

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Plant growth promoting rhizobacteria

Trabajo de Fin de Grado

Alejandro Peñín López

Tutorizado por Ángel M. Gutiérrez Navarro y Juan Pérez Yépez.

Grado en Biología.

Julio 2017

Índice

1. Resumen-----	3
Abstract -----	3
2. Introducción -----	4
2.1 <i>Rizobacterias y su relación con la rizosfera</i> -----	4
2.2 <i>Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal</i> -----	5
2.3 <i>Importancia de las PGPR</i> -----	10
3. Objetivos -----	11
4. Material y Métodos.-----	12
4.1 <i>Bacterias</i> -----	12
4.2 <i>Material Vegetal</i> -----	12
4.3 <i>Medios de Cultivo</i> -----	12
4.4 <i>Evaluación de propiedades promotoras del crecimiento vegetal de las cepas.</i> -----	14
4.5 <i>Ensayo de infección en Lactuca sativa y condiciones de crecimiento de las plantas.</i> -	16
5. Resultados y Discusión-----	18
5.1 <i>Evaluación de propiedades promotoras del crecimiento de las cepas.</i> -----	18
5.2 <i>Ensayo de infección en plantas.</i> -----	23
6. Conclusiones-----	26
Conclusions-----	26
7. Bibliografía-----	28

1. Resumen

Las rizobacterias son un extenso grupo de bacterias que habitan la rizosfera de las plantas. Dentro de este diverso grupo se encuentran bacterias con la capacidad de promover el crecimiento y desarrollo vegetal gracias a diversos mecanismos, denominándose en su conjunto PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), adquiriendo importancia como biofertilizantes y agentes de biocontrol frente al uso de fertilizantes químicos en la agricultura. En este trabajo se ensayaron *in vitro* distintas propiedades PGP en 6 cepas pertenecientes a los géneros, *Pseudomonas*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium ciceri*, *Phyllobacterium*, *Bacillus* y un actinomiceto. Los resultados mostraron que 3 de las 6 cepas producen sideróforos, todas las cepas tienen la capacidad de producir ácido indol acético, 1 de las 6 cepas puede crecer en medio con ACC como fuente de nitrógeno, 2 de las 6 cepas pueden solubilizar fosfato y 1 de las seis cepas tiene la capacidad de fijar el nitrógeno en vida libre. El ensayo de infectividad llevado a cabo en *Lactuca sativa* mostró que tres de las 6 cepas ensayadas aumentaron el peso medio fresco y seco de la planta, correspondiendo con las cepas Sta8b (*Pseudomonas* sp.), PVL28 (*Sinorhizobium* sp.) y LEUL6a (actinomiceto).

Abstract

Rhizobacteria is the term used to define the diverse group of bacteria that grows and cohabits the rhizosphere of plants. Within this group, there are bacteria with the capacity to promote plant growth and development through several mechanisms known as PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), acquiring importance as biofertilizers and biocontrol agents against the use of chemicals in crops. In this work different PGP properties were tested *in vitro* on 6 strains belonging to the bacterial genera, *Pseudomonas*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium ciceri*, *Phyllobacterium*, *Bacillus* and a non-determined actinomycete. *In vitro* tests results showed that, 3 out of 6 strains produced siderophores, all the strains were able to synthesize indole-3-acetic acid, 1 out of 6 strains has the ability to grow using ACC as a sole nitrogen source, 2 out of 6 strains could solubilize phosphate and 1 out of 6 strains had the ability of free-living nitrogen fixation. Infectivity test carried out in *Lactuca sativa* showed that 3 out of 6 strains increased the average fresh and dry weights corresponding with strains Sta8b (*Pseudomonas* sp.), PVL28 (*Sinorhizobium* sp.) and LEUL6a (actinomycete).

2. Introducción

Se denomina rizobacterias a las bacterias que viven en las inmediaciones de las raíces de las plantas, es decir, la rizosfera. Estas bacterias constituyen un grupo formado por multitud de especies, algunas de las cuales tienen efectos beneficiosos sobre el desarrollo de las plantas mediante diversos mecanismos, recibiendo por ello el nombre de PGPR (*Plants Growth Promoting Rhizobacteria*). Por tanto, para hablar de sus características y diferentes efectos en el desarrollo de las plantas, se debe definir primero cómo se comportan en relación con el espacio de suelo que supone la rizosfera y los demás microorganismos presentes en él.

2.1 Rizobacterias y su relación con la rizosfera

Las rizobacterias colonizan las raíces de las plantas por medio de diversos mecanismos. Esta colonización es posible debido a que la propia rizosfera proporciona una gran cantidad de nutrientes gracias a los exudados de las raíces de las plantas, tratándose por tanto de un ambiente muy rico que satisface la mayoría de las necesidades que requieren las bacterias para desarrollarse [Glick, 2012]. Sin embargo, por esta misma razón, este ambiente es propenso a facilitar la colonización por parte de otros grupos de bacterias y microorganismos que pueden ser fitopatógenos, u otros que no tengan efectos de ningún tipo sobre las plantas, pero que, por relaciones de competición, comprometen el desarrollo de las rizobacterias que si son beneficiosas para la planta [Requena *et al.*, 1997]. Por tanto para que las rizobacterias puedan proliferar en la rizosfera deben poseer diversos mecanismos que favorezcan la competencia.

Entre estos mecanismos podemos encontrar los movimientos quimiotácticos o la producción de compuestos con actividad antibiótica frente a otros posibles colonizadores de la raíz. [Camelo *et al.*, 2011].

Otra característica que se debe de tener en cuenta son las distintas formas que tienen de colonizar las raíces las PGPR. Existen formas de vida simbiótica que nodulan las raíces, como el género *Rhizobium*, que colonizan las raíces de las plantas de la familia Fabaceae [Desbrosses & Stougaard, 2011]. También se pueden dar relaciones no simbióticas, tanto epifitas como endófitas, como por ejemplo es el caso de bacterias del género *Azospirillum*, que colonizan raíces de gran variedad de plantas. Existen estudios además que muestran especies de cianobacterias, mayormente del género *Nostoc*, que pueden

colonizar intracelular o extracelularmente distintos órganos de plantas de las familias Gunneraceae y Cyaraceae [Santi & Franche, 2013]. Por otro lado el desarrollo de las rizobacterias, no sólo tendría efectos en la planta sino que también produciría cambios químicos en el suelo, dado que para su propio desarrollo usan los compuestos tanto de los exudados de las raíces como de los presentes en el propio suelo [Requena et. al., 1997].

2.2 Mecanismos de promoción del crecimiento

Los efectos beneficiosos que pueden producir las PGPR sobre las plantas son varios: la estimulación de la germinación, el incremento de los niveles endógenos de fitohormonas y la captación de nutrientes, traduciéndose en un aumento del crecimiento y desarrollo vegetal.

Las rizobacterias son muy variadas así como sus propiedades, las funciones que llevan a cabo y los fines con los que se pueden comercializar. Según los fines comerciales, las PGPR se pueden clasificar según Bhattacharyya & Jha (2012):

1. En primer lugar aquellos microorganismos que se emplean a modo de **biofertilizadores**, preparados comerciales que contienen microorganismos vivos que se pueden inocular en las semillas, en la superficie de la planta o en el suelo. Al colonizar las distintas partes de las mismas, estimulan el rendimiento y crecimiento vegetal [Saharan & Nehra, 2012]. Algunos de los mecanismos por lo que actúan son la fijación del nitrógeno, que puede llevarse a cabo en forma de vida libre, (como por ejemplo los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Azospirillum*), o en simbiosis (como por ejemplo los géneros *Frankia* o *Rhizobium*) [Tilak et al., 2006]. Otro mecanismo empleado en este grupo de biofertilizadores es la solubilización del fósforo, que a pesar de ser uno de los principales nutrientes requeridos por las plantas se encuentra poco accesible para estas [Bhattacharyya & Jha, 2012].
2. Un segundo grupo serían los **bioestimulantes**, formulaciones comerciales compuestas por microorganismos con la capacidad de producir fitohormonas, que pueden ser ácido indol acético, etileno, giberelinas, etc. [Glick, 2012].
3. Por último se encuentran las rizobacterias que se usan como **biopesticidas** en las tareas de biocontrol, un campo que empieza a emerger como sustitutivo de los pesticidas químicos y sintéticos [Bhattacharyya & Jha, 2012]. Los mecanismos

que se recogen dentro de los biopesticidas son varios: la producción de antibióticos, sideróforos, o enzimas hidrolíticas que impiden la colonización de las plantas por microorganismos patógenos [Beneduzi *et al.*, 2012]. Los grupos de bacterias que poseen estas capacidades son múltiples, especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterobacter* o *Azospirillum* son algunos de los ejemplos más comunes de bacterias con capacidad de biocontrol.

