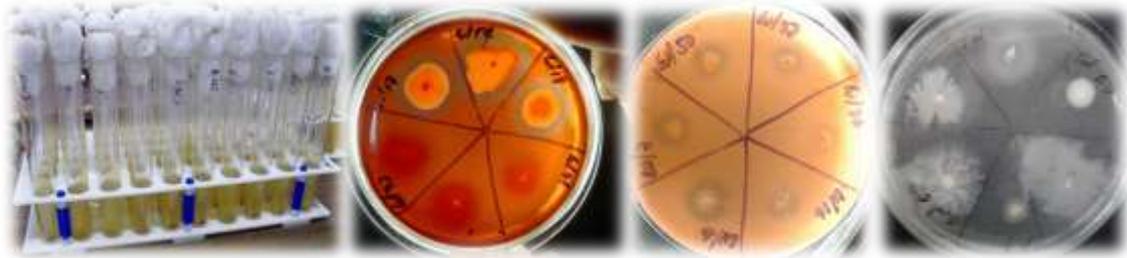


Selección de aislados de *Bacillus* spp. con propiedades antagónicas de fitopatógenos y actividad mananolítica



Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo

Autora: Yosbel Quintana Castillo

Tutor: MSc. Yunel Pérez Hernández

Julio, 2018

*Al final, no os preguntarán qué habéis sabido, sino qué
habéis hecho.*

Jean de Gerson

Declaración de Autoridad

Declaro que yo, **Yosbel Quintana Castillo**, 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

A toda mi familia; en especial a mis padres Juan Quintana Rivera y Midalis Castillo Oliva por todo el esfuerzo realizado y los obstáculos vencidos para que yo pudiese alcanzar hoy en día un título profesional. A mi hermana Lisbel Quintana Castillo por ser mi fuente de inspiración y de responsabilidad. A mi novia Maibet Ruffín Hernández y mis suegros por el apoyo demostrado durante toda la carrera. A mis amigos más cercanos Yudiel, Roberto, Pedro, Ale, Edgar, Andy por compartir conmigo esta travesía sin igual. Al recién llegado a la familia; mi ahijado Chadiel. Al claustro de profesores que compartió conmigo durante los cinco años de la carrera. A mi tutor Yunel por el sacrificio realizado para sacar la tesis en tiempo y por su ayuda incondicional. A mi Universidad, a mi municipio, a mi provincia, a mi país.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia; en especial a mis padres Juan Quintana Rivera y Midalis Castillo Oliva por todo el esfuerzo realizado y los obstáculos vencidos para que yo pudiese alcanzar hoy en día un título profesional.

A mi hermana Lisbel Quintana Castillo por ser mi fuente de inspiración y de responsabilidad.

A todo el claustro de profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por su profesionalidad y dedicación.

A mi novia Maibet Ruffin Hernández y mis suegros por el apoyo demostrado durante toda la carrera.

A mis amigos más cercanos Yudiel, Roberto, Pedro, Ale, Edgar, Andy por compartir conmigo esta travesía sin igual.

A mi tutor Yunel por el sacrificio realizado para sacar la tesis en tiempo y por su ayuda incondicional.

A mi Universidad, a mi municipio, a mi provincia, a mi país.

A todos los que de una forma u otra contribuyeron a mi formación como ingeniero.

OPINIÓN DEL TUTOR

El estudiante Yosbel Quintana Castillo, quien hoy defiende el trabajo de Diploma titulado, "Selección de aislados de *Bacillus* spp. con propiedades antagónicas de fitopatógenos y actividad mananolítica", ha demostrado durante esta etapa independencia y habilidades para el trabajo de laboratorio, lo que permitió la culminación de los objetivos propuestos. El estudiante, además, demostró durante los cinco años de la Carrera las potencialidades académicas que posee, con un índice académico de 4,85.

En las condiciones económicas actuales de Cuba, es imperativo desarrollar nuevas alternativas que permitan incrementar las producciones agrícolas, en función de satisfacer las demandas de alimentos y reducir las importaciones. En este contexto, las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal constituyen una alternativa viable para reducir la aplicación de plaguicidas químicos, que afectan al medio ambiente y son costosos, ya que algunos de estos microorganismos poseen mecanismos antagónicos a hongos fitopatógenos y a otras plagas, que pueden utilizarse para reducir los daños a los cultivos y en consecuencia, las afectaciones a los rendimientos agrícolas.

Los resultados de este trabajo tributan a un proyecto asociado a programa nacional, donde el estudiante viene aportando desde tercer año y contribuyó además, al desarrollo de las diferentes tareas planificadas en este curso. Los resultados obtenidos constituyen la base para el desarrollo de nuevas investigaciones en aras de obtener un producto biocontrolador de hongos fitopatógenos del frijol.

Finalmente quisiera decir que en calidad de tutor acepto los aciertos y desaciertos de este trabajo.

Tutor:

MSc. Yunel Pérez Hernández

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo “seleccionar cepas de *Bacillus* sp. con propiedades antagónicas y productoras de enzimas mananasas”. 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 evaluaron actividades enzimáticas líticas y mananolíticas y la capacidad de producir cianuro de hidrógeno. Los datos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple. Se obtuvieron 141 aislados Gram positivos esporulados. Se identificaron varios aislados productores de enzimas hidrolíticas (quitinasas y/o β -glucanasas, proteasas y lipasas) y cianuro de hidrógeno, con potencialidades para el biocontrol de fitopatógenos. Se identificaron ocho aislados con actividades mananolíticas superiores a 100 % de índice de potencia, los cuales son fuentes potenciales para la producción de mananasas con aplicabilidad en el sector agropecuario e industrial.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problema e hipótesis científica.....	2
1.2. Objetivo general.....	2
1.3. Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Importancia del cultivo del frijol para la alimentación humana.....	4
2.2. Principales factores que afectan la producción de frijol en Cuba.....	5
2.3. Principales plagas que afectan al cultivo del frijol en Cuba.....	6
2.4. La rizosfera y su importancia agronómica.....	8
2.5. Potencialidades de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) para el desarrollo de la agricultura.....	9
2.5.1. Las RPCV como bioestimuladoras y biofertilizantes.....	9
2.5.1.1. Producción de reguladores del crecimiento vegetal.....	12
2.5.1.2. Solubilización de fosfatos.....	13
2.5.2. Las RPCV como antagonistas y biocontroladores de organismos fitopatógenos...	15
2.5.1.1. Producción de sideróforos.....	17
2.5.1.2. Producción de enzimas hidrolíticas.....	18
2.5.1.3. Producción de antibióticos.....	18
2.5.1.4. Producción de bacteriocinas.....	20
2.5.1.5. Resistencia sistémica inducida.....	21
2.5.1.6. Producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa	23
2.6. Importancia del género <i>Bacillus</i> como RPCV.....	24
2.7. Importancia del género <i>Bacillus</i> con fines industriales.....	25
2.8. Comercialización de las PGPR como agentes biofertilizantes y biocontroladores....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Etapas generales de la investigación.....	28
3.2. Aislamiento de las colonias bacterianas.....	29
3.2.1. Colecta de las muestras.....	29
3.2.2. Siembra en Caldo Nutriente.....	30
3.2.3. Diluciones seriadas y siembra en medio Agar Nutriente	30
3.2.4. Aislamiento de las colonias bacterianas.....	31
3.2.5. Identificación de las cepas de <i>Bacillus</i> Gram + productoras de endosporas.....	32
3.3. Ensayos microbiológicos.....	33
3.3.1. Actividad quitinolítica / glucanolítica.....	33
3.3.2. Actividad lipídica.....	34
3.3.3. Actividad proteolítica.....	34
3.3.4. Producción de cianuro de hidrógeno (HCN).....	34
3.3.5. Actividad mananolítica.....	35
3.4. Conservación de las cepas bacterianas.....	35
3.5. Procesamiento estadístico.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

4.1. Aislamiento de las colonias bacterianas.....	36
4.2. Actividad lítica de los aislados bacterianos.....	37
4.2.1. Actividad β -1,3-gluconolítica y/o quitinolítica.....	37
4.2.2. Actividad lipídica.....	40
4.2.3. Actividad proteolítica.....	43
4.2.4. Producción de cianuro de hidrógeno.....	45
4.2.5. Actividad mananolítica.....	48
5. CONCLUSIONES.....	52
6. RECOMENDACIONES.....	53
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

I. INTRODUCCIÓN

La bioprospección o la prospección de la biodiversidad se define como la exploración de la biodiversidad para encontrar nuevos recursos de valor social o comercial (Beatti *et al.*, 2011). Desde la antigüedad, el hombre realiza esta actividad sobre todo lo que existe en la tierra, pero con el desarrollo científico las fronteras se desplazaron desde la búsqueda de animales y plantas, hacia otras formas de vida como bacterias, hongos, virus, etc., que también constituyen recursos genéticos con un potencial comercial elevado (Salvador *et al.*, 2019). La bioprospección es una actividad de exploración natural, no destructiva, la que a través de investigaciones científica, pretende obtener información derivada de pequeñas cantidades de material biológico para su aplicación en diversos sectores como la agricultura, la medicina y la industria (Setzer *et al.*, 2003).

Los microorganismos del suelo constituyen una fuente inagotable de nuevos agentes, con disímiles aplicaciones en diversas áreas, especialmente en la agricultura y algunas industrias como la alimenticia, la textil, entre otras. Estos microorganismos, especialmente las bacterias, producen una gama amplia de metabolitos y enzimas, que pueden ser utilizados en la solución de diferentes problemas como por ejemplo, el aumento de la productividad de los cultivos con bajos costos de producción e impacto ambiental (Zahid *et al.*, 2015), y elevar la calidad (digestibilidad) de alimentos fibrosos, que se utilizan en la alimentación de animales monogástricos (Li *et al.*, 2008).

La agricultura es el principal sector de crecimiento económico de los países en desarrollo (Nehra *et al.*, 2016). Las producciones agrícolas mundiales se sustentan, principalmente, con el uso de grandes cantidades de insumos como fertilizantes químicos y plaguicidas. Sin embargo, estos productos tienen un impacto negativo en los agroecosistemas, como la lixiviación de nitratos, la contaminación de recursos hídricos, y las emisiones gaseosas, que provocan daños al ambiente y constituyen un riesgo para la salud del hombre y los animales (Zahid *et al.*, 2015; Vejan *et al.*, 2016). Debido a esta situación, los científicos buscan nuevas estrategias para disminuir uso de estos productos agroquímicos, por otros que sean menos agresivos al medioambiente y mantengan rendimientos que permitan satisfacer las demandas de la población.

Entre los microorganismos del suelo, las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) pueden ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento de los cultivos. Las interacciones beneficiosas que se establecen planta-microbio, influyen sobre el vigor de las plantas y la fertilidad de los suelos. Los efectos beneficiosos de las RPCV están determinados por mecanismos directos e indirectos que presentan sobre las plantas (Moreno *et al.*, 2018).

La acción directa sobre el crecimiento está determinada por la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan el crecimiento, así como por otros compuestos químicos que solubilizan fosfatos minerales de baja solubilidad (Thanh y Tram, 2018). Los mecanismos indirectos implican la reducción de las poblaciones de fitopatógenos, por la producción de diferentes metabolitos secundarios como los antibióticos y los sideróforos que afectan directamente al patógeno o limita su desarrollo (Thakur y Parikh, 2018).

El género *Bacillus* constituye un grupo atractivo para el desarrollo de nuevos productos agrícolas con efecto bioestimulante, biofertilizante o biocontrolador (Chowdhury *et al.*, 2013). Además, a partir de diferentes cepas de este género se obtienen enzimas como mananasas, celulasas, amilasas, etc., con aplicaciones en la producción de alimentos, bioetanol, papel, detergentes y en la industria textil (Huang *et al.*, 2012; Salvador *et al.*, 2019).

A partir de lo expuesto anteriormente se planteó como **problema científico** el siguiente: el sector agropecuario no cuenta con ceparios que permitan el desarrollo de nuevos productos biocontroladores de fitopatógenos del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), con potencialidades en otros sectores.

Hipótesis científica: la identificación de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de la rizofera del frijol, con propiedades antagónica y actividad mananasa, permitirá el desarrollo de un nuevo producto biocontrolador de plagas de este cultivo y una fuente de enzimas mananasas con diferentes aplicaciones industriales.

Para corroborar la hipótesis anterior se planteó como **objetivo general:** seleccionar cepas de *Bacillus* sp. con propiedades antagónicas y productoras de enzimas mananasas.

Objetivos específicos:

- Aislar cepas de *Bacillus* a partir de la rizofera de diferentes variedades de frijol, cultivadas en los municipios Colón y Unión de Reyes en la provincia de Matanzas.
- Evaluar la actividad antagónica de los aislados bacterianos, a partir de la producción de enzimas líticas y cianuro de hidrógeno.
- Determinar la actividad mananasa de los aislados bacterianos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importancia del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para la alimentación humana

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) representa la leguminosa de grano más importante del mundo para el consumo humano, debido a las propiedades nutricionales que presenta (Estrada *et al.*, 2017) (Figura 1). Más de 300 millones de personas en el planeta utilizan este cultivo como un componente importante de la dieta diaria (Mederos, 2013). En Cuba, como en América Latina, forma parte de la dieta básica junto al arroz (*Oryza sativa* L.) y se cultiva en todas las provincias del país, con un área total de siembra de 122 000 ha entre 2016 y 2017 y se produjeron 253 470 toneladas (ONEI, 2017).



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

El valor nutricional de esta leguminosa está determinado fundamentalmente por el contenido de proteína, la cual se encuentra en un rango entre 20 y 40 % (Gallegos, 2004). Las variedades de *Phaseolus vulgaris* L. más consumidas en Latinoamérica presentan un contenido de proteína promedio del 20 %, con un intervalo de variación entre 19,3 y 35,2 % (Nabhan *et al.*, 1985).

Las proteínas del frijol presenta un contenido alto de lisina (6,4-7,6 g / 100 g de proteína) y de fenilalanina más tirosina (5,3-8,2 g / 100 g de proteína). Por lo

tanto, satisface los requerimientos mínimos recomendados por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) o por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Guzmán, 2002).

Los frijoles, además de ser ricos proteínas, son fuente de diferentes elementos como hierro, potasio, magnesio, zinc, fibras, almidones, ácido fólico y tiamina con funciones importantes en los organismos (USDA, 2000; Santalla *et al.*, 1999). La fibra es muy importante en el proceso de la digestión y en otros indicadores de salud, ya que limita y/o disminuye la velocidad de absorción de algunos nutrientes, y favorece el tránsito intestinal. Por estas características, la fibra permite una absorción más lenta de la glucosa, lo cual condiciona índices glicémicos moderados y, por lo tanto, permite el control de la hiperinsulinemia y los niveles del colesterol en la sangre (Guzmán, 2002).

Este alimento contribuye a la prevención y al tratamiento de distintas patologías, como son las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer, que constituyen serios problemas de morbimortalidad. Esto se debe tanto a su aporte en micronutrientes (particularmente ácido fólico y magnesio) como por su alto contenido de fibra, aminoácidos azufrados, taninos, fitoestrógenos y aminoácidos no esenciales (Rodríguez y Fernández, 2003). Diferentes compuestos fitoquímicos derivados del frijol se relacionaron con la disminución del riesgo de cáncer (Hughes *et al.*, 1997); entre los que están al ácido fólico que reduce el riesgo de contraer cáncer de colon y de mamas, probablemente por su efecto antioxidante (Guzmán, 2002).

2.2. Principales factores que afectan la producción de frijol en Cuba

La productividad del frijol en Cuba y en el mundo está determinada por un grupo de factores climáticos, edáficos y bióticos, entre los cuales se pueden producir complejas interacciones (Corzo *et al.*, 2015). Se plantea que el 60 % de la producción a nivel mundial se obtiene bajo condiciones de déficit hídrico, por lo que se considera la sequía como el segundo factor limitante para su rendimiento, después de los diferentes tipos de plagas. El déficit hídrico inhibe el crecimiento de los diferentes órganos del cultivo, por lo que debilita a la planta y eleva la

susceptibilidad al ataque de plagas. Esto conlleva a una disminución del rendimiento lo que afecta la sostenibilidad agrícola (Seckin y Aksoy, 2014).

En Cuba, además de estos problemas se suman otros de índole económica como el insuficiente suministro de insumos para el desarrollo de las distintas etapas del proceso de producción del frijol y los eventos climatológicos como tormentas y huracanes que destruyen las cosechas y los sistemas de riego.

Entre los factores bióticos se encuentran un grupo numeroso de virus, bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, los cuales se describen a continuación.

2.3. Principales plagas que afectan al cultivo del frijol en Cuba

Los hongos y las bacterias constituyen dos grupos de organismos importantes que afectan al cultivo del frijol. Los hongos asociados a las semillas provocan la pérdida de su calidad, ya que afectan la viabilidad y reducen su germinación (Ghangaokar y Kshirsagar, 2013). Estos hongos inciden principalmente en el campo (fitopatógenos) o durante su almacenamiento o conservación (de almacén). Aquellos que contaminan las semillas en el campo usualmente permanecen inactivos durante su almacenamiento; sin embargo, los que inciden en almacén, producen afectaciones debido a su capacidad de crecer en condiciones de baja humedad en la cuales la mayoría de los hongos no consiguen desarrollarse.

La mayor parte de los hongos fitopatógenos que afectan al frijol emplean las semillas como vía de introducción hacia nuevas áreas, donde bajo condiciones favorables pueden causar pérdidas considerables en el cultivo. Aunque en Cuba se desarrollaron varios estudios relacionados con la microbiota asociada a semillas de frijol, muy pocos reflejan la incidencia por variedad de las diferentes especies fúngicas asociadas a este tipo de semilla, lo cual es importante analizar con el objetivo de reducir la incidencia de estos patógenos y disminuir los costos de producción dirigidos al control fitosanitario.

