



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Dirección de Postgrado

**Maestría en Biotecnología Industrial**

Potencial biotecnológico de bacterias aisladas de las raíces y rizosfera de *Salicornia neei* (Lag.) del Chaco seco paraguayo

**Lic. Biol. Yolanda Amelia López Benítez**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención  
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY

Mes – 2020



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

## Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

**Maestría en Biotecnología Industrial**

Potencial biotecnológico de bacterias aisladas de las raíces y rizosfera de *Salicornia neei* (Lag.) del Chaco seco paraguayo

**Lic. Biol. Yolanda Amelia López Benítez**

Orientador: Dr. Leandro Marcio Moreira

Co Orientador: Dr. Gilberto Antonio Benítez Rodas

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención  
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY

Abril – 2020

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)

DE LA BIBLIOTECA DE LA FACEN – UNA

Dejar en blanco ésta página que será destinada para el registro del depósito de la tesis en la biblioteca de la FACEN.

**Potencial biotecnológico de bacterias aisladas de las raíces y rizosfera de  
*Salicornia neei* (Lag.) del Chaco seco paraguayo**

YOLANDA AMELIA LÓPEZ BENÍTEZ

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial.

Fecha de aprobación:     de                     de 2020.

**MESA EXAMINADORA**

MIEMBROS:

**Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Autónoma de Barcelona, España*

**Prof. Dra. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de la Pampa, Argentina*

**Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina*

**Prof. MSc. Andrea Weiler Gustafson de Albertini**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha                     de de 2020.

**Prof. MSc. Andrea Weiler Gustafson de Albertini**

Director de Postgrado, FACEN – UNA

A mis padres,

Don Liborio López Gayoso y Doña Antonina Benítez  
Maidana.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT por la financiación de la Maestría. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción FACEN – UNA por desarrollar la Maestría en Biotecnología Industrial.

## Potencial biotecnológico de bacterias aisladas de las raíces y rizosfera de *Salicornia neei* (Lag.) del Chaco seco paraguayo

Autor: YOLANDA AMELIA LÓPEZ BENITEZ

Orientador: DR. LEANDRO MARCIO MOREIRA

Co Orientador: Dr. GILBERTO ANTONIO BENÍTEZ RODAS

### RESUMEN

El suelo es un ecosistema importante donde las raíces de plantas y microorganismos se asocian para la adquisición de nutrientes, y basados en esta relación se empleó a *Salicornia neei* como planta modelo, debido a que crece en los saladares del Chaco paraguayo considerado uno de los lugares más calurosos del país, y que en estas condiciones podría albergar microorganismos halófilos con adaptaciones para la sobrevivencia a esta región hostil, y con una alta probabilidad de uso biotecnológico industrial. Por esta razón, se estableció como objetivo analizar el potencial biotecnológico de las bacterias aisladas de las raíces y rizosfera de *S. neei* del Chaco paraguayo. Para esto se utilizaron técnicas de cultivos microbiológicos, aislamiento, caracterización, estrés abiótico, seguidos de pruebas bioquímicas que permitieron verificar la capacidad de las bacterias de producir HCN, verificar el potencial de degradación de pectina, caseína y celulosa, y solubilizar el fosfato. Los resultados obtenidos en este trabajo representan unos de los primeros estudios de aislamientos bacterianos de una planta halotolerante como *S. neei* en condiciones de estrés abiótico. Se obtuvieron en total 64 aislados, siendo Gram positivas 61 (95,3%) y Gram negativas 3 (4,7%). El 9,2% (6) de los aislados lograron crecer a diferentes rangos de temperatura, mientras que 21 (32,8%) a concentraciones elevadas de NaCl. Los aislados capaces de producir HCN fueron 18 (27,6%), producción de celulasas 22 (34,3%), producción de pectinasas 30 (46,9%), producción de proteasas 4 (6,3%), del total solo 7 (10,9%) fueron capaces de producir las tres enzimas hidrolíticas estudiadas. Los aislados bacterianos capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron mayoritariamente bacterias endofíticas capaces de hidrolizar para celulosa, pectina, y caseína. Finalmente, las bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium solani* fueron 13,8%, de *Klebsiella pneumoniae* el 4,6% y *Staphylococcus aureus* el 0,6%. En conclusión, se puede mencionar que 3 aislados presentaron características bioquímicas con potencial biotecnológico para su uso en procesos industriales.

**Palabras claves:** *Salicornia neei*, halófilo, solubilización de fosfato, antagonismo.

# **Biotechnological potential of bacteria isolated from the roots and rhizosphere of *Salicornia neei* (Lag.) of the Paraguayan Chaco.**

Author: YOLANDA AMELIA LÓPEZ BENITEZ

Advisor: DR. LEANDRO MARCIO MOREIRA

Co Advisor: Dr. GILBERTO ANTONIO BENÍTEZ RODAS

## **SUMMARY**

The soil is an important ecosystem where the roots of plants and microorganisms are associated for the acquisition of nutrients, and based on this relationship, *Salicornia neei* was used as a model plant, because it grows in the salt flats of the Paraguayan Chaco considered one of the places warmest in the country, and that under these conditions could harbor halophilic microorganisms with adaptations for survival in this hostile region, and with a high probability of industrial biotechnological use. For this reason, the objective was to analyze the biotechnological potential of bacteria isolated from the roots and rhizosphere of *S. neei* from the Paraguayan Chaco. For this, microbiological culture techniques, isolation, characterization, abiotic stress were used, followed by biochemical tests that allowed verifying the ability of bacteria to produce HCN, verifying the degradation potential of pectin, casein and cellulose, and solubilizing phosphate. The results obtained in this work represent one of the first studies of bacterial isolations of a halotolerant *S. neei* plant under abiotic stress conditions. A total of 64 isolates were obtained, with 61 (95.3%) and Gram negative 3 (4.7%) being Gram positive. 9.2% (6) of the isolates managed to grow at different temperature ranges, while 21 (32.8%) at high concentrations of NaCl. The isolates capable of producing HCN were 18 (27.6%), cellulase production 22 (34.3%), pectinase production 30 (46.9%), protease production 4 (6.3%), of the total only 7 (10.9%) were able to produce the three hydrolytic enzymes studied. The bacterial isolates capable of producing hydrolytic enