

Selección de aislados de *Bacillus* spp. con fines agropecuarios e industriales a partir del bioproducto IHPLUS®



Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo

Autora: Ener Alejandro Betancourt Herrera

Tutor: Dr. C. Maykelis Díaz Solares
MSc. Yunel Pérez Hernández

Julio, 2018



Hay tres cosas que cada persona debería hacer durante su vida: plantar un árbol, tener un hijo y escribir un libro.

José Martí

Declaración de Autoridad

Declaro que yo, **Ener Alejandro Betancourt Herrera**, 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

Primero que nada, a mi Dios, mi rey y mi salvador, quien merece toda la gloria y adoración por ser el único Dios verdadero y mi único y supremo dueño. A mis padres y familia en general a quienes debo la mayor parte de mi educación y preparación ya que gracias a su esfuerzo y por la gracia de Dios hoy estoy donde estoy. A mi iglesia y mis hermanos en la fe a quienes espero servir con mi vida y mi preparación.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios y Señor por haberme permitido en su gracia llegar hasta aquí. A mis queridos padres René Betancourt y Yamilka Herrera por brindarme su apoyo y dedicación incondicional durante todos mis años de estudio, por su tiempo, paciencia, estímulo, consejos, amor.

A mi familia en general, pero especialmente a la parte de ella que vive en Cárdenas, a mi hermana Yileimis, a mi abuela Nora y a mis tíos Moraima, Rafael, Magali y Roberto por haberme recibido en sus casas y ser como padres para mí.

A todo el claustro de profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que con su profesionalidad y dedicación han inculcado en mí el amor a la Agronomía y además por darme las herramientas necesarias para la culminación de mis estudios. Algunos de los que no quisiera dejar de mencionar son: Yunel, Agustín, Sergio, Mabelquis, Sonia, Dania, Llildrey, Enildo, Camacho, Héctor, Marlén, Jorge Luis, Roberto, entre otros a los cuales muchos hemos llegado a querer como familia.

En especial quiero agradecer a mis tutores Maykelis y Yunel por su empeño, preocupación, dedicación, y paciencia y a quienes le debo verdaderamente el éxito de este trabajo.

A todos mis compañeros de aula, por todos los momentos maravillosos que vivimos y por la amistad que hemos construido que siempre es mejor que los títulos que podremos alcanzar. Especialmente a quienes han sido mi equipo más cercano: Yosbel, Roberto, Edgar, Yudiel, Pedro, Andy, Jaime, Rolando y mi prima Elianis.

Agradezco a Dios y todo aquel que de una forma u otra contribuyó al desarrollo de este trabajo.

¡A todos, un millón de gracias!

OPINIÓN DEL TUTOR

El estudiante Ener Alejandro Betancourt Herrera, quien hoy defiende el trabajo de Diploma titulado, “Selección de cepas de *Bacillus* spp. con fines agropecuarios e industriales a partir del bioproducto IHPLUS®”, ha demostrado durante esta etapa responsabilidad en las diferentes etapas de la investigación, lo que permitió la culminación de las tareas científicas planificadas.

La situación actual de la agricultura cubana demanda diferentes estrategias urgentes para elevar los rendimientos agrícolas, y al mismo tiempo preservar los ecosistemas y los recursos naturales para las próximas generaciones. En este contexto, el uso de microorganismos estimuladores del crecimiento de las plantas, aparece como una de las estrategias para enfrentar el ataque de las plagas que comúnmente aparecen en los trópicos y disminuyen notablemente los cultivos. Por otra parte, la búsqueda de microorganismos con potencialidades para producir enzimas como amilasas, celulasas y manasas, de utilidad en una amplia gama de sectores, contribuye a mejorar numerosos procesos tecnológicos y sustituir importaciones.

Los resultados de este trabajo tributan a un proyecto asociado a programa nacional, donde el estudiante contribuyó al desarrollo de los objetivos propuestos para la etapa. Los resultados abren nuevas perspectivas de trabajo para profundizar en varios aspectos relacionados con los microorganismos presentes en el producto IHPLUS® y sus potencialidades agropecuarias e industriales.

Como tutores estamos satisfechos por el desempeño del estudiante y aceptamos con responsabilidad los aciertos y desaciertos del trabajo.

Tutores:

Dr. C. Maykelis Díaz Solares

MSc. Yunel Pérez Hernández

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar aislados de *Bacillus* sp. con características promotoras del crecimiento vegetal y con potencialidades industriales, a partir del producto IHPLUS®. Para el aislamiento se inocularon 10 mL del producto en medio Caldo Nutriente y posteriormente se realizó un golpe térmico, para iniciar el proceso a partir de formas productoras de esporas. Se realizaron diluciones seriadas y se realizaron siembras en medio Agar Nutriente. Los aislados fueron purificados y se verificó que se correspondieran con formas bacilares Gram positivas productoras de endosporas. Se evaluó la producción de ácido indolacético y la capacidad de los aislados de solubilizar fosfatos. Se determinaron las actividades quitinolítica y/o glucanolítica, lipídica, proteolítica, amilolítica, celulolítica y mananolítica. Se obtuvieron un total de cuatro aislados de *Bacillus* sp. Gram positivos y con capacidad de esporular. Los aislados IH7 e IH5 mostraron propiedades bioestimuladoras y biofertilizantes al producir ácido indolacético ($23,55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y solubilizar fosfato tricálcico, respectivamente. El aislado IH7 evidenció potencialidades como agente antagónico de fitopatógenos ya que produjo cianuro de hidrógeno y actividades β -1,3-glucanolítica y/o quitinolítica (95,55 %) y proteolítica (43,98 %). IH5 mostró actividad amilolítica y mananolítica, mientras que IH7 es productor de amilasas y celulasas, lo cual indica que el producto IHPLUS® constituye una fuente para la obtención de aislados de *Bacillus* con aplicaciones en diferentes industrias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problema e hipótesis científica.....	2
1.2. Objetivo general.....	2
1.3. Objetivos específicos.....	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Agricultura sostenible: concepto y realidades.....	4
2.2. La rizosfera y la rizobioma.....	4
2.2.1. Los exudados de las raíces y su relación con la rizobioma.....	5
2.2.2. Rizobioma y la salud de las plantas.....	5
2.3. Los microorganismos beneficiosos	6
2.3.1. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).....	8
2.3.2. Mecanismos de acción de las BPCV.....	9
2.3.2.1. Producción de fitohormonas.....	10
2.3.2.2. Fijación biológica del nitrógeno.....	13
2.3.2.3. Solubilización de fosfato.....	13
2.3.2.4. Producción de sideróforos.....	14
2.3.2.5. Efecto de la actividad enzimática ACC deaminasa en los niveles de etileno.....	16
2.3.2.6. Actividad biocontroladora de las BPCV.....	17
2.3.2.6.1. Producción de sideróforos.....	18
2.3.2.6.2. Producción de antibióticos.....	18
2.3.2.6.3. Resistencia Sistémica Inducida (ISR).....	18
2.3.2.6.4. Resistencia sistémica adquirida (RSA).....	19
2.3.2.6.5. Síntesis de enzimas hidrolíticas.....	20
2.4. Otras aplicaciones de las BPCV.....	21
2.4.1. Biorremediación.....	21
2.4.2. Aplicaciones industriales de las enzimas microbianas.....	21
2.5. Principales limitantes de la aplicación de las BPCV y perspectivas futuras.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Esquema general del trabajo.....	25
3.2. Aislamiento de los aislados bacterianos	26
3.2.1. IHPLUS®.....	26
3.2.2. Siembra en Caldo Nutriente.....	27
3.2.3. Diluciones seriadas y siembra en medio Agar Nutriente.....	27
3.2.4. Aislamiento de las colonias bacterianas.....	28
3.3. Identificación de los aislados de <i>Bacillus</i> Gram + productores de endosporas.....	28
3.4. Ensayos bioquímicos y microbiológicos.....	29
3.4.1.1. Producción de ácido 3-indolacético (AIA).....	29
3.4.2. Determinación cualitativa de la producción de ácidos orgánicos.....	30
3.4.3.1. Solubilización de fosfatos.....	30
3.4.3.2. Actividad quitinolítica y/o β -1,3-glucanolítica.....	31
3.4.3.3. Actividad lipídica.....	31

3.4.3.4. Actividad proteolítica.....	32
3.4.3.5. Producción de cianuro de hidrógeno (HCN).....	32
3.4.3.6. Actividad amilolítica.....	32
3.4.3.7. Actividad celulolítica.....	33
3.4.3.7. Actividad mananolítica.....	33
3.5. Conservación de las cepas bacterianas.....	33
3.6. Procesamiento estadístico.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1. Aislamiento de las colonias bacterianas.....	35
4.2. Propiedades bioestimuladoras.....	36
4.2.1. Producción de ácido indolacético.....	36
4.3. Propiedades biofertilizadoras de los aislados.....	38
4.3.1. Solubilización de fosfatos.....	38
4.4. Propiedades antagónicas de los aislados.....	40
4.4.1. Producción de cianuro de hidrógeno.....	40
4.4.2. Actividades de enzimas líticas.....	41
4.5. Producción de enzimas con aplicaciones industriales.....	42
4.6. Valoración económica.....	45
5. CONCLUSIONES.....	47
6. RECOMENDACIONES.....	48
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

I. INTRODUCCIÓN

En la agricultura moderna se utiliza indiscriminadamente cantidades elevadas de agroquímicos, para maximizar las producciones agrícolas. Sin embargo, esto provoca la contaminación de los suelos, el aire y el agua, lo que afecta negativamente los ecosistemas agroproductivos y ponen en riesgo la salud humana (Zahid *et al.*, 2015). La aplicación de fertilizantes químicos durante períodos largos de tiempo, con frecuencia reducen el pH del suelo y las bases intercambiadoras, lo cual convierte a los suelos improductivos para numerosos cultivos y en consecuencia disminuyen los rendimientos agrícolas (Gupta *et al.*, 2015).

Entre las estrategias para resolver estos problemas está el desarrollo de nuevos productos, a base de microorganismos provenientes del suelo que tienen efectos beneficiosos directos e indirectos sobre las plantas (Thakur *et al.* 2017). Estos microorganismos se dominan en su conjunto promotores del crecimiento vegetal y se destacan un grupo importante de géneros bacterianos como son: *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Serratia*, entre otros (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Los mecanismos que presentan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), están relacionados con la producción de fitohormonas estimuladoras de crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas (Jha y Saraf, 2015), la solubilización de fosfatos y otros elementos (Thanh y Tram, 2018), la producción de sideróforos que quelatan el hierro (Rayavarapu y Padmavathi, 2016), así como la secreción de antibióticos y enzimas líticas que tienen un efecto antagónico y biocontrolador de patógenos (Yamamoto *et al.*, 2015).

Uno de los géneros donde los investigadores centran su atención es en *Bacillus*, debido a su fácil crecimiento en medios de cultivos, la capacidad de producir endosporas resistentes a diversas condiciones desfavorables y que a su vez, facilita las formulaciones estables de los productos. Además, está demostrado las propiedades de este género como BPCV en diferentes especies vegetales (Hauka *et al.*, 2016; Robledo-Buriticá *et al.*, 2018). Por otra parte, numerosas investigaciones avalan la capacidad de este género para producir diferentes tipos de enzimas hidrolíticas como mananasa, celulasas y amilasas, que se

utilizan en el desarrollo de distintas industrias como la alimentaria, la farmacéutica, la textil, así como en la producción del papel, bioetanol y detergentes, entre otras, debido a la (Huang *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015).

En Cuba, existen varios productos a base de microorganismos beneficiosos que promueven el crecimiento vegetal. Entre estos, el IHPLUS® desarrollado por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, posee amplias perspectivas de uso tanto en la rama agrícola como en la producción animal. Estudios recientes demostraron su efecto beneficioso sobre la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. (Milián, 2018) y *Sorghum bicolor* L. (Moench) (González, 2017). Sin embargo, este producto por su naturaleza, constituye en sí un complejo microbiano cuyo efecto puede estar asociado a la interacción conjunta de los microorganismos o a determinados componentes. Por estas razones, se propuso como **problema científico** en la presente investigación el siguiente: el IHPLUS® constituye producto con diferentes utilidades en la agricultura; sin embargo, no se conoce el efecto aislado de sus componentes y sus potencialidades para el desarrollo de nuevos productos y otras ramas industriales.

Hipótesis científica: el aislamiento y la caracterización bioquímica y microbiológica de aislados de *Bacillus* sp., a partir del producto IHPLUS®, permitirá contar con nuevos aislados con potencialidades para el desarrollo de la agricultura y otras industrias.

Objetivo general: seleccionar aislados de *Bacillus* sp. con características promotoras del crecimiento vegetal y con potencialidades industriales a partir del producto IHPLUS®.

Objetivos específicos:

- Obtener aislados de *Bacillus* a partir del producto IHPLUS®.
- Evaluar las características de los aislados como bacterias estimuladoras del crecimiento vegetal.
- Determinar las actividades amilolíticas, celulolíticas y mananolíticas de los aislados, como fuentes de enzimas de diversas aplicaciones industriales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agricultura sostenible: concepto y realidades actuales

En el período Neolítico (hace 10 000 años) comenzó el desarrollo de la agricultura. El hombre nómada pasó a un estilo de vida sedentario que implicó la domesticación de numerosas especies vegetales y animales para su supervivencia. Este suceso representó un cambio radical en los ecosistemas donde se asentaron los humanos, debido a la interacción inminente entre la actividad agrícola y el medio ambiente. La productividad de los sistemas agrícolas depende en gran medida de los recursos naturales para sostener su desarrollo. Con el desarrollo de la ciencia se crearon nuevas tecnologías como el riego, la fertilización de los suelos, el uso de plaguicidas químicos, entre otros, que potenciaron diferentes procesos biológicos en los cultivos y se redujeron los obstáculos ambientales que limitaban los rendimientos de los mismos.

Posterior a la Segunda Guerra Mundial en el siglo XX, hubo un incremento notable en la demanda de alimentos a nivel mundial, debido a una explosión demográfica. Como una solución a esta crisis se produjo la llamada “Revolución verde”, que tenía como objetivo elevar al máximo el rendimiento de varias especies de cultivos agrícolas tradicionales, basado en una agricultura intensiva y agresiva al medio ambiente, con la aplicación de dosis elevadas de fertilizantes químicos, así como otros productos agroquímicos como fungicidas y plaguicidas que protegen a las plantas de los principales patógenos. Sin embargo, el uso excesivo de estos agroquímicos provoca la contaminación y el deterioro del medioambiente con un riesgo importante sobre la salud humana y animal (Singh, 2018a).

Por estas razones, surge como una alternativa menos agresiva al medio ambiente la agricultura sostenible, la cual constituye una forma de producción agropecuaria, basada en un uso mínimo de laboreo y un manejo integral de plagas y enfermedades para reducir el uso de plaguicidas químicos. La agricultura sostenible puede definirse como “la manera de cultivar el suelo conservando al máximo la calidad medioambiental”. Este tipo de agricultura debe permitir ingresos adecuados a los agricultores, proporcionar suficientes

alimentos a los consumidores, preservar y regenerar los recursos naturales y producir alimentos sanos y seguros.

2.2. La rizosfera y la rizobioma

La rizosfera es el área del suelo alrededor del sistema radicular y representa la fracción de suelo que está unido, en el ambiente inmediato, a las raíces. La rizosfera de una planta está determinada por las relaciones sinérgicas entre el suelo, las raíces y los microbios presentes; y está influenciada por el pH, el tipo, la complejidad del suelo (Mendes *et al.*, 2013) y los exudados producidos por las raíces que incluyen diferentes sustancias como aminoácidos, azúcares y diferentes nutrientes (Moe, 2013, Lakshmanan *et al.*, 2014).