En estudios realizados por Martínez *et al.* (2014) se identificaron los principales hongos asociados a semillas de frijol provenientes de 102 lotes de semilla de 16 variedades cultivadas en Cuba. Se determinaron un total de 679 aislados fúngicos pertenecientes a 34 especies de 20 géneros. De estas, *Penicillium* sp.

(78,4%), *Rhizoctonia solani* Kühn (77,5%), *Aspergillus niger* van Tieghem (68,6%) y *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen (51,0%) fueron las más frecuentemente. En los casos de *Rhizoctonia solani* (77,5%) y *Macrophomina phaseolina* (30,4%) (Figura 2), detectados los lotes de semilla, constituyen dos de los patógenos más importantes del frijol en Cuba (Nerey *et al.*, 2010).

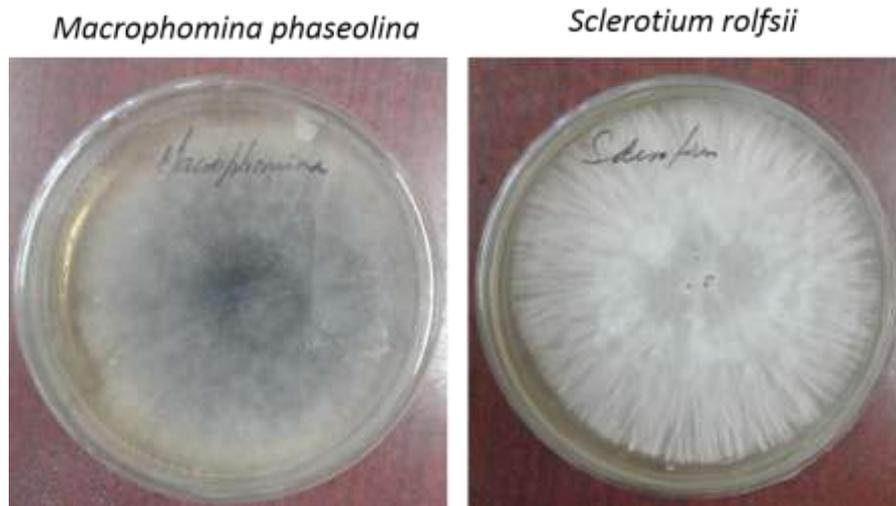


Figura 2. Fotografías de los hongos fitopatógenos del frijol *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii*. Fuente: autor.

También se identificó el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, de interés cuarentenario para Cuba, que fue informado recientemente en campos de frijol de las provincias Artemisa, Mayabeque y Matanzas (Martínez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2014). Este resultado es importante ya que la transmisión por semilla es una de las principales vías de dispersión de este patógeno, que presenta un rango amplio de hospederos y constituye una de las plagas más importantes del frijol, especialmente del cultivado en invierno y bajo riego (Parisi *et al.*, 2006).

Entre las bacterias que afectan al frijol están *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Burkholder) Starr & Burkholder, que provocan la enfermedad de Bacteriosis común o Tizón común (Corzo *et al.*, 2015).

El mecanismo principal de diseminación de estos patógenos es a través de la infección externa o interna de la semilla, que representa una fuente importante

de inóculo. Otras vías de propagación son a través de la lluvia, el viento, los insectos vectores y restos de cosecha infectados (Arayas, 2012).

Las pérdidas provocadas por este patógeno en el rendimiento del cultivo están entre 10 y 40%, en dependencia de la susceptibilidad del cultivar y las condiciones medioambientales (Asensio-Manzanera *et al.*, 2005). En Cuba, esta enfermedad se detectó en las etapas de prefloración, floración y formación de la vaina, con afectaciones en el follaje entre 15 y 48 %, y hasta 80% en cultivares susceptibles (Stefanova, 1996).

2.4. La rizosfera y su importancia agronómica

El término rizosfera fue denominado primeramente por Hiltner en 1904 para describir aquella zona de máxima actividad microbiana, que corresponde al volumen del suelo que está bajo la influencia de las raíces de las plantas. La población microbiana presente en la rizosfera es relativamente diferente de la que se encuentra a los alrededores, debido a la presencia de exudados que sirven como fuente de nutrición al crecimiento microbiano. La composición de estos exudados depende del estatus fisiológico de las plantas y de la especie vegetal en conjunto con los microorganismos que comparten el mismo espacio.

La diversidad de microorganismos presentes en el suelo, su actividad y población dinámica, depende de varios factores como la composición química y la textura del suelo, la disponibilidad de agua, las fuentes de energía disponible, la temperatura, la presión hidrostática, el pH y el potencial de oxidación-reducción (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2017). Además, la diversidad puede ser alterada por factores antropogénicos como la urbanización, la agricultura y la contaminación (Huot *et al.*, 2017).

La rizosfera constituye un área importante en las investigaciones agrícolas que se desarrollan durante muchos años, debido a su incidencia sobre el crecimiento de las plantas, la productividad de los cultivos, el reciclaje de nutrientes y otros procesos ecosistémicos (Philippot *et al.*, 2013). Por otra parte, una parte de los microorganismos que se desarrollan en la rizosfera contribuyen notablemente no solo al crecimiento de las plantas, sino también atenúan el efecto negativo de estreses bióticos y abióticos (Yadav y Saini, 2018). Esta fracción de

microorganismos beneficiosos se denomina en su conjunto Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (MPCV). Dentro de este grupo se distinguen las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV), las cuales se caracterizan por ser no patogénicas, colonizar fuertemente las raíces de las plantas y estimular el crecimiento de las plantas por uno o más mecanismos (Babalola, 2010). Existe un rango amplio de especies de RPCV pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* (Saharan y Nehra, 2011). Las RPCV representan entre el 2 y el 5% del total de las bacterias rizosféricas (Antoun y Kloepper, 2001).

2.5. Potencialidades de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) para el desarrollo de la agricultura

Las RPCV pueden afectar el crecimiento de las plantas mediante dos vías fundamentales: directa e indirecta. La primera está relacionada con la capacidad de estas bacterias de sintetizar compuestos como fitohormonas que estimulan el crecimiento, o sustancias que facilitan la solubilización y absorción de ciertos nutrientes del ambiente (Anupama *et al.*, 2015; Jogaiah *et al.*, 2016); mientras que la vía indirecta se asocia a mecanismos que permiten suprimir organismos fitopatógenos a través de la competencia por los nutrientes o de la producción de compuestos antimicrobianos (Berendsen *et al.*, 2012; Jogaiah *et al.*, 2016; Flores-Núñez *et al.*, 2018) (Figura 3).

Las RPCV también contribuyen a atenuar el impacto negativo de estreses abióticos como el déficit hídrico sobre las plantas. La producción de diferentes compuestos como estimuladores del crecimiento, inducen la acumulación de osmolitos, sustancias antioxidantes, regulan positiva y negativa los genes de respuesta a estrés y alteran la morfología de las raíz, lo que permite el desarrollo de la tolerancia a la sequía (Prasad *et al.*, 2016).

2.5.1. Las RPCV como bioestimuladoras y biofertilizantes

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas poseen un potencial elevado, para su uso como agentes estimuladores del crecimiento y desarrollo de diferentes cultivos como *Kalanchoe daigremontiana* (Yong-Soon *et al.*, 2015),

Rubus glaucus Benth. cv. Thornless (Robledo-Buriticá *et al.*, 2018), *Brassica oleracea* L. var. botrytis (Ekinci *et al.*, 2014), *Cydonia oblonga* Miller (Arkan *et al.*, 2013), *Capsicum annuum* L. (Datta *et al.*, 2015), *Cicer arietinum* L. (Singh *et al.*, 2017) y *Musa* spp. (Yuan *et al.*, 2013).

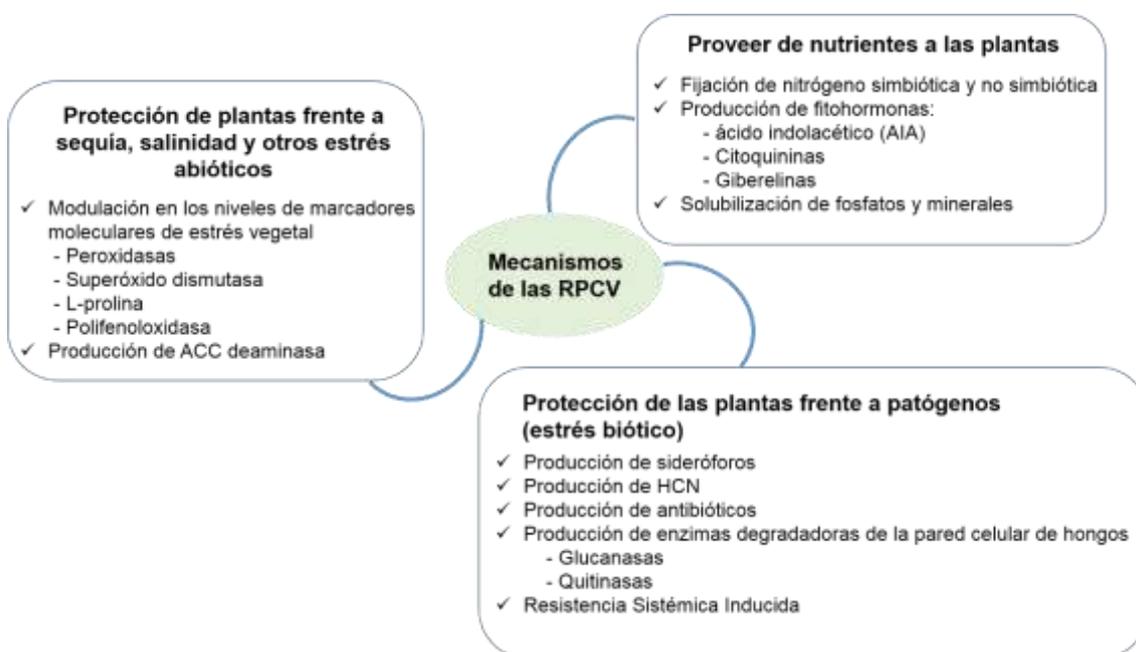


Figura 3. Mecanismos de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV).

Las RPCV estimulan el crecimiento de las plantas mediante varios mecanismos entre los que están la producción de sustancias reguladoras del crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas (Rayavarapu y Padmavathi, 2016; Yousef, 2018) y la solubilización de minerales como el fósforo, el hierro y el zinc (Giassia *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016) (Tabla 1).

Tabla 1. RPCV con actividad bioestimulante y/o biofertilizante.

RPCV	Mecanismo	Efecto	Autor (es)
<i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp.	Producción de ácido indolacético,	Incremento en la germinación de <i>Araquis hipogea</i> L.	Thakur y Parikh, (2018)

	solubilización de fosfatos		
<i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp.	Producción de AIA, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos	Aumento en la longitud de la planta (<i>Aloe vera</i> L.)	Thakur <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus</i> spp.	Producción de AIA, solubilización de fosfato y producción de sideróforos.	No evaluado	Thanh y Tram (2018)
<i>Bacillus</i> spp.	Producción de AIA, giberelinas, solubilización de fosfato y producción de sideróforos.	No evaluado	Rayavarapu y Padmavathi (2016)
<i>Bacillus</i> sp. cepa CaSUT007	Producción de AIA	Aumento en la longitud del tallo y las raíces de <i>Manihot esculenta</i> L.	Buensanteai <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus megaterium</i>	Producción de AIA, giberelinas, solubilización de fosfato	Aumento del peso fresco del tallo, longitud, peso seco y diámetro de la raíz de	Ekinci <i>et al.</i> (2014)

		<i>Brassica oleracea</i> L. var. botrytis	
<i>Bacillus</i> sp. OSU-142	Producción de AIA y giberelina	Aumento del peso, tamaño y número de frutos de <i>Cydonia oblonga</i> Miller	Arikan <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus megaterium</i> TV-91C, <i>Pantoea agglomerans</i> RK-92, <i>Bacillus subtilis</i> TV-17C	Producción de AIA y solubilización de fosfato	Aumento del peso fresco y seco del tallo, peso seco de la raíz, longitud de la plántula, diámetro del tallo	Turan <i>et al.</i> (2014)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa NJN-6	Producción de AIA y ácido giberélico	Incremento del peso seco de raíz y tallo de <i>Musa</i> spp.	Yuan <i>et al.</i> (2013)

2.5.1.1. Producción de reguladores del crecimiento vegetal

Los grupos de sustancias reguladoras del crecimiento más importantes son: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Entre estas fitohormonas las tres primeras se consideran estimuladoras del crecimiento, por sus funciones en los procesos de división y alargamiento celular. Estos compuestos tienen funciones vitales en las plantas y son producidos tanto por los vegetales como por los microorganismos. Aquellos últimos que tienen la capacidad de regular las producciones de las fitohormonas se les conoce como fitoestimuladores. Los reguladores del crecimiento están presentes en pequeñas cantidades pero influyen de manera marcada y variada en el crecimiento de las

plantas, ya que afectan numerosos procesos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (Somers *et al.*, 2004).

Entre los reguladores del crecimiento naturales más importantes está el ácido 3-indolacético (AIA), el cual es una auxina indispensable para el desarrollo de órganos, respuestas celulares como la diferenciación, el alargamiento y la división celular y la regulación de genes (Ryu *et al.*, 2008). Existe un grupo numeroso de bacterias que tienen la capacidad de producir fitohormonas como el AIA, y este criterio se utiliza para identificar cepas productoras eficientes que constituyen agente bioestimuladores potenciales (Khalid *et al.*, 2004).

Está demostrado que la concentración de auxinas es un factor de sensibilidad para el proceso de germinación de semillas. Bajas concentraciones estimulan el crecimiento, mientras que las concentraciones elevadas inducen la inhibición (Arshad y Frankenberger, 1991). Los estudios relacionados con el efecto de las bacterias productoras de AIA en el crecimiento de las plantas, asociaron las especies bioestimuladoras con un incremento en la longitud de las raíces que en consecuencia aumenta el área de superficie de absorción de nutrientes (Mandal *et al.*, 2007).

Los microorganismos asociados con las plantas son responsables de la producción de AIA por las vías L-triptófano dependiente e independiente. Este aminoácido es el precursor del AIA y se encuentra en los exudados de las raíces de las plantas. Aproximadamente el 90 % del total de producción se estima que se produzca por la vía independiente, mientras que solo el 10 % se sintetiza por el mecanismo conocido mediante la utilización del triptófano (Idris *et al.*, 2007).

2.5.1.2. Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes y limitantes para el crecimiento de las plantas. Aunque es abundante en el suelo, aun provoca la reducción del crecimiento de las plantas, debido a que el 50 % del fósforo está en forma insoluble. En suelos calcáreos está como fosfato de calcio. Los fosfatos inorgánicos están presentes en asociación con diferentes elementos como compuestos de aluminio o hierro. Las plantas solo pueden utilizar las formas monobásicas o dibásicas del fósforo (Jha y Saraf, 2015).

Los microorganismos generalmente contribuyen con el desarrollo de las plantas mediante el uso y la conversión de las formas orgánicas e inorgánicas del fósforo como el fosfato de aluminio y fosfato de tricálcico, etc., en formas inorgánicas que pueden ser fácilmente asimiladas por las plantas y posteriormente incorporadas al metabolismo de las plantas para su desarrollo. Uno de los mecanismos comunes para la solubilización de fosfatos, está relacionado con la secreción de ácidos orgánicos por los microorganismos, los cuales se forman por el uso de azúcares presentes en los exudados de las raíces. Estos ácidos actúan como agentes quelantes y eliminan los cationes Ca^{2+} , lo que provoca la salida de los grupos fosfatos de los diferentes compuestos fosfatados presentes en el suelo (Goswami *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Gunes *et al.* (2015) con diferentes cepas de *Bacillus megaterium*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Hafnia alvei*, mostraron la producción de diferentes tipos de ácidos orgánicos como succínico, cítrico, láctico, butírico, málico, propiónico, tartárico, malónico, maleico y fumárico. Los valores más elevados se obtuvieron en los primeros cuatro ácidos orgánicos mencionados anteriormente.

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) representan una nueva alternativa en el campo de la agricultura para el desarrollo sostenible de las producciones. Entre los grupos bacterianos que se caracterizan por solubilizar fosfatos están *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*. Los microorganismos solubilizadores de fosfato en acción a otras RPCV permitieron disminuir los requerimientos de fosfatos y aumentó la calidad de los rendimientos, el uso eficiente de los fertilizantes, menor contaminación y menor impacto ambiental (Yazdani *et al.*, 2009). Los MSF constituyen entre el 20 y el 40 % de los microorganismos que pueden ser cultivados y gran cantidad de estos pueden colonizar la rizosfera (Chabot *et al.*, 1993).

El llamado fitato (hexa fosfato) constituye aproximadamente el 80 % del fósforo orgánico presente en el suelo. Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, también se encuentran entre los microorganismos más efectivos para la solubilización del fitato y la incorporación del fosfato a la cadena trófica (Patel *et al.*, 2015).

2.5.2. Las RPCV como antagonistas y biocontroladores de organismos fitopatógenos

El empleo de rizobacterias como agentes biocontroladores de fitopatógenos constituye un tema de investigación en continuo crecimiento. Estas bacterias representan una fuente de agentes con potencial como controladores biológicos de plagas de cultivos, que pueden ser utilizados como alternativas sostenibles a la aplicación de compuestos agroquímicos sintéticos (Méndez-Bravo *et al.*, 2018). Sin embargo, solo recientemente se le ha dado una atención considerable a la supresión de estos patógenos que se asocian a las raíces de las plantas, como una alternativa para mantener la productividad de los agroecosistemas.