La clasificación anterior, como se ha indicado, es comercial. Para este tipo de trabajo es de mayor interés la clasificación de los distintos mecanismos que emplean las PGPR para promover el crecimiento vegetal. Además estos mecanismos se pueden clasificar según favorezcan a las plantas de forma directa o de forma indirecta.

En cuanto a los mecanismos directos que emplean las PGPR para la promoción del crecimiento podemos considerar:

1. **Bacterias fijadoras de nitrógeno**, que como antes se mencionó pueden ser tanto de vida libre como simbiótica en las plantas. Tanto en un caso como en otro, reducen el dinitrógeno atmosférico, forma molecular que no es asimilable por las plantas, hasta ion amonio, forma soluble y aprovechable para las mismas, en algunos casos de forma directa y en otros, previa oxidación a nitrato. Esta transformación la pueden llevar a cabo gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa [Glick, 2012]. En comparación, la fijación biológica de nitrógeno es mucho mayor y más eficaz en especies simbióticas que en especies de fijación libre [Santi *et al.*, 2013]. Esto se debe a que la nitrogenasa y los genes que la codifican son sensibles al oxígeno, siendo este, un inhibidor de la actividad enzimática a determinadas concentraciones [Santi *et al.*, 2013].
2. **Producción de sideróforos**. Son compuestos capaces de capturar iones de hierro. Una de las funciones de estos compuestos es favorecer la nutrición vegetal, ya que facilita la adquisición del hierro por parte de la planta [Saha *et al.*, 2013]. El mecanismo de producción de sideróforos puede estar modulado por factores ambientales como el pH, el nivel de iones de hierro ambiental y la presencia de ciertos elementos traza que favorecen la síntesis [Saharan & Nehra, 2011]. Algunas de las bacterias conocidas con esta capacidad pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*. Estas bacterias sintetizan en bajas concentraciones distintos tipos de sideróforos que son

capaces de captar el hierro en forma insoluble formando un complejo soluble Fe^{+3} que puede ser captado por las plantas mediante mecanismos de transporte activo [Glick, 1995]. Se ha demostrado que además la producción de sideróforos es muy útil cuando las plantas se encuentran en situaciones de estrés por altas concentraciones de metales pesados; la inoculación de la rizosfera con estas bacterias permite que los sideróforos alivien estas concentraciones reduciendo el estrés que ejercen sobre las plantas [Carrillo-Castañeda *et al.*, 2011].

- 3. Solubilización del fósforo.** El fósforo junto con el nitrógeno, son los macronutrientes más limitantes para el desarrollo vegetal [Maathuis, 2009]. Las bacterias solubilizadoras del fósforo son capaces de liberar este fósforo a formas accesibles para las plantas [Pradhan & Sukla, 2006]. Este proceso se puede llevar a cabo gracias a la producción de distintos ácidos orgánicos, como por ejemplo el glucónico o el cítrico, o bien se puede solubilizar por reacciones de intercambio iónico [Fernández *et al.*, 2005]. La inoculación de maíz con bacterias con esta capacidad ha demostrado un incremento del rendimiento biológico, un mayor número de granos, así como una mayor tasa de cosecha [Yazdani *et al.*, 2009]. Algunas de las bacterias capaces de solubilizar fósforo pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* o *Enterobacter*.
- 4. Producción de fitohormonas.** Es otro mecanismo directo por el que las PGPR pueden promover el crecimiento y desarrollo vegetal, capaces de producir o intervenir en la producción de algunas de las hormonas vegetales implicadas en su desarrollo, como pueden ser las giberelinas, el ácido indol acético o el etileno. No se ha podido describir los mecanismos celulares mediante los cuales las bacterias promueven el desarrollo vegetal a través la producción de fitohormonas. Sin embargo varios estudios donde se citan estos efectos beneficiosos, han demostrado que nódulos de leguminosas, con bacterias del género *Bradyrhizobium*, han resultado tener una mayor concentración de giberelinas, provocando un incremento de la elongación general de la planta [Bottini *et al.*, 2004.]. Otros estudios sostienen que los efectos de estrés hídrico se ven reducidos en trigo inoculado con bacterias del género *Azospirillum*, en parte por la producción de giberelinas [Creus *et al.*, 1997].

Por otra parte el ácido indol acético, una de las auxinas más estudiadas, ha demostrado variar sus concentraciones en la planta cuando esta se encuentra

asociada con bacterias capaces de producir esta hormona. El efecto que tiene la hormona según su concentración puede ser diferente. Cuando se alcanza en combinación (concentración de AIA producida por bacterias y concentración de AIA producida por la propia planta) una concentración óptima en la planta, esta aumenta su rendimiento y crecimiento, pero cuando alcanza concentraciones superiores a las óptimas, tiene el efecto contrario, se observa una inhibición del crecimiento [Arshad & Frankenberger, 1991].

También existen bacterias capaces de modificar en las plantas los niveles endógenos de etileno, hormona implicada en los procesos madurativos de las plantas, como en el cambio de flor a fruto, que sufren en determinado momento. También se destaca su papel ante situaciones de estrés en la planta como puede ser el estrés salino, el estrés por anegamiento o estrés por calor, que acaban provocando una mayor síntesis de esta hormona [Bleecker & Kende, 2000]. El etileno es una hormona que actúa a muy bajas concentraciones dentro de la planta. Por tanto, una producción excesiva de esta hormona provocada por alguna clase de estrés, biótico o abiótico, puede desencadenar efectos perjudiciales para la propia planta [Glick, 2005]. Las rizobacterias, pueden modular esta síntesis al poseer una enzima capaz de actuar sobre uno de los intermediarios del etileno, conocido como ACC (1-aminoacilciclopropano-1-carboxilato), esta enzima, la ACC deaminasa (1-aminoacilciclopropano-1-carboxilato deaminasa), cataliza la conversión de ACC a α -cetobutirato, impidiendo la síntesis del etileno [Shaharoon et al. 2006]. La inoculación de PGPR con actividad ACCd, permite reducir la concentración de etileno endógeno en la planta inducida por una situación de estrés tanto ambiental como biológico [Saleem et al., 2007].

Gracias a estos mecanismos las bacterias son capaces de modular la producción de hormonas en las plantas, adquiriendo importancia a la hora de conseguir en distintas situaciones un mejor rendimiento, o incluso mantener el desarrollo de las plantas bajo condiciones de estrés. Dentro de este grupo de bacterias, podemos encontrar especies de los géneros *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otras.

Por otra parte, como mecanismos indirectos de la promoción podemos destacar:

5. La capacidad de **biocontrol** de otros microorganismos que puedan potencialmente ser patógenos de las plantas. La forma de realizar esta tarea es variada, desde la producción de sustancias antibióticas, producción de los propios sideróforos, excreción de enzimas líticas, entre otros [Fernando *et al.*, 2006].

Entre los mecanismos directos se explicó el papel nutritivo de los sideróforos producidos por las PGPR, sin embargo, también cumplen una función como factores de biocontrol. Por el mismo mecanismo que emplean para captar los metales, los sideróforos comprometen el desarrollo de fitopatógenos que pueden infectar la planta, ya que estos también requieren de estos metales para su correcto crecimiento [Saha *et al.*, 2013].