La rizobioma está formada por el conjunto de microorganismos beneficiosos y no beneficiosos presentes en la rizosfera. La composición, la posición y la abundancia de los mismos afectan el desarrollo de las plantas y el rendimiento de los cultivos. Las raíces de las plantas poseen un efecto mutualista sobre el suelo rizosférico y los microbios; de esta forma, la rizobioma actúa como un segundo nicho funcional para las plantas (Pineda *et al.*, 2015). Berendsen *et al.* (2012) se refirieron al rizobioma como el segundo genoma de la planta, por la interacción estrecha que existe entre la planta y los microorganismos rizosféricos.

La participación del rizobioma en el crecimiento de las plantas se conoce desde que se descubrió, sin embargo, las diferentes interacciones que tienen lugar están menos estudiadas debido a la no disponibilidad de herramientas y técnicas requeridas (Brink, 2016). No obstante, la combinación de varias técnicas como las tecnologías de secuenciación (Hacquard, 2016) y la sonificación (Lundberg *et al.*, 2012), permitieron desarrollar estudios sobre la diversidad microbiana rizosférica y las plantas, además de analizar cómo afecta esta relación al estado de salud de la planta.

El genotipo de la planta y el tipo de suelo afecta de manera marcada el rizobioma de las plantas (Mendes *et al.*, 2013). El rizobioma influye en la comunidad de las plantas invariablemente y se caracteriza por la coexistencia mutualista de competidores en el mismo ambiente (Liu *et al.*, 2015). Estas relaciones pueden ser positivas como la simbiosis con el hospedero o negativa asociado a la

presencia de patógenos y depredadores (Mack y Bever, 2014). De cualquier forma, el rizobioma afecta el crecimiento de las plantas y la tolerancia a estreses y su importancia aumenta cada día en el campo de la agricultura (Reinhart, 2012).

2.2.1. Los exudados de las raíces y su relación con el rizobioma

La microbiota de la rizosfera está determinada por los exudados y las deposiciones de sustancias producidas por las raíces de las plantas (Moe, 2013). Estos compuestos también pueden constituir moléculas señalizadoras en las interacciones microorganismo-microorganismo, planta-microorganismos y planta-planta.

La mayoría de los microorganismos rizosféricos utilizan los nutrientes exudados de las plantas, y muchos de éstos tienen un efecto notable sobre el crecimiento y desarrollo de las mismas, a través de varios mecanismos como el aumento de la disponibilidad de nutrientes y la supresión y control de las enfermedades y el incremento del rendimiento (Raaijmakers, 2015). Estos microorganismos se denominan comúnmente rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). Existe una relación simbiótica entre las plantas y los microorganismos de la rizosfera, ya que las plantas alimentan a los microorganismos mediante los exudados derivados de la fijación de carbono y en cambio, las RBPC estimulan el crecimiento de las plantas (Minz *et al.*, 2013).

2.2.2. Rizobioma y la salud de las plantas

El rizobioma es vital para el crecimiento, la nutrición y la salud de las plantas. La composición del rizobioma posee una diversidad de genomas elevada que incluye eucariotas, procariotas y virus, los cuales se encuentran en el ecosistema de la planta (Lakshmanan *et al.*, 2014). Todos estos organismos desarrollan diferentes relaciones con la planta hospedera y con otros organismos. Estas interacciones engranadas afectan el crecimiento y salud de las plantas de manera positiva y negativa (Lapsansky *et al.*, 2016). Positivamente, pueden mejorar la germinación y el vigor de las semillas, el crecimiento, la nutrición y el desarrollo de las plantas; mientras que negativamente pueden provocar enfermedades y estrés por competencia por los nutrientes.

El rizobioma actúa como un hábitat secundario altamente desarrollado para las plantas (Lareen *et al.*, 2016). Los microorganismos de la rizosfera influyen en la diversidad y la riqueza de nutrientes debajo del suelo, la cual contribuye a mantener la productividad de los cultivos bajo condiciones adversas (Schnitzer *et al.*, 2011).

Los microorganismos de la rizosfera pueden tener una influencia beneficiosa, detrimental o ambas sobre la salud de las plantas, la cual ocurre mediante la acción de microorganismos beneficiosos o patógenos. Los efectos positivos están asociados con la producción de reguladores del crecimiento de las plantas, la solubilización de nutrientes, el antagonismo de patógenos y la inducción del sistema inmune de las plantas (Verbon y Liberman, 2016).

La secreción de azúcares y otros exudados por las plantas a través de las raíces, provoca un influjo microbiano que aumenta las poblaciones de microbios debido a la disponibilidad de nutrientes (Vorholt, 2012). La composición, diversidad y abundancia del rizobioma depende de factores diversos como la planta hospedera, características edáficas y la carga microbiana, que en conjunto determinan la sobrevivencia de la planta hospedera (Lakshmanan *et al.*, 2014).

El impacto del rizobioma sobre la salud de las plantas se hace más evidente en la supresión de enfermedades, como por ejemplo a través de la competencia entre los microorganismos beneficiosos y patógenos por los nutrientes disponibles en el suelo (Lareen *et al.*, 2016, Mommer *et al.*, 2016). Como la mayoría de los patógenos necesitan incrementar en población hasta ocupar la rizosfera, antes de invadir la planta hospedera, es vital que la población de microorganismos beneficiosos sea superior a la de los patógenos, lo que provoca la privación de nutrientes para éstos últimos y su ineffectividad (Lareen *et al.*, 2016). Este fenómeno se conoce como la supresión general de la enfermedad y se atribuye a la actividad microbiana total (Berendsen *et al.*, 2012).

2.3. Los microorganismos beneficiosos

Los microorganismos beneficiosos en la rizosfera contribuyen al crecimiento, desarrollo y control de los patógenos de las plantas a través de mecanismos, como la biofertilización, la biorremediación y el biocontrol (Ahemad y Kibret,

2014). Como ejemplos de biofertilización está la fijación del nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas reguladoras del crecimiento vegetal, mientras que el biocontrol está relacionado con la inhibición de los patógenos a través de la síntesis de sideróforos, la regulación del nivel de etileno, la resistencia sistémica inducida y la resistencia sistémica adquirida (Glick, 2014).

Los microorganismos rizosféricos están fuertemente asociados con la absorción de algunos elementos como el hierro, el cual existe primariamente en forma insoluble inaccesible para las plantas. Por esta razón, los sideróforos tienen una función importante en la solubilización de este elemento que posee funciones fisiológicas notables en las plantas (Aznar y Dellagi, 2015).

Otros mecanismos importantes de biocontrol utilizados por los microorganismos beneficiosos es la antibiosis y la competencia por los nutrientes (Schenk *et al.*, 2012). La mayoría de las rizobacterias y los hongos rizosféricos también producen metabolitos que inhiben el crecimiento de los patógenos (Saraf *et al.*, 2014). Los antibióticos pueden actuar como inhibidores del crecimiento o como mediadores de señales celulares, en dependencia de la concentración.

Los compuestos orgánicos volátiles constituyen otro grupo importante de metabolitos producidos por los microorganismos de la rizofera. Se conoce que que tienen actividad estimuladora del crecimiento de las plantas y del rizobioma, incluso cuando son producidos en concentraciones pequeñas en comparación con otros metabolitos (Chung *et al.*, 2015). *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomas maltophilia*, *Pseudomonas trivialis*, *P. fluorescens*, *Serratia plymuthica* y *Bacillus subtilis* están entre las especies de bacterias productoras de ácidos orgánicos volátiles (Ali *et al.*, 2015).

2.3.1. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) constituyen microorganismos promisorios para el desarrollo agrícola, y el término fue nombrado por Kloepper en los años 70 del siglo pasado. Aunque las BPCV incluyen un rango amplio de géneros y especies bacterianas como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Alcaligenes*,

Enterobacter, *Bradyrhizobium*, *Rhodococcus*, etc. (Singh, 2018a), estos microorganismos son confinados a ciertas áreas de aplicación, debido a diferentes aspectos como la sobrevivencia de estos en el sistema suelo, la capacidad de interactuar con la microflora en el lugar, los factores ambientales y la compatibilidad con el cultivo en cuestión (Martinez-Viveros *et al.*, 2010).

El ecosistema del suelo formado por las bacterias, los hongos, los protozoos, los virus, entre otros. Entre estos, las primeras constituyen el grupo más abundante y esta ventaja en población contribuye a que sean las colonias bacterias el grupo con el efecto más dominante en el ecosistema rizosférico, en comparación con los otros grupos menos representativos (Singh, 2018b).

Para que un organismo colonice efectivamente un ecosistema, deben estar presente varios factores en el entorno entre la planta hospedera y la vecindad inmediata. Las interacciones que ocurren en la rizosfera entre las plantas y los microorganismos, así como entre microorganismos, tiene un impacto directo en la forma de la rizosfera y determinan la capacidad de colonización de cualquier organismo en este entorno. Debido al poder colonizador elevado de las rizobacterias, estas tienen un efecto marcado en la rizosfera y en especial en la planta hospedera.

Las rizobacterias y algunos hongos constituyen un campo de investigación importante debido a la importancia que presentan los mismos en la agricultura, debido a la capacidad que tienen algunos de mejorar la disponibilidad de nutrientes. Estas rizobacterias son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) (Kloepper *et al.*, 1989), aunque también existen bacterias de vida libre en el suelo aisladas de la rizosfera, las cuales mejoran la salud e incrementan la productividad de los cultivos. El efecto de las RPCV sobre las plantas está asociado generalmente con la estimulación del crecimiento y la actividad de biocontrol (Ahemad y Kibret, 2014).

Estos efectos son estimulados con frecuencia por el mismo organismo. La presencia de estas bacterias en la rizosfera incrementa la resistencia sistémica de las plantas a los patógenos. Existen referencias que evidencian el incremento significativo en el crecimiento y el rendimiento de cultivos como respuesta a la inoculación con BPCV (Chauhan *et al.*, 2015, Grobelak *et al.*, 2015). Las BPCV

se utilizan en el desarrollo agrícola sostenible y sus usos aumentan rápidamente en varias partes del mundo. Se conoce que estos microorganismos afectan positivamente las plantas vasculares y constituyen una parte integral en los programas de manejo productivo de cultivos (Datta *et al.*, 2015).

2.3.2. Mecanismos de acción de las BPCV

Las BPCV regula el crecimiento de las plantas mediante varios mecanismos directos e indirectos; los cuales están relacionados con la adición de compuestos derivados del metabolismo microbiano con diferentes funciones, como las bacteriocinas y las enzimas líticas que participan en la protección vegetal, los sideróforos y otros compuestos que permiten solubilizar minerales, así como la producción de reguladores del crecimiento (Ali *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017).

Géneros como *Bacillus* y *Enterobacter* producen sideróforos, cuya función es quelatar el hierro para su uso por la planta, lo cual contribuye a retardar la senescencia (Ajillogba y Babalola, 2013). Otras vías es la producción de fitohormonas como las auxinas, las giberelinas y las citoquinas, las cuales intervienen en diversos procesos fisiológicos de las plantas como la velocidad de respiración radicular, el metabolismo y la producción de raíces secundarias (Ghorbanpour *et al.*, 2015).

Existen muchas especies de microorganismos colonizadores de la rizosfera y cada especie tiene una actividad elevada para uno o más de estos mecanismos, aunque no existen organismos que pueden utilizar efectivamente todos estos mecanismos (Saharan y Nehra, 2011). Muchos inoculantes de BPCV que se comercializan actualmente, parecen incrementar el crecimiento para al menos uno de los mecanismos. Las bacterias del género *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*, son buenos agentes controladores biológicos que son estudiados constantemente y ofertados como productos agrícolas (Pal y Tilak, 2012). Es importante considerar que algunos de estos mecanismos que presentan cada BPCV determinan qué hacen y cómo funcionan estos microorganismos. De manera general, los mecanismos más notables de los BPCV son la producción de fitohormonas, la fijación del nitrógenos y la solubilización del fosfato, la actividad enzimática ACC deaminasa, la producción de sideróforos, la producción de antibióticos, la síntesis de enzimas líticas, la

Resistencia Sistémica Inducida (RSI) y la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).

2.3.2.1. Producción de fitohormonas

Las fitohormonas producidas por las BPCV constituyen buenos estimuladores del crecimiento y también son metabolizados y utilizados por estas bacterias como nutrientes (Dodd *et al.*, 2010). Los principales grupos de reguladores del crecimiento son: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y el etileno.

Auxinas

Las auxinas son reguladores del crecimiento vitales para las plantas, que cuando no se encuentran presente tienen un impacto profundo en el crecimiento vegetal. Patten y Glick (1996) refirieron que aproximadamente el 80% de los microorganismos de la rizosfera pueden sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios. La clase de auxina natural más abundante es el ácido indol 3-acético (AIA) (Spaepen *et al.*, 2007). Otras auxinas importantes son el indol e-acetamida, el indol-3-piruvato y el indol-3-acetaldehído (Figura 1).

Las formas inactivas de la auxina incluyen el ácido 4-cloroindol-3-acético y otras formas conjugadas con azúcares, alcoholes, aminoácidos y glicoproteínas (Korasick *et al.*, 2013). Las auxinas participan en fenómenos como el geotropismo y el fototropismo, la diferenciación vascular de tejidos, la dominancia apical, la iniciación de las raíces laterales y adventicias, la división celular y el alargamiento de raíces y tallos (Grobelač *et al.*, 2015).

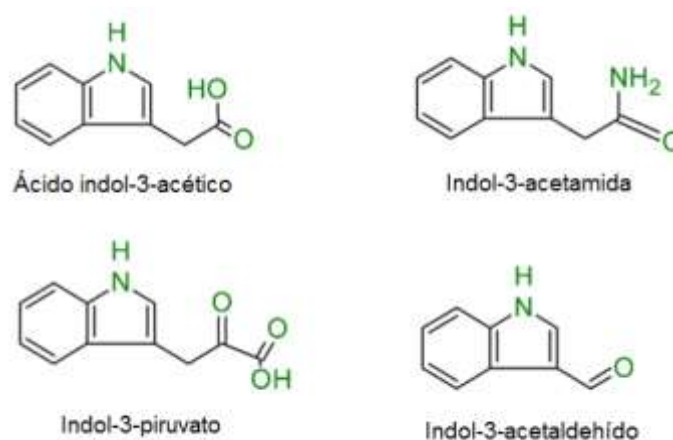


Figura 1. Principales auxinas naturales producidas por las BPCV.

El ácido indolacético producido por las RPCV altera el balance de auxinas de las plantas, aumentan la longitud de las raíces y el área superficial. El precursor del AIA es el triptófano, el cual se encuentra en los exudados en diferentes concentraciones, en dependencia del genotipo de las plantas (Figura 2). La capacidad de estimular el crecimiento de las auxinas producidas por las BPRC, requiere de señales efectivas de la mayoría de las plantas hospederas (Vacheron *et al.*, 2013).

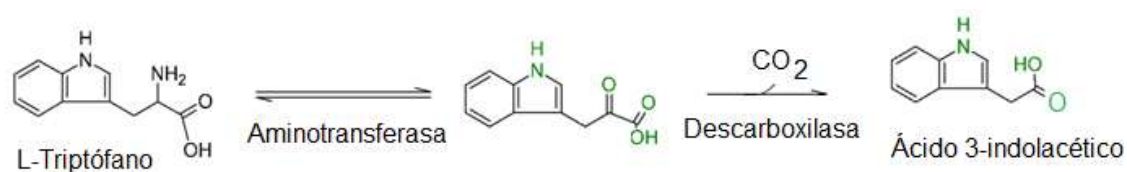


Figura 2. Representación esquemática de la ruta biosintética del ácido 3-indolacético.