Los mecanismos antagonistas que presentan las RPCV están relacionados con la síntesis de enzimas hidrolíticas tales como quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas, que pueden provocar la lisis de las paredes celulares patogénicas de los hongos (Neeraja *et al.*, 2010; Maksimov *et al.*, 2011); la competencia por nutrientes y la colonización de nichos disponibles en la superficie de las raíces (Kamilova *et al.*, 2005), la regulación de los niveles de etileno en la planta a través de la enzima ACC-deaminasa, la cual actúa en la modulación de los niveles de etileno como resultado de estreses bióticos (Van Loon, 2007), así como mediante la producción de sideróforos y antibióticos (Tabla 2).

Tabla 2. RPCV con actividad antagónica a fitopatógenos.

RPCV	Mecanismo	Fitopatógeno	Autor (es)
<i>Bacillus</i> sp.	Producción de compuestos volátiles	<i>Phytophthora Cinnamomi</i>	Méndez-Bravo <i>et al.</i> (2018)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Iturin (lipopéptido)	<i>Alternaria panax</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum orbiculare</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	Ji <i>et al.</i> (2013)

<i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp.	Producción de HCN, actividad quitinolítica	<i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	Thakur y Parikh (2018)
<i>Pseudomonas</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp.	Producción de HCN y de sideróforos, actividad quitinolítica	<i>Alternaria</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> spp.	Thakur <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa NJN-6	Producción del lipopéptido iturin A y compuestos orgánicos volátiles	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	Yuan <i>et al.</i> (2013)
<i>B. licheniformis</i> MML2501, <i>P. aeruginosa</i> MML2212, <i>Bacillus</i> sp. MML2551	No determinado	Virus de la necrosis del girasol (SNV)	Srinivasan y Mathivanan (2011)
<i>Bacillus</i> cepas CNPSo 2477 y CNPSo 2478	Producción de enzimas líticas y sideróforos	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>Bipolaris maydis</i> y <i>Cercospora zea-maydis</i> .	Szilagyi-Zecchin <i>et al.</i> (2014)
<i>Bacillus</i> sp. B19, <i>Bacillus</i> sp. P12 y <i>Bacillus</i>	Lipopéptidos: surfactina, iturina y fengicina	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	Sabaté <i>et al.</i> (2018)

<i>amyloliquefaciens</i>			
B14			

2.5.1.1. Producción de sideróforos

El hierro es un nutriente esencial para las plantas y la deficiencia de este elemento provoca modificaciones metabólicas drásticas en los vegetales. Esto se debe a que el hierro participa como un cofactor de varias enzimas fundamentales, que catalizan reacciones en procesos fisiológicos importantes como la respiración, la fotosíntesis y la fijación del nitrógeno. El hierro es abundante en los suelos pero frecuentemente se encuentra de forma no disponible para las plantas o para los microorganismos. La especie química predominante es la forma oxidada Fe^{3+} que reacciona para formar óxidos e hidróxidos insolubles, inaccesibles para los diferentes organismos (Goswami *et al.*, 2016).

Las plantas poseen dos estrategias para realizar la absorción eficiente del hierro. La primera consiste en liberar compuestos orgánicos capaces de quelatar hierro y convertirlo en una forma soluble que puede difundir hacia la planta, y posteriormente reducirlo y absorberlo por sistemas enzimáticos presentes en la membrana celular de la planta. La segunda vía está relacionada con la absorción del complejo formado por el compuesto orgánico y el Fe^{3+} , donde el hierro es reducido dentro de la planta. Algunas bacterias rizosféricas son capaces de liberar moléculas quelatadoras de hierro hacia la rizofera, que constituyen agentes químicos que atraen este elemento hacia esta región donde puede ser absorbido por la planta (Payne, 1994).

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular, los cuales poseen grupos funcionales capaces de unir hierro de manera reversible. Las bacterias rizosféricas liberan estos compuestos para incrementar su potencial competitivo, ya que estas sustancias tienen actividad antibiótica y favorecen la nutrición del hierro de la planta. Además, estos compuestos mejoran la salud de las plantas ya que dificultan el crecimiento de patógenos, generalmente hongos, ya que limitan la disponibilidad del hierro porque estos hongos no son capaces de

absorber el complejo hierro-sideróforo, y los compuestos sideróforos se secretan tienen menos afinidad que los producidos por las RPCV (Shen *et al.*, 2013).

2.5.1.2. Producción de enzimas hidrolíticas

Uno de los mecanismos más efectivos que utilizan los agentes biocontroladores del suelo, está relacionado con la producción de enzimas que degradan o modifican la pared celular de los patógenos (Kobayashi *et al.*, 2002). Las enzimas líticas secretadas por las RPCV como las β -1,3-glucanasas, las quitinasas, las celulasas, las lipasas y las proteasas, tienen un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de las hifas de los hongos patógenos, ya que las mismas actúan degradando o modificando los componentes de la pared celular.

Las enzimas que degradan la pared celular afectan la integridad estructural de la misma. La actividad quitinolítica de la cepa *Serratia marcescens* B2 sobre los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, evidenció varias anomalías en las paredes celulares de estos patógenos como el hinchamiento parcial y curvamiento de las hifas y ruptura de la misma por los extremos (Someya *et al.*, 2000).

La quitinasa es una de las enzimas más importantes implicadas en los mecanismos de biocontrol, ya que degrada la quitina, un polímero lineal insoluble formado por β -1,4-N-acetil-glucosamina, que constituye el componente mayoritario de las paredes de los hongos. La β -1,3-glucanasa sintetizada por cepas de *Paenibacillus* y *Streptomyces* spp., pueden degradar las paredes celulares del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*; mientras que *Bacillus cepacia* expresa la β -1,3-glucanasa, que destruye las paredes celulares de otros patógenos como *Rhizoctonia solani*, *P. ultimum* y *Sclerotium rolfsii* (Compant *et al.*, 2005).

2.5.1.3. Producción de antibióticos

La producción de uno o más tipos de antibióticos es el mecanismo más común que expresan los agentes antagonistas de fitopatógenos, como las RPCV (Glick *et al.*, 2007). El conocimiento sobre los mecanismos de la antibiosis (actividad de biocontrol basada en la secreción de moléculas que destruyen o reducen el crecimiento de patógenos), se conoce con más detalle a partir de un grupo

numeroso de investigaciones realizadas en las últimas dos décadas (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son nocivos para el crecimiento o la actividad metabólica de otros microorganismos (Duffy, 2003).

Las RPCV biocontroladoras están dotadas fundamentalmente de la capacidad de producir antibióticos contra numerosos hongos fitopatógenos y bacterias. Estas rizobacterias producen uno o más tipos de antibióticos como el 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), los compuestos de fenazina (Phz), la pirrolnitrina (Prn), y el piluteorin (Plt) (Raaijmakers *et al.*, 1997). Las PGPR pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* tienen una función importante en la supresión de patógenos de plantas, mediante la producción y secreción extracelular de metabolitos que son inhibitorios incluso a bajas concentraciones (Goswami *et al.*, 2016).

Las bacterias del género *Bacillus* producen una amplia variedad de antibióticos antibacterianos y antifúngicos. Entre estos compuestos están la subtilina, la subtilosina A, la TasA y la sublancina, los cuales tienen un origen ribosomal; mientras que otros como bacilisina, clorotetaína, micobacilina, rizocitina, bacilaene, difficidina y lipopéptidos son producidos por péptido sintetasas no ribosomales (Leclere *et al.*, 2005).

La cepa *Bacillus cereus* UW85 que produce los antibióticos zwittermicina A y B, suprimen enfermedades con mayor efectividad que las cepas de *Bacillus* que no produce antibióticos (Stabb *et al.*, 1994). Esta cepa demostró ser efectiva también contra el patógeno *Phytophthora* (Emmert y Handelsman, 1999). En general, el antibiótico zwittermicina A producido por esta cepa puede afectar negativamente el crecimiento y la actividad de un amplio rango de hongos fitopatógenos (Silo-Suh *et al.*, 1998).

Muchas otras especies del género producen antibióticos, de las cuales la más importante es *Bacillus subtilis* (Foldes *et al.*, 2000), la cual está distribuida ampliamente en los sistemas agrícolas. La cepa comercial más exitosa es *B. subtilis* GBO3, la cual coloniza efectivamente las raíces y constituye un ingrediente activo de uno de los biofungicidas más ampliamente distribuidos (Kodiac, Gostafson LLC) (McSpadden y Fravel, 2002). *B. subtilis* A13 es otra

cepa de buenos resultados en el biocontrol, la cual además de inhibir nueve patógenos enfrentados *in vitro*, estimuló subsecuentemente el crecimiento de cereales y zanahorias cuando se inoculó a las semillas (Kim *et al.*, 1997). *Bacillus* spp. se considera un candidato importante para su uso como agentes biocontroladores en programas de inoculación de semillas contra patógenos del suelo (Walker *et al.*, 1998).

Las bacterias del género *Pseudomonas* también producen diversos tipos de metabolitos con actividades biológicas importantes como antiviral, antimicrobiana, antialimentaria de insectos y mamíferos, antihelmíntica, fitotóxica, antioxidante, citotóxica y antitumoral (Hammer *et al.*, 1997). Varias cepas de *Pseudomonas* spp. son utilizadas para el control de enfermedades en diferentes cultivos y otras especies sin interés agrícola. Durante la fase de crecimiento estacionaria, las cepas biocontroladoras de *Pseudomonas* sintetizan los antibióticos ácido carboxílico fenazina, 2,4-DAPG, pioluterina y pirrolnitrina (Schnider *et al.*, 1995).

El cianuro de hidrógeno constituye otro grupo importante de antibióticos de naturaleza volátil, con efecto antagónico a diferentes fitopatógenos. La producción de este gas se observó en diferentes RPCV como la cepa de *Bacillus* sp. AvSB-5 y la cepa *Pseudomonas* sp. AvSP-7 (Thakur *et al.*, 2017), *Bacillus* sp. cepas BA1, BA4, BA6-8 (Karupiah y Rajaram, 2011), *Bacillus amyloliquefaciens* cepa sks_bnj_1 (Sharma *et al.*, 2013) y *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Bacillus* sp. (Agbodjato *et al.*, 2015). Este compuesto se considera un agente biológico importante para el control de varios patógenos de plantas, ya que forma complejos con metales como el cobre e inactiva enzimas como la citocromo oxidasa, de la cadena de transporte electrónico. Esto provoca una interrupción en la producción de energía metabólica (ATP) que es requerida para todas las funciones metabólicas de cualquier organismos (Blumer y Haas, 2000).

2.5.1.4. Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas constituyen otro grupo de moléculas que utilizan los microorganismos en su sistema de defensa. Estos compuestos difieren de los

antibióticos tradicionales en que comúnmente tienen un espectro de destrucción relativamente estrecho, y son tóxicos solamente a bacterias relacionadas estrechamente con la cepa productora (Riley y Wertz, 2002). Casi todas las bacterias pueden producir al menos un tipo de bacteriocina y muchas veces se nombran a partir del nombre científico del microorganismo que la produce: *Escherichia coli* (colicinas), *P. pyogenes* (piocinas), *Enterobacter cloacae* (cloacinas), *Serratia marcescens* (marcescinas) y *Bacillus megaterium* (megacinas) (Cascales *et al.*, 2007). La importancia de las bacteriocinas de *Bacillus* spp. aumentó notablemente debido al espectro de inhibición amplio que muestra algunas veces, en comparación con las bacteriocinas de otros grupos como las bacterias lácticas (Abriouel *et al.*, 2011).

2.5.1.5. Resistencia sistémica inducida

La resistencia sistémica inducida (ISR, por las siglas en inglés) constituye otro mecanismo mediante el cual las PGPR pueden proteger a las plantas de enfermedades. Este proceso está relacionado con un aumento de la defensa del hospedero (planta) frente a patógenos, cuando entra en contacto con las PGPR. Esto se manifiesta con una reducción de la severidad o incidencia de enfermedades provocadas por patógenos, que están separados espacialmente del agente inductor (van Loon *et al.*, 1998). Mayormente, la resistencia inducida es de carácter no específico y provoca un aumento de la resistencia basal a numerosos patógenos simultáneamente, lo cual constituye un beneficio importante en condiciones naturales donde múltiples patógenos se encuentran presentes (Van Loon and Bakker, 2006; Thakker *et al.*, 2007; Thakker *et al.*, 2011).

Las RPCV utilizan varios mecanismos para inducir la Resistencia Sistémica de las plantas, los cuales están relacionados el reforzamiento de la pared celular o la liberación de compuestos químicos para la defensa contra el agente causante de la enfermedad. Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) tratadas con la cepa *Bacillus pumilus* SE34, indujo un reforzamiento de las paredes celulares del tomate frente a *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou *et al.* 1998). Este tipo de reacción de defensa rápida no permite que el patógeno

invada a la planta y además da al patógeno tiempo suficiente para utilizar otros mecanismos de defensa contra el patógeno.

La Resistencia Sistémica Inducida también puede ocurrir mediante la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, como las enzimas líticas β -1,3 glucanasas y endoquitinasas (Maurhofer *et al.*, 1994). Estas enzimas se acumulan en el sitio de penetración de las hifas del hongo *F. oxysporum* f. sp. pisi, lo que provoca la degradación de la pared celular del hongo (Benhamou *et al.*, 1996). De manera similar, las enzimas quitinasas y peroxidasa también pueden inducir la resistencia sistémica en la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Viswanathan y Samiyappan, 1999).

Las plantas producen otras enzimas de defensa de actividad no lítica como la fenilamonioliasa (PAL, por sus siglas en inglés) y la polifenol oxidasa. Mientras que la última participa en la formación de la lignina junto a las peroxidasa, la PAL y otras enzimas están relacionadas con la producción de fitoalexinas (Figueiredo *et al.*, 2010). Estos compuestos constituyen metabolitos secundarios o antibióticos de bajo peso molecular, producidos por las plantas en respuesta a estreses físicos, químicos o biológicos y son capaces de prevenir o reducir la actividad de los patógenos. La velocidad de producción de las fitoalexinas depende del genotipo de la planta y/o del patógeno (Daniel y Purkayastha, 1995).

Las RPCV tales como cepas de *Pseudomonas* pueden inducir la resistencia sistémica en cultivos como el clavel (*Dianthus* sp.), la remolacha y *Arabidopsis thaliana* L., donde una cadena lateral antigénica de la membrana lipopolisacárida externa actúa como el determinante inductor; mientras que el sideróforo pseudobactin induce la resistencia sistémica en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y *Arabidopsis thaliana* L. Otro tipo de sideróforo conocido como la pseudomanina, producido por cepas de *Pseudomonas*, induce la producción de ácido salicílico en el rábano (*Raphanus raphanus*) lo cual eleva la defensa de la planta (Van Loon y Bakker, 2006). De esta forma, las rizobacterias inductoras en las raíces de las plantas producen señales, las cuales se extienden sistemáticamente dentro de las plantas y elevan la capacidad defensiva de los tejidos distantes de la infección por patógenos (Thakker *et al.*, 2012).

En trabajo realizado por Srinivasan y Mathivanan (2011), la aplicación de un consorcio de *B. licheniformis*, *Bacillus* sp., *P. aeruginosa* y *S. fradiae* a plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) infestadas con el virus de la necrosis del girasol (SNV), redujo el título viral y no se observaron síntomas de la enfermedad ni se detectó la presencia de patógeno en hojas jóvenes, luego de 45 días de iniciado el tratamiento. Este resultado evidenció un efecto positivo del consorcio en la inducción sistémica de la planta.

La efectividad de la aplicación de las RPCV se mantiene durante cierto tiempo y posteriormente disminuye con el tiempo. Este hecho determina el número de aplicaciones de las formulaciones de RPCV que se necesitan para mantener niveles de resistencia en los cultivos (Dalisay y Kuc, 1995). El método de aplicación también afecta la durabilidad de la efectividad. La aplicación foliar de *Pseudomonas fluorescens* puede dar una resistencia a intervalos de 15 días en el manejo de enfermedades en el arroz (*Oryza sativa* L.) (Vidhyasekaran *et al.*, 1997).

Los experimentos conducidos por Nayar (1996) indicaron que la inducción de los mecanismos de defensa de *P. fluorescens* persistieron hasta 60 días mediante el tratamiento de las semillas, 30 días por su aplicación en el sistema radicular y 15 días asperjado en las hojas. La duración de la resistencia inducida varía también en dependencia del tipo de cultivo y de cepa de RPCV que se utilice (Viswanathan, 1999).

2.5.1.6. Producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa

El ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, por sus siglas en inglés) es el precursor de la fitohormona etileno. Este compuesto gaseoso es producido de manera natural por las plantas, sin embargo, su nivel aumenta significativamente bajo condiciones de estrés abiótico como la sequía, la salinidad y el encharcamiento (Etesami *et al.*, 2015; Jha y Saraf, 2015). Este compuesto se conoce como la fitohormona del estrés y tiene un efecto detrimental en las plantas, donde provoca senescencia y abscisión de las hojas, clorosis y la marchitez de las flores.

Numerosas PGPR poseen la capacidad de producir la enzima ACC deaminasa (EC 4.1.99.4), que degrada el compuesto ACC, lo cual inhibe su conversión a etileno. Las plantas tolerantes a estreses abióticos producen cantidades considerables de ACC, el cual es transformado en amonio y α -cetobutirato por la enzima bacteriana ACC deaminasa, que impide de esta forma la producción de etileno y protege a la planta del efecto perjudicial del etileno (Glick, 2014).