En cuanto a la antibiosis, los mecanismos por los que se consiguen se han ido describiendo a lo largo de las últimas décadas. Es sabido que las cascadas genéticas que regulan la síntesis de estos componentes están reguladas a su vez por condiciones ambientales, como pueden ser el pH, distintas fuentes de nutrientes, elementos traza, varios tipos de estímulos, incluso el genotipo de la planta huésped han resultado tener influencia en la regulación de la síntesis de estos compuestos [Compant *et al.*, 2005]. Cabe destacar, que de entre todos los antibióticos descubiertos hasta la fecha, algunos de ellos presentan cierta eficacia en experimentos farmacéuticos, dando lugar a una nueva fuente de fármacos con el fin de luchar contra las bacterias multirresistentes [Compant *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2017].

La producción de enzimas líticas por parte de las bacterias supone otro mecanismo de biocontrol. Algunas de estas enzimas son quitinasas, celulasas, lipasas o proteasas que tienen la capacidad de hidrolizar partes de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos [Chaiharn *et al.*, 2008].

Todos estos mecanismos los emplean las bacterias para poder competir por el rico nicho que supone la rizosfera de forma que ellas se vean favorecidas por su colonización. A su vez esta actividad de las bacterias favorece a las plantas protegiéndolas de la colonización por patógenos o incluso induciendo mecanismos de resistencia que empleará la planta por sí misma [Dutta *et al.*,

2008]. *Pseudomonas*, *Delftia* o *Rhizobium* son algunos de los géneros que poseen especies bacterianas capaces de estas funciones.

2.3 Importancia de las PGPR

Como se puede observar las capacidades de las rizobacterias para promover el crecimiento y su uso en tareas de biocontrol son múltiples y suponen una alternativa de gran relevancia para el excesivo uso de fertilizantes y pesticidas de origen químico en la agricultura actual por varias razones. El uso a largo plazo de los fertilizantes y pesticidas artificiales termina por provocar efectos nocivos en los mismos cultivos. Dada la difícil degradación de los compuestos que los forman, pueden acarrear problemas de biomagnificación a través de las cadenas tróficas hasta el punto de afectar la salud de animales y humanos [Camelo *et al.*, 2011]. La agricultura convencional sin embargo, no es capaz de reducir estos efectos sin aumentar costes económicos o reducir el rendimiento de las cosechas [Singh *et al.*, 2011]. Por lo que el uso de PGPR como biofertilizantes permite encarar esta serie de problemas, además de que supone una alternativa más barata económicamente [Flores-Félix *et al.*, 2013].

Sin embargo no se pueden usar todas las PGPR de la misma forma. Como se dijo anteriormente, la actividad de estas bacterias va a depender en gran medida de cómo interaccionan con los demás componentes de la rizosfera e incluso dependerá de la propia cepa que se esté usando, además que se debe de tener en cuenta que no sean microorganismos patógenos para el hombre en caso de usarlos como biofertilizantes [Bhattacharyya & Jha, 2012]. Por tanto para determinar cuál o cuáles son las mejores cepas a usar en cada tipo de situación que se presenta se deben realizar una serie de estudios previos.

En un principio estos estudios consistían en comprobar primero la capacidad que poseían las bacterias de interés en inhibir el crecimiento de las que potencialmente pudieran ser patógenas o que no produjeran ningún tipo de beneficio en la planta.

En aquellas que se obtenía un resultado positivo, se iniciaban una serie de ensayos para comprobar su capacidad de promover el crecimiento en distintos aspectos, desde aumento del rendimiento, inducción de la germinación, aumento del crecimiento de la raíz, etc. Todas estas pruebas se realizan primero en invernadero, para después probar aquellas de mejor rendimiento en pruebas de campo real [Bhattacharyya & Jha, 2012].

Hoy en día la mejora en técnicas genéticas y de screening facilita mucho la búsqueda de las cepas con mejores propiedades PGPR [Bhattacharyya & Jha, 2012].

3. Objetivos

Para la realización de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Revisión bibliográfica de las distintas funciones y propiedades de las bacterias con propiedades PGPs.
2. Evaluación *in vitro* de las propiedades PGPs de cepas de distintos géneros
3. Evaluación del potencial promotor de las cepas empleadas en este trabajo en un ensayo de infección en semillas de *Lactuca sativa*.

4. Material y Métodos.

4.1 Bacterias

Las cepas empleadas para el trabajo se aislaron en distintos estudios previos y se recogen en la Tabla 1.

CEPA	GÉNERO	HUESPED	Ref.
Sta8b	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Lotus lancerottensis</i>	-
LEUL6a	<i>Actinomiceto</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	-
LCAn8	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Lotus camphylocladus</i>	-
LLAN61	<i>Phyllobacterium sp.</i>	<i>Lotus lancerottensis</i>	León-Barrios <i>et al.</i> , 2017
PVL28	<i>Sinorhizobium sp.</i>	<i>Phaseoulus vulgaris</i>	-
CCANP14	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer canariense</i>	Pérez-Yépez <i>et al.</i> , 2014

Tabla 1. Cepas seleccionadas para evaluar sus propiedades PGPs.

4.2 Material Vegetal

Para el trabajo se emplearon semillas de *Lactuca sativa* var. Maravilla de Verano (lechuga) comerciales, debido a su interés comercial y su importancia alimenticia.

4.3 Medios de Cultivo

Durante el trabajo se emplearon varios medios de cultivo; algunos de ellos se utilizaron de forma asidua y generalizada, mientras que otros solo se emplearon puntualmente para la realización de pruebas concretas. Todos los medios se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 min.

4.3.1 **Medio TSA (Panreac)**, preparado según las instrucciones dadas por el fabricante.

4.3.2 **Medio YM** [Vincent, 1970], empleado para el mantenimiento y crecimiento de las cepas de rizobios usadas durante el trabajo (CCANP14 y PVL28). El medio contiene: KH_2PO_4 0,5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; NaCl 0,1 g/l; Extracto de levadura 0,8 g/l; Manitol 6 g/l; H_2O destilada hasta 1 litro. El pH se ajustó a 6,8, y se añadió agar 1,5% (15g/l) en el caso de prepararse medio YMA.

4.3.3 **Medio Pikovskaya** [Pikovskaya, 1948], utilizado para la evaluación de la solubilización de fosfato de las cepas. El medio contiene: Glucosa 10 g/l; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5g/l;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l; Extracto de levadura 0,5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g/l; KCl 0,2 g/l. El pH se ajustó a 7.

4.3.4 Medio Chromo Azurol S (CAS) [Alexander & Zuberer, 1991], usado para observación de producción de sideróforos. El medio se preparó a partir de 3 soluciones diferentes. Solución A: Chromoazurol S (CAS) 60,5 mg/l en 50 ml de agua destilada. Solución B: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,7 mg/l en 10 ml de HCl 10 mM. Solución C: N-cetyl-N,N,N-Trimethylammonium Bromide PA (HDTMA) 72,9 mg/l en 40 ml de agua destilada.

El medio se preparó mezclando en primer lugar las soluciones A y B generando una solución violeta; después con agitación suave se añadió lentamente la solución C obteniendo una mezcla de color azul oscuro. Por otro lado se disolvieron 30,24 g de PIPES en 750 ml de agua destilada, el pH se ajustó a 6,8 usando NaOH 1N, después se añadió agar 1,5% y junto con la mezcla A, B y C se esterilizaron en el autoclave. Una vez las soluciones A, B, C y PIPES están esterilizadas se mezclan para obtener un medio de color azul.

4.3.5 Medio Nfb [Döbereiner & Baldani 1979], usado para la evaluación de la fijación de nitrógeno en vida libre. El medio contiene: Ácido málico 5 g/l; KH_2PO_4 0,5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; NaCl 0,1 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/l; solución de elementos traza* 2ml; Azul Bromitol 2 ml/l; Solución de Vitaminas** 1 ml/l; Fe EDTA 1,64% 4ml/l. El pH se ajustó a una valor de 6,8 y se añadió agar, a la concentración de 1,75 g/l.