Giberelinas (AG)

Las giberelinas constituyen un grupo amplio de ácidos carboxílicos tetracíclicos diterpenoides que poseen 20 o 19 átomos de carbono en su estructura química (Hedden y Thomas, 2012). Estas sustancias tienen funciones importantes como la estimulación del crecimiento y la activación de procesos como el alargamiento del tallo, la producción de pelos radiculares, la expresión del sexo, la germinación de las semillas y en conjunto con otras fitohormonas, participan en la transducción de señales (Ghorbanpour *et al.*, 2015).

La producción de AG por las BPCV se observó en diferentes géneros y especies como *Achromobacter xylosoxidans*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobia*, *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Herbaspirillum seropedicae* y *Azospirillum* spp. (Dodd *et al.*, 2010, Deka *et al.*, 2015).

Citoquininas

Las citoquininas están distribuidas ampliamente en varios grupos como las algas, las bacterias y las plantas superiores, aunque existe poca información disponible sobre la funciones de las citoquininas producidas por bacterias (Tirichine *et al.*, 2007), entre las que se refieren *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas savastanoi* (Zhang *et al.*, 2011).

Estos reguladores tienen funciones importantes en procesos fisiológicos como el control de la diferenciación celular en los tejidos meristemáticos de las plantas y en conjunto con las auxinas participan en la organogénesis (Jha y Saraf, 2015). Existen dos grupos basados en su estructura, el tipo adenina y el tipo fenil urea. Entre los miembros de la primera están la kinetina y la zeatina, mientras que la difenil urea y el tiazaurón pertenecen al segundo tipo (Figura 3).



Figura 3. Citoquininas derivadas de la adenina.

Las citoquininas retardan el proceso de la senescencia ya que intervienen en la acumulación de clorofila, y en la formación de órganos y de un amplio rango de tejidos. También estimulan el alargamiento de la raíz, la formación de pelos absorbentes, la expansión foliar y la iniciación del tallo (Sakakibara, 2006).

2.3.2.2. Fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para las plantas y su deficiencia en las plantas tiene un efecto negativo notable sobre el rendimiento de los cultivos. La sobreexplotación de los suelos provoca deficiencia de nitrógeno y por ello se utilizan los fertilizantes químicos nitrogenados para alcanzar máximos de productividad en la mayoría de los cultivos (Zhang *et al.*, 2015). Aproximadamente el 78 % del nitrógeno se encuentra en la atmósfera en forma de dinitrógeno (N₂); sin embargo, no puede ser asimilado e incorporado al metabolismo por la mayoría de los organismos, entre estos, las plantas (Baas *et al.*, 2014).

Para que el nitrógeno atmosférico sea incorporado a la cadena trófica, debe convertirse a una forma asimilable para las plantas, a través del proceso de fijación del nitrógeno por las bacterias fijadoras de nitrógeno (Cooper y Scherer, 2012). Como ejemplo de microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno están *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Frankia*, *Azoarcus*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, y *Herbaspirillum* (Babalola, 2010).

2.3.2.3. Solubilización de fosfato

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes que limitan el crecimiento óptimo de las plantas (Beltrán, 2014). Algunas bacterias heterotróficas y hongos tienen la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos a partir de fuentes insolubles como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 , y AlPO_4 y convertirlos en formas asimilables para las plantas (Goswami *et al.*, 2016). A estos microorganismos se les denomina solubilizadores de fosfatos. Entre las bacterias más eficientes se encuentran los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter* y *Agrobacterium* (Beltrán, 2014). La actividad de estos organismos depende de las condiciones ambientales, del suelo, las plantas y las cepas bacterianas presentes (Gupta *et al.*, 2015).

El mecanismo de solubilización de fosfatos está relacionado con la secreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales reducen el pH y quelatan cationes metálicos (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) unidos a fosfatos insolubles, con la consecuente liberación del fósforo en una de las formas solubles para la planta: la forma monobásica (H_2PO_4^-) y la dibásica (HPO_4^{2-}).

El proceso de solubilización está asociado con las propiedades de los grupos hidroxilos y carboxilos presentes en los ácidos orgánicos y otros compuestos como sideróforos e iones hidroxilos, que participan en la quelatación de los cationes metálicos y que permiten la liberación de los fosfatos (Bhardwaj *et al.*, 2014). Entre los ácidos orgánicos más frecuentes producidos por estos microorganismos están: acético, adípico, cítrico, fórmico, fumárico, glicólico, glucónico, indolacético, láctico, málico, malónico, oxálico, propiónico, succínico y 2-cetoglucónico (Goswami *et al.*, 2016).

La disminución del pH en el suelo por la secreción de los ácidos orgánicos también reduce la precipitación de dichos fosfatos por la presencia de Fe y Al en el suelo (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010). Estos mecanismos de solubilización de fosfatos no solo difieren entre los microorganismos, sino también depende de la fuente de fosfato aplicada a las plantas.

Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) también son capaces de mineralizar el fosfato orgánico insoluble, a través de la excreción de enzimas extracelulares como las fosfatasas, las cuales catalizan la hidrólisis de ésteres fosfóricos. Entre estas enzimas las fitasas tienen una importancia notable ya que son capaces de hidrolizar el hexafosfato de inositol o fitato, que constituye alrededor del 80% del total de formas en que se encuentra el fósforo orgánico (Alexander, 1977).

La inoculación con BSF aumenta la disponibilidad de P en la rizosfera y su absorción por la planta (Faria *et al.*, 2013). Es posible reducir la aplicación de P en un 50 % mediante el uso combinado de microorganismos solubilizadores de fosfatos sin afectar el rendimiento (Tahir y Aqeel, 2013).

2.3.2.4. Producción de sideróforos

El hierro es uno de los minerales más abundantes en la tierra y tiene funciones esenciales en las plantas, al constituir un cofactor de diferentes enzimas que participan en procesos importantes como la fotosíntesis, la respiración celular y la fijación del nitrógeno. Sin embargo, en el suelo no se encuentra de forma disponible para su asimilación directa por las plantas y los animales. Esto se debe a que el hierro férrico (Fe^{3+}), la forma más común de hierro en la naturaleza, es poco soluble (10^{-18} M a pH 7,0). Por lo tanto, la cantidad de hierro soluble en el suelo escasamente permite el crecimiento microbiano (Glick y Bashan, 1997). Para solucionar este problema, los microorganismos secretan proteínas de bajo peso molecular (0,4-1,0 kDa) que unen o quelatan Fe^{3+} con una afinidad elevada. La mayoría de los microorganismos aeróbicos y anaerobios facultativos producen sideróforos que unen y transportan iones férricos nuevamente hacia las células microbianas, donde son introducidos al interior mediante receptores de membrana (Bultreys *et al.*, 2001).

El hierro es un elemento con funciones vitales en el sistema fotosintético de las plantas y participa en diferentes rutas metabólicas biosintéticas (Jeong *et al.*, 2014). La cantidad de hierro soluble presente en el suelo no es siempre suficiente para garantizar producciones elevadas de los cultivos; de ahí la importancia de las rizobacterias que producen y secretan sideróforos y ácidos orgánicos.

Los sideróforos son moléculas peptídicas pequeñas que tienen una cadena lateral y un grupo funcional al cual se unen iones férricos y posteriormente son introducido en las plantas (Goswami *et al.*, 2016). La funcionabilidad de estos compuestos fue demostrada con el desarrollo de las tecnologías de la ingeniería genética, ya que los microorganismos transgénicos que sobreexpresan sideróforos aumentaron el crecimiento y la productividad de los cultivos (Simiyo *et al.*, 2016).

Los microorganismos productores de sideróforos también utilizan estas moléculas para enfrentar patógenos, ya que reducen la disponibilidad de hierro y otros ligandos útiles a los organismos patógenos (Shen *et al.*, 2013). Su elevada afinidad por los iones hierro hace posible su fácil extracción de la mayoría de los minerales y complejos orgánicos (Gupta *et al.*, 2015). En presencia de oxígeno y pH neutro, la forma reducida del Fe^{2+} no es estable, por lo cual es convertida fácilmente a Fe^{3+} . Esta última forma es un poco más soluble y está presente como hidróxido de hierro, el cual no es disponible para los sistemas biológicos (Saha *et al.*, 2015). Entre los tipos de sideróforos descritos están: carboxilatos, hidroxamatos, fenol catecolato, pioverdinas, enterobactinas, vibriobactinas, micobactinas, acinetobactinas, anguibactinas, yersiniabactina y pioquelina (Figura 4).

La actividad de los sideróforos presentes en cada microorganismo determina su capacidad de mejorar el desarrollo de la planta, siempre que la planta reconozca el complejo hierro-sideróforo para que pueda ser absorbido el mineral (Dimkpa *et al.*, 2009). Durante la competencia entre los microorganismos por los nutrientes y los minerales, la disponibilidad de los sideróforos puede definir cuáles organismos puede hacer uso de la fuente de carbono disponible a partir de los exudados de la raíz y de la rizodeposición (Crowley, 2006).

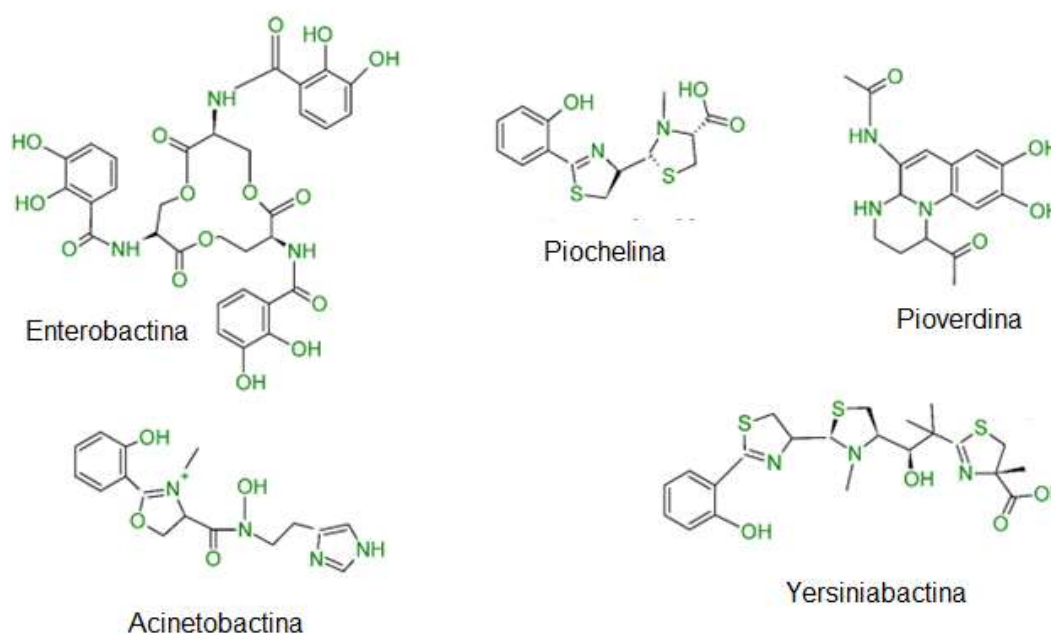


Figura 4. Estructura química de sideróforos producidos por bacterias que participan en el crecimiento de las plantas y el biocontrol de patógenos.

2.3.2.5. Efecto de la actividad enzimática ACC deaminasa en los niveles de etileno

Las BPCV contienen una enzima vital denominada ácido 1-aminociclopropano-1-carboxil (ACC) deaminasa (EC 4.1.99.4), la cual regula la producción de etileno ya que es capaz de metabolizar el ACC (un intermediario precursor de la biosíntesis de etileno en las plantas superiores), en α -cetobutirato y amonio. Esta enzima microbiana hidroliza irreversiblemente el ACC, por lo cual disminuyen los niveles de etileno en la planta, lo que permite una mayor resistencia del vegetal a una amplia variedad de estreses ambientales (Saraf *et al.*, 2010).

La enzima ACC deaminasa que poseen las BPCV, disminuyen una porción significativa de los daños fisiológicos que ocurren en las plantas debido a diferentes factores estresantes como la infección por patógenos, la exposición a temperaturas extremas, metales pesados, contaminantes orgánicos, concentraciones elevadas de sales, inundaciones y a la depredación por insectos. Para muchas especies de plantas el aumento en las concentraciones de etileno es necesaria para romper la dormancia de las semillas, pero posterior

a la germinación, los niveles elevados y sostenidos de esta fitohormona pueden inhibir el alargamiento celular (Kumar y Saraf, 2015).

Las BPCV que contienen la enzima ACC deaminasa, cuando se unen a las raíces de las plantas o a la cubierta de las semillas de un plántula durante el proceso de germinación, pueden actuar como un mecanismos para asegurar que los niveles de etileno dentro de los tejidos del vegetal, no alcancen niveles superior a punto en el cual afecte el crecimiento y el desarrollo de las raíces y de los brotes (Kumar y Saraf, 2015).

3.3.2.6. Actividad biocontroladora de las BPCV

Las bacterias que tienen actividades antagonistas contra patógenos de plantas y previenen o suprimen las enfermedades se denominan agentes biocontroladores. Un biocontrolador efectivo debe ser un colonizador de raíces vigoroso y tener la capacidad de competir y suprimir las acciones de los patógenos. Los géneros como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Agrobacterium* son estudiados predominantemente y se utilizan para el desarrollo de productos agrícolas con fines biocontroladores (Berkelmans *et al.*, 2003).

Algunas BPCV tienen la capacidad de suprimir enfermedades en las plantas y promover el crecimiento vegetal simultáneamente. Estas bacterias tienen su efecto mediante varios mecanismos tales como la competencia por los nutrientes (Babalola, 2010), la disminución de los niveles de etileno en la planta por acción de la enzima ACC deaminasa (Glick *et al.*, 2007), la producción de sideróforos y antibióticos, la resistencia sistémica inducida (RSI) y la resistencia sistémica adquirida (RSA), la síntesis de enzimas hidrolíticas tales como quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas, que pueden provocar la lisis o deformaciones de las células de los hongos patógenos (Saharan y Nehra, 2011, Goswami *et al.*, 2016).

3.3.2.5.1. Producción de sideróforos

Las RPCV que poseen actividad biocontroladora previenen la proliferación de patógenos del suelo y facilitan el crecimiento de las plantas a través de la producción de los sideróforos. Esto se debe a que los microorganismos quelatan

la mayoría del Fe³⁺ disponible en la rizofera, por lo cual inhibe el crecimiento y proliferación de hongos patógenos en la vecindad inmediata debido a la carencia de estos iones (O'Sullivan y O'Gara, 1992). Los sideróforos producidos por los hongos fitopatógenos tienen mucha menor afinidad por el hierro que los sideróforos de las RPCV (Pérez-Montaña *et al.*, 2016)

3.3.2.5.2. Producción de antibióticos

Los antibióticos constituyen uno de los antagonistas microbianos más comunes utilizados contra patógenos de plantas (Glick *et al.*, 2007). Estos constituyen un grupo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que afectan el crecimiento o la actividad metabólica de otros microorganismos (Ali *et al.*, 2015). Los antibióticos polimixina, circulina y colistina producidos por *Bacillus* spp. son activos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como otros hongos patógenos (Maksimov *et al.*, 2011). Entre las clases de antibióticos asociadas con la actividad biocontroladora de enfermedades de raíces están la fenazina, el floriglucinol, la pioluteorina, la pirrolnitrina, los lipopéptidos cíclicos, el cianuro de hidrógeno, las quinolonas y el resorcinol.

3.3.2.5.3. Resistencia Sistémica Inducida (ISR)

El aumento en los niveles de resistencia a enfermedades con el uso de agentes externos sin alterar el material genético de las plantas, se conoce como resistencia inducida (Hassen, 2007). Se describe también como un proceso en el cual los microorganismos no patogénicos reducen las enfermedades de las plantas mediante la activación de mecanismos de resistencia en las plantas (Van Loon *et al.*, 1998).