Estudios con diferentes PGPR productores de ACC deaminasa mostraron un retardo de la senescencia de las flores en el clavel (Ali *et al.*, 2012) y una protección frente a estreses inducidos por temperatura, anegamiento, radiaciones ultravioletas y metales pesados (Mayak *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2012; Glick, 2014).

2.6. Importancia del género *Bacillus* como RPCV

Bacillus spp. posee un potencial elevado para desarrollar funciones fisiológicas importantes y diversas en interacciones multiespecies que ocurren en ecosistemas (Kloepper *et al.* 2004; Van der Ent *et al.* 2009) y se utiliza ampliamente por su asociación simbiótico con plantas y su actividad antagonista contra patógenos de diferentes cultivos (Compant *et al.* 2005). La actividad promotora del crecimiento de *Bacillus* spp., se asocia a la producción de diversas moléculas con un espectro amplio de actividades (Ongena y Jacques, 2008), las formulaciones estables de endosporas (Errington, 2003), la multiplicación masiva *in vitro*, la colonización rápida y extensiva y la competencia en la rizosfera bajo condiciones de estrés (Chowdhury *et al.*, 2013).

Numerosas especies de *Bacillus* como *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, son colonizadores exitosos de las plantas (Kloepper *et al.* 2004). Por ejemplo, *B. cereus* es un colonizador de raíces persistente y relativamente abundante, que muestra actividad antifúngica y capacidad de estimular el crecimiento vegetal en diferentes especies (Chang *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2013). *Bacillus subtilis* es una de las rizobacterias predominantes y presenta un espectro amplio de beneficios a las plantas como actividades antibacteriana y antifúngica (Kinsella *et al.*, 2009), incrementa el rendimiento y la capacidad reproductiva (Sharaf-Eldin *et al.*, 2008) y eleva las defensas contra la

plaga *Bemisia tabaco* (Valenzuela-Soto *et al.*, 2010). *Bacillus amyloliquefaciens* también es abundante en la rizosfera, coloniza exitosamente las raíces, incrementa el rendimiento (Chowdhury *et al.*, 2013) y promueve el crecimiento de las plantas indirectamente mediante la supresión de patógenos (Kim y Chung, 2004).

Estudios realizados por Guillén-Cruz *et al.* (2006) demostraron un efecto marcado en el crecimiento y en el desarrollo del pimiento (*Capsicum annuum* L.), con la aplicación de cuatro aislados de *Bacillus* en un suelo infestado con los patógenos que provocan la pudrición de la raíz. La aplicación de las bacterias incrementó la altura de la planta en un 20 % y el rendimiento al final del cultivo en 270 %. También, se redujo la incidencia en un 80 % y la severidad de pudrición de raíz en 39 %, respecto al testigo. Las especies identificadas molecularmente fueron *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*.

2.7. Importancia del género *Bacillus* con fines industriales

Bacillus spp. se considera un género muy promisorio para la obtención de enzimas con diferentes aplicaciones industriales. De este grupo bacteriano se extraen enzimas versátiles como amilasas, proteasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas y mananasas, entre otras.

Las mananasas son particularmente importantes por número de usos que poseen. Este grupo de enzimas degradan el manano, el cual constituye el componente mayoritario de la fracción hemicelulósica de las maderas blandas, y se encuentra en prácticamente todos los tejidos de las plantas y son producidas por numerosos organismos como hongos, actinomicetos, plantas y animales. Las enzimas que más degradan el manano son la β -mananasa (E.C 3.2.1.78), la β -manosidasa (E.C 3.2.1.25) y la β -glucosidasa (E.C 3.2.1.21). La β -mannanasa degrada la hemicelulosa en oligómeros cortos, que pueden ser hidrolizados posteriormente a manosa por β -manosidasas.

Entre las aplicaciones que poseen estas enzimas están su uso en la producción de alimentos, la extracción de café, la producción de etanol, y las industrias

farmacéuticas y de fabricación de pulpa y papel (Van Zyl *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2012).

2.8. Comercialización de las PGPR como agentes biofertilizantes y biocontroladores

Numerosas cepas de PGPR están disponible comercialmente como productos formulados que se emplean como biofertilizantes y agentes biocontroladores (Jha y Saraf, 2015). Los biofertilizantes bacterianos son formulados de diferentes maneras y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, se utiliza la formulación de esporulados de bacterias Gram positivas resistente a la desecación y al calor, ya que pueden producir formulaciones estables. Como una alternativa a las formulaciones de polvos está la suspensión de microorganismos en aceite, donde el propósito es excluir el oxígeno del medio, lo que evita que ocurra el proceso de respiración (Kamilova *et al.*, 2015).

La comercialización de productos a base de PGPR constituye un tópico de actualidad, y numerosas industrias comercializan cepas de bacterias y hongos como biofertilizantes a base de PGPR, entre los que se pueden estar “Biofox” (www.biofox.com), para el control de *Fusarium moniliforme*; Ecosoil (www.ecosoil.com), una formulación con *Pseudomonas aureofaciens* que se utiliza para control de diferentes patógenos como *Pythium aphanidermatum* y *Microchium patch*. Un producto a base de *Streptomyces griseoviridis* strain K61 se comercializa con el nombre de “AgBio” (<http://www.agbio-inc.com>), el cual inhibe a patógenos importantes como *Fusarium* spp., *Alternaria brassicola*, *Phomopsis* spp., *Botrytis* spp., *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. que provocan enfermedades en numerosos cultivos y plantas ornamentales. Un biofertilizante que contiene esporas de *Bacillus licheniformis* SB3086 fue elaborado por la compañía estadounidense Novozyme (<http://www.bioag.novozymes.com/>), el cual actúa como solubilizador de fosfato y es efectivo contra la enfermedad dollar spot de las plantas. El biocontrolador comercial “EcoGuard” se comercializa como una suspensión concentrada de esporas de *Bacillus licheniformis* SB3086, el cual es efectivo como inhibidor natural frente a una variedad de hongos patógenos agrónomicamente importantes, particularmente la antracnosis (<https://www.harrells.com/uploads/products/labels/ecogua.pdf>).

En Cuba se desarrollan varios tipos de estos productos como Azofert®, el cual mostró resultados satisfactorios en el cultivo del frijol en condiciones de estrés hídrico (Estrada *et al.*, 2017). Estos autores inocularon el producto en dos variedades (CC-25-9R) y Tomeguín-93 con riego y sin riego en la etapa reproductiva. En ambas variedades se observó un efecto positivo del producto tanto en presencia de riego como en condiciones de déficit hídrico. Este efecto está en dependencia de la persistencia y del funcionamiento simbiótico de la cepa bacteriana de *Rhizobium* que forma parte del producto, frente a diversos factores como la sequía, la falta de nitrógeno y la capacidad de exudación de las raíces, lo que estará a su vez determinado por las asociaciones planta-microorganismo que sean capaces de permitir la supervivencia y la tolerancia durante la restricción hídrica (Da Silva Lobato *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Etapas generales de la investigación

La investigación se desarrolló en los laboratorios del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Matanzas. El trabajo se desarrolló en varias etapas las cuales se muestran a continuación (Figura 4).

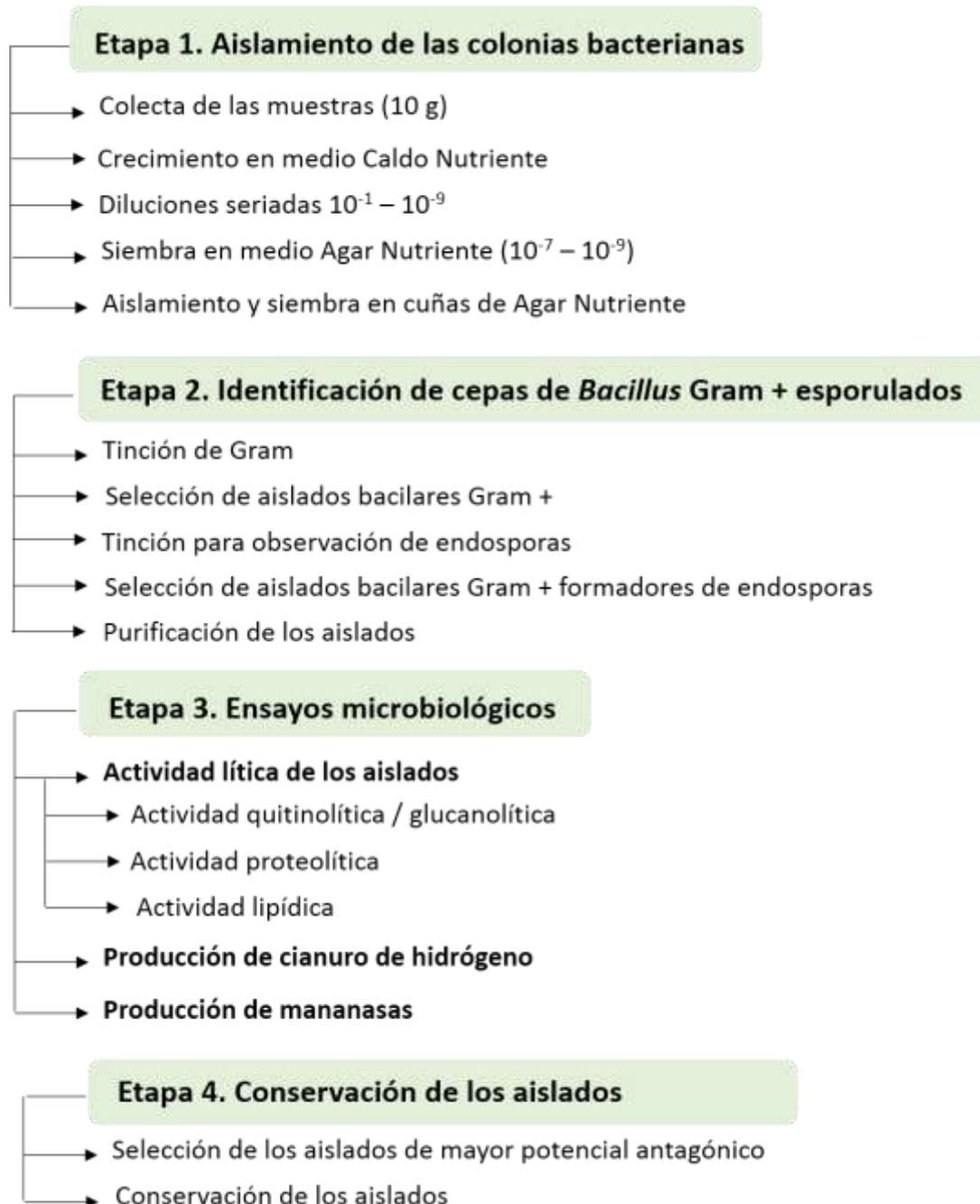


Figura 4. Esquema general de la investigación.

3.2. Aislamiento de las colonias bacterianas

3.2.1. Colecta de las muestras

Se colectó suelo rizosférico de tres variedades de frijol en distintas localidades de los municipios Colón y Unión de Reyes de la provincia de Matanzas (Tabla 3). Se obtuvieron muestras de 11 sitios diferentes en cada área de siembra, mediante un diseño de bandera inglesa (Figura 5A). El material se colectó en frasco estériles de 50 mL con ayuda de una espátula también estéril (Figura 5B). Las muestras se trasladaron hacia el laboratorio para su inoculación en medio Caldo Nutriente.

Tabla 3. Variedades de frijol y localidades seleccionadas para la colecta de suelo rizosférico.

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



Figura 5. Colecta de suelo rizosférico de plantas de frijol. A: esquema de la toma de muestras en forma de bandera inglesa. B: suelo rizosférico de la variedad Tomeguín 93 del municipio Colón, colectadas en frascos plásticos estériles.

3.2.2. Siembra en Caldo Nutriente

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

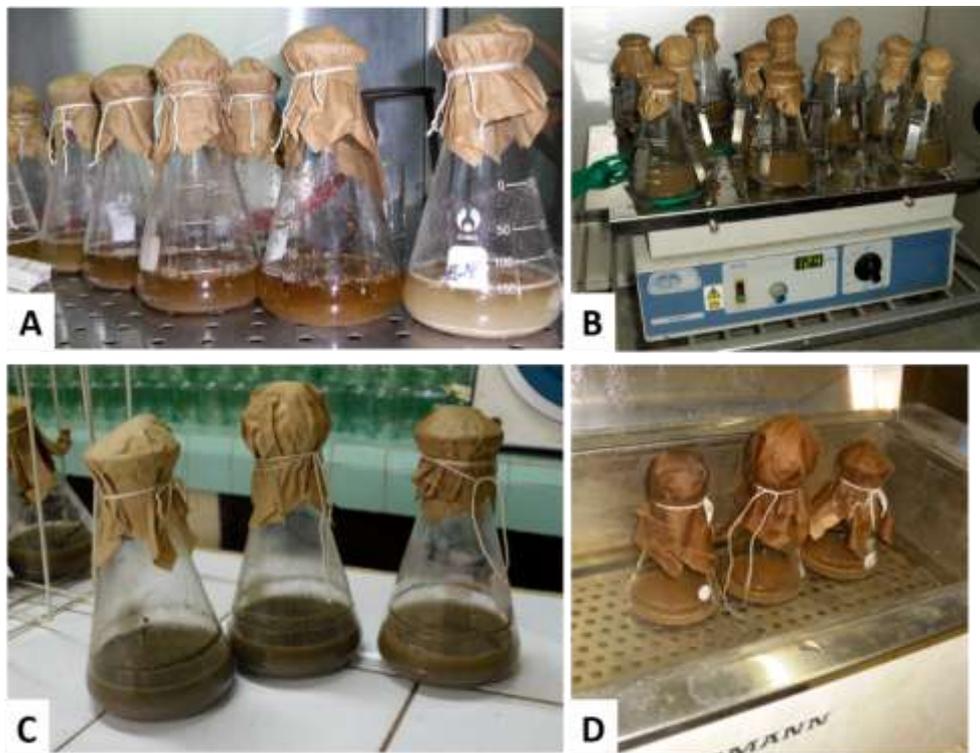


Figura 6. Crecimiento de las muestras se suelo rizoférico en Caldo Nutriente. A: erlenmeyers con muestras posterior a la inoculación. B: suspensiones en zaranda. C: crecimiento microbiano en el medio de cultivo posterior a 72 h de incubación. D: tratamiento de calor a las suspensiones microbianas.

3.2.3. Diluciones seriadas y siembra en medio Agar Nutriente

Posterior al choque térmico se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} y 10^{-9}) a partir de las suspensiones microbianas en soluciones salinas (NaCl 0,9 %) (Figura 7).

Se tomaron alícuotas de 100 µL de las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} y se transfirieron a placas Petri 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.



Figura 7. Diluciones seriadas a partir de las suspensiones microbianas crecidas en medio Caldo Nutriente.

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 con medio Agar Nutriente en forma de cuña. Los aislados se identificaron numéricamente (Tabla 4, Figura 8). Las muestras se colocaron en condiciones similares descritas en el acápite anterior.

Tabla 4. Nomenclatura utilizada para la identificación de los aislados de bacilos.

Nombre de los aislados	Descripción
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

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



Figura 8. Aislados bacterianos obtenidos de la rizosfera de la variedad Cuba Cuento Negro.

3.2.5. Identificación de las cepas de *Bacillus* Gram + productoras de endosporas

Posterior a las 24 h de crecimiento se realizaron tinciones de Gram a todas las de las colonias, para identificar los aislados Gram positivos con morfología bacilar. A las colonias que mostraron estas características se le realizó una tinción verde de Malaquita a las 72 h 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).

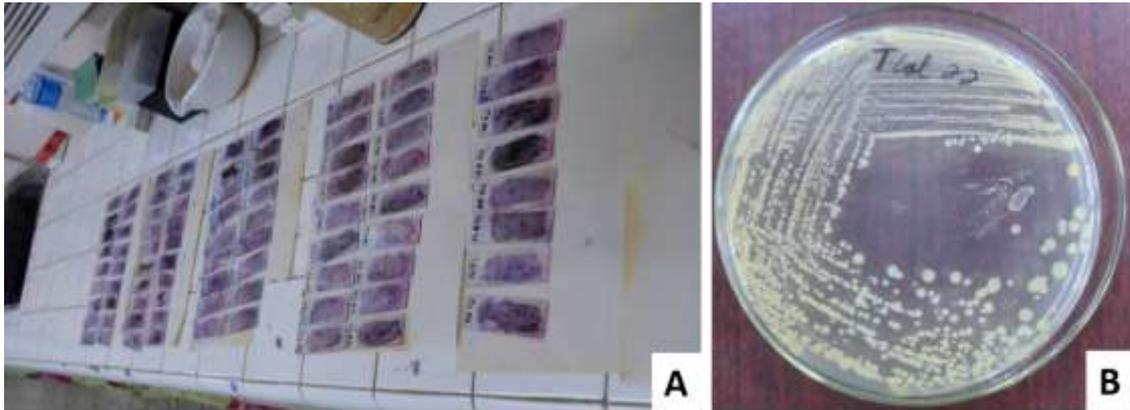


Figura 9. Tinción de Gram (A) y purificación del aislado TCol 22 (B).