*Solución de elementos traza: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/l; H_3BO_3 1,4 g/l; $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l.

**Solución de Vitaminas: biotina 10 mg; Piridixol.HCl 20mg; agua destilada 100 ml

4.3.6 Medio Mínimo Bergersen [Bergersen, 1961], usado para la evaluación del uso de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno. El medio contiene: $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,45 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,033 g/l; CaCl_2 0,04 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0,38 g/l; NO_3K 0,29 g/l; manitol 6 g/l; tiamina 100 $\mu\text{g/l}$; biotina 10 $\mu\text{g/l}$. Tras añadir el manitol el pH se ajustó a 6,8 y se esterilizó el medio. La tiamina y la biotina fueron añadidas al medio tras la esterilización mediante filtración, usando un filtro de 0,22 μm .

4.3.7 **Agar-Agua**, usado para la germinación de las semillas de *Lactuca sativa*. El medio contiene: agar 10 g/l y agua destilada 1 litro. Tras preparar la solución, el medio se esterilizó en autoclave.

4.4 Evaluación de propiedades promotoras del crecimiento vegetal de las cepas.

Se ensayaron las distintas propiedades de las cepas bacterianas, para evaluar su capacidad como potenciales promotores del crecimiento vegetal. Los inóculos de las bacterias empleadas en cada prueba, se prepararon a partir de cultivos en placas de medios TSA o YMA (en función de la cepa) ajustándose en tubos de solución salina a un valor de turbidez 1 de la escala de McFarland.

4.4.1 **Producción de sideróforos.** Para comprobar esta capacidad se siguió el procedimiento de difusión en CAS agar [Alexander & Zuberer 1991]. Se inocularon 5 µl de suspensiones bacterianas ajustadas a valor 1 de la escala de McFarland por triplicado en medio YMA o TSA, en función de la cepa, y se incubaron hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente se vertió el medio CAS y se dejó un día más incubando, esta vez en condiciones de oscuridad.

4.4.2 **Producción de ácido indol-3-acético (AIA).** Para el ensayo de esta capacidad se procedió siguiendo el protocolo colorimétrico de Gordon-Weber [Gordon & Weber, 1951], usando el Reactivo de Salkowski. Las cepas fueron cultivadas a 28°C hasta que alcanzaron la fase estacionaria y posteriormente se ajustaron al valor 1 de la escala de McFarland en tubos de soluciones salina para su inoculación en tubos de YMB o TSB, complementados con triptófano 2,5 mM por triplicado. Una vez inoculados se dejaron incubando a 28°C durante varios días hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Tras el periodo de incubación, se tomó 1,5 ml de cada tubo y se pasaron a tubos Eppendorf para centrifugarse a 10.000 rpm durante 5 min en la microfuga.

Una vez centrifugados los tubos, se extraen 300 µl de sobrenadante y se llevan a otros tubos Eppendorf nuevos, después se añade 3 veces el volumen de sobrenadante del Reactivo de Salkowski (900 µl). Después de añadir el reactivo, se dejan los tubos en reposo durante media hora en condiciones de oscuridad. Alternativamente, se prepararon blancos en las mismas condiciones usando el medio en el que se incubó la

cepa con el reactivo de Salkowski ($\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3,465 g; H_2SO_4 100 ml; Agua destilada 300ml).

Una vez transcurrido el periodo de reposo, se usó una placa de 96 pocillos NunclonSurface para medir los niveles de AIA según la absorbancia a 540 nm en el sistema BioRadModel 680 Microplate Reader empleando el software Microplate Manager versión 5.2.1 Los datos posteriormente se interpolaron utilizando una recta patrón de concentraciones conocidas de AIA.

4.4.3 Uso de ACC como única fuente de nitrógeno. En una primera etapa para estudiar la actividad ACC deaminasa (ACCd), se crecieron las cepas en el medio mínimo de Bergensen variando la fuente de nitrógeno, de tal manera que para este ensayo se preparó medio con una fuente de nitrógeno, asimilable por todas las bacterias del ensayo, de tal manera que sería un control positivo, medio sin fuente de nitrógeno como control negativo, y medio donde se reemplaza la fuente de nitrógeno clásica por el compuesto ACC (Sigma LifeScience) a una concentración de 1,5 mM. Para la inoculación de las placas se prepararon suspensiones de las cepas en solución salina y se procedió a lavarlas para eliminar cualquier posible traza de nitrógeno que se pueda arrastrar del medio de cultivo anterior. Una vez realizado el lavado de las cepas se ajustaron a un valor 1 en la escala de McFarland en tubos de solución salina, después se inocularon 5 μl de la suspensión en las placas por triplicado. Una vez inoculadas se llevaron a incubar a 28°C durante un tiempo entre 10 y 20 días, según la cepa.

4.4.4 Solubilización de fosfato. Para el ensayo de capacidad de solubilización de fosfato se usó el medio Pikovskaya siguiendo el mismo protocolo descrito para los inóculos en placas, 5 μl de suspensiones con un valor 1 en la escala de McFarland. Los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron las placas a 28°C entre 7 y 10 días, según la cepa. La capacidad de solubilización de fosfato, se manifiesta con la presencia de halos de clarificación del medio alrededor de las colonias. Para la lectura de la prueba, se miden los diámetros de las colonias positivas (c) y se halla la media aritmética de cada cepa, después se miden los diámetros de los halos de clarificación de las cepas positivas (z) y se halla la media aritmética. Por último para conocer la eficiencia de solubilización de las cepas positivas se emplea la siguiente fórmula: $ES(\%) = 100 \times (z - c) / c$ [Srivastava *et al.*, 2004.].

4.4.5 Fijación de nitrógeno en vida libre. Para este ensayo se usó el medio semi-sólido Nfb, el cual se realizó por triplicado mediante siembra por picadura. Se usaron inóculos de cada cepa preparados en solución salina ajustado a valor 1 en la escala de McFarland. Después de inocular los tubos se llevaron a incubar durante 15-20 días, el resultado de la prueba se puede observar al darse un cambio de color en el medio, del verde original, pasa a una tonalidad azulada en la zona de inoculación.

4.5 Ensayo de infección en *Lactuca sativa* y condiciones de crecimiento de las plantas.

Para comprobar en plantas las propiedades PGPs ensayadas en las cepas, se infectaron semillas esterilizadas de *Lactuca sativa*. Se realizaron 12 réplicas de cada una de las 6 cepas empleadas además de otras 12 replicas sin ninguna cepa, a modo de control negativo.

Para la esterilización de las semillas se siguió el siguiente procedimiento. En primer lugar las semillas se bañaron con alcohol, 96% 30 segundos y seguidamente se sumergieron en hipoclorito sódico (lejía) al 50% durante 4 min. Tras la esterilización se procedió a realizar varios lavados con agua destilada estéril para eliminar los residuos de lejía en las semillas, fueron sometidas a varios lavados rápidos de 1 min y sucesivos lavados de 5 y 7 min.

Posteriormente las semillas se sembraron en medio agar-agua al 1% para su germinación, se mantuvieron en oscuridad durante 2-3 días hasta obtener plántulas con una radícula de aproximadamente 4 cm. La infección de las plántulas se realizó preparando suspensiones de las cepas empleadas ajustadas a un valor de 5 en la escala de McFarland con las que se impregnaron las radículas durante 15-20 min. Una vez infectadas las plántulas, se plantaron en semilleros rellenos con vermiculita esterilizada a 121°C durante 20 min y se trasladaron a una cámara de crecimiento con las siguientes condiciones de crecimiento: 16 horas de luz frente a 8 horas oscuridad, con una humedad relativa de 60% y manteniendo una temperatura de 25 °C durante el periodo de luz y 20°C durante el periodo de oscuridad.