Algunas RPCB son capaces de provocar la inducción de la ISR. Los agentes inductores pueden ser bióticos o abióticos. La producción de fengicina por cepas de *Bacillus* es un caso convincente de la inducción de la ISR por RPCV (Ali *et al.*, 2015). La resistencia sistémica inducida fue estudiada en muchas rizobacterias inoculadas en plantas y se demostró inicialmente por Van Peer y Schippers (1992) quienes observaron un efecto protector de la cepa *Pseudomonas fluorescens* WCS417r frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi.

Bacillus subtilis también produce metabolitos y enzimas como surfactina, iturina y quitinasa, las cuales elicitan la resistencia sistémica inducida en planta por activación de la expresión de genes como se observó hojas de fresa (*Fragaria* spp.) (Yamamoto *et al.*, 2015).

Algunos estudios utilizaron la actividad de enzimas para inducir la RSI y determinar el mecanismo asociado. Estas actividades están determinadas por los agentes inductores, el genotipo de la planta, el patógeno y las condiciones fisiológicas de la planta (Yamamoto *et al.*, 2015). La RSI permite a la planta reaccionar rápidamente al ataque de patógenos donde el ácido jasmónico y el etileno también participan en la respuesta (Farace *et al.*, 2015). Muchas sustancias que contribuyen a la supresión de enfermedades en las plantas son atribuidas a la acción de las RPCV, lo que evidencia el uso viable de las RPCV para el desarrollo de un sistema agrícola sostenible, ya que pueden estimular tanto el crecimiento como la protección de las plantas frente a patógenos.

3.3.2.5.4. Resistencia sistémica adquirida (RSA)

Este fenómeno se analizó y practicó en 1961, cuando se infestaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con el virus del mosaico del tabaco y se descubrió un efecto protector en las plantas expuestas frente a otros virus, lo cual originó el término “Resistencia Sistémica Adquirida” (Ross, 1961). Los hongos, los virus, los nemátodos y las bacterias, pueden activar los mecanismos de defensa de las plantas, los cuales pueden ser un solo organismo o más que actúan en sinergismo, mediante la secreción de enzimas que provocan la patogénesis o contribuyen a esta (Ali *et al.*, 2015).

Entre las enzimas inductoras de la patogénesis están las lipooxigenasas, las peroxidases, las quitinasas y las glucanasas (Yamamoto *et al.*, 2015). Las peroxidases son expresadas durante la interacción entre el patógeno y las plantas hospederas, donde ocurren fenómenos como la oxidación de los fenoles, la protección de la planta, la lignificación y el alargamiento celular (Abhayashree *et al.*, 2016). La resistencia en muchas plantas como el arroz (*Oryza sativa* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) conlleva a un incremento en la actividad peroxidasa y lipooxigenasa, que provoca la inhibición del patógeno y la inducción de las fitoalexinas.

Las fitoalexinas constituyen un grupo de metabolitos secundarios como antibióticos y otros compuestos de bajo peso molecular, que son producidas por las plantas en respuesta a estreses físicos, químicos o biológicos (Bacon *et al.*, 2015). Las fitoalexinas son capaces de prevenir o reducir la actividad de los patógenos en dependencia de los genotipos de las plantas hospederas y del patógeno en cuestión. Estas sustancias tienen actividad biocida y están relacionadas directamente a los mecanismos de defensa de las plantas (Kulkarni y Lingraju, 2015).

3.3.2.5.5. Síntesis de enzimas hidrolíticas

Entre las enzimas hidrolíticas producidas por las bacterias están las glucanasas, las proteasas, las celulasas y las quitinasas. El efecto de estas enzimas está relacionado con la actividad lítica que tienen sobre componentes de la pared celular de patógenos u oosporas (estructuras reproductoras), lo que afecta directamente el crecimiento y desarrollo del patógeno, así como el proceso de germinación de las oosporas (Pérez *et al.*, 2016, Spadaro y Droby, 2016). Las RPCV productoras de enzimas líticas son utilizadas exitosamente en consorcios con otros agentes biocontroladores, lo que produce un efecto coinhibidor frente a los patógenos (Someya *et al.*, 2007).

2.4. Otras aplicaciones de las BPCV

2.4.1. Biorremediación

La biorremediación abarca el uso de microorganismos para solucionar problemas ambientales provocados por metales, derramamiento de petróleo y otras sustancias contaminantes y otros factores. Estos problemas afectan las prácticas agrícolas ya que la contaminación de los suelos puede provocar que no sean adecuados para estas labores. Así como los metales pueden ser útiles a las plantas, también pueden afectar su funcionamiento, cuando están en concentraciones excesivas.

Cuando los metales se encuentran en su forma inestable (oxidada), pueden afectar numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos en las plantas (Masood *et al.*, 2016); por ejemplo, pueden atacar biomoléculas importantes lo que afecta su actividad biológica y en consecuencia las rutas metabólicas donde éstas

participan (Wang *et al.*, 2016). Esto provoca un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (Azarmi *et al.*, 2016), así como de la toxicidad en plantas, ya que estos compuestos reaccionan con proteínas, lo que provoca trastornos en procesos como la fotosíntesis (Wang *et al.*, 2016).

Las BPCV se utilizan en procesos de biorremediación y está descrita su participación en la eliminación de metales pesados, mediante la producción de agentes quelantes como sideróforos; mientras que las plantas intercambian nutrientes para la nutrición y sobrevivencia de la microbiota. Según Tak *et al.* (2013), los microorganismos poseen diferentes mecanismos para el proceso de biorremediación como la fitoextracción, fitoestabilización, fitovolatilización, fitoestimulación y fitodegradación.

2.4.2. Aplicaciones industriales de las enzimas microbianas

Los microorganismos constituyen una fuente importante de enzimas con usos en diversas industrias. Enzimas como las celulasas, las amilasas y las mananasas se destacan por el número de aplicaciones en diferentes procesos.

Las mananasas son un grupo de enzimas que degradan el manano, el cual constituye el componente mayoritario de la fracción hemicelulósica de las maderas blandas, y tienen una distribución amplia en los tejidos de las plantas. Las enzimas que más degradan el manano son la β -mananasa (E.C 3.2.1.78), β -manosidasa (E.C 3.2.1.25) y la β -glucosidasa (E.C 3.2.1.21). La β -mannanasa es la más importante y degrada la hemicelulosa en oligómeros cortos de enlaces β -1,4, los cuales pueden ser hidrolizados posteriormente a manosa por β -manosidasas. Las enzimas β -mananasas son producidas por una variedad de organismos como bacterias, hongos, actinomicetos, plantas y animales y tiene un potencial de aplicaciones elevado en la Biotecnología y en diferentes industrias y procesos como 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).

Las enzimas amilasas también poseen una amplia aplicabilidad en diferentes industrias y tienen la función catalítica de degradar el almidón. Estas enzimas se caracterizan por su ubicuidad al estar presentes en plantas, animales y microorganismos. Sin embargo, los microorganismos productores de amilasas

reemplazaron exitosamente la metodología del procesamiento químico del almidón en diferentes industrias, debido al costo efectivo y al avance en el desarrollo de las tecnologías (Vengadaramana, 2013).

Actualmente, con la expansión en las aplicaciones, las investigaciones están enfocadas en el desarrollo de nuevas amilasas con estabilidad elevada al pH y la temperatura, para incrementar las velocidades catalíticas, mejorar la gelatinización del almidón, disminuir la viscosidad media y la posibilidad de la contaminación microbiana (Li *et al.*, 2012). En la tabla 1 se muestran las principales aplicaciones industriales de estas enzimas (Gupta *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2016).

Tabla 1. Aplicaciones industriales de las enzimas amilasas.

Industria	Aplicaciones
Alimenticia	Licuefacción del almidón y sacarificación, elaboración de siropes de maíz, incrementar el tiempo de vida de productos horneados como el pan.
Detergente	Eliminar las manchas asociadas a la deposición de almidón en las ropas.
Papel	Reducción en la viscosidad y aumento de la dureza.
Textil	Aumento de flexibilidad de las fibras.
Biocombustible	Producción de bioetanol.
Farmacéutica	Mejorar la digestibilidad.
Biorremediación	Biorremediación de residuales con contenidos de almidón.

La celulasa es otra de las enzimas de mayor interés industrial producida por bacterias celulolíticas (Sadhu, 2013), ya que convierten la celulosa en azúcares que se utilizan en la alimentación humana. A gran escala, estos azúcares pueden ser fermentados para generar bioetanol. Las celulasas también se aplican en la industria textil, donde se utilizan para pulir la tela y en la industria del detergente (Hill *et al.*, 2006).

2.5. Principales limitantes de la aplicación de las BPCV y perspectivas futuras

Aunque el efecto positivo de las BPCV sobre el crecimiento y el rendimiento de los cultivos está bien documentado, la práctica de esta estrategia todavía no está bien implementada en numerosas regiones del mundo. Esto se debe a que los resultados son inconsistentes por que la actividad promotora del crecimiento de la mayoría de las BPCV depende de las condiciones de cultivo en campo (Bly *et al.*, 2009).

Otro factor que puede ser responsable de la inconsistencia de las RPCV es la sensibilidad de las plantas y las condiciones del suelo, que limita la capacidad de las bacterias para colonizar la rizosfera y expresar los mecanismos de promoción del crecimiento. Estas condiciones abarcan diferentes aspectos como el tipo de suelo, la temperatura, el contenido de humedad, la materia orgánica y el pH (McSpadden-Gardener, 2004; Cakmakçi *et al.*, 2006).

Debido a que estas condiciones pueden variar considerablemente a través de las diferentes localidades geográficas, la efectividad de las BPCV se refiere frecuentemente como variable, en dependencia de la localización en la cual se realizó el estudio. En trabajos realizados por Suslow *et al.* (1979) en California, EUA, se obtuvo un aumento en el contenido de azúcar de la remolacha en condiciones de campo; sin embargo, los resultados no fueron buenos cuando se realizaron los ensayos en Idaho. Por el contrario, mientras que otra cepa produjo los mayores rendimientos en Idaho, cuando se utilizó en California no mostró la misma efectividad. Por estas razones, para que las RPCV tenga un uso comercial, se requiere que sean efectivas en diferentes condiciones ambientales; por lo que la selección de tales organismos todavía constituye un reto en el campo de la agricultura.

Las RPCV representan una alternativa atractiva y ecológica para la producción de alimentos en todos los países del mundo. El impacto negativo de los fertilizantes químicos sobre el medioambiente hace patente la necesidad de nuevos enfoques y estrategias más económicas y amigables con el ambiente. Unido a la selección de cepas con capacidades para estimular el crecimiento de los cultivos y controlar el ataque de patógenos; es necesario realizar estudios moleculares que permitan determinar los genes activos durante la interacción rizobacteria-planta y comprender los mecanismos de acción de estas BPCV.

La mayoría de los mecanismos que utilizan las BPCV para promover el crecimiento de las plantas son regulados por genes específicos. Por lo que el conocimiento de los genes responsables de estas vías regulatorias, permitirá estimular o disminuir la expresión de los metabolitos intermediarios que participan en estos procesos. La nueva generación de secuenciación en conjunto con los estudios metabolómicos y genómicos, serán la clave para avanzar en los mecanismos y funciones de las BPCV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en los laboratorios del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Matanzas. En la Figura 5 muestra las diferentes etapas de la investigación.

3.1. Esquema general del trabajo

Etapas generales de la investigación

1. Aislamiento de las colonias bacterianas

- 1.1. Colecta de las muestras
- 1.2. Siembra en medio Agar Nutriente (10^{-7} – 10^{-9})
- 1.3. Diluciones seriadas 10^{-1} – 10^{-9}
- 1.4. Aislamiento y siembra en medio Agar Nutriente

2. Identificación de cepas de *Bacillus* Gram + esporulados

- 2.1. Tinción de Gram
- 2.2. Selección de aislados bacilares Gram +
- 2.3. Tinción para observación de endosporas
- 2.4. Selección de aislados bacilares Gram + formadores de endosporas

3. Ensayos microbiológicos y bioquímicos

- 3.1. Actividad amilolítica
- 3.2. Actividad celulolítica
- 3.3. Actividad mananolítica
- 3.4. Actividad lipídica
- 3.4. Actividad proteolítica
- 3.5. Actividad quitinolítica / glucanolítica
- 3.6. Producción de HCN
- 3.7. Producción de ácidos orgánicos
- 3.8. Solubilización de fosfatos
- 3.9. Producción de ácido 3-indolacético

4. Selección y conservación de los aislados

- 4.1. Conservación en glicerol 20%

Figura 5. Etapas generales de la investigación.

3.2. Aislamiento de los aislados bacterianos

3.2.1. IHPLUS®

Los experimentos se realizaron con el lote 31 de inóculo líquido del IHPLUS® caracterizado según el procedimiento normalizado de operación (PNO-LB-M-008/2014) de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” y los resultados aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización del lote 31.

Características organolépticas	Lote 31
Olor	Agradable a vino
Características físico-químicas	
pH	3,87
Conteo total de microorganismos (UFC)	
Bacterias aeróbicas	10 ⁶
Bacterias anaeróbicas	10 ⁵
Hongos y levaduras	10 ⁴ -10 ⁵
Lactobacilos	10 ⁴
Ausencia de microorganismos patógenos	
<i>Escherichia coli</i>	No presencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	No determinado
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	No presencia
<i>Salmonella typhi</i>	No presencia
<i>Coliformes fecales y totales</i>	No presencia
<i>Shigella</i>	No presencia
<i>Clostridium perfringens</i>	No presencia

El conteo total de los principales grupos de microorganismos benéficos se encontró dentro de lo establecido para la producción y no tuvo crecimiento de patógenos. Además, a los 3 meses de la realización de las pruebas de calidad se volvió a comprobar la ausencia de microorganismos no deseados y se obtuvieron resultados satisfactorios.

3.2.2. Siembra en Caldo Nutriente

Con el objetivo de incrementar la población bacteriana presente en el suelo rizosférico, se inocularon 10 mL del producto IHPLUS® en 90 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 6). Posteriormente, los medios de cultivo se colocaron en baño María a 80 °C durante 12 minutos para eliminar todas las formas vegetativas y comenzar el proceso de aislamiento a partir de endosporas resistentes a estas condiciones.

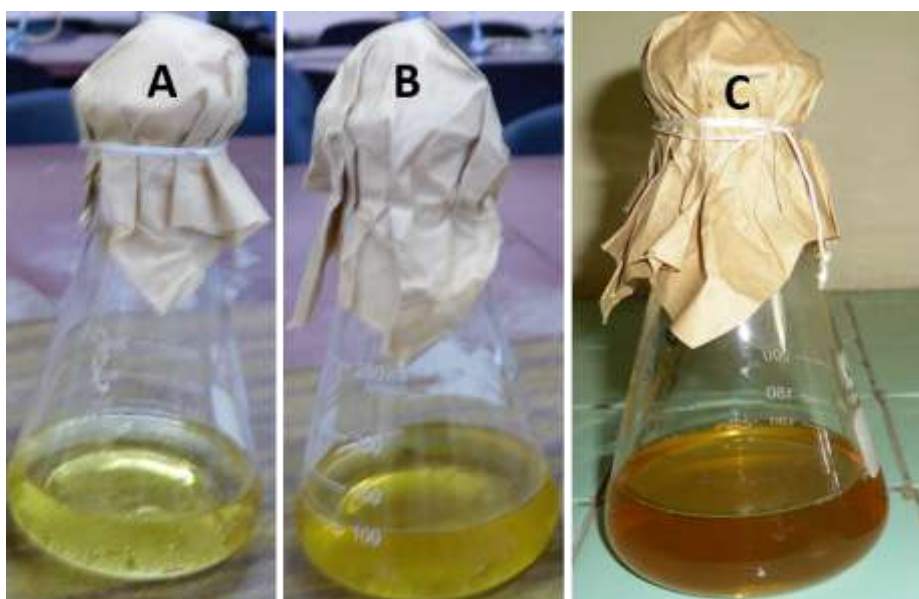


Figura 6. Crecimiento de los microorganismos del producto IHPLUS® en Caldo Nutriente. A: erlenmeyer con medio Caldo Nutriente sin inocular. B: erlenmeyer con medio Caldo Nutriente inmediatamente después de la inoculación. C: crecimiento microbiano en el medio de cultivo posterior a 72 h de incubación.