3.3. Ensayos microbiológicos

3.3.1. Actividad quitinolítica y/o β -1,3-gluconolítica

La levadura panadera (*Saccharomyces cerevisiae*) contiene en sus paredes celulares quitina y β -1,3-glucono (Klis *et al.*, 2002); por lo cual, la producción de β -1,3-gluconasa y/o quitinasa por los aislados bacterianos se determinó mediante el crecimiento de las mismas en un medio de cultivo con levadura (Gaye, 2016). 4,0 g.L⁻¹ de levadura panadera y 16 g.L⁻¹ de agar fueron autoclavados a 121 °C durante 20 min. Los aislados fueron sembrados en placas Petri con el medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La presencia de una zona clara alrededor de las colonias indicó la producción de β -1,3-gluconasa y/o quitinasa.

Para el cálculo de la eficiencia de midieron los halos claros con el uso de una regla milimetrada. El resultado se expresó en porcentaje mediante la fórmula siguiente:

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

Donde,

E: eficiencia

Z: zona de hidrólisis

C: zona de crecimiento de la colonia

3.3.2. Actividad lipídica

La actividad lipídica se determinó mediante la siembra de las cepas en un medio de cultivo compuesto por peptona (10 g.L^{-1}), cloruro de calcio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), cloruro de sodio (5 g.L^{-1}), agar (15 g.L^{-1}) y 10 mL del detergente Tween 80 (Omidvari, 2008). La peptona y las sales se disolvieron en 990 mL de agua destilada. Posteriormente se autoclavarón por separado el Tween 80 y el medio a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Previo a verter el medio de cultivo en las placas Petri se mezclaron y homogenizaron el Tween 80 y el resto de los componentes del medio. Las placas con los aislados sembrados se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. Las deposiciones (zonas claras) alrededor de las colonias bacterianas indicaron la actividad de la enzima lipasa. El índice de potencia se determinó mediante la medición del diámetro de zona de deposición (hidrólisis) con el empleo de una regla milimetrada. Para el cálculo del índice de potencia se utilizó la fórmula descrita en el acápite 3.3.1.

3.3.3. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se realizó de acuerdo al método de Marhofer *et al.* (1995). Los aislados fueron sembrados en placas Petri con medio de cultivo compuesto por 15 g.L^{-1} de leche descremada, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extracto de levadura, 15 g.L^{-1} de agar. Las placas se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Los diámetros de los halos claros alrededor de las colonias se midieron con una regla milimetrada para determinar la actividad proteolítica según la fórmula descrita en el acápite 3.3.1.

3.3.4. Producción de cianuro de hidrógeno (HCN)

Se utilizó el método de Lorck (1948) para determinar la capacidad de producción de cianuro de hidrógeno de los aislados bacterianos. El medio Agar Nutriente se suplementó con $4,4 \text{ g.L}^{-1}$ de glicina y se autoclavó a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Los aislados se sembraron por estrías en placas Petri con la ayuda de un asa calibrada. Posteriormente se humedeció una capa de papel de filtro Whatman No. 1, en una solución compuesta por carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% y ácido

pítrico 0,5 %. El papel humedecido se colocó en la tapa superior de la placa Petri y posteriormente se selló con para-film. Las placas Petri fueron incubadas a 37 °C durante cuatro días. El cambio de coloración de amarillo a naranja-rojizo indicó la producción de cianuro de hidrógeno. Se utilizó como control una placa Petri con medio de cultivo sin inocular.

2.3.5. Actividad mananolítica

Se determinó mediante el método de Matos *et al.* (2018). La siembra de los aislados bacterianos se realizó en Medio Mínimo de Sales (NaCl 0,1 %, KH₂PO₄ 0,3 %, K₂HPO₄ 0,6 %, MgSO₄ 0,12 %, peptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 %) suplementado con goma de algarrobo (LBG, de las siglas en inglés) (0,5 %) y agar 15 g.L⁻¹. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad mananolítica se observó mediante la tinción del medio de cultivo con Rojo Congo (0,5 %). La presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia indicó producción de mananasas. El índice de potencia de los aislados se determinó mediante la fórmula descrita en el acápite 3.3.1.

2.4. 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.

2.5. 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 las colonias bacterianas

Los resultados generales del proceso de aislamiento de colonias de bacilos se muestran en la Tabla 5. Se obtuvo un total de 437 aislados entre bacilos espulados (141), bacilos no esporulados (79), cocos (189) con diferentes agrupaciones (diplococcus, tetracoccus, en sarcinas, etc.), así como otras formas, fundamentalmente actinomicetos (28) (Figura 10). El porcentaje general de formas bacilares con capacidad de esporular con respecto al total de aislados fue de 32,27 %.

Tabla 5. 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

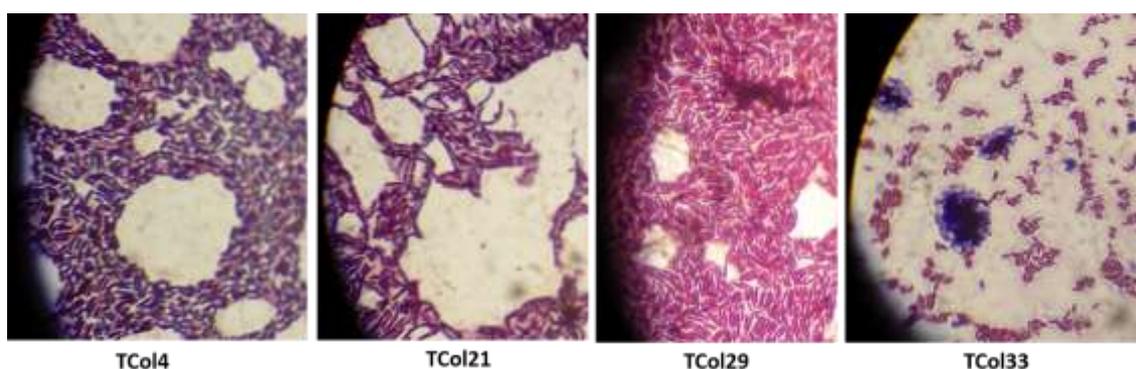


Figura 10. Fotografías de aislados de bacilos productores de esporas obtenidos de la rizosfera de la variedad Tomeguín 93 del municipio Colón.

4.2. Actividad lítica de los aislados bacterianos

4.2.1. Actividad β -1,3-gluconolítica y/o quitinolítica

La Figura 11 muestra el porcentaje de aislados con actividad β -1,3-gluconolítica y/o quitinolítica. Los aislados obtenidos de las variedades Cul 156 y Tomeguín 93 de Cabezas, Unión de Reyes, mostraron el porcentaje más alto con un 84,85 % y 80,00 %, respectivamente. El valor más bajo se observó en los aislados obtenidos de la variedad Cuba Cueto Negro (28,57 %).

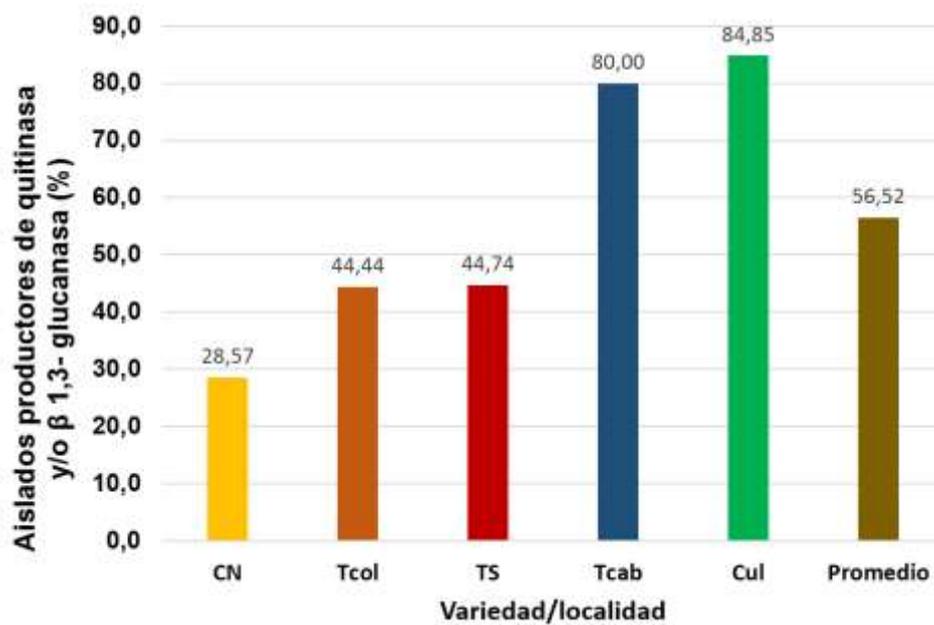


Figura 11. Porcentaje de aislados de bacilos con actividad β -1,3-gluconolítica y/o quitinolítica por variedad/localidad.

Los aislados Cul22, TCab2, TCol72, TS34, TS147, TS74 y TS104 mostraron las actividades más elevadas (Tabla 6, Figura 12). El 60,6 % de los aislados Cul mostraron una actividad alta o moderada; mientras que los valores más bajos se obtuvieron en el caso de los aislados CN donde solamente el 22,22 % manifestó una actividad moderada o baja. Entre los aislados con mayor actividad, más de la mitad (57 %) correspondieron a la variedad Tomeguín 93 de la localidad de Sabanilla.

Tabla 6. Aislados bacterianos que mostraron actividad β -1,3-gluconolítica y/o quitinolítica.

Cepa	Actividad	Cepa	Actividad	Cepa	Actividad
Cul 22	+++	Cul 63	++	Cul 9	+
TCab 2	+++	Cul 37	++	Cul 37	+
TCol72	+++	T Cab 1	++	Cul 57	+
TS 34	+++	T Cab 8	++	T Cab 7	+
TS 147	+++	T Cab 20	++	T Cab 6	+
TS 74	+++	T Cab 9	++	T Cab 51	+
TS 104	+++	T Cab 10	++	T Col 59	+
Cul 31	++	TCab 19	++	T Col 7	+
Cul 6	++	T Cab 23	++	T Col 21	+
Cul 7	++	T Col 57	++	T Col 49	+
Cul 50	++	T Col 58	++	T Col 48	+
Cul 32	++	TS 114	++	T Col 68	+
Cul 36	++	TS 97	++	TS 15	+
Cul 16	++	TS 112	++	TS 110	+
Cul 53	++	TS 142	++	TS 96	+
Cul 26	++	TS 115	++	TS 48	+
Cul 35	++	TS 84	++	TS 47	+
Cul 63	++	CN 65	++	TS 83	+
Cul 19	++	CN 84	++	CN 59	+
Cul 20	++	Cul 54	+	CN 19	+
Cul 39	++	Cul 1	+	CN 69	+
Cul 33	++	Cul 3	+	CN 85	+
Cul 62	++	Cul 18	+		

Cul 21	++	Cul 30	+		
--------	----	--------	---	--	--

Actividad: +++ alta, ++ moderada, + baja.

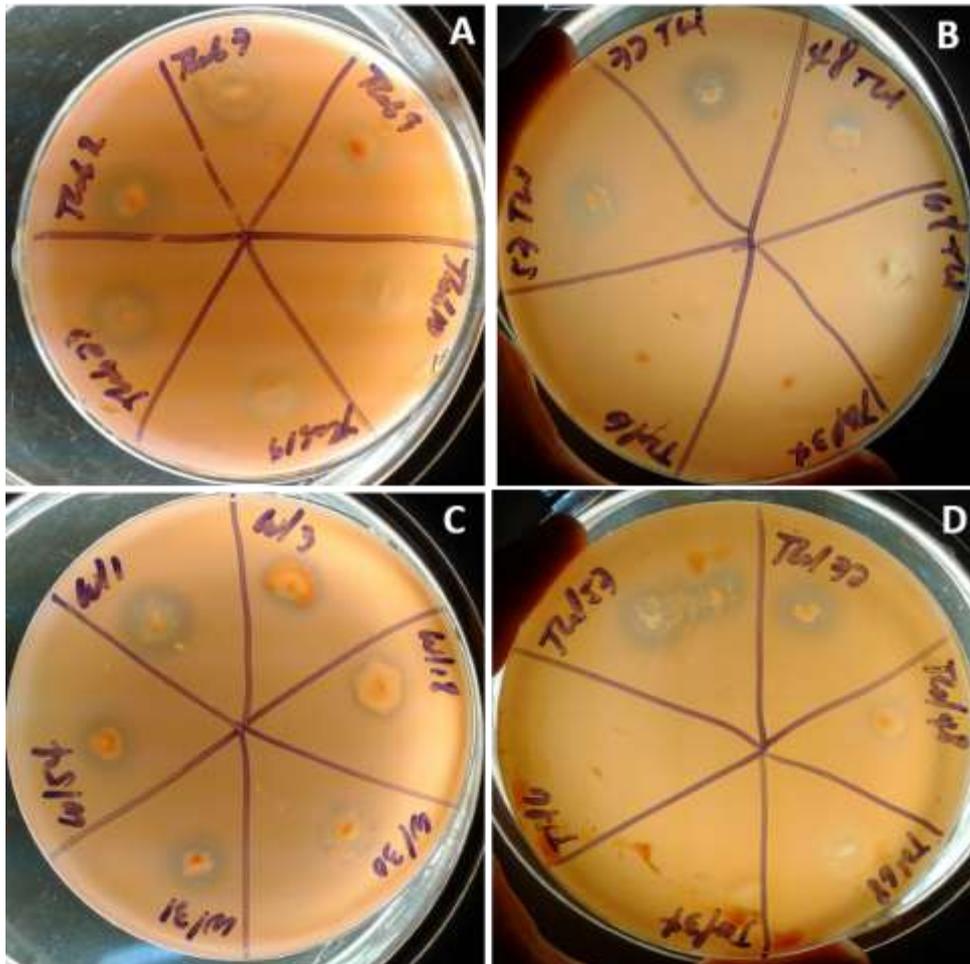


Figura 12. Actividad β -1,3-gluconolítica y/o quitinolítica de los aislados bacterianos. A: Variedad Tomeguín 93 de Cabezas, B y D: variedad Tomeguín de Colón, C: variedad CUI156.

Estos resultados coinciden con estudios de bioprospección donde se evidenciaron las potencialidades de *Bacillus* spp. para producir quitinasas (Dar *et al.*, 2018). La actividad quitinolítica y/o β -1,3-gluconolítica mostrada por varios de los aislados estudiados, indican un uso potencial de éstos como agentes biocontroladores, debido a la capacidad que tienen estas enzimas de inhibir el crecimiento de las hifas de los hongos fitopatógenos, ya que pueden provocar la

lisis o modificaciones a las paredes celulares de estos organismos (Haldar y Sengupta, 2015).

La actividad lítica de estas enzimas se debe a que las quitinasas (endo y exoquitinasas) degradan la quitina, un polímero lineal insoluble de β -1,4-N-acetilglucosamina, el cual constituye el componente fundamental de las paredes celulares de los hongos. Las β -glucanasas, por otra parte, pueden actuar mediante dos mecanismos, las exo β -glucanasas hidrolizan la cadena de β -glucano por sucesivos cortes que provocan la liberación de residuos de glucosa en el extremo no reductor de la cadena; mientras que las endo- β -glucanasas rompen los β -enlaces aleatoriamente a lo largo de la cadena, con la consiguiente producción de oligosacáridos pequeños (Pitson *et al.*, 1993).

Numerosos trabajos evidencian la actividad antagónica de cepas bacterianas productoras de enzimas hidrolíticas. La enzima β -1,3-glucanasa sintetizada por cepas de *Paenibacillus* y *Streptomyces* spp., pueden degradar fácilmente las paredes celulares del hongo *Fusarium oxysporum* (Compant *et al.*, 2005). De manera similar, *Bacillus cepacia* sintetiza β -1,3-glucanasa, que destruye las paredes celulares de los fitopatógenos del suelo *R. solani*, *P. ultimum* y *Sclerotium rolfsii* (Compant *et al.*, 2005). Varios de los agentes biocontroladores potentes con actividad quitinolítica, constituyen cepas de varias especies del género *Bacillus*: *Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. subtilis* y *B. turirgensis* (Sadfi *et al.*, 2001).

En estudios realizados por Przemieniecki *et al.* (2018) con la cepa *Bacillus* SP-A9, relacionada estrechamente con *Bacillus subtilis*, se observaron propiedades antagónicas *in vitro* frente a *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* and *Monographella nivalis*. Los análisis microbiológicos mostraron una fuerte actividad quitinolítica y celulolítica, que fueron asociadas con características antifúngicas.

4.2.2. Actividad lipídica

La capacidad de los aislados de producir lipasas se muestra en la Figuras 13 y 14 y en la Tabla 7. Los aislados con mayores porcentajes fueron los correspondientes a las variedades Tomeguín 93 de Cabezas (20,00 %) y

Tomeguín 93 de Sabanillas (18,42 %), mientras que los porcentajes más bajos se obtuvieron con los aislados de las variedades Cul156 (6,06 %) y Cuba Cueto Negro (11,11 %). En general, solo el 13,98 % del total de aislados de *Bacillus* spp. mostraron la capacidad de producir lipasas.