Se empleó la solución nutritiva Rigaud y Puppo [Rigaud & Puppo, 1975] para regar las plantas. La solución nutritiva contiene: KCl 10 ml/l; MgSO₄·7H₂O 10ml/l; KH₂PO₄ 10 ml/l; CaCl₂ 10ml/l; elementos traza 1ml/l; KNO₃ 0,4 g/l; secuestreno 0,025 g/l. La

solución se ajustó a pH 6,8-7 con NaOH 1N y se esterilizó a 121°C durante 20 min. El riego se realizó de forma alternativa con la solución nutritiva y con agua destilada estéril, aproximadamente cada 2 o 3 días.

Las plantas se retiraron de los semilleros tras seis semanas de crecimiento. De cada planta se midió la longitud radicular y aérea, así como el contenido de clorofila, eligiendo tres hojas de cada planta al azar, empleando el medidor de clorofila SPAD-502, Minolta. El peso de las plantas se tomó en fresco y en seco, tras dejar las plantas en una estufa a 65°C hasta tener un peso constante en la medida de peso seco. Por último, se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos recogidos mediante un análisis de varianza (ANOVA) y de la mínima diferencia significativa (LSD).

5. Resultados y Discusión

5.1 Evaluación de propiedades promotoras del crecimiento de las cepas.

En la siguiente tabla se recogen de forma resumida los resultados obtenidos en los ensayos realizados sobre las cepas seleccionadas para el trabajo (Tabla 2).

Cepa	Producción Sideróforos	Producción AIA	Crecimiento en ACC	Solubilización fosfato	Nfb
Sta8b	+	+	-	-	+
LEUL6a	-	+	-	-	-
LLAN61	-	+	-	+	+
PVL28	+	+	+	-	-
LCA8	+	+	-	-	-
CCANP14	-	+	-	+	-

Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos en los análisis de propiedades PGP. Cepas positivas (+) y cepas negativas (-)

5.1.1 **Producción de sideróforos.** Las cepas productoras de sideróforos formaron un halo de color amarillo alrededor de las colonias, consecuencia de la actividad productora. La extensión del halo varía en función de la actividad de cada cepa. De las cepas ensayadas produjeron sideróforos las cepas Sta8b (*Pseudomonas*), PVL28 (*Sinorhizobium*) y LCA8 (*Bacillus*). Los sideróforos, como se explicó en la introducción, son compuestos que favorecen el crecimiento de la planta de forma directa, aumentando la captación de nutrientes, y de forma indirecta, comprometiendo el desarrollo de fitopatógenos. Varios estudios, destacan el papel de bacterias del género *Pseudomonas* en tareas de biocontrol, al producir sideróforos que captan iones de hierro necesarios para el desarrollo de algunos fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* [Weller, 2007; Chen *et al.*, 1995]. Siguiendo los resultados obtenidos en este ensayo, se puede destacar el papel de especies del género *Bacillus*, en concreto de cepas de la especie *Bacillus subtilis*, por su elevada actividad de producción de sideróforos dándole la capacidad de antagonizar la actividad de hasta 15 hongos fitopatógenos en plantas de pepino [Yu *et al.*, 2011].

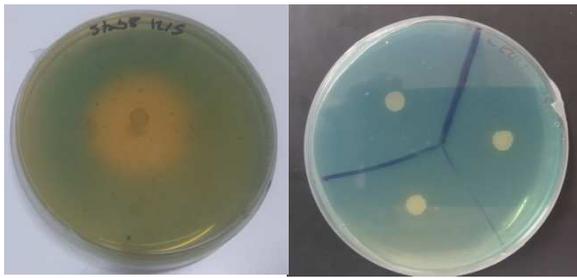


Figura 1. Placas con medio YMA (LEUL6a) y TSA (Sta8b) con CAS. A la izquierda la cepa Sta8b, productora de sideróforos, se puede observar el halo amarillo. A la derecha la cepa LEUL6a,

5.1.2 Producción de ácido indol-3-acético (AIA). Para la prueba de producción de AIA, se siguió el procedimiento según Gordon-Weber, descrito en el apartado de material y métodos. Tras añadir el reactivo de Salkowski y dejar reposar el sobrenadante de cada cepa, se observó en aquellas cepas positivas que el sobrenadante adquirió un color rosado cuya intensidad varía en función de la concentración de AIA producida por la cepa (Figura 2). Todas las cepas ensayadas dieron positivo en la producción de AIA, pero la concentración varía en función de cada una (Figura 3).

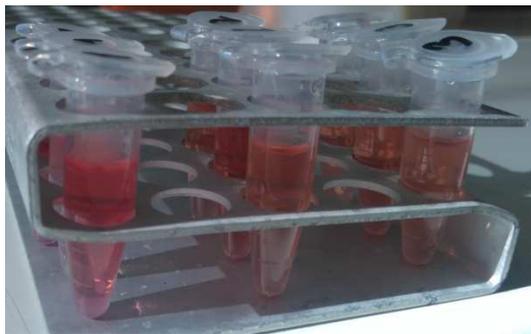


Figura 2. Ejemplo de muestras preparadas para lectura de producción de AIA. La diferencia de intensidad de coloración indica distintas concentraciones de AIA.

Producción de AIA ($\mu\text{g/ml}$)

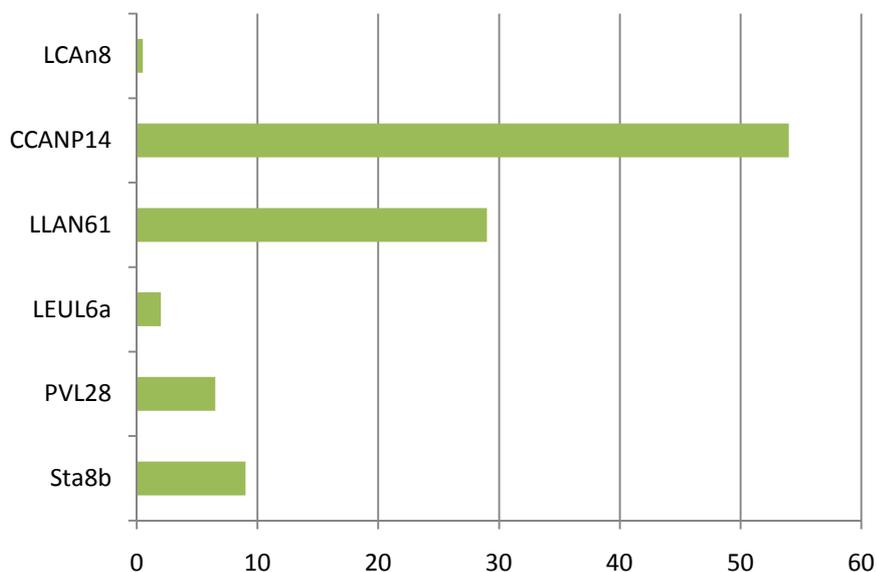


Figura 3. Gráfico de producción de AIA

Según los resultados obtenidos, las cepas ensayadas produjeron AIA en un amplio rango, desde los 0,5µg/ml, hasta 54µg/ml. Destacan la cepa CCANP14 (*Mesorhizobium ciceri* sp.) por la mayor producción seguida de la cepa LLAN61 (*Phyllobacterium* sp.). Siguiendo el criterio de varios autores, las bacterias se pueden clasificar según la cantidad de AIA producida en tres niveles (bajo, medio y alto), [Anjum *et al.*, 2011]. En este caso la cepa CCANP14 se considera un productor medio, y el resto de cepas se consideran como bajos productores.