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 las suspensiones microbianas en solución salina (NaCl 0,9 %). Se tomaron alícuotas de 100 μ L de las diluciones 10^{-1} - 10^{-5} 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.

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 (Figura 7). Los aislados se identificaron numéricamente y se colocaron en similares condiciones al acápite anterior.

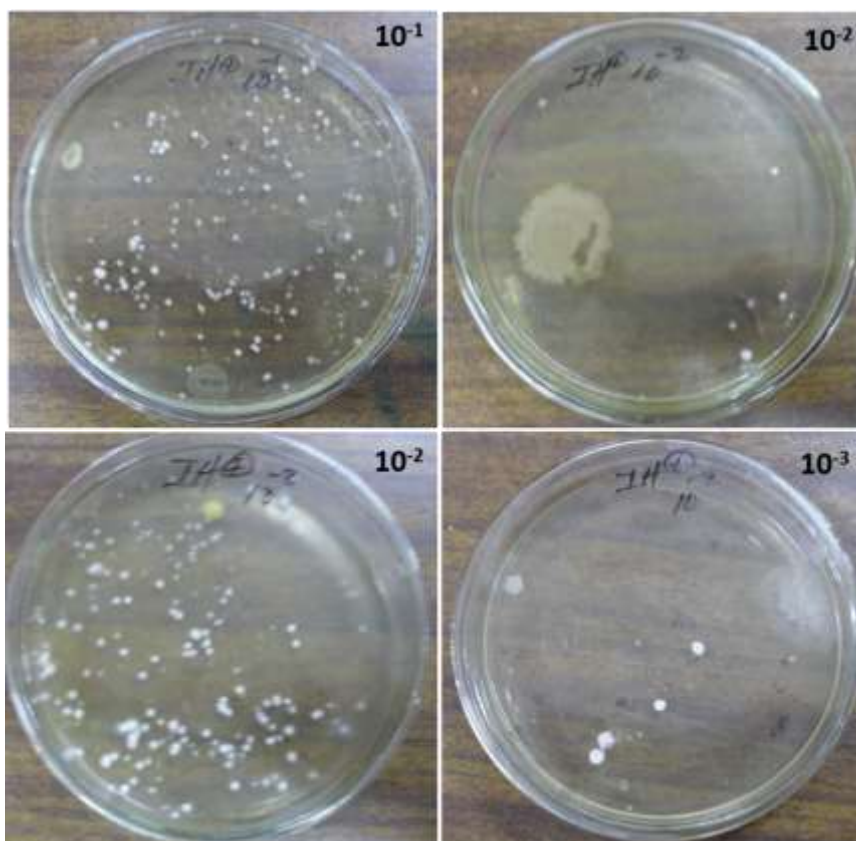


Figura 7. Aislados obtenidos del producto IHPLUS®. En la esquina derecha superior de las fotografías se muestra la dilución.

3.3. Identificación de los aislados de *Bacillus* Gram + productores de endosporas

Posterior a las 24 h de crecimiento se realizó una tinción de Gram a todas las colonias aisladas, para identificar los aislados con morfología bacilar y Gram positivos. A las colonias que mostraron estas características se le realizó una tinción verde de Malaquita a las 72 h de sembradas 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 8).

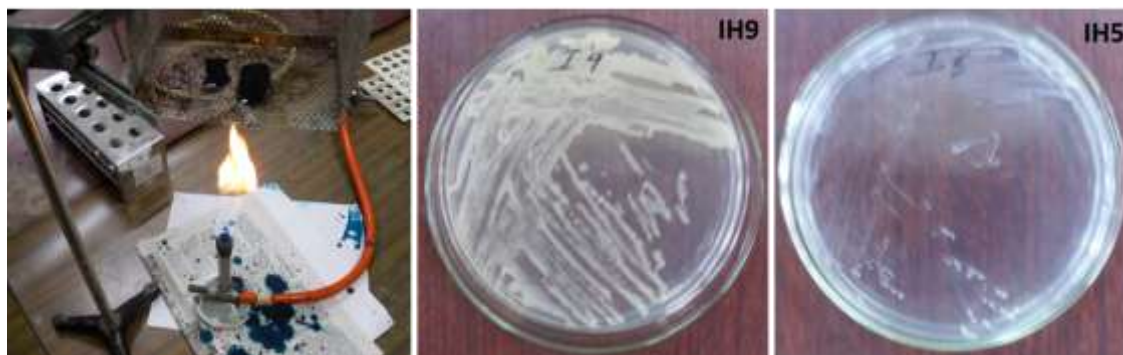


Figura 8. Tinción de endospora (izquierda) y purificación de los aislados IH9 e IH5 (derecha).

3.4. Ensayos bioquímicos y microbiológicos

3.4.1. Ensayos bioquímicos

3.4.1.1. Producción de ácido 3-indolacético (AIA)

La producción de ácido indolacético se determinó con el método de Loper y Schroth (1986). Los aislados bacterianos (un asa calibrada llena) se inocularon en erlenmeyers de 25 mL de volumen con 10 mL de Caldo Nutriente suplementado con L-triptófano ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los medios de cultivo se colocaron en condiciones de agitación (130 rpm), oscuridad y $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Posteriormente, las suspensiones celulares se centrifugaron a 6 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colectó para la determinación cualitativa y cuantitativa de ácido 3-indolacético. Se utilizó como control negativo el medio de cultivo sin inóculo.

3.4.1.1.1. Determinación cualitativa de AIA

Se colocaron alícuotas de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de los sobrenadantes correspondientes a los aislados obtenidos, en placas de 96 pocillos y se adicionaron posteriormente $100 \text{ }\mu\text{L}$ del reactivo Salkowski (ácido perclórico HClO_4 $3,48 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y FeCl_3 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Este reactivo permite establecer la presencia de grupos indol en las soluciones que contengan, entre otros compuestos, tejidos vegetales y extractos de cultivos microbianos. El desarrollo de una coloración entre rosado y rojo fucsia indicó la presencia de grupos indol presumibles como compuestos auxínicos (Celis y Gallardo, 2008).

3.4.1.1.2. Determinación cuantitativa de AIA

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

3.4.2. Determinación cualitativa de la producción de ácidos orgánicos

La capacidad de producir ácidos orgánicos se determinó inoculando los aislados bacterianos en erlenmeyers de 25 mL de volumen, con 10 mL de medio de cultivo compuesto por glucosa (5 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (5,0 g.L⁻¹) y peptona (5,0 g.L⁻¹), pH 7,3. Los inóculos se incubaron en agitación (130 rpm) a 37 °C, durante 48 h. Posteriormente se colocaron alícuotas de 200 µL de cada cultivo bacteriano en placas de 96 pocillos y se adicionaron 100 µL del indicador rojo metilo (0,02 %). El cambio instantáneo del color amarillo del medio de cultivo a rojo, indicó la formación de ácidos orgánicos (Trivedi *et al.*, 2013).

3.4.3. Ensayos microbiológicos

3.4.3.1. Solubilización de fosfatos

La capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos por los aislados bacterianos se determinó en medio Agar Pikovskaya (1948) compuesto por: glucosa (10,0 g.L⁻¹), Ca₃(PO₄)₂ (5,0 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (0,5 g.L⁻¹), KCl (0,2 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,1 g.L⁻¹), MnSO₄ (0,002 g.L⁻¹), FeSO₄ (0,002 g.L⁻¹), extracto de levadura (0,5 g.L⁻¹), Agar (15,0 g.L⁻¹). Los aislados se sembraron en placas Petri con el medio de cultivo y se incubaron a 37 °C durante siete días. La eficiencia de solubilización (ES) se determinó mediante la fórmula siguiente:

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

Donde,

Z: diámetro del halo de hidrólisis

C: diámetro de la colonia bacteriana

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

La levadura panadera (*Saccharomyces cerevisiae*) contiene en sus paredes celulares quitina y β -1,3-glucano (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). Se disolvieron 4,0 g.L⁻¹ de levadura panadera y 16 g.L⁻¹ de agar en agua destilada y el medio se esterilizó a 121 °C durante 20 min. Los aislados 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 y se expresó en términos de eficiencia (%) igual a la actividad anterior.

3.4.3.3. Actividad lipídica

La actividad lipídica se determinó con la siembra de las cepas en un medio de cultivo compuesto por peptona (10 g.L⁻¹), cloruro de calcio (0,1 g.L⁻¹), cloruro de sodio (5 g.L⁻¹), agar (15 g.L⁻¹) y 10 mL de Tween 80 (Omidvari, 2008). La peptona y las sales se disolvieron en 990 mL de agua destilada. Posteriormente se autoclavaron por separado el Tween 80 y el medio de cultivo a 121 °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 °C durante 48 h. Las deposiciones alrededor de las colonias bacterianas indicó la actividad de la enzima lipasa. El índice de potencia se determinó mediante la medición del diámetro de zona clara 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 3.4.3.1 y se expresó en %.

3.4.3.4. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se realizó de acuerdo al método de Marhofer *et al.* (1995). Los aislados fueron sembrado en placas Petri con medio de cultivo compuesto por 15 g.L⁻¹ de leche descremada, 0,5 g.L⁻¹ de extracto de levadura, 15 g.L⁻¹ de agar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. 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 3.4.3.1.

3.4.3.5. Producción de cianuro de hidrógeno (HCN)

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

3.4.3.6. Actividad amilolítica

Se determinó según el método de Karnwal (2011). Los aislados bacterianos se sembraron en un medio compuesto por: NaCl 0,1 %, KH₂PO₄ 0,3 %, K₂HPO₄ 0,6 %, MgSO₄ 0,12 %, peptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 % y suplementado con almidón soluble (1,0 %) y agar 15 g.L⁻¹. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad amilolítica se observó mediante la tinción del medio de cultivo con la solución yodada de Gram (yodo 2 % y yoduro de potasio 0,2 %). La presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia indicó la producción de enzimas amilasas. La capacidad de producir estas enzimas se evaluó cualitativamente como: ausencia (-), bajo (+), medio (++) y alto (+++).

3.4.3.7. Actividad celulolítica

Los aislados bacterianos se sembraron en medio de cultivo compuesto por: NaCl 0,1 %, KH₂PO₄ 0,3 %, K₂HPO₄ 0,6 %, MgSO₄ 0,12 %, peptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 %, suplementado con carboximetil celulosa (1,0 %) y agar 15 g.L⁻¹. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y la actividad celulolítica se determinó mediante la tinción del medio de cultivo con una solución de Rojo Congo (0,5 %). La presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia indicó producción de enzimas celulolíticas. El índice de potencia se determinó mediante la fórmula descrita en el acápite 3.4.3.1 y se expresó en %.

3.4.3.7. Actividad mananolítica

Se determinó mediante la siembra de los aislados bacterianos en el medio de cultivo compuesto por: NaCl 0,1 %, KH₂PO₄ 0,3 %, K₂HPO₄ 0,6 %, MgSO₄ 0,12 %, peptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 %, suplementado con goma de algarrobo (LBG, por las siglas en inglés de Locust Beans Gum) (0,5 %) y agar 15 g.L⁻¹ (Matos *et al.*, 2018). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y 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 descritas en el acápite 3.4.3.1 y se expresión en %.

2.5. Conservación de las cepas bacterianas

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

2.6. Procesamiento estadístico

Todas las actividades bioquímicas se determinaron por triplicado. Los datos fueron procesados según paquete Statgraphic plus 5.1 sobre WINDOW. Se determinó el ajuste a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett. 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 3. Se obtuvo un total de 20 aislados entre bacilos esporulados (4), bacilos no esporulados (5), cocos (6) con diferentes agrupaciones (diplococcus, tetracoccus, en sarcinas, etc.), así como otras formas, fundamentalmente actinomicetos (5) (Figura 9). El porcentaje general de formas bacilares con capacidad de esporular con respecto al total de aislados fue de 20,0 %. El hecho de que se obtuvieron pocos aislados en número y diversidad, puede estar relacionados con el pH ácido del producto IHPLUS® (3,87) que afecta el crecimiento de los bacilos.

Tabla 3. Resultados del aislamiento de cepas bacterianas del producto IHPLUS®.

Aislados	Formas bacilares	Cocos	Otros	BNE	BE	Total
IH	9	6	5	5	4	20
%	45	30	25	25	20	100

BNE: bacilos no esporulados, BE: bacilos esporulados.

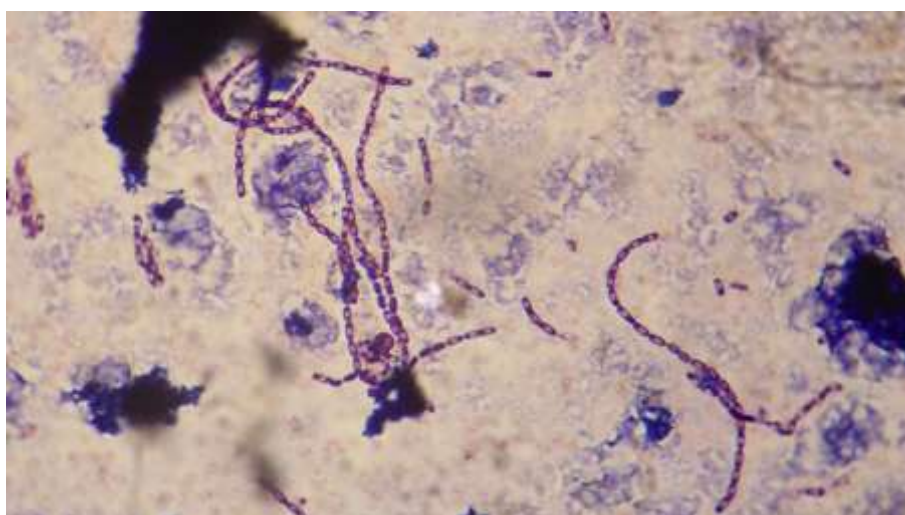


Figura 9. Tinción de Gram al aislado IH7: bacilos Gram positivos en cadena con esporas ovales centrales.

4.2. Propiedades bioestimulantes de los aislados bacterianos

4.2.1. Producción de ácido indolacético

El ácido indolacético constituye una auxina natural producida por las plantas y amplia gama de microorganismos del suelo. Las Figuras 10 y 11 muestran los resultados del análisis cualitativo y cuantitativo de la producción de AIA. Como se puede observar, los mejores resultados se obtuvieron con el aislado IH7 con una concentración de $23,55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que los aislados IH4, IH5 e IH9 produjeron valores bajos sin diferencias estadísticas entre estos.