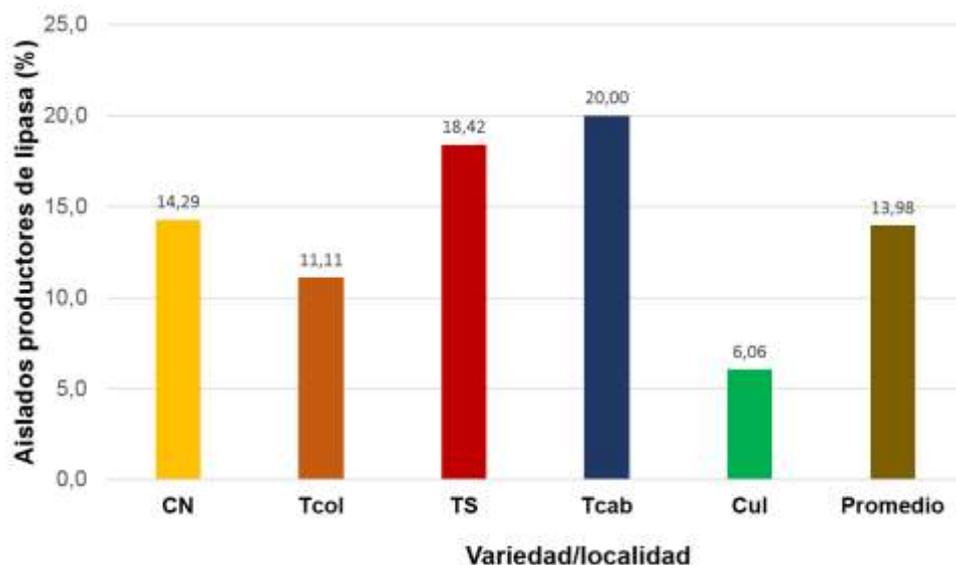


Figura 13. Porcentaje de aislados de bacilos con actividad lipídica por variedad/localidad.

El aislado con mayor índice de potencia fue TCol35 (312,22 %), seguido de TS124 (257,14 %) y TS104 (149,12%), TCab17 (132,54 %) y CN85 (125,56 %). Entre los últimos tres no hubo diferencias significativas (Figura 14).

Tabla 7. Aislados bacterianos que mostraron actividad lipídica.

Cepa	Actividad (IP%) ± EE	Cepa	Actividad (IP%) ± EE
TCol35	312,22 ^a ± 6,18	TS123	59,68 ^{ef} ± 4,13
TS124	257,14 ^b ± 8,24	TS33	34,52 ^{fg} ± 3,82
TS104	149,12 ^c ± 8,75	TS15	32,41 ^{fg} ± 5,09
TCab17	132,54 ^c ± 10,3	Cul57	30,36 ^{fg} ± 3,71
CN85	125,56 ^c ± 2,14	CN65	27,78 ^{fg} ± 3,46

CN94	101,11 ^d ± 18,2	Cul59	26,90 ^{fg} ± 4,63
TS119	93,04 ^d ± 7,32	TCab6	26,50 ^{fg} ± 2,27
Tcol 39	63,18 ^e ± 4,55	CN71	24,29 ^g ± 9,72
TS149	59,89 ^{ef} ± 9,44	TCab18	24,07 ^g ± 0,92

Letras diferentes indican diferencias según Prueba de Student Newman Keuls (P≤0,05). IP: índice de potencia, EE: error estándar.

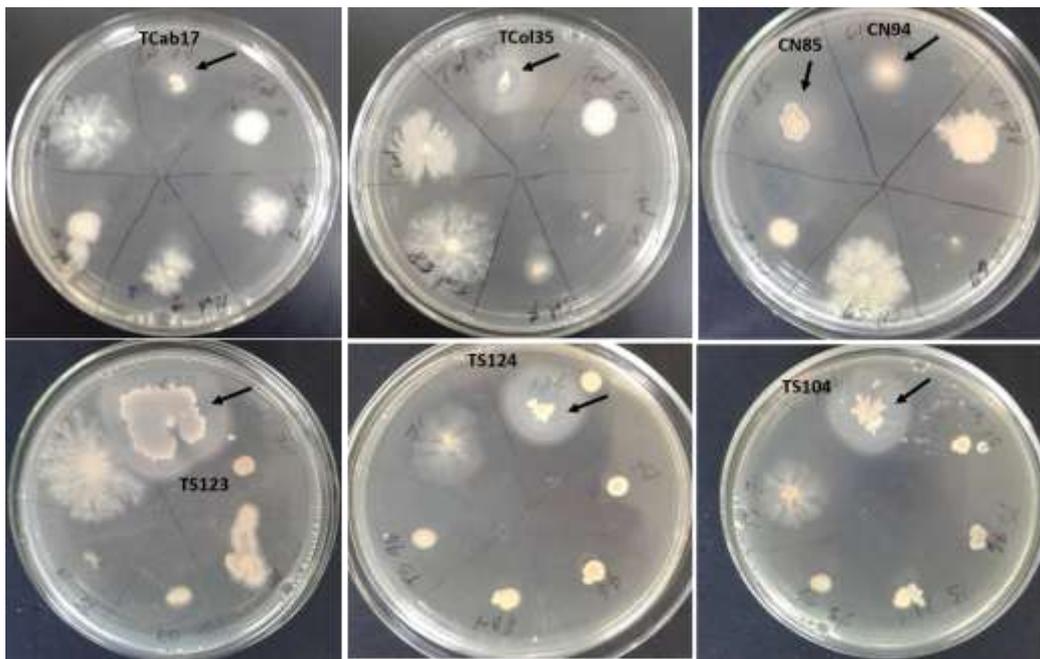


Figura 14. Actividad lipídica de los aislados bacterianos. Las flechas indican halos de deposiciones alrededor de las colonias como resultados de la hidrólisis de los lípidos.

Estos resultados concuerdan con otros autores, quienes plantean que la actividad lipídica de RPCV, también está documentada entre las especies del género *Bacillus* (Malleswari y Bagyanarayana, 2013). La acción de esta enzima en conjunto con quitinasas, proteasas y glucanasas, pueden inhibir el desarrollo de diferentes patógenos como *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* (Glick, 2012; Joshi *et al.*, 2012).

4.2.3. Actividad proteolítica

La Figura 15 muestra el porcentaje de aislados con actividad proteolítica por variedad/localidad. El mayor valor se obtuvo con los aislados obtenidos de la variedad Tomeguín 93 de Sabanilla (81,58 %) y el menor porcentaje se observó en los aislados de la variedad Cuba Cueto Negro (35,71 %). El promedio entre todos los aislados fue de 57,68 %.

Los 20 aislados con mayores actividades se muestran en la Tabla 8. Entre estos, las cepas TS fueron las más representativas (55 %) con relación al segundo de mayor representación, que se correspondió con la variedad TCol (30 %). Es importante señalar que entre las 12 primeras no hubo diferencias significativas, lo cual estuvo relacionado con la varianza observada entre los aislados.

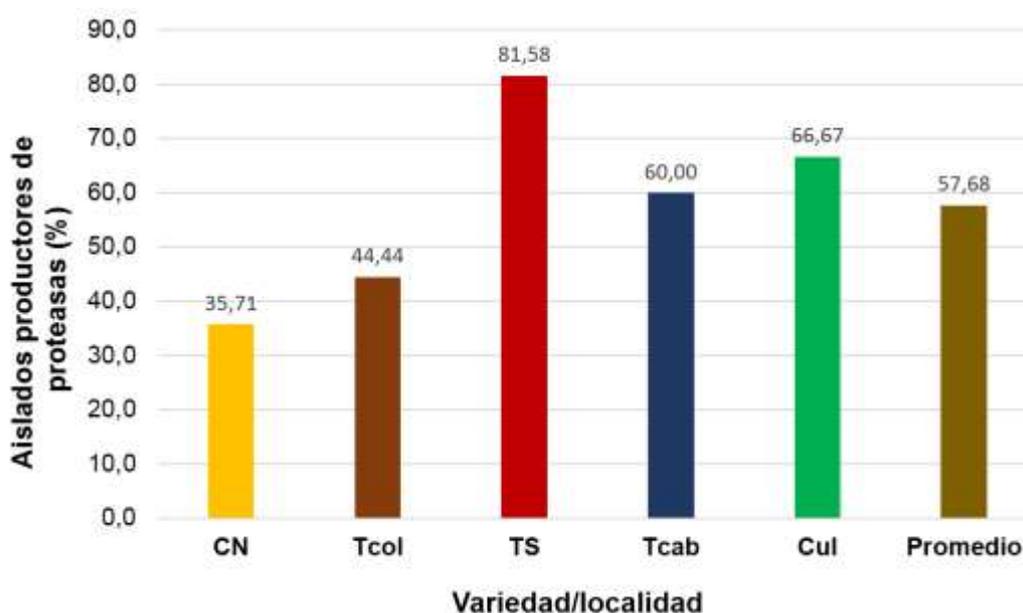


Figura 15. Porcentaje de aislados bacterianos con actividad proteolítica por variedad/localidad.

Tabla 8. Actividad proteolítica de los mejores 20 aislados bacterianos.

Cepa	Actividad (IP%) ± EE	Cepa	Actividad (IP%) ± EE
TS96	201,11 ^a ± 10,59	TS124	125,56 ^{ab} ± 17,88
TS149	200,61 ^a ± 11,02	TS114	125,56 ^{ab} ± 17,80
CN15	175,24 ^{ab} ± 18,09	CN92	125,15 ^b ± 3,57
TS142	172,22 ^{ab} ± 18,00	TS70	120,00 ^b ± 20,00

Tcol40	171,21 ^{ab} ± 14,92	Tcol62	116,67 ^b ± 8,81
Tcol21	151,10 ^{ab} ± 2,7	TS115	115,49 ^b ± 12,70
TS84	133,84 ^{ab} ± 20,79	TS47	115,21 ^b ± 19,40
Tcol54	131,85 ^{ab} ± 11,85	TS110	113,85 ^b ± 16,60
TS123	129,12 ^{ab} ± 10,74	Tcol53	107,89 ^b ± 9,13
CN78	127,78 ^{ab} ± 11,56	Tcol22	103,89 ^b ± 8,41

Letras diferentes indican diferencias según Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD (P≤0,05). IP: índice de potencia, EE: error estándar.

Los resultados obtenidos están en correspondencia con otros trabajos realizados por Thakur *et al.* (2017), con aislados de *Bacillus* spp. provenientes de la rizosfera de *Aloe vera* L.. Estos aislados determinaron un 88,8 % de aislados con actividad proteolítica, aunque la efectividad estuvo entre 11,3 y 21,8%.

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

La obtención de aislados con una eficiencia elevada en la actividad de enzimas hidrolíticas como quitinasas y/o glucanasas, lipasas y proteasas, indican un uso potencial de varios de estos aislados como biocontroladores de fitopatógenos, ya que estas enzimas provocan la lisis o alteran los componentes de las paredes celulares de los hongos, los cuales están compuestos por quitina, β-glucano y proteínas (Flores *et al.*, 1997; Neeraja *et al.*, 2010). Rao *et al.* (2013) refirieron un efecto inhibitorio sobre *Fusarium* sp. por las cepas *Bacillus* EU07, QST713 y FZB24, asociado a la producción de enzimas bacterianas líticas como proteasas, celulasas, proteasas, β-1,3-glucanasas, entre otras hidrolasas.

Trabajos recientes realizados por Jimtha *et al.* (2016) demostraron el efecto antagónico de la cepa *Bacillus* sp. WG4 frente al hongo fitopatógeno *Pythium myriotylum*, al producir alteraciones morfológicas en el patrón de crecimiento del patógeno, por acción de los metabolitos extracelulares secretados por la

bacteria. Los estudios de ultraestructura indicaron cambios en el grosor y la regeneración de las paredes celulares del hongo, así como constricciones en las hifas en la región de septo transversal.

La acción de las enzimas hidrolíticas no sólo pueden suprimir el desarrollo de hongos fitopatógenos, sino también poblaciones de nemátodos dentro de la rizosfera (Youssef y Eissa, 2014).

4.2.4. Producción de cianuro de hidrógeno

La producción de cianuro de hidrógeno constituye uno de los indicadores importantes que son evaluados en la búsqueda de aislados con actividad antagónica. En la Figura 16 se observan los porcentajes de aislados por variedad/localidad con la capacidad de producir este compuesto. Los aislados mejores representados fueron los de la variedad Tomeguín de Cabezas (13,33 %) y Cul156 (12,12 %) también de la localidad de Cabezas. Entre los aislados obtenidos de la variedad Tomeguín 93 de Sabanilla no se observó ninguno con esta propiedad.

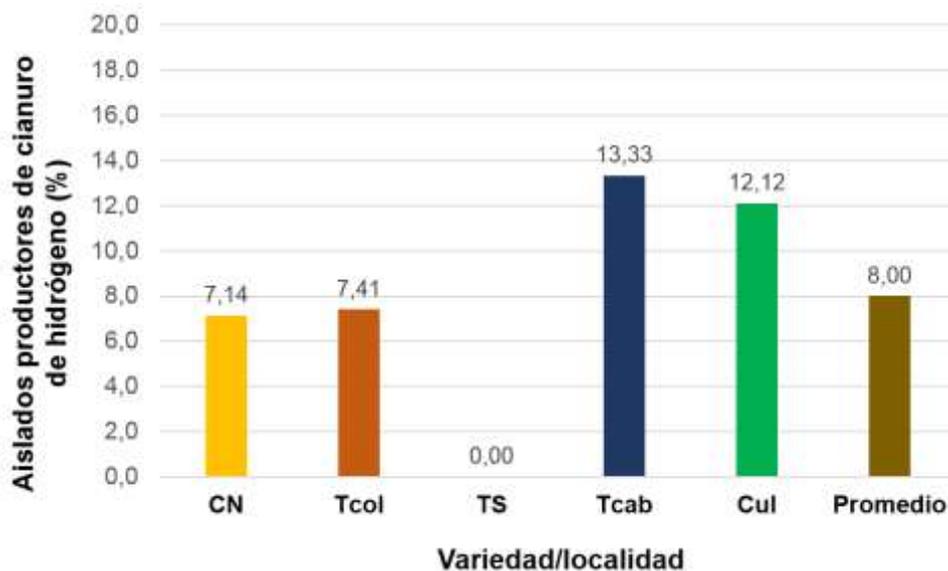


Figura 15. Porcentaje de aislados bacterianos con capacidad de producir cianuro de hidrógeno por variedad/localidad.

Entre todos los aislados, Tcol54 mostró una producción elevada de HCN, determinada en función de la intensidad de la coloración naranja-rojo en el papel de filtro (Tabla 9, Figura 16). Las cepas TCab23 y Cul53 produjeron niveles

moderados del gas tóxico y el resto de las cepas mostraron bajas producciones del antibiótico.

Tabla 9. Producción de cianuro de hidrógeno por los aislados bacterianos.

Cepa	Producción
Tcol54	+++
TCab23	++
Cul53	++
Tcol34	+
TCab1	+
Cul6	+
Cul7	+
Cul22	+
CN84	+
CN92	+

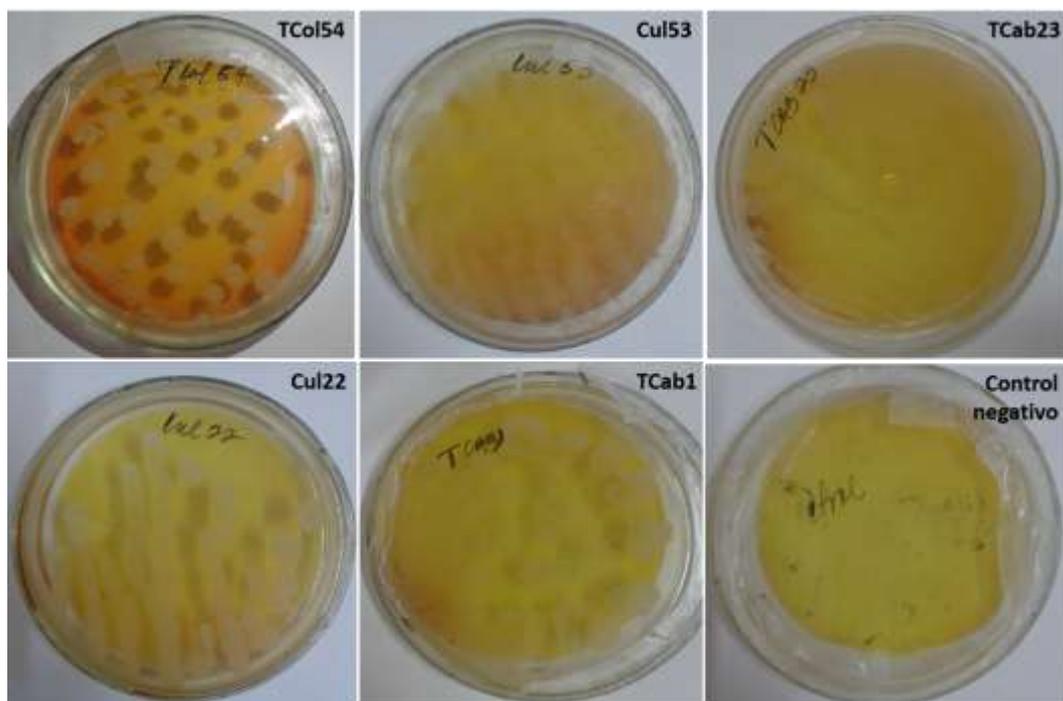


Figura 16. Aislados productores de cianuro de hidrógeno. TCol54 (abundante), Cul53 y TCab23 (moderado), Cul22, TCab1 (bajo) y el control negativo (no productor).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores. Thakur y Parikh (2018) obtuvieron un 12 % de aislados rizosféricos cianogénicos a partir de la rizosfera de *Arachys hypogea* L. De manera similar, El-Sayed *et al.* (2014) observaron 34 aislados productores de HCN (6,45 %) entre 531 aislados analizados. Thakur *et al.* (2017) también obtuvieron porcentajes bajos (11,11 %) de aislados rizosféricos de *Bacillus* spp. con estas características. Por el contrario, Agbodjato *et al.* (2015) refirieron un 100 % de aislados productores de HCN pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Estudios similares confirman que *Bacillus* es un género productor de cianuro de hidrógeno, donde se refieren varias especies rizosféricas de este género con actividad cianogénica (Yadav *et al.*, 2010; Kumar y Shruthi, 2013).