5.1.3 Crecimiento con ACC como única fuente de nitrógeno. Esta prueba supone un primer paso para confirmar la presencia de la enzima ACCd (ACC deaminasa). Las cepas que dieron positivo en esta prueba demuestran que pueden crecer en el medio Bergensen con ACC como única fuente de nitrógeno, pudiendo significar que cuentan con la maquinaria genética que permite la expresión de esta enzima en vida libre. Para comprobarlo se requieren de estudios posteriores. De las cepas ensayadas, PVL28 dio resultado positivo, siendo candidata a poseer la enzima ACCd (Figura 4). Es de esperar que en algunas cepas ensayadas en un medio con ACC como única fuente de nitrógeno no se observe crecimiento, como en el caso de CCANP14 (*Mesorhizobium ciceri*). Se ha comprobado en varias especies de este género, que a pesar de poseer el gen *acdS*, cuyo producto es la enzima ACCd, no se expresa en vida libre, siendo regulado por la proteína NifA, fundamental en el proceso de nodulación de estas bacterias, sugiriendo que la expresión del *acdS* en el género *Mesorhizobium ciceri* está regulado bajo condiciones de simbiosis [Nascimento *et al.*, 2012]. En los últimos años se discute un posible modelo de actuación de la enzima ACCd. Este modelo propone una combinación de la promoción del crecimiento radicular de la planta por medio de producción de AIA y la actividad de la propia enzima ACCd [Saleem *et al.*, 2007]. La síntesis por parte de las bacterias y la posterior adquisición por parte de la planta de AIA, induce en la planta un aumento de la síntesis de ACC. Parte de este ACC es exudado fuera de la raíz y usado por la bacteria, que por medio de la ACCd lo hidroliza y lo usa como fuente de nitrógeno para su desarrollo, a su vez, los niveles de ACC endógeno en la planta se mantienen en un nivel controlado permitiendo un mayor desarrollo de la raíz de la planta [Glick *et al.*, 1998].

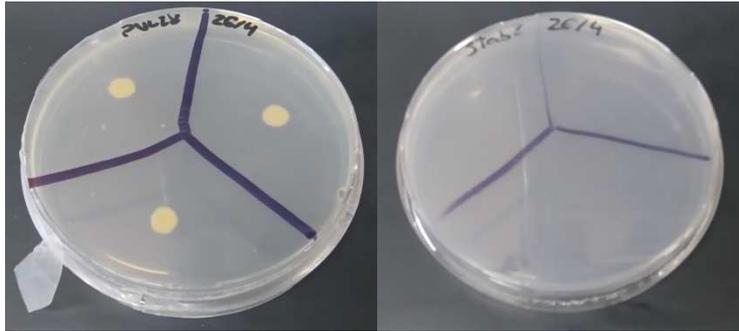


Figura 4. Resultado de prueba de crecimiento con ACC. A la izquierda la cepa PVL28, resultado positivo, a la derecha la cepa Sta8b, resultado negativo.

5.1.4 Solubilización de fosfatos. Se consideraron positivos aquellos ensayos en los que se observó un halo de clarificación alrededor de las colonias, denotando la capacidad para solubilizar fosfato. En este caso, las cepas LLAN61 (*Phyllobacterium*) y CCANP14 (*Mesorhizobium ciceri*) dieron positivo en esta prueba (Figura 5). Como se describió en la introducción, los mecanismos de solubilización del fósforo son varios, desde la acidificación por secreción de ácidos orgánicos a reacciones de intercambio iónico. En relación con los resultados obtenidos, diferentes trabajos destacan que varias especies del género *Phyllobacterium* acidifican el medio como principal mecanismo de solubilización [Ma *et al.*, 2013]. Esta característica cobra importancia en suelos agrícolas con elevadas concentraciones de cadmio, que potencialmente puede provocar problemas de salud en el ser humano. Se ha demostrado, que la acidificación de suelo consecuencia de la actividad de este tipo de bacterias, reduce la captación de cadmio por la planta debido a la competición con el ión hidrogeno [Waisberg *et al.*, 2004].

También se puede destacar el papel solubilizador del genero *Mesorhizobium ciceri*, según varios trabajos. En concreto una cepa de *Mesorhizobium ciceri mediterraneum*, que además de la fijación del nitrógeno, provocó un aumento significativo del contenido de fósforo en plantas de garbanzo y cebada [Peix *et al.*, 2001].

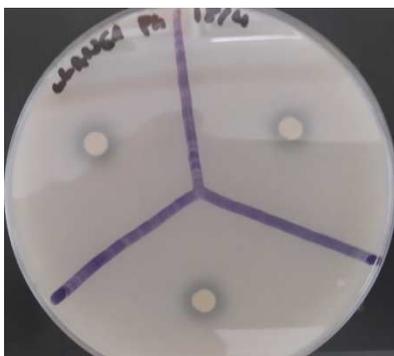


Figura 5. Placa con medio Pikovskaya donde se puede observar el halo de clarificación producto de la solubilización de la fuente de fosfato. En este caso la cepa LLAN61.

Por otro lado, se cuantificó la eficacia de solubilización en las cepas positivas de este ensayo. Para ello se siguió el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos y se empleó la fórmula usada por Srivastava y colaboradores (Tabla 3).

Cepa	Eficacia de solubilización (ES%)
LLAN61	45%
CCANP14	26%

Tabla 3. Eficacia de solubilización de fosfato en las cepas positivas de la prueba. La cepa LLAN61, dio un mayor rendimiento en este aspecto.

5.1.5 Fijación de nitrógeno en vida libre. En esta prueba la cepa que se consideró positiva fue Sta8b (*Pseudomonas* sp.), observándose un viraje del color del medio Nfb, desde el verde normal a un color azul, además de observarse una pequeña zona de turbidez en la zona donde se realizó la siembra por picadura (Figura 6). El medio Nfb, es un medio sin fuente de nitrógeno, por lo que el crecimiento de bacterias en el mismo puede ser un indicativo de actividad fijadora por parte de las bacterias. Para confirmar esta actividad, se tendrían que llevar cabo estudios posteriores. El género *Pseudomonas* se puede considerar como un buen fijador de nitrógeno en plantas como el arroz, al provocar un aumento del rendimiento de la planta comparable al atribuido por otras bacterias del género *Azospirillum*, un típico fijador de nitrógeno en vida libre[Mirza *et al.*, 2006].

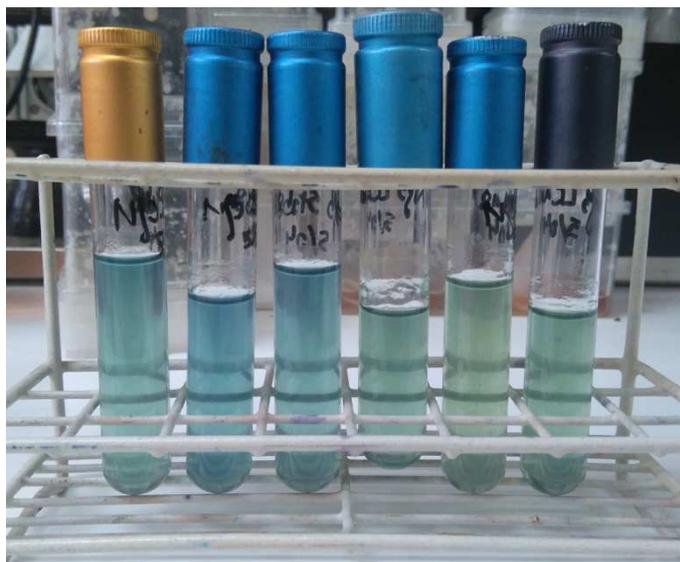


Figura 6. En la imagen se observa, el resultado obtenido en la prueba de fijación de nitrógeno. A la izquierda los tres tubos de la cepa Sta8b, resultado positivo, donde se puede observar un color azul del medio, comparado con los tres tubos de la derecha, cepa LCA8, resultado negativo, que mantiene el color verde original del medio.

5.1.6 **Contenido de clorofila.** El valor promedio de las mediciones, se representó en el siguiente gráfico (Figura 7). El análisis estadístico de estos valores reveló que no existen diferencias significativas entre ellos.