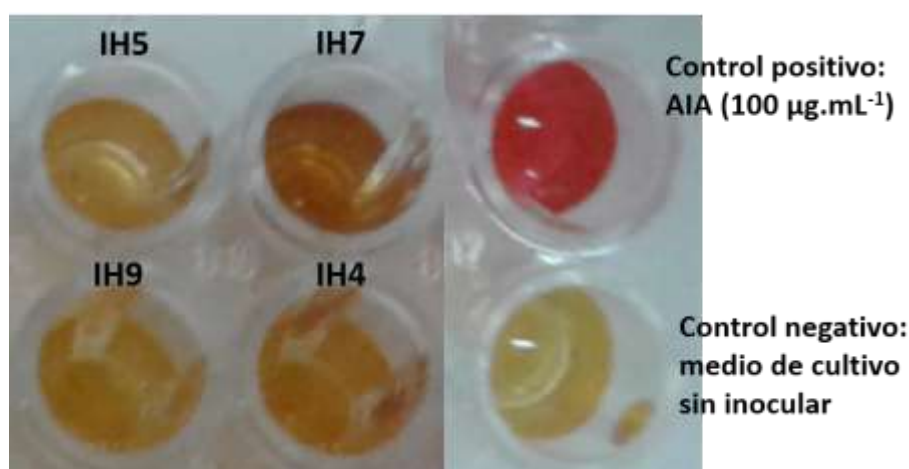


Figura 10. Ensayo cualitativo de la producción de AIA por los aislados bacterianos.

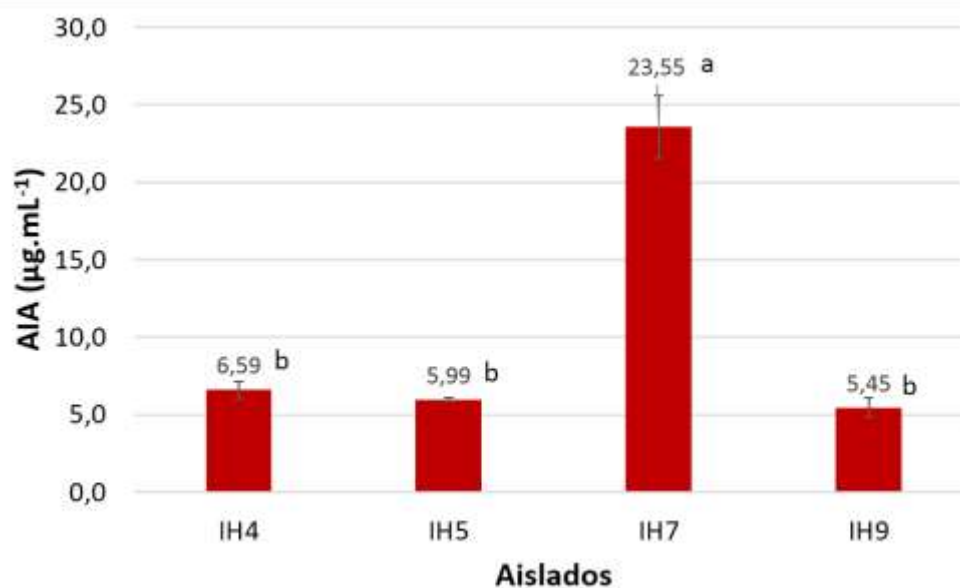


Figura 11. Ensayo cuantitativo de la producción de AIA. Letras distintas indican diferencias significativas entre aislados según Prueba de Newman-Keuls ($P \leq 0,05$).

Estos resultados se corresponden con los observados por Thakur y Parikh (2018), quienes obtuvieron valores de AIA entre 3,85 y 11,65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con aislados rizosféricos de *Bacillus* spp. obtenidos de la rizosfera de plantas de maní (*Arachis hypogea* L.). De manera similar, otros autores refirieron valores de esta auxina en este rango, en aislados bacterianos obtenidos de la rizosfera de *Piper nigrum* L. (Thanh y Tram, 2018), *Zea mays* L. (Thanh *et al.*, 2016) y *Aloe vera* L. (Thakur *et al.*, 2017).

Otros estudios realizados con cepas de *Bacillus* spp. mostraron valores de AIA superiores a IH7, como por ejemplo *Bacillus* sp. CaSUT007 con 31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Buensanteai *et al.*, 2013). Estas diferencias en la concentración de AIA pueden estar relacionadas con la especie bacteriana, así como el medio de cultivo, el tiempo de crecimiento y la concentración de L-triptófano utilizado como precursor de la síntesis de esta auxina (Buensanteai *et al.*, 2013).

En el caso de la presente investigación, el aislado IH7 constituye un candidato potencial como bioestimulador del crecimiento vegetal. En estudios realizados con cepas de *Bacillus* sp. productores de AIA se observó un aumento del desarrollo radicular de *Triticum aestivum* L. (Fatima *et al.*, 2009), *Allium cepa* L. (Reetha *et al.*, 2014) y *Glycine max* L. (Araujo *et al.*, 2005); de la germinación y el crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y fabas (*Vicia faba* L.) (Yousef, 2018), así como del rendimiento del trigo (Baghaeeravari y Heidarzadeh, 2014) y la soya (*Glycine max* L. Merrill) (Sushil *et al.*, 2013). Por otra parte, la producción de ácido indolacético por IH7 puede actuar además como un mecanismo de biocontrol, relacionado con la inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento del micelio en hongos fitopatógenos (Uneo, 2004).

Sin embargo, es necesario comprobar el efecto de los aislados promisorios obtenidos en la presente investigación, sobre el proceso de la germinación y el crecimiento de cultivos de importancia agrícola; ya que la respuesta de las plantas depende la concentración de este regulador en el medio y del genotipo vegetal, entre otros factores. En varios estudios con *Bacillus* sp. se evidenció una respuesta variable sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Egamberdiyeva (2007) refirió un efecto positivo de *Bacillus* sobre la germinación

y el crecimiento vegetal asociado a la producción de sustancias reguladoras del crecimiento. De manera similar, Vrbničanin *et al.* (2011) observaron una respuesta positiva en la germinación de *Ambrosia artemisiifolia* L. con el uso de *Bacillus pumilus*. Por el contrario, estos últimos autores determinaron un efecto inhibitorio sobre *A. artemisiifolia* L. con la aplicación de *Bacillus licheniformis*.

En otros trabajos similares, pero con otra especie descrita como BPCV, *Pseudomonas fluorescens*, se observó en algunos casos un comportamiento bioestimulador (Zdor *et al.*, 2005) y en otros inhibitorio (Vrbničanin *et al.*, 2011). Carrillo-Castaneda *et al.* (2002) refirió que *P. fluorescens* tiene un efecto variable sobre la germinación de la alfalfa (*Medicago sativa* L.), en dependencia del medio de cultivo donde se desarrolle la bacteria.

4.2.2. Propiedades biofertilizadoras de los aislados

4.2.3. Solubilización de fosfatos

El resultado del ensayo de solubilización de fosfato se muestra en la Figura 12. Entre los aislados obtenidos solamente IH4 mostró la capacidad de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, con un índice potencia de 68,25 %. En trabajos realizados por Thanh y Tram (2018), se obtuvieron aislados rizosféricos de *Bacillus* spp. con eficiencias similares o inferiores a las observadas por IH4.



Figura 12. Solubilización de fosfato tricálcico por los aislados bacterianos. La flecha muestra el halo de claro alrededor de la cepa que indica la actividad solubilizadora de fosfato.

Se realizó un estudio de la capacidad de producción de ácidos orgánicos por los aislados como mecanismo posible para la solubilización de fosfatos. El análisis del medio de cultivo mediante la adición del indicador rojo metilo, mostró que no hubo cambios de pH (el indicador varió su coloración instantáneamente de rojo a amarillo); por lo cual, los aislados no producen en el medio de cultivo utilizado cantidades significativas de ácidos orgánicos (Figura 13).

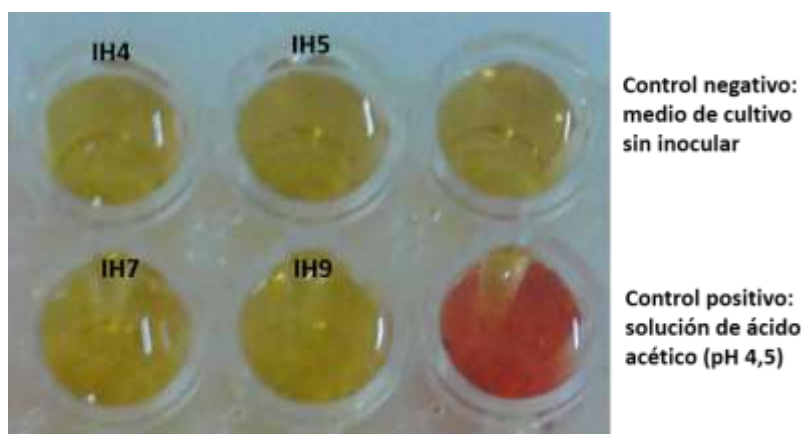


Figura 13. Ensayo cualitativo de la producción de ácidos orgánicos por los aislados bacterianos.

Este resultado indica que el aislado IH4 posee otros mecanismos para la solubilización del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, como la secreción de otros compuestos como iones hidroxilos. No obstante, es posible que en el caso específico del aislado IH4, este produzca ácidos orgánicos en el medio Pikovskaya con presencia de fosfato tricálcico, como inductor de la síntesis de ácidos orgánicos.

El uso de IH4 en consorcio con otros aislados puede contribuir a elevar el crecimiento y desarrollo de cultivos. El empleo de solubilizadores de fosfatos eleva la disponibilidad del fósforo para los cultivos, que tiene funciones vitales al ser un componente estructural de ácidos nucleicos, fosfolípidos y moléculas ATP. Además, este elemento incrementa la producción de semillas y frutos y estimula el crecimiento de las raíces (Ranjbar-Moghaddam y Aminpanah, 2015).

Es importante señalar que es necesario realizar estudios adicionales en condiciones *in vivo*, ya que un aislado bacteriano que produce cantidades considerables de AIA y es buen solubilizador de fosfatos en el laboratorio, puede no exhibir estas propiedades en condiciones de campo y por el contrario, algunas BPCV pueden no producir AIA o fosfatos solubles en cantidades significativas en

condiciones *in vitro*, pero en el campo pueden estimular notablemente el crecimiento y la productividad de las plantas.

4.2.3. Propiedades antagónicas de los aislados

4.2.3.1. Producción de cianuro de hidrógeno

La producción de cianuro de hidrógeno forma parte del sistema de defensa de algunos microorganismos. El estudio de la capacidad de producción de este gas tóxico, mostró que solo el aislado IH7 (25 %) es capaz de sintetizar este compuesto, lo cual se evidenció por el cambio de coloración del papel de filtro de amarillo a pardo rojizo (Figura 14).



Figura 14. Producción de cianuro de hidrógeno por el aislado IH7 (derecha). Izquierda: control (placa con medio de cultivo estéril sin inocular).

En estudios similares relacionados con la evaluación de aislados rizosféricos se observó la producción de cianuro de hidrógeno por varios autores con porcentajes diferentes (El-Sayed *et al.*, 2014, Agbodjato *et al.*, 2015; Thakur y Parikh, 2018). Este compuesto se considera un agente biológico importante para el control de varios patógenos de plantas, ya que bloquea la cadena de transporte electrónica mitocondrial, al formar complejos con algunos metales como el cobre e inactivar enzimas como la citocromo oxidasa. Esto provoca una disminución en la producción de ATP indispensable para todos los procesos metabólicos (Blumer y Haas, 2000).

4.2.3.2. Producción de enzimas líticas

Con el objetivo de evaluar capacidad de los aislados de producir enzimas líticas, se evaluaron las actividades β -1,3-glucanólítica y/o quitinolítica, lipídica y proteolítica (Tabla 4, Figura 15). Los aislados IH4 e IH7 mostraron actividad β -1,3-glucanólítica y/o quitinolítica. En el caso de IH7 la efectividad resultó mayor (95,55 %) que el IH4 (43,98%). No se determinó actividad lipídica de ninguno de los aislados, mientras solo IH7 expresó también actividad proteolítica con un índice de potencia de 43,98 %. Estos resultados concuerdan con otros trabajos con cepas de *Bacillus* sp. donde también se observaron actividades quitinolíticas (Bhatt y Bharatkumar, 2014) y proteolíticas (Majumdar y Chakraborty, 2017).

Tabla 4. Actividades β -1,3-glucanólítica y/o quitinolítica, lipídica y proteolítica de los aislados.

Aislados	Actividades (Índice de Potencia %)		
	β -1,3-glucanólítica y/o quitinolítica \pm EE	Lipídica \pm EE	Proteolítica \pm EE
IH4	23,15 ^b \pm 0,92	-	-
IH5	-	-	-
IH7	95,55 ^a \pm 3,61	-	43,98 \pm 4,75
IH9	-	-	-

Letras diferentes indican diferencias estadísticas según Prueba de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).



Figura 14. Actividad β -1,3-glucanólítica y/o quitinolítica de los aislados IH7 e IH4.

La actividad proteolítica obtenida con IH7 fue superior a la observada en otros aislados de *Bacillus* spp. extraídos de la rizosfera de *Aloe vera* L. con valores índice de potencia entre 11,3 y 21,8 % (Thakur *et al.*, 2017). Estos resultados pueden sugerir el empleo de este aislado como biocontrolador de fitopatógenos. Los trabajos relacionados con cepas de *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. tequilensis*, evidenciaron las potencialidades de este género para la producción de enzimas quitinasas (Dar *et al.*, 2018).

Un estudio de la capacidad antagónica de la cepa productora de proteasas *Bacillus subtilis* B28, demostró ser efectiva frente al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris* y además, estimuló el crecimiento de *Cicer arietinum* L., al incrementar indicadores como la altura de la planta y el peso seco y fresco en comparación con plantas control sin tratar (Karimil *et al.*, 2012).

La obtención de aislados con actividades quitinolíticas y/o glucanolíticas y proteolítica, indican un uso potencial de IH7 como biocontrolador de fitopatógenos, ya que estas enzimas provocan la lisis o alteran los componentes de las paredes celulares de los hongos (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.

Es importante también señalar que en el caso de los aislados obtenidos del producto IHPLUS®, estos tienen también la capacidad de tolerar pH ácidos inferiores a valores de 4, por lo cual es posible que posean enzimas tolerantes a este pH. Esto sugiere un posible empleo de los aislados con actividad promotora y antagónica en suelos ácidos.

4.2.4. Producción de enzimas con aplicaciones industriales

Para determinar las potencialidades de los aislados con fines industriales se evaluó la capacidad de producción de tres enzimas importantes: amilasas, celulasas y mananasas. En la Tabla 5 y Figura 16 se muestran los resultados de estos ensayos. Con relación a la actividad amilolítica, los aislados IH5 e IH7 mostraron la capacidad de expresar amilasas. En el caso de IH4 no se pudo

determinar debido a que este aislado secreta sustancias cerosas hidrofóbicas que cubren el medio de cultivo, por lo cual no fue posible revelar la actividad mediante la tinción del medio. Con relación al resto de las actividades evaluadas, el aislado IH7 mostró también una actividad celulolítica notable (152,06 %) e IH5 fue capaz de producir mananases con un índice de potencia igual a 94,44%.

Tabla 5. Actividades amilolítica, celulolítica y mananolítica de los aislados.