El género *Bacillus* spp. también fue descrito por otros autores como productor de compuestos volátiles que participan en el control biológico de hongos, bacterias y virus en varios cultivos de importancia agrícola (Tahir *et al.*, 2017). Los aislados obtenidos de la rizosfera de la planta de té, produjeron compuestos antifúngicos volátiles sobre seis hongos patogénicos en condiciones de cultivo *in vitro* (Chaurasia *et al.*, 2005). *Bacillus megaterium* inhibió el crecimiento de dos patógenos de plantas, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*, también mediante la producción de compuestos volátiles (Trivedi y Pandey, 2008).

La producción notable de cianuro de hidrógeno por Tcol54, puede contribuir al desarrollo de un nuevo agente biocontrolador. El HCN se considera un metabolito secundario volátil que actúa indirectamente como un agente biológico en el control de varios patógenos de plantas. La acción de este compuesto se basa en la formación de complejos con algunos metales a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, lo cual inhibe la síntesis de ATP mediado por la citocromo oxidasa (Blumer y Haas, 2000; Kandan, 2005). No obstante, si se produce en cantidades considerables este compuesto puede inhibir el crecimiento de las plantas, por lo cual es importante estudiar el efecto de la aplicación de este aislado en condiciones *in vivo* (Siddiqui *et al.*, 2006).

El hecho de obtener diferentes aislados con distintas actividades biológicas notables, sugiere el uso de consorcios entre estos aislados, con el objetivo de potenciar el efecto antagónico frente a fitopatógenos. El empleo de varios

consorcios donde participan cepas de especies diferentes de *Bacillus* o combinaciones de *Bacillus* con otros géneros, demuestran la efectividad de los mismos para incrementar el crecimiento y la actividad antagónica frente a diferentes especies vegetales (Khabbaz y Abbasi, 2014; Jimtha *et al.*, 2016).

4.2.5. Actividad mananolítica

El ensayo para la determinación de la actividad mananolítica de los aislados en estudio, mostró los mayores porcentajes en los obtenidos en las variedades Cul156 de Cabezas (36,36 %) y Tomeguín 93 de también de esa localidad (33,33 %). Los menores porcentajes se correspondieron las los aislados de las variedades Cuba Cueto Negro (7,14 %) y Tomeguín 93 de Sabanilla (7,89 %) (Figura 17).

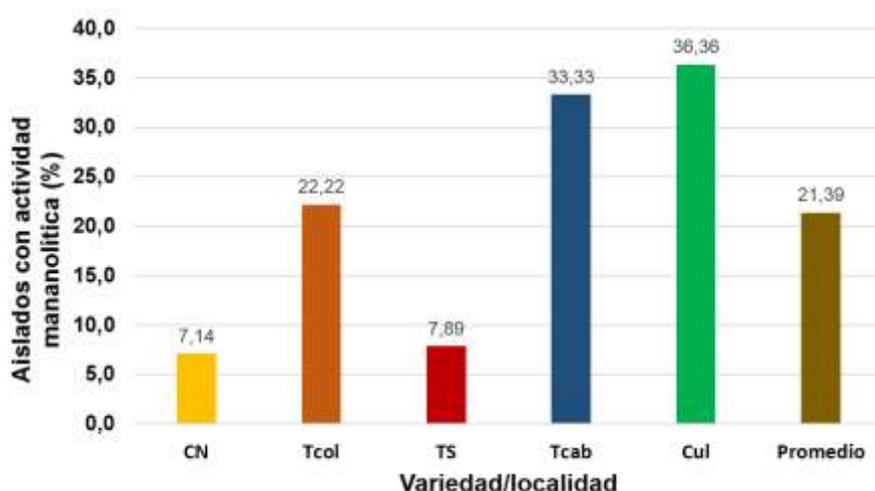


Figura 17. Porcentaje de aislados bacterianos con capacidad de producir cianuro de hidrógeno por variedad/localidad.

Los aislados con mayor actividad mananolítica fueron TS142, Cul6, CN12 Cul39, Cul20, TCab7 y Cul26, entre los que no hubo diferencias significativas (Tabla 10, Figura 18).

Tabla 10. Resultados de la actividad mananolítica de los 25 mejores aislados bacterianos.

	Cepa	Actividad (IP %) ±EE		Cepa	Actividad (IP %)± EE
1	TS 142	138,89 ^a ± 19,24	14	T Col 54	75,93 ^{bcd} ± 4,41
2	Cul 6	131,33 ^a ± 8,17	15	Cul 9	68,33 ^{cd} ± 7,64

3	CN 12	128,33 ^a ± 17,4	16	Cul54	67,09 ^{cd} ± 6,53
4	Cul 39	125,45 ^a ± 12,77	17	T Col 9	65,00 ^{cd} ± 3,84
5	Cul 20	121,79 ^a ± 5,78	18	Cul18	64,78 ^d ± 3,84
6	T Cab 7	119,44 ^{ab} ± 4,81	19	T Cab 2	59,22 ^d ± 2,89
7	Cul 26	110,44 ^{abc} ± 4,81	20	Cul 62	55,19 ^d ± 8,44
8	Cul 37	108,33 ^{bcd} ± 8,81	21	Cul17	51,59 ^d ± 8,25
9	CN 19	83,33 ^{bcd} ± 5,13	22	TS 124	51,39 ^d ± 6,85
10	TCab6	83,33 ^{bcd} ± 7,25	23	T Cab 10	51,21 ^d ± 8,58
11	Cul 61	82,58 ^{bcd} ± 5,78	24	T Col 58	49,59 ^d ± 7,70
12	Cul51	79,77 ^{bcd} ± 4,39	25	Tcab 8	46,26 ^d ± 13,02
13	T Col 57	78,21 ^{bcd} ± 14,46			

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

IP: índice de potencia, EE: error estándar.

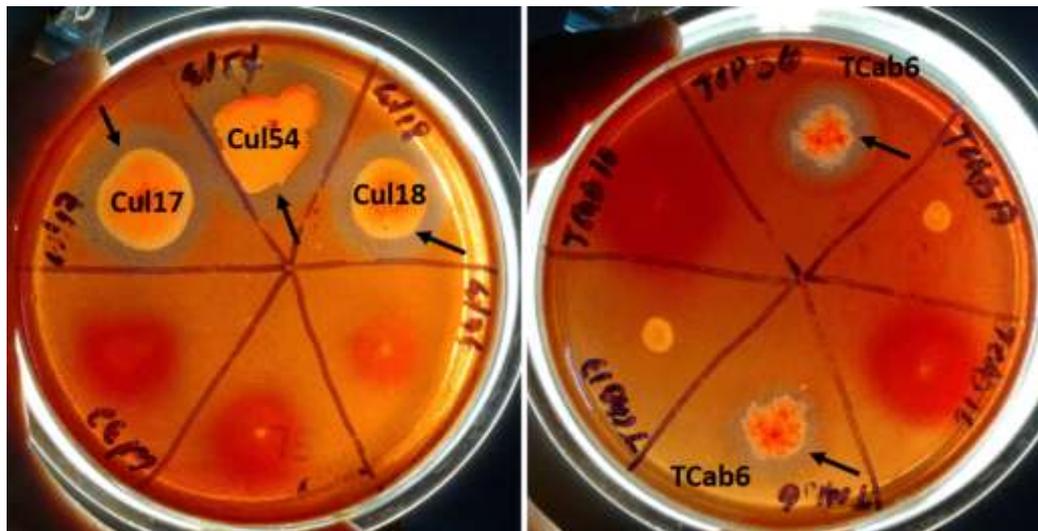


Figura 18. Aislados productores de mananasas. Izquierda: aislados de la variedad Cul156, derecha: aislados de la variedad Tomeguín 93 de Cabezas. Las flechas indican los halos de hidrólisis alrededor de las colonias.

La producción de enzimas mananasas también fue referida por otros autores en *Bacillus* como por ejemplo: *Bacillus nealsonii* (Chauhan *et al.*, 2012), *Bacillus subtilis* (Huang *et al.*, 2012) y *Bacillus* sp. (Hossain *et al.*, 1996).

La actividad mananolítica mostrada por varios de los aislados obtenidos sugiere la posibilidad de utilizar algunos, como agentes productores de mananasas con diferentes aplicaciones. En el sector agropecuario, ya que estas enzimas hidrolizan los enlaces β -1,4-mananosídicos presentes en las moléculas de manano, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos (Naughton *et al.*, 2001), para producir varios oligosacáridos como productos mayoritarios, que aumentan la disponibilidad y la asimilación de nutrientes energéticos en animales monogástricos como pollos, cerdos, etc.

En otros trabajos relacionados se obtuvieron mananasas bacterianas utilizadas en la producción de monooligosacáridos con efectos prebióticos que fueron descritos por Al-Ghazzewi *et al.* (2007). De manera similar, otros trabajos refirieron un efecto positivos de los monooligosacáridos sobre la microflora, la estructura y el funcionamiento intestinal (Chauhan *et al.*, 2014). Estos compuestos derivados de la actividad mananolítica de enzimas bacterianas, también son empleados ampliamente como suplementos nutricionales en aditivos naturales (Van Zyl *et al.*, 2010).

Los mejores aislados también pueden ser fuentes de mananasas con aplicaciones en diferentes industrias como en la producción de alimentos, la extracción de café, la producción de etanol, y las industrias farmacéuticas y de fabricación de pulpa y papel (Van Zyl *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2012).

El análisis conjunto de los mejores aislados para los ensayos realizados se muestra en la tabla 11. Aunque se observaron varios aislados con potencialidades como antagónicas, es importante destacar que otros como TS96, TCol35 y Cul22 mostraron eficiencias muy elevadas con relación a las actividades proteolíticas, lipídicas y quitinolíticas y/o glucanolíticas, respectivamente; por lo cual se deben valorar también algunos de estos aislados en consorcio con otros que mostraron buenos resultados, para su empleo en el control de hongos fitopatógenos.

Tabla 11. Aislados con características promisoras como antagonistas.

Aislados	Actividades			
	Quitinolítica y/o glucanolítica	Proteolítica	Lipídica	HCN
Tcol54		+		+
TCab23	+			+
Cul53	+			+
TCab1	+			+
Cul53				+
Cul6	+			+
Cul7	+			+
CN84	+			+
CN92		+		+
TS104	+		+	

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una colección de *Bacillus* spp. proveniente de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L., compuesta por 141 aislados Gram positivos esporulados.
- Se identificaron varios aislados productores de enzimas hidrolíticas (quitinasas y/o β -glucanasas, proteasas y lipasas) y cianuro de hidrógeno, con potencialidades para el biocontrol de fitopatógenos.
- Los aislados Tcol54, Tcab23, Cul53, Cul6, Cul7, CN84, CN92 y TS104, mostraron las mejores características como agentes antagónicos.
- Se identificaron ocho aislados con actividades mananolíticas superiores a 100 % de índice de potencia, los cuales son fuentes potenciales para la producción de mananasas con aplicabilidad en el sector agropecuario e industrial.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antagónica *in vitro* e *in vivo* de los mejores aislados frente a hongos fitopatógenos.
- Caracterizar bioquímicamente las enzimas mananasas producidas por los aislados en función de la estabilidad al pH y a la temperatura.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, H., Franz, C.M., Ben, Omar, N. and Gálvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* 35:201-232.
- Agbodjato, N.A., Noumavo, P.A., Baba-Moussa, F., Salami, H.A., Sina, H., Sèzan, A., Bankolé, H., Adjanooun, A. and Baba-Moussa, L. 2015. Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Central and Northern Benin (West Africa). *Applied and Environmental Soil Science.* 2015: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/901656>.
- Al-Ghazzewi, F.H., Khanna, S., Tester, R.F. and Piggott, J. 2007. The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. *J Sci Food Agric.* 87: 1758–1766.
- Ali, S., Charles, T.C. and Glick, B.R. 2012. Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology.* 113: 1139–1144. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05409.x
- Antoun, H. and Kloepper, J.W. 2001. Plant growth promoting rhizobacteria. In. *Encyclopedia of Genetics*, ed. Brenner S., Miller J. H., New York: USA. 1477-1480.
- Anupama, N.B., Jogaiah, S., Shin-ichi, I., Nagaraj, A.K., Tran, LS.P. 2015. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial trait and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenoloxidase. *PlantSci.* 231: 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.006>.
- Arayas, F.C.M. 2012. Guía de identificación y manejo integrado de enfermedades del frijol en América Central. 3th ed. Tegucigalpa. Honduras. 2012. p. 1-37.
- 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.
- Arshad, M. and Frankenberger, W.T. 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant Soil.* 133 (Suppl1): 1-8.
- Asensio-Manzanera, M.C., Asensio, C. and Singh, S.P.I. 2005. Introgressing resistance to bacterial y viral diseases from the Middle American to yean common bean. *Euphytica.* 143: 223-228.
- Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett.* 32:1559–1570.
- Benhamou, N., Belanger, R.R. and Paulitz, T.C. 1996. Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* Ri T-DNA transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi and *Pythium ultimum*. *Phytopathology.* 86:114–178.

- Blumer, C. and Haas, D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbio.* 173: 170-177.
- 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.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. and Cavard, D. 2007. Colicin Biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71: 158-229.
- Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P. 1993. Stimulation in the growth of corn and romaine lettuce by microorganisms dissolving inorganic phosphorus. *Can J Microbiol.* 39: 941-947.
- Chang, W.T., Chen, Y.C. and Jao, C.L. 2007. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresour Technol.* 98: 1224-1230.
- Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P. and Gupta, N. 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 3 (5): 1817–1830.
- Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P. and Gupta, N. 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 3 (5): 1817–1830.
- Chauhan, P.S., Sharma, P., Puri, N. and Gupta, N. 2014. Purification and characterization of an alkali-thermostable b-mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in mannooligosaccharides preparation having prebiotic potential. *Eur Food Res Technol.* 238: 927–936.
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H. and Borriss, R. 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS ONE* 8:e68818.
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H. and Borriss, R. 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS ONE* 8:e68818.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E.A. 2005. Use of plant growthpromoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 71: 4951-4959.

- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005
- Corzo, M., Rivero, D., Zamora, L., Martínez, Y. y Martínez, B. 2015. Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. *Rev. Protección Veg.* 30 (2): 97-103.
- Da Silva-Lobato, A.K., Gomes da Silveira, J.A., Lobo da Costa, R.C., De Oliveira Neto, C.F. 2013. Responses of organisms to water stress. Chapter 3. Edited by Şener Akinci, Rijeka, Croatia, 188 p. ISBN 978-953-51-0933-4. En: <http://dx.doi.org/10.5772/46157> Consultado 7 de mayo de 2019.
- Dalisay, R.F. and Kuc, J.A. 1995. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiol Mol Plant Pathol*. 47: 315–327.
- Daniel, M. and Purkayastha, R.P. 1995. Handbook of phytoalexin metabolism and action. Marcel Dekker, New York, p 615.
- Datta, M., Paul, D., Sinha, S.N. and Sengupta, Ch. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria improve the production and enhancement of alkaloid content in chilli. *Frontiers in Environmental Microbiology*. 1 (2): 24-26. doi: 10.11648/j.fem.20150102.13.
- Delgado-Baquerizo, M., Reich, P.B., Khachane, A.N., Campbell, C.D., Thomas, N., Freitag, T.E., Abu, Al-Soud, W., Sørensen, S., Bardgett, R.D. and Singh, B.K. 2017. It is elemental: soil nutrient stoichiometry drives bacterial diversity. *Environmental Microbiology*. 19, 1176–1188. doi:10.1111/1462-2920.13642.
- Duffy, B. 2003. Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu Rev Phytopathol*. 41: 501-38.
- Dutta, S., Rani, T.S. and Podile, A.R. 2013. Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *PLoS ONE* 8:e78369.
- Ekinci, M., Turan, M., Yildirim, E., Güneş, 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.
- Emmeret, E.A.B. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant diseases: a (Gram) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*. 171: 1-9.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*. 1: 117-126.
- Estrada, W., Chávez, L., Jerez, E., Nápoles, M.C., Sosa, A., Cordoví, C. y Celeiro, F. 2017. Efecto del Azofert® en el rendimiento de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de déficit hídrico. *Centro Agrícola*. 44 (3): 36-42.

- Estrada, W., Chávez, L., Jerez, E., Nápoles, M.C., Sosa, A., Cordoví, C. y Celeiro, F. 2017. Efecto del Azofert® en el rendimiento de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de déficit hídrico. *Centro Agrícola*. 44 (3): 36-42.
- Etesami, H., Alikhani, H. A. and Hosseini, H.M. 2015. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: Bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*(pp. 183–258). Springer International. doi:10.1007/978-3-319-24654-3_8.
- Figueiredo, M.V.B., Seldin, L., Araujo, F.F. and Mariano, R.L.R. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari DK (ed) *Plant growth and health promoting bacteria*. Microbiology monographs 18. Springer, Berlin, pp 21–43. doi: 10.1007/978-3-642-13612-2_2.
- Flores AC, Luna AAE, Portugal VO (2007) Yield and quality enhancement of marigold flowers by inoculation with *Bacillus subtilis* and *Glomus fasciculatum*. *J Sustainable Agric* 31:21-31
- Flores-Núñez, V.M., Amora-Lazcano, E., Rodríguez-Dorantes, A., Cruz-Maya, J.A. y Jan-Roblero, J. 2018. Comparison of plant growth-promoting rhizobacteria in a pine forest soil and an agricultural soil. *Soil Research*. <https://doi.org/10.1071/SR17227>
- Foldes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L. and Szigeti, J. 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in-vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, and spoilage microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 840-846.
- Gallegos, S. 2004. Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L. *Arch Latinoam Nut*. 54 (1): 1-10.
- Gaye, R. 2016. Plant growth-promoting bacteria from Western Australian soils. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias. Universidad de Murdoch, Australia.
- Ghangaokar, N.M. and Kshirsagar, A.D. 2013. Study of seed borne fungi of different legumes. *Trends in Life Sciences*. 2 (1): 32-35.
- Giassia, V., Kiritani, C. and Kupper, K.C. 2016. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*. 190: 46–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>.
- Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 169: 30–39. doi:/10.1016/j.micres.2013.09.009.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol*. 119:329-39.
- Glick, R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 1-16.

- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P., Thakker, J.N. 2014. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiol Res.* 169: 66-75.
- Goswami, D., Thakker, J.N. and Dhandhukia, P.C. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture.* 2: 1-19. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F.D., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C.N., PadrónCorral, E. y Reyes-Valdés, M.H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología.* 24: 105-114.
- 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.
- Guzmán, S. 2002. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica en México.* 28 (2): 159-173.
- Haldar, S. and Sengupta, S. 2015. Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere: insight and biotechnological potential. *Open Microbiol J.* 9: 1–7.
- Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., Van Pée, K.H. and Ligon, J M. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Applied and Environmental Microbiology.* 63: 2147–2154. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/63/6/2147>
- Hossain, M.Z., Abe, J., and Hizukuri, S. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme and Microbial Technology,* 18:95–98.
- Huang, J.L., Bao, L.X., Zou, H.Y., Che, S.G., and Wang, G.X. 2012. High-level production of a cold-active β -mannanase from *Bacillus subtilis* Bs5 and its molecular cloning and expression. *Molecular Genetics Microbiology and Virology.* 27: 147-153.
- Huang, J.L., Bao, L.X., Zou, H.Y., Che, S.G., and Wang, G.X. 2012. High-level production of a cold-active β -mannanase from *Bacillus subtilis* Bs5 and its molecular cloning and expression. *Molecular Genetics Microbiology and Virology,* 27:147-153.
- Hughes, J., Ganthavorn, C. y Wilson, S. 1997. Dry beans inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 Rats 1, 2, 3. *American Society for Nutritional Sciences,* p. 2328-2333.
- Huot, H., Joyner, J., Córdoba, A., Shaw, R.K., Wilson, M.A., Walter, R., Muth, T.R. and Cheng, Z. 2017. Characterizing urban soils in New York City: profile properties and bacterial communities. *Journal of Soils and Sediments* 17: 393–407. doi:10.1007/s11368-016-1552-9.
- Idris, S.E., Iglesias, D.J., Talon, M. and Borriss, R. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol PlantMicrobe Interact.* 20 (6): 619-626.

- Jha, C.K. and Saraf, M. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *J Agric Res Dev.* 5: 108-119.
- Jha, C.K. and Saraf, M. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *E3 Journal of Agricultural Research and Development.* 5: 108–119.
- Ji, S.H., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.S., Yu, S.H. 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiol.* 41 (4): 234-242. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.4.234>.
- Jimtha, J.C, Jishma, P., Arathy, G.B., Anisha, C., Radhakrishnan, E.K. 2016. Identification of plant growth promoting Rhizosphere *Bacillus* sp. WG4 antagonistic to *Pythium myriotylum* and its enhanced antifungal effect in association with *Trichoderma*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.* 16: (3): 578-590.
- Jogaiah, S., Mahantesh, K., Sharathchnadra, R.G., Shetty, H.S., Vedamurthy, A.B., Phan, LS. 2016. Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection. *Sci. Rep.* 6: 30789. <https://doi.org/10.1038/srep30789>.
- Joshi, Y.B., Chu, J. and Pratico, D. 2012. Stress hormone leads to memory deficits and altered tau phosphorylation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 31:167-176.
- Kamilova, F., Okon, Y., de Weert, S., & Hora, K. (2015). Commercialization of microbes: Manufacturing, inoculation, best practice for objective field testing, and registration. In B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 319–327). Springer International. doi:10.1007/978-3-319-08575-3_33.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ Microbiol* 7:1809-1817.
- Karuppiyah, 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.
- Khabbaz, S.E. and Abbasi, P.A. 2014. Isolation, characterization, and formulation of antagonistic bacteria for the management of seedlings damping-off and root rot disease of cucumber. *Canadian Journal of Microbiology.* 60: 25-33.
- Khalid, A., Arshad, M. and Zahir, Z.A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol.* 96 (Suppl 3): 473-480.
- Kim, D.S., Weller, D.M. and Cook R.J. 1997. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology.* 87: 559-564.

- Kim, P. and Chung, K.C. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Lett.* 234: 177-183.
- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, T.F. and Stuart, J.D. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 41: 374-379.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 26: 239-256.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* 94:1259-1266.
- Kobayashi, D.Y., Reedy, R.M., Bick, J. and Oudemans, P.V. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and Environmental Microbiology.* 68: 1047–1054. doi:10.1128/AEM.68.3.1047-1054.2002
- Kumar, P., Dubey, R.Ch., Kumar, D., Park, Y. and Bajpai, V.K. 2016. Isolation of plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. Ppr 8 from the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. *Arch Biol Sci.* 68 (2): 363-374.
- Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., & Thonart, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 4577–4584.
- Li, Y., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Wu, N., Fan, Y., and Yao, B. 2008. Gene cloning, expression, and characterization of a novel beta-mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 18 (1): 160–166.
- Lorck, H., 1948, Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiology*, 1, 142–146.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 63: 541-555.
- Maksimov, I.V., Abizgil'dinam R.R. and Pusenkova, L.I. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (Review). *Appl Biochem Microbiol.* 47:333-345.
- Mandal, S.M., Mondal, K.C., Dey, S. and Pati, B.R. 2007. Optimization of cultural and nutritional conditions for indol-3-acetic acid (IAA) production by a *Rhizobium* sp. isolated from rot nodules of *Vigna mungo* (L) hepper. *Res J Microbiol.* 2 (3): 239-246.
- Martínez, E., Cantillo, T. y García, D. 2014. Hongos asociados a semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas en Cuba. *Bioteología Vegetal.* 14, 2: 99 – 105.

- Martínez-de la Parte, E., Trujillo, M., Cantillo-Pérez, T. and García, D. 2013. First report of white mould of beans caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Cuba. *New Disease Reports*. 27: 5.
- Matos, M. M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Brizuela, M. A., Portilla, Y., Ramírez, H. L. (2018). Production of xylanases by *Bacillus subtilis* E44 under submerged fermentation conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 52 (3): 1–8.
- Maurhofer, M., Hase, C. Meuwley, P., Metraux, J.P. and Defago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to necrosis by root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of *gac A* and of pyoverdinin production. *Phytopathology*. 84: 139-146.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 565–572. doi:10.1016/j.plaphy.2004.05.009.
- McSpadden, G.B. and Fravel, D. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization and application in the USA. Online. *Plant Health Progress*. doi: 10. 1094/PHP-2002-05-10-RV.
- Mederos, Y. 2013. Revisión bibliográfica: Indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Cultivos Tropicales*. 27 (3): 55-62.
- Méndez-Bravo, A., Cortazar-Murillo, E.M., Guevara-Avenidaño, E., Ceballos-Luna, O., Rodríguez-Haas, B., Kiel-Martínez, A.L., Hernández-Cristóbal, O., Guerrero-Analco, J.A., Reverchon, F. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLoS ONE*. 13 (3): e0194665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194665>
- Moreno, A., García, V., Reyes, J.L., Vásquez, J. y Cano, P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 20 (1): 68-83.
- Nabhan, G.; Weber, C. y Berry, J. 1985. Variation in composition of Hopi Indian beans. *Ecology of Food and Nutrition*. 16: 135-152.
- Naughton, P.J., Mikkelsen, L.L., and Jensen, B.B. 2001. Effects of nondigestible oligosaccharides on *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* and nonpathogenic *Escherichia coli* in the pig small intestine *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3391–3395.
- Nayar, K. 1996. Development and evaluation of a biopesticide formulation for control of foliar disease of rice. Ph.D. Dissertation. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore (Tamil Nadu), India, p 223.
- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P., Moerschbacher, B.M., Podile, A.R. 2010. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 231-241.
- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P., Moerschbacher, B.M. and Podile, A.R. 2010. Biotechnological approaches to develop

- bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit Rev Biotechnol.* 30:231-241.
- Nehra, V., Saharan, B. S. and Choudhary, M. (2016). Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *Springerplus.* 5 (1): 948. doi:10.1186/s40064-016-2584-8
- Nerey, Y., Pannecoucq, J., Hernández, H.P., Díaz, M., Espinosa, R., De Vos, E., Van Beneden, S., Herrera, L. and Höfte, M. 2010. *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology.* 158: 236-243.
- 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
- Omidvari, M. 2008. Biological control of *Fusarium solani*, the causal agent of damping off, by fluorescent pseudomonads and studying some of their antifungal metabolite productions on it. MS thesis (in Persian language), Tehran University, Iran, p.94.
- Ongena, M. and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115-125.
- Parisi, J.J.D., Patrício, F.R.A. and Oliveira, S.H.F. 2006. Modification of the paper towel seed health test for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Summa Phytopathologica.* 32 (3): 288-290.
- Patel, K., Goswami, D., Dhandhukia, P., Thakker, J. 2015. Techniques to study microbial phytohormones. In: *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem.* Maheshwari DK, ed. Springer International. 1-27.
- Payne, S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology.* 235: 329–344. doi:10.1016/0076-6879(94)35151-1
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., vander Putten, W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>.
- Pitson, S.M., Seviour, R. J. and McDougall, B.M. 1993. Noncellulolytic fungal α -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 178-192.
- Prasad, S.S.K., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and Sk, Z.A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.* 184: 13–24.
- Przemieniecki, S.W., Kurowski, T.P., Damszel, M., Krawczyk, K. and Karwowska, A. 2018. Effectiveness of the *Bacillus* sp. SP-A9 strain as a biological control agent for spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agr. Sci. Tech.* 20: 609-619.

- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M. and Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Environ. Microbiol.* 63: 881-887.
- 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.
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.* 56:117-137.
- 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.
- Rodríguez, C. y Fernández, X. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): Su aporte a la dieta del costarricense. *Acta Méd. Costarric.* 45:3.
- Ryu, R. and Patten, C.L. 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4 TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Am Soc Microbiol.* 190 (Suppl 21): 1-35
- Sabaté, D.C., Pérez, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R. and Audisio, M.C. 2018. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological Research.* 211: 21–30.
- Saharan, B.S. and Nehra, V. 2011. Assessment of Plant growth promoting attributes of cotton (*Gossypium hirsutum*) rhizosphere isolates and their potential as bio-inoculants. *Journal of Environmental Research and Development.* 5 (3): 575-583.
- Salvador, C.A., Rojas, M., Mesa, L., Londoño-Larrea, P., Villavicencio, J. y González, E. 2019. Obtention of cellulases in Ecuador to reduce enzyme costs in sugar cane bagasse hydrolysis. *Revista Centro Azúcar.* 46 (1): 18-28.
- Santalla, M. 1999. Breeding for culinary and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in intercropping systems with maize (*Zea mays* L.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 3 (4): 225-229.
- Schnider, U., Keel, C., Blumer, C., Troxler, J., Defago, G. and Hass, D. 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHAO enhances antibiotic production and improves bio-control abilities. *Journal of Bacteriology.* 177: 5387-5392.
- Seckin, B. and Merve, A. 2014. Drought Tolerance of Knotgrass (*Polygonum Maritimum* L.) Leaves under different drought treatments. *Pak. J. Bot.* 46 (2): 417-421.
- Setzer, M., Moriarity, D., Lawton Ro., Setzer, W., Gentry, G., Haber, W. 2003. Phytomedical potential of tropical cloud forest plant from Monteverde, Costa Rica., *Rev. Biol.Trop.* 51 (3-4): 647-674.

- Sharaf-Eldin, M., Elkholy, S., Fernandez, J.A., Junge, H., Cheetham, R., Guardiola, J. and Weathers, P. 2008. *Bacillus subtilis* FZB24 (R) affects flower quantity and quality of saffron (*Crocus sativus*). *Planta Med.* 74: 1316.
- Sharma, S.K., Ramesh, A. and Johri, B.N. 2013. Isolation and characterization of Plant Growth-Promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Virology & Microbiology.* 2013: 1-19. DOI: 10.5171/2013.446006.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., & Zhang, X. 2013. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics.* 14, 271. doi:10.1186/1471-2164-14-271
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana. Editorial Pueblo y Educación. 743 p.
- Silo-Suh, L.A., Stabb, E.V., Raffel, S.J. and Handelsman, J. 1998. Target range of Zwittermycin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current Microbiology.* 37: 6-11.
- 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.
- Somers, E., Vanderleyden, J. and Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol.* 30: 205-240.
- Someya, N., Kataoka, N., Komagata, T., Hirayae, K., Hibi, T. and Akutsu, K. 2000. Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Disease.* 84: 334-340. doi:10.1094/PDIS.2000.84.3.334.
- Srinivasan, K. and Mathivanan, N. 2011. Plant growth promoting microbial consortia mediated classical biocontrol of sunflower necrosis virus disease. *J. of Biopesticides.* 4 (1): 65 – 72.
- Stabb, E.V., Jacobson, L.M. and Handelsman, J. 1994. Zwittermycin A producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology.* 60: 4404-4412.
- Stefanova, M. 1996. Aspectos Etiológicos y epidemiológicos de la Bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) de frijol en Cuba. 1er Taller Internacional sobre Bacteriosis común del Frijol. Univ. de Puerto Rico. PROFRIJOL. Mayaguez, Puerto Rico. p. 121-129.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C. and Galli-Terasawa, L.V. 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agricultura. *AMB Express.* 4 (26): 2-9.
- Thakker, J.N, Patel, S. and Dhandhukia, P.C. 2012. Induction of defense-related enzymes in banana plants: Effect of live and dead pathogenic strain of

Fusarium oxysporum f. sp. cubense. ISRN Biotechnology. doi:10.5402/2013/601303

- Thakker, J.N., Patel, N. and Kothari, I.L. 2007. *Fusarium oxysporum* derived elicitor-induced changes in enzymes of banana leaves against wilt disease. *Journal of Mycology and Plant Pathology*. 37: 510–513.
- Thakker, J.N., Patel, P. and Dhandhukia, P.C. 2011. Induction of defence-related enzymes in susceptible variety of banana: Role of *Fusarium*-derived elicitors. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 44: 1976–1984. doi:10.1080/03235408.2011.559032
- 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* (IJJET). 10 (1): 1-10. <http://dx.doi.org/10.21172/ijjet.101.01>.
- Trivedi, P., Pandey, A. and Palni, L.M.S. 2008. *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiol. Res*. 163:329-336.
- 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.
- USDA. US Department of Agriculture. Base de datos sobre composición de alimentos. <<http://www.nal.usda/fnic>>, 2000.
- Valenzuela-Soto, J.H., Estrada-Hernandez, M.G., Ibarra-Laclette, E. and Delano-Frier, J.P. 2010. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growthpromoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. *Planta*. 231: 397-410
- Van der Ent, S., Van Wees, S. and Pieterse, C.M.J. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*. 70:1581-1588.
- Van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol*. 119: 243-254.
- Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 2006. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), PGPR: Biocontrol and biofertilization (39–66). Dordrecht: Springer Netherlands.

- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453–483. doi:10.1146/annurev.phyto.36.1.453
- Van Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K., and Gorgens, J.F. 2010. Fungal β -mannanase: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnology applications. *Process Biochemistry*, 45: 203-1213.
- Van Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K. and Gorgens, J.F. 2010. Fungal β -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Proc Biochem*. 45:1203–1213.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. and Nasrulhaq-Boyce, A. 2016. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability- A Review. *Molecules*. 21(5). doi:10.3390/molecules.
- Vidhyasekaran, P., Rabindran, R., Muthamilan, M., Nayar, K., Rajappan, K., Subramanian, N. and Vasumathi, K. 1997. Development of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. *Plant Pathol*. 46: 291–297.
- Viswanathan, R. 1999. Induction of systemic resistance against red rot disease in sugarcane by plant growth promoting rhizobacteria. Ph.D. Dissertation. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore (Tamil Nadu), India p 175.
- Viswanathan, R. and Samiyappan, R. 1999. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease caused by *Colletotrichum falcatum* Went in sugarcane. *Proc Sugar Tech Assoc India*. 61: 24–39.
- Walker, R., Powel, A.A. and Seddon, B. 1998. *Bacillus* isolates from the rhizosphere of peas and dwarf French beans with anti-fungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 791-801.
- 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.
- Yadav, R.K. and Saini, P.K. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria & its influence on plant growth: Review. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 6 (6): 43-46.
- Yazdani, M., Bahmanyar, M.A., Pirdashti, H. and Esmaili, M.A. 2009. Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). *World Acad Sci Eng Technol*. 49: 90-92.
- 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.

- Youssef, M.M.A. and Eissa, M.F.M. 2014. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. *EJBPR*. 5: 1–6.
- Yuan, J., Ruan, Y., Wang, B., Zhang, J., Waseem, R., Huang, Q. and Shen, Q. 2013. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 -Enriched Bio-organic Fertilizer Suppressed *Fusarium* Wilt and Promoted the Growth of Banana Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 3774–3780.
- Zahid, M., Abbasi, M.K., Hameed, S. and Rahim, N. 2015. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Front Microbiol.* 6, 207. doi:10.3389/fmicb.2015.00207.