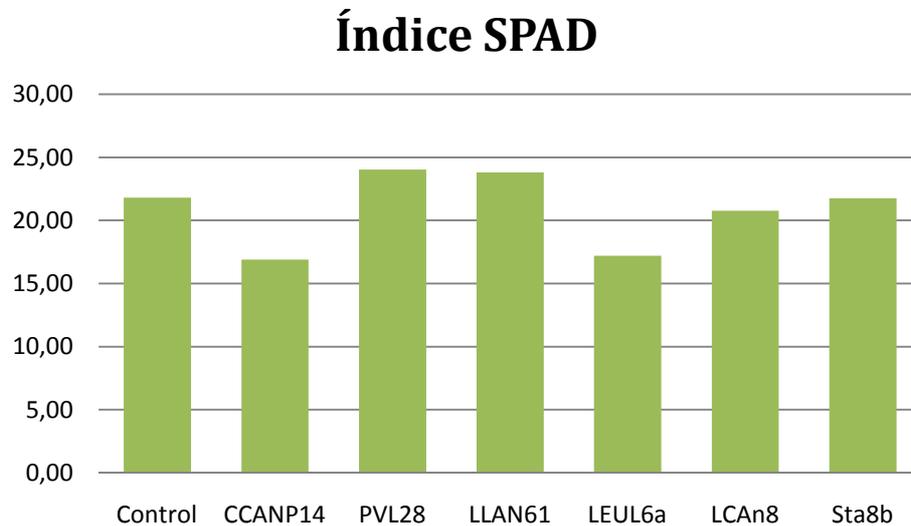


Figura 7. Gráfico de índice SP.AD promedio

El índice SPAD es un parámetro, cada vez más usual debido a su rápida medición y su relación con el contenido de clorofila presente en la planta [Yamamoto *et al.*, 2002]. En la figura 7 se observan valores superiores en los tratamientos con las cepas PVL28 y LLAN61 con respecto al control.

5.2 Ensayo de infección en plantas.

Para ensayar las potenciales propiedades de promoción en plantas, se emplearon las cepas seleccionadas y se infectaron las plántulas de *Lactuca sativa* siguiendo el protocolo especificado en el apartado de materiales y métodos, además de preparar el control negativo sin ningún inóculo.

Con respecto a los parámetros de longitud radicular y aérea no se observaron diferencias significativas con respecto al control. En la figura 8, se puede observar un gráfico con los resultados obtenidos, en relación al peso fresco y seco.

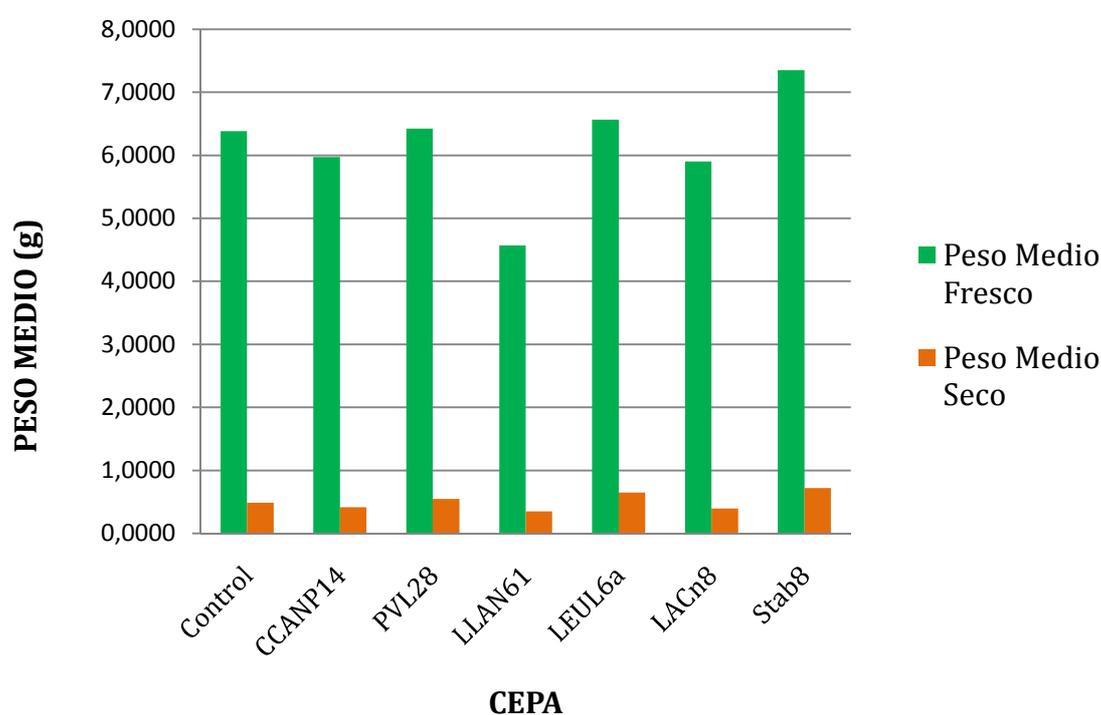


Figura 8. Media de peso fresco y seco de las plantas ensayadas según la cepa utilizada y el control negativo.

De acuerdo con lo observado en la figura, 3 de los 6 grupos de plantas infectadas respondieron positivamente a las bacterias empleadas, observándose un aumento del peso medio fresco y seco de la planta, a pesar de que el análisis estadístico revela que las diferencias entre los tratamientos y el control negativo no son significativas. Este aumento del peso corresponde con las cepas Sta8b (*Pseudomonas* sp.), PVL28 (*Sinorhizobium* sp.) y la cepa LEUL6a (actinomiceto), siendo la más destacada la primera. Es importante resaltar que las cepas Sta8b y PVL28 presentaron 3 de las 5 propiedades PGPs ensayadas, mientras que la cepa LEUL6a solo presentó una propiedad PGP. Por

otro lado, a pesar de ser un interesante candidato para su uso como promotor del crecimiento por presentar varias propiedades, el género *Pseudomonas* cuenta con varias especies patogénicas para el hombre, por lo que, de ser éste el caso, la cepa Sta8b no sería recomendable como agente biofertilizante. Por el contrario, la cepa de *Sinorhizobium*, no presenta este inconveniente dado que no se ha descrito ninguna especie patógena dentro de este género y esto la convierte en la mejor candidata para su uso como agente de biofertilización. A pesar de que los rizobios son bacterias nodulantes de la familia de las fabáceas, se puede resaltar su importancia en plantas no leguminosas a la hora de emplearlas como agentes fertilizantes. Por ejemplo, se ha demostrado que una cepa del género *Rhizobium*, en concreto de la especie *Rhizobium leguminosarum*, es capaz de aumentar el crecimiento radicular y de biomasa de plantas de lechuga y zanahoria, además de incrementar la captación de nutrientes como nitrógeno y fosforo [Flores-Félix *et al.*, 2013]. También se ha demostrado que determinadas cepas de *Sinorhizobium meliloti* en asociación con micorrizas arbusculares, tiene la capacidad de aumentar el crecimiento de la raíz y la parte aérea de plantas de lechuga de forma significativa [Galleguillos *et al.*, 2000].

6. Conclusiones

1. La gran diversidad de rizobacterias y sus distintos mecanismos de promoción vegetal las convierten en una alternativa a tener en cuenta para la mejora de cultivos prescindiendo del abuso de sustancias químicas potencialmente nocivas. A su vez destaca su posible papel como agentes de biorremediación por algunos de estos mismos mecanismos.
2. Todas las cepas utilizadas en este trabajo cuentan al menos con una propiedad de promoción entre las ensayadas. Destacan las cepas de *Pseudomonas* sp. (Sta8b) y *Sinorhizobium* (PVL28) por las propiedades que presentan, producción de sideróforos, síntesis de AIA y fijación en vida libre de nitrógeno por parte de *Pseudomonas* sp. y producción de sideróforos, síntesis de AIA y uso de ACC como fuente de nitrógeno por parte de *Sinorhizobium* sp.
3. La inoculación de semillas de *Lactuca sativa* variedad Maravilla de Verano con las cepas Sta8b (*Pseudomonas* sp.), PVL28 (*Sinorhizobium* sp.) y LEUL6a (actinomiceto) produjeron el mayor crecimiento vegetal, aunque sin diferencias significativas con los controles.