Aislados	Actividades (Índice de Potencia %)		
	Amilolítica	Celulolítica ± EE	Mananolítica ± EE
IH4	No determinada	-	-
IH5	+	-	94,44 ± 5,56
IH7	+	152,06 ± 14,23	-
IH9	-	-	-

Los resultados obtenidos son congruentes con los observados por otros autores quienes refirieron actividades amilolíticas (Saxena *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011) y celulolíticas (Sadhu y Maiti, 2013; Bhatt y Bharatkumar, 2014) en *Bacillus* spp. Varias especies de *Bacillus* se utilizan ampliamente para la obtención de α -amilasas para fines industriales como por ejemplo *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* (Saini *et al.*, 2017). La actividad celulolítica observada en IH7 sugiere posibles aplicaciones en diferentes áreas como por ejemplo la agropecuaria. El sinergismo entre la producción de celulasas y antibióticos en bacterias, puede suprimir enfermedades provocadas por hongos patógenos (El-Tarabily *et al.*, 1996). Por ejemplo, *Paenibacillus ehimensis* KWN38 produce compuestos antifúngicos en combinación con enzimas líticas, especialmente celulasas y β -glucanasas, las cuales protegen a los cultivos de oomicetos patogénicos, tales como cepas del género *Phytophthora* (Naing *et al.*, 2014). Además, las celulasas descomponen la materia orgánica celulósica presente en la rizosfera y con ello se aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

De manera similar, diferentes especies de *Bacillus* manifestaron actividad mananolítica como por ejemplo: *Bacillus nealsonii* (Chauhan *et al.*, 2012), *Bacillus subtilis* (Huang *et al.*, 2012), *Bacillus* sp. (Hossain *et al.*, 1996).

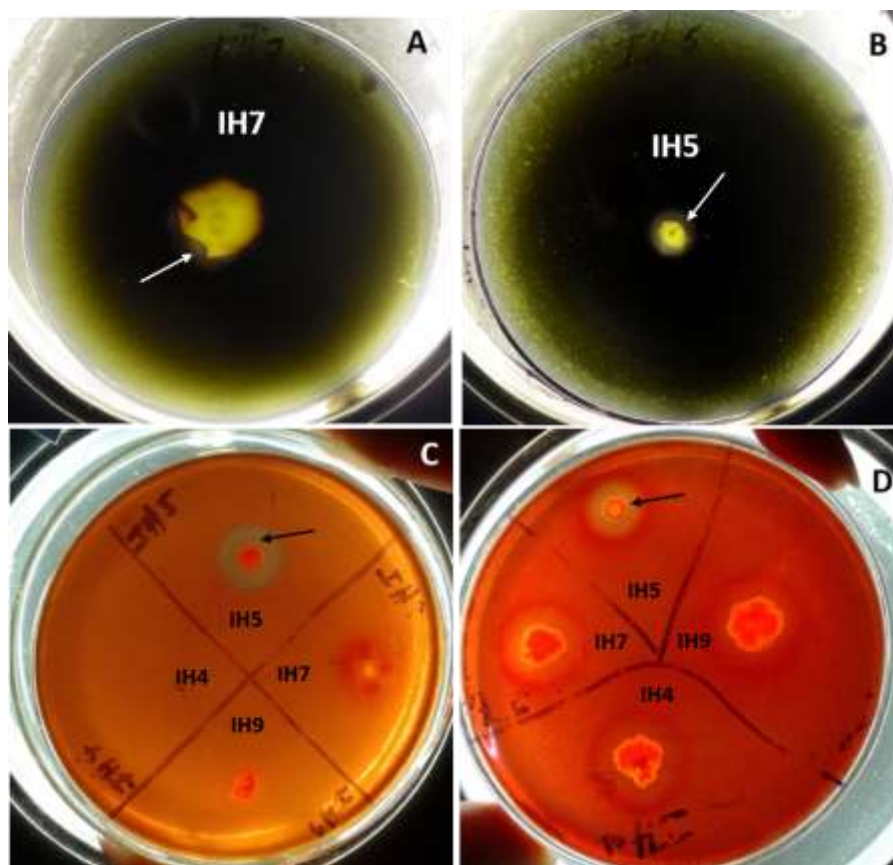


Figura 16. Actividad amilolítica (A y B) y mananolítica (C y D) de los aislados de bacterianos IHPLUS®. Las flechas indican los halos de hidrólisis enzimática.

La actividad mananolítica notable observada por IH5 sugiere un uso potencial de este aislado en diferentes áreas agropecuarias e industriales, como por ejemplo, para mejorar la digestibilidad y absorción de nutrientes, en animales que se alimentan de desechos fibrosos de plantas como el bagazo de la caña de azúcar y la paja de maíz (Matos *et al.*, 2018).

El desarrollo de procesos fermentativos en estas materias prima con IH5, pudiera digerir parcialmente diferentes componentes de las paredes celulares, ya que las mananasas hidrolizan los enlaces β -1,4-mananosídicos presentes en esqueletos carbonados de manano, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos (Naughton *et al.*, 2001), con la producción de varios oligosacáridos como productos mayoritarios. Este proceso eleva la disponibilidad y asimilación de nutrientes energéticos en animales monogástricos como aves de corral, etc.

IH5 también puede ser utilizado en la fabricación de pulpa y papel (Pan *et al.*, 2011), detergente (Bettioli *et al.*, 2000), café (Van Zyl *et al.*, 2010), así como en la industrias farmacéuticas (Parisi *et al.*, 2002), de aceites y gas (Varnai *et al.*, 2011).

4.3. VALORACIÓN ECONÓMICA

Durante el siglo pasado, la industrialización de la agricultura provocó un incremento sustancial de la productividad de los cultivos y de la disponibilidad de alimentos. Unido a este resultado, aparecieron serios problemas ambientales y sociales, que deben ser enfrentados y resueltos a corto y mediano plazo. Actualmente, es necesario mantener producciones elevadas pero con el mínimo impacto sobre el medio ambiente. Por lo tanto, se deben encaminar esfuerzos por desarrollar una agricultura ambientalmente sostenible, donde se preserven los ecosistemas y la biodiversidad.

Una vía potencial para disminuir los efectos negativos del uso de fertilizantes químicos, herbicidas y pesticidas, es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento de plantas. La diversidad de mecanismos biológicos que poseen estos microorganismos, permite que puedan ser utilizados en consorcio y potenciar el efecto total sobre los cultivos.

La producción de sustancias reguladoras del crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas por las BPCV, constituye un mecanismo bien establecido para estimular el crecimiento de las raíces de las plantas; por lo cual, aumenta la capacidad de absorción de agua y sales minerales en condiciones normales o en presencia de déficit hídrico.

Por otra parte, la obtención de aislados productores de AIA, puede constituir una vía para desarrollar productos enraizadores de estacas, en cultivos donde se utiliza la multiplicación vegetativa como forma fundamental de propagación. Esto contribuye a elevar la eficiencia del proceso al aumentar el porcentaje de supervivencia. Además, el aislamiento de estas sustancias con actividad biológica, puede utilizarse en laboratorios de cultivo de tejidos vegetales en

diferentes etapas del proceso de micropropagación. Todo esto reduciría los costos de producción y la sustitución de importaciones.

Los aislados solubilizadores de fosfatos también pueden contribuir al desarrollo de nuevos biofertilizantes. De acuerdo con Vessey (2003), los biofertilizantes son definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos y cuando se aplican a semillas, a superficies de plantas o al suelo, estos colonizan la rizosfera de la planta y estimulan el crecimiento mediante el incremento de la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo y el hierro, entre otros, en la planta hospedera. Las BPCV evaluadas como biofertilizantes, constituyen una alternativa a los fertilizantes químicos y minerales para elevar los rendimientos en el marco de una agricultura sostenible (Babalola, 2010).

Los microorganismos biofertilizadores como las bacterias nitrificadoras incrementan la absorción de nitrógeno, otros producen ácidos orgánicos y sideróforos que solubilizan formas insolubles de hierro e incrementan la entrada de fósforo asimilable a la planta, mientras que las bacterias que oxidan el azufre elevan la disponibilidad de este elemento para la planta hospedera (Stamford *et al.*, 2008).

El ataque de plagas a los cultivos tropicales constituye una de las causas fundamentales de disminución de los rendimientos agrícolas. Por ello, se dedican numerosos recursos para el control de estos patógenos. El empleo de aislados bacterianos con actividad antagónica, permite no solo disminuir los gastos por concepto de compra de insumos, sino también reducir el impacto ambiental y producir alimentos más sanos.

Por otra parte, las enzimas microbianas se utilizan en la actualidad de manera rutinaria en numerosos procesos tecnológicos que abarcan diferentes campos como la industria alimenticia, la farmacéutica, del papel y el detergente, entre otras. El uso de aislados con capacidad de expresar estas enzimas de manera notable, brinda una oportunidad para la explotación de estos recursos naturales, en función de elevar la calidad de distintas producciones industriales e incluso de exportar nuevos productos.

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron un total de cuatro aislados de *Bacillus* sp. Gram positivos con capacidad de esporular.
- Los aislados IH7 e IH5 mostraron propiedades bioestimuladoras y biofertilizantes, al producir ácido indolacético ($23,55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y solubilizar fosfato tricálcico, respectivamente.
- El aislado IH7 evidenció potencialidades como agente antagónico de fitopatógenos ya que produjo cianuro de hidrógeno y actividades β -1,3-gluconolítica y/o quitinolítica (95,55 %) y proteolítica (43,98 %).
- IH5 mostró actividad amilolítica y mananolítica, mientras que IH7 es productor de amilasas y celulasas, lo cual indica que el producto IHPLUS® constituye una fuente para la obtención de cepas con aplicaciones en diferentes industrias.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antagónica de la cepa IH7 frente a hongos y bacterias fitopatógenas.
- Determinar el efecto del ácido indolacético producido por el aislado IH7 sobre la germinación, el crecimiento y el desarrollo de cultivos de interés agrícola.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhayashree, M.S., Murali, M. and Amruthesh, K.N., 2016. Abiotic elicitors mediated resistance and enhanced defense related enzymes in *Capsicum annuum* L. against anthracnose disease. *Sci. Hortic.* 204: 172–178.
- Agbodjato, N.A., Noumavo, P.A., Baba-Moussa, F., Salami, H.A., Sina, H., Sèzan, A., Bankolé, H., Adjanohoun, 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*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/901656>. Consulta: junio, 2019.
- Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univ Sci.* 26: 1-20.
- Ajillogba, C.F. and Babalola, O.O. 2013. Integrated Management Strategies for Tomato *Fusarium* Wilt. *Biocontrol Science*, 18: 117-127.
- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology (2nd ed.). New York, NY: Wiley. 1977.
- Ali, G.S., Norman, D. and El-Sayed, A.S. 2015. Chapter Ten-Soluble and Volatile Metabolites of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPRs): Role and Practical Applications in Inhibiting Pathogens and Activating Induced Systemic Resistance (ISR). *Advances in Botanical Research.* 75: 241-284.
- Araujo, F.F., Henning, A.A. and Hungria, M. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 1639-1645.
- Azarmi, F., Mozafari, V., Dahaji, P.A. and Hamidpour, M. 2016. Biochemical, physiological and antioxidant enzymatic activity responses of pistachio seedlings treated with plant growth promoting rhizobacteria and Zn to salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 1-16.
- Aznar, A. and Dellagi, A. 2015. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*, erv155.
- Baas, P., Mohan, J.E., Markewitz, D. and Knoepp, J.D. 2014. Assessing heterogeneity in soil nitrogen cycling: a plot-scale approach. *Soil Science Society of America Journal*, 78: 237-247.
- Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32: 1559-1570.
- Bacon, C.W., Palencia, E.R. and Hinton, D.M. 2015. Abiotic and biotic plant stress tolerant and beneficial secondary metabolites produced by endophytic *Bacillus* species. Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. *Springer*, 163-177.

- Baghaeravari, S. and Heidarzadeh, N. 2014. Isolation and characterization of rhizosphere auxin producing Bacilli and evaluation of their potency on wheat growth improvement. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 60: 895-905.
- Beltrán, P.E.M. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15(1): 101-113.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M. and Bakker, P.A. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*. 17: 478-486.
- Berkelmans, R., Ferris, H., Tenuta, M. and Van Bruggen, A. 2003. Effects of long-term crop management on trophic levels of nematodes other than plant parasitic nematodes disappear after one year of uniform management. *Applied Journal of Soil Ecology*, 23: 223-235.
- Bettiol, J.L.P., Boutique, J.P., Gualco, L.M.P. and Johnston, J.P. 2000. Nonaqueous liquid detergent compositions comprising a borate releasing compound and a mannanase. Patent EP1059351.
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K. and Tuteja, N. 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*. 13 (66): 1-10.
- Bhatt, P.V. and Bharatkumar, R.M.V. 2014. Screening and Characterization of Plant Growth and Health Promoting Rhizobacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3 (6): 139-155.
- Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*. 28: 1327-1350.
- Blumer, C. and Haas, D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbio*. 173: 170-177.
- Bly, U., Woodard, H. and Gelderman, R. 2009. "Biological inoculants and other products for soybeans during 2009 (44309 and 44409)," Soil/Water Research South Dakota State University 2009 Research Progress Report, 2009, <http://extension.agron.iastate.edu/compendium/compendiumpdfs/pr093.pdf>.
- Brink, S.C. 2016. Unlocking the secrets of the rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21, 169.
- 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.
- Bultreys, A., Gheysen, I., Maraite, H. and de-Hoffman, E. 2001. Characterization of fluorescent and non fluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1718-1727.
- Cakmakçi, R., Dönmez, F., Aydın, A. and Şahin, F. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two

- different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 38 (6): 1482–1487.
- Carrillo-Castañeda, G., Juárez Muños, J., Peralta-Videa, J.R., Gomez, E., Tiemann, K.J., Duarte-Gardea, M. and Gardea-Torresdey, J.L. 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research*. 6: 391-399.
- Celis, L. y Gallardo, I. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia, 2008.
- Chauhan, H., bagyaraj, D., Selvakumar, G. and Sundaram, S. 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*. 95: 38-53.
- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (5): 1817-1830.
- Chung, J.H., Song, G.C. and Ryu C.M. 2015. Sweet scents from good bacteria: Case studies on bacterial volatile compounds for plant growth and immunity. *Plant Molecular Biology*. 1-11.
- Cooper, J.E. and Scherer, H.W. 2012. Chapter 16 - Nitrogen Fixation. In: MARSCHNER, P. (ed.) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). San Diego: Academic Press, 389-408.
- Crowley, D.E. 2006. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. *Springer*. 169-198.
- Dar, G.H., Sofi, S., Padder, S.A. and Kabli, A.A. 2018. Molecular characterization of rhizobacteria isolated from walnut (*Juglans regia*) rhizosphere in Western Himalayas and assessment of their plant growth promoting activities. *Biodiversitas*. 19 (2): 712-719.
- Datta, M., Paul, D., Sinha, S.N. and Sengupta, C. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Improve the Production and Enhancement of Alkaloid Content in Chilli. *Frontiers in Environmental Microbiology*. 1: 24-26.
- Deka, H., Deka, S. and Baruah, C. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Value Addition: Mechanism of Action. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. *Springer*. 305-321.
- Dimkpa, C., Svatoš, A., Merten, D., Büchel, G. and Kothe, E. 2008. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 163-172.
- Dodd, I.C., Zinovkina, N.Y., Safronova, V.I. and Belimov, A.A. 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annal of Applied Biology*, 157: 361-379.

- Egamberdiyeva, D. 2009. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiol Plant.* 31: 861-864.
- El-Sayed, W.S., Akhka, A., El-Naggar, M.Y. and Elbadry, M. 2014. In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Frontiers Microbio.* 5: 651.
- El-Tarabily, K.A., Sykes, M.L. and Kurtböke, I.D. 1996. Synergistic effects of a cellulose-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. *Can J Botany.* 74: 618–624.
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E.A., Jacquard, C. and Dorey, S. 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*, 16: 177-187.
- Faria, D.C., Dias, A. C., Melo, I. S. & de Carvalho-Costa, F. E. (2013). Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World J Microbiol Biotechnol.* 29 (2): 217-221. doi:10.1007/s11274-012-1173-4.
- Fatima, Z., Saleemi, M., Zia, M., Sultan, T., Aslam, M., Riaz-ur-Rehman, Chaudhary, M.F. 2009. Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *Afr J Biotechnol.* 8: 219-225.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M., Kariman, K. and Khavazi, K. 2015. Enhanced Efficiency of Medicinal and Aromatic Plants by PGPRs. *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Springer*, 43-70.
- Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169: 30-39.
- Glick, B.R. and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant-growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances.* 15: 353-378.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research. Springer*, 329-339.
- González, Y. 2017. Efecto del IHplus® sobre el proceso de germinación de *Sorghum bicolor* L. (Moench). Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Matanzas, Cuba.
- Goswami, D., Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C. & Tejada-Moral, M. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2 (1). doi:10.1080/23311932.2015.1127500.
- Grobelak, A., Napora, A. and Kacprzak, M. 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering.* 84: 22-28.

- Gupta, G., Pariharm S,S, Ahirwar, N.K., Snehi, S.K. and Singh, V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *JMicrob Biochem Technol.* 7: 096-102. doi:10.4172/1948-5948.1000188.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38: 1599 - 1616.
- Hacquard, S. 2016. Disentangling the factors shaping microbiota composition across the plant holobiont. *New Phytologist.* 209: 454-457.
- Hassen, A.I. 2007. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion and biocontrol of *Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum* on sorghum in Ethiopia and South Africa. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de Pretoria, Sudáfrica.
- Hauka, F.I.A., Moslam, T.M., Ghanem, Kh.M. and El-Shahat, M.M. 2016. Impact of some plant growth promoting rhizobacteria "pgpr" on organically cultivated spinach plants (*Spinacia oleracea* L.). *J. Agric. Chem. and Biotechn., Mansoura Univ.* 7 (9): 235 – 240.
- Hedden, P. and Thomas, S.G. 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*, 444: 11-25.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. and Tiffany, D. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11206
- 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.
- Jeong, S., Moon, H.S. and Nam, K. 2014. Enhanced uptake and translocation of arsenic in Cretan brake fern (*Pteris cretica* L.) through siderophore-arsenic complex formation with an aid of rhizospheric bacterial activity. *Journal of Hazardous Materials*, 280: 536-543.
- Jha, C.K. and Saraf, M. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Journal of Agricultural Research and Development.* 5: 108-119.
- Karimil, K., Aminil, J., Harighil, B. and Bahramnejad, B. 2012. Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Australian Journal of Crop Science (AJCS).* 6 (4): 695-703.
- Karnwal, A. 2011. Screening and optimization of extracellular amylase production from plant growth promoting rhizobacteria. *Annals. Food Science and Technology.* 12 (2): 135-141.

- 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., Lifshitz, R. and Zablutowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. 7: 39-44.
- Korasick, D.A., Enders, T.A. and Strader, L.C. 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*. 64: 2541-2555.
- Kulkarni, S. and Lingraju, S. 2015. Management of plant diseases under organic cultivation. Recent advances in the diagnosis and management of plant diseases. *Springer*, 11-16.
- Kumar, C. and Saraf, M. 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*. 5 (2): 0108-0119.
- Lakshmanan, V., Selvaraj, G. and Bais, H.P. 2014. Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Journal of Plant Physiology*. 166: 689-700.
- Lapsansky, E.R., Milroy, A.M., Andales, M.J. and Vivanco, J.M. 2016. Soil memory as a potential mechanism for encouraging sustainable plant health and productivity. *Current Opinion in Biotechnology*. 38: 137-142.
- Lareen, A., Burton, F. and Schäfer, P. 2016. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Molecular Biology*. 1-13.
- Li, S., Yang, X. and Yang, S. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2: 1–11.
- Liu, X., Etienne, R.S., Liang, M., Wang, Y. and Yu, S. 2015. Experimental evidence for an intraspecific Janzen-Connell effect mediated by soil biota. *Ecology*. 96: 662-671.
- Loper, J.E. and Schroth, M.N. 1986. Influence of bacterial sources on indole-3-acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*. 76: 386-389.
- Lorck, H. 1948, Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiology*, 1: 142–146.
- Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Paredes, S.H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrekton, A., Kunin, V. and del Rio, T.G. 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*. 488: 86-90.
- Mack, K.M. and Bever, J.D. 2014. Coexistence and relative abundance in plant communities are determined by feedbacks when the scale of feedback and dispersal is local. *Journal of Ecology*. 102: 1195-1201.
- Majumdar, S. and Chakraborty, U. 2017. Optimization of protease production from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* showing antagonistic activity against phytopathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 8(2): 635-642.
- Maksimov, I., Abizgil'dina, R. and Pusenkova, L. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 333-345.

- Martinez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D.E., Gajardo, G. and Mora, M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 10 (3): 293-319.
- 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.
- McSpadden-Gardener, B.B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*. 94 (11): 1252–1258.
- Mendes, R., Garbeva, P. and Raaijmakers, J.M. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 37: 634-663.
- Milián, M. 2018. Efecto del producto natural IHPLUS® sobre la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Tomeguín. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Matanzas, Cuba.
- Minz, D., Ofek, M. and Hadar, Y. 2013. Plant rhizosphere microbial communities. *The Prokaryotes*. Springer. 56-84.
- Moe, L.A. 2013. Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *American Journal of Botany*. 100: 1692-1705.
- Mommer, L., Kirkegaard, J. and Van Ruijven, J. 2016. Root–Root Interactions: Towards A Rhizosphere Framework. *Trends in Plant Science*. 21: 209-217.
- Naing, K.W., Anees, M., Nguyen, X.H. 2014. Biocontrol of Late Blight Disease (*Phytophthora capsici*) of Pepper and the Plant Growth Promotion by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. *J Phytopathol*. 162: 367–376.
- 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.
- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P.V.S.R.N., Moerschbacher, B.M. and Podile, A.R. 2010. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Critl Rev Biotechnol*. 30:231–241
- O' Sullivan, D.J. and O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in the suppression of plant root pathogens. *Microbiology Review*. 56: 662-676.
- 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.
- Pal, K. and Tilak, K. 2012. Bacterial biocontrol agents and their role in plant disease management. *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes*, 25.

- Pan, X., Zhou, J., Tian, A., Le, K., Yuan, H., Xue, Y., Ma, Y., and Lu, H. 2011. High level expression of a truncated β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Kluyveromyces cicerisporus*. *Biotechnology Letters*. 33 (3): 565–570.
- Paredes-Mendoza, M. and Espinosa-Victoria, D. 2010. Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review. *Terra Latinoamericana*. 28 (1): 61-70.
- Parisi, G.C., Zilli, M., Miani, M.P., Carrara, M., Bottona, E., Verdianelli, G., Battaglia, G., Desideri, S., Faedo, A., Marzolino, C., Tono, A., Ermani, M., and Leandro, G. 2002. High-fibre diet supplementation in patients with irritable bowel syndrome (IBS): a multicenter, randomized, open trial comparison between wheat bran diet and partially hydrolyzed guar gum (PHGG). *Digestive Diseases and Sciences*. 47(8):1697–1704.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42: 207-220.
- Pérez, J., Moraleta-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J. and Muñoz-Dorado, J. 2016. Bacterial predation: 75 years and counting! *Environmental Microbiology*, 18: 766-779.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T. 2013. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Pikovskaya, R.E. 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 17: 362-370.
- Pineda, A., Soler, R., Pozo, M. J., Rasmann, S. and Turlings, T. 2015. Above below ground interactions involving plants, microbes and insects. *Frontiers in Plant Science*. 6, 318.
- Raaijmakers, J.M. 2015. The minimal rhizosphere microbiome. *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer. 411-417.
- Ranjbar-Moghaddam, F. and Aminpanah, H. 2015. Green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield as affected by chemical phosphorus fertilizer and phosphate bio-fertilizer. *IDESIA (Chile)*. 33 (2): 77-85.
- Rao, C.V., Baysal, Ö., Lai, D., Xu, H.H., Siragusa, M., Çalışkan, M.A. 2013. Proteomic approach provides new insights into the control of soilborne plant pathogens by *Bacillus* species. *PLoS ONE*. 8, e53182
- Rayavarapu, V.G.B. and Padmavathi, T. 2016. *Bacillus* sp. as potential plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Advanced Life Sciences (IJALS)*. 9 (1): 29-36.
- Reetha, S., Bhuvaneshwari, G., Thamizhiniyan, P., Ravi-Mycin, T. 2014. Isolation of Indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). *Int Curr Microbiol App Sci*. 3 (2): 268-574

- Reinhart, K.O. 2012. The organization of plant communities: negative plant–soil feedbacks and semiarid grasslands. *Ecology*. 93: 2377-2385.
- 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.
- Ross, A.F. 1961. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*. 14: 340-358.
- Sadhu, S. 2013. Br. Microbiol. Res. J.3, 235.
- Sadhu, S. and Maiti, T.K. 2013. Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*. 3: 235–258.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. 2015. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23: 3984-3999.
- Saharan, B.S. and Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21: 1-30.
- Saini, R., Singh, H. and Dahiya, A. 2017. Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6 (4): 1865-1871.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 431-449.
- Sánchez-García, C. 2013. Purificación de ácido indolacético obtenido a partir de una fermentación microbiana y su evaluación *in vitro* en *Spathiphyllum wallisii* var. Chopin. Tesis de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ciencia Animal. Departamento de Ciencia Y Tecnología de Alimentos, México.
- Saraf, M., Jha, C.K. and Patel, D. 2010. The role of ACC deaminase producing PGPR in sustainable Agriculture. In: Maheshwari DK (Eds.) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, *Microbiology Monographs* 18, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.365-385.
- Saraf, M., Pandya, U. and Thakkar, A. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*. 169: 18-29.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L. and Nayyar, P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresour. Technol.* 98 (2): 260- 265.
- Schenk, S.T., Stein, E., Kogel, K.H. and Schikora, A. 2012. Arabidopsis growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules. *Plant Signaling and Behavior*. 7: 178-181.
- Schnitzer, S.A., Klironomos, J.N., Hillerislambers, J., Kinkel, L.L., Reich, P.B., Xiao, K., Rillig, M. C., Sikes, B.A., Callaway, R.M. and Mangan, S.A. 2011. Soil microbes drive the classic plant diversity-productivity pattern. *Ecology*. 92: 296-303.

- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W. and Zhang, X. 2013. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics*, 14: 1471-2164.
- Simiyi, W.C. 2016. Abundance, genetic diversity and symbiotic potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodule associated bacteria in western Kenya soils. Tesis en opción al grado académico de Máster en Ciencias Biotecnológicas. Universidad de Kenyatta, Kenya.
- Singh, H. 2018b. Potential of plant growth - promoting rhizobacteria in the management of nematodes: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6 (3): 1536-1545.
- Singh, I. 2018a. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. *European Journal of Biological Research*. 8 (4): 191-213.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P.K. 2016. Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 6:174. DOI 10.1007/s13205-016-0485-8.
- Singh, S.R., Joshi, D., Singh, P., Srivastava, T.K. and Tripathi, N. 2017. Plant growth-promoting bacteria: an emerging tool for sustainable crop production under salt stress, in bioremediation of salt affected soils. *Indian Persp*. 101-131.
- Singh, V., Sharma, R. y Sharma, P. 2015. Isolation, screening and optimization of amylase producing *Bacillus* sp. from soil. *Asian Pac. J. Health Sci*. 2 (3): 86-93.
- Someya, N., Tsuchiya, K., Yoshida, T., Noguchi, M.T., Akutsu, K. and Sawada, H. 2007. Co-inoculation of an antibiotic-producing bacterium and a lytic enzyme-producing bacterium for the biocontrol of tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Science*: 1-6.
- Spadaro, D. and Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47: 39-49.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 425-448.
- Stamford, N., Santos, C., Junior, S.S., Junior, M.L. and Figueiredo, M. 2008. Effect of rhizobia and rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on cowpea nodulation and nutrients uptake in a tableland soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 1857-1865.
- Sushil, K., Ramesh, S.A., 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*. 1-19.
- Suslow, T., Kloepper, J., Schroth, M. and Burr, T. 1979. Beneficial bacteria enhance plant growth. *California Agric*. 33 (11): 5-17.

- Tahir, M. and Aqeel, S.M. 2013. Plant Growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*. 11 (1): 1-7.
- Tak, H.I., Ahmad, F. and Babalola, O.O. 2013. Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Springer*, 33-52.
- 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/ijiet.101.01>.
- Thanh, D.T.N.N., My, T.X. and Diep, C.N. 2016. "Indole acetic acid and siderophore production by selected isolates of plant-associated bacteria and their effects on growth of maize (*Zea mays* L.) in pot experiments". *Science Journal of Can Tho University*. 47: 59-67.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. and Staugaard, J. 2007. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*. 315: 104-107.
- Trivedi, M.K., Patil, S. and Tallapragada, R.M. 2013. Effect of bio field treatment on the physical and thermal characteristics of vanadium pentoxide powders. *J. Mater. Sci. Eng.*, S11: 001.
- Uneo, M. 2004. Indole acetic acid related compounds induce the resistance to rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* in Barley. *Phytopathology*. 152: 606-661.
Buscar los otros autores
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moënnelocoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F. and Prigent-combaret, C. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 4, 356.
- Van Loon, L., Bakker, P. and Pieterse, C. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.
- Van Peer, R. and Schippers, B. 1992. Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98: 129-139.
- 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: 203-213.

- Varnai, A., Huikko, L., Pere, J., Siikaaho, M., and Viikari, L. 2011. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource Technology*, 102: 9096–9104.
- Vengadaramana A. 2013. Industrial Important Microbial alpha-Amylase on Starch-Converting Process. *Sch. Acad. J. Pharm.* 2 (3): 209-221.
- Verbon, E.H. and Liberman, L. M. 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in Plant Science*. 21: 218-229.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Vorholt, J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 828-840.
- Vrbničanin, S., Božić, D., Sarić, M., Pavlović, D. and Raičević, V. 2011. Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on *Ambrosia artemisiifolia* L. Seed Germination. *Pestic. Phytomed.* (Belgrade). 26 (2): 141–146
- Vrbničanin, S., Božić, D., Sarić, M., Pavlović, D., & Raičević, V. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on *Ambrosia artemisiifolia* L. seed germination. *Pesticidi i fitomedicina/Pesticides and Phytomedicine*. 26 (2): 141-146.
- Wang, Q., Dodd, I.C., Belimov, A.A. and Jiang, F. 2016. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na⁺ accumulation. *Functional Plant Biology*, 43: 161-172.
- Yamamoto, S., Shiraishi, S. and Suzuki, S. 2015. Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Letters in Applied Microbiology*. 60: 379-386.
- Yang, H., Liu, L. and Chen, J. 2011. Heterologous expression, biochemical characterization and overproduction of alkaline α -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microbial. Cell Fact.* 10: 77-85.
- Yousef, N.M.H. 2018. Capability of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. *European Journal of Biological Research*. 8 (4): 174-182.
- Zahid, M., Abbasi, M.K., Hameed, S. and Rahim, N. 2015. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Front Microbiol.* 6, 207. doi:10.3389/fmicb.2015.00207.
- Zdor, R.E., Alexander, C.M. and Kremer, R.J. 2005. Weed Suppression by Deleterious Rhizobacteria is affected by formulation and Soil Properties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 36: 1289-1299
- Zhang, J., Liu, W., Yang, X., Gao, A., Li, X., Wu, X. and Li, L. 2011. Isolation and characterization of two putative cytokinin oxidase genes related to grain

number per spike phenotype in wheat. *Molecular Biology Reports*, 38: 2337-2347.

Zhang, S., Gao, P., Tong, Y., Norse, D., Lu, Y. and Powlson, D. 2015. Overcoming nitrogen fertilizer over-use through technical and advisory approaches: a case study from Shaanxi Province, Northwest China. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 209: 89-99.