Conclusions

1. The great diversity of rhizobacteria and their different mechanisms for vegetal promotion and development make them an alternative to be taken into account as an alternative option to potentially harmful chemical substances. Also highlights their possible role as agents for bioremediation by some of these mechanisms.
2. All the strains used in this work have at least one property of promotion among the tested. Distinguish the strains of *Pseudomonas* sp. (Sta8b) and *Sinorhizobium* (PVL28) for their properties, ability for siderophores production, IAA synthesis and free-living nitrogen-fixation by *Pseudomonas* sp. and production of siderophores, synthesis of IAA and use of ACC as a source of nitrogen by *Sinorhizobium* sp.
3. Inoculation of *Lactuca sativa* var. Wonder Summer seeds with Sta8b (*Pseudomonas* sp.), PVL28 (*Sinorhizobium* sp.) and LEUL6a (actinomycete)

strains produced the highest plant growth, although there were not significant differences with the control plants.

7. Referencias.

1. **Anjum, M. A., Zahir, Z. A., Muhammad, A., & Muhammad, A.,** 2011. Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. *Soil and Environment*, 30(1), 18-26.
2. **Arshad M. & Frankenberger W. T.,** 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant and soil*, 133(1), 1-8.
3. **Arshad, M., Shaharoon, B., & Mahmood, T.,** 2008. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere*, 18(5), 611-620.
4. **Bergersen, F. J.,** 1961. The growth of Rhizobium in synthetic media. *Australian Journal of Biological Sciences*, 14(3), 349-360.
5. **Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M.,** 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.
6. **Bernard R. Glick,** 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica* Volume 2012. Article ID 963401.
7. **Bernard R. Glick,** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109-117.
8. **Bernard R. Glick,** 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbiology letters*, 251(1), 1-7.
9. **Bleecker, A. B., & Kende, H.,** 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 1-18.
10. **Bottini R., Cassán, F., & Piccoli, P.,** 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(5), 497-503.
11. **BS. Saharan, V. Nehra,** 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Science and Medicine Research* Volume 2011: LSMR-21.
12. **Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R.,** 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166.
13. **Carrillo-Castañeda, G., Juárez-Muñoz, J., & Tijerina-Castro, G. D.,** 2011. Aislamiento de microorganismos inocuos productores de sideróforos para sistemas de fitorremediación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3).
14. **Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A., & Lumyong, S.,** 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *KMITL Sci Technol J*, 8(1), 18-23.
15. **Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguezkabana, R., & Kloepper, J. W.,** 1995. Biological control of Fusarium wilts on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological control*, 5(1), 83-91.
16. **Creus, C. M., Sueldo, R. J., & Barassi, C. A.,** 1997. Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *Plant Physiol. Biochem*, 35(12), 939-944.
17. **D. B. Alexander & D. A. Zuberer,** 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1), 39-45.
18. **Desbrosses, G. J., & Stougaard, J.,** 2011. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host & Microbe*, 10(4), 348-358.
19. **Döbereiner, J., & Baldani, V. L.,** 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 25(11), 1264.
20. **Dutta, S., Mishra, A. K., & Kumar, B. D.,** 2008. Induction of systemic resistance against fusarial wilts in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(2), 452-461.
21. **Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A.,** 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo*, 23(1), 31-37.
22. **Fischer, H. M.,** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological reviews*, 58(3), 352-386.
23. **Flores-Félix José D., Menéndez Esther, et al.,** 2013. Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J. Plant. Natur. Soil Sci.*, 176, 876-882.
24. **Galleguillos, C., Aguirre, C., Barea, J. M., & Azcon, R.,** 2000. Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-

legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science*, 159(1), 57-63.

25. **Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J.**, 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology*, 190(1), 63-68.
26. **Lau, C. H. F., van Engelen, K., Gordon, S., Renaud, J., & Topp, E.**, 2017. Novel antibiotic resistance determinants from agricultural soil exposed to antibiotics widely used in human medicine and animal farming. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-00989.
27. **León-Barrios, M., Pérez-Yépez, J., Dorta, P., Garrido, A., & Jiménez, C.**, 2017. Alkalinity of Lanzarote soils is a factor shaping rhizobial populations with *Sinorhizobium meliloti* being the predominant microsymbiont of *Lotus lancerottensis*. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(3), 171-178.
28. **M. Asharafuzzaman, Farid Akhtar Hossen, M. Razi Ismail, Md. Anamul Hoque, M. Zahurul, et al.**, 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 Abril 2009:1247-1252.
29. **Maathuis, F. J.**, 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 250-258.
30. **Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y., & Freitas, H.**, 2013. Phytoextraction of heavy metal polluted soils using *Sedum plumbizincicola* inoculated with metal mobilizing *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b. *Chemosphere*, 93(7), 1386-1392.
31. **Mirza, M. S., Mehnaz, S., Normand, P., Prigent-Combaret, C., Moëgne-Loccoz, Y., Bally, R., & Malik, K. A.**, 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils*, 43(2), 163-170.
32. **M. Saleem, M. Arshad, et al.**, 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 34: 635-648.
33. **M. Yazdani, M. Ali Bahmanyar, H. Pirdashti y M. Ali Esmaili**, 2009. Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield and Yield Components of Corn (*Zea mays* L.). *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* Vol: 3.
34. **Nascimento, F. X., Brígido, C., Glick, B. R., & Oliveira, S.**, 2012. ACC deaminase genes are conserved among *Mesorhizobium ciceri* species able to nodulate the same host plant. *FEMS microbiology letters*, 336(1), 26-37.
35. **N. Requena, I. Jiménez, M. Toro y J. M. Barea**, 1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. In the rhizosphere of *Anthyllis cytosoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol.* 1997: 667-677.
36. **Peix, A., Rivas-Boyer, A. A., Mateos, P. F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E., & Velazquez, E.**, 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium ciceri* mediterraneum under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(1), 103-110.
37. **Pérez-Yépez, J., Armas-Capote, N., Velázquez, E., Pérez-Galdona, R., Rivas, R., & León-Barrios, M.**, (2014). Evaluation of seven housekeeping genes for multilocus sequence analysis of the genus *Mesorhizobium ciceri*: resolving the taxonomic affiliation of the *Cicer canariense* rhizobia. *Systematic and applied microbiology*, 37(8), 553-559.
38. **Pikovskaya, R. I.**, 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
39. **P. N. Bhattacharyya & D. K. Jha**, 2012. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* (2012) 28:1327-1350.
40. **Pradhan, N., & Sukla, L. B.**, 2006. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10).
41. **Rigaud, J., & Puppo, A.**, 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *Microbiology*, 88(2), 223-228.
42. **S. A. Gordon & R. P. Weber**, 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.
43. **Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L.**, 2013. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of basic microbiology*, 53(4), 303-317.
44. **Shaharoon, B., Arshad, M., Zahir, Z. A., & Khalid, A.**, 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2971-2975.

45. **Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C.,** 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, 111(5), 743-767.
46. **Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P.,** 2011. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3), 339-353.
47. **Srivastav, S., Yadav, K. S., & Kundu, B. S.,** 2004. Prospects of using phosphate solubilizing *Pseudomonas* as biofungicide. *Indian Journal of Microbiology*, 44(2), 91-94.
48. **S. Compant, B. Duffy, J. Nowak, C. Clément y E Ait Barka,** 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Disease: Principles, Mechanisms of Action and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* Sept 2005: 4951-4959.
49. **Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., & Manoharachari, C.,** 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*, 57(1), 67-71.
50. **Vincent, J. M.,** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Blackwell Scientific (eds.) 164. Oxford, Reino Unido.
51. **Waisberg, M., Black, W. D., Waisberg, C. M., & Hale, B.,** 2004. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food and Chemical Toxicology*, 42(5), 835-842.
52. **Weller, D. M.** 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
53. **W. G. Dilantha Fernando, S. Nakkeeran, Yilan Zhang,** 2006. Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases p. 67-109. En: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer Netherlands.
54. **Yamamoto, A., Nakamura, T., Adu-Gyamfi, J. J., & Saigusa, M.,** 2002. Relationship between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeonpea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). *Journal of Plant Nutrition*, 25(10), 2295-2301.
55. **Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G.,** 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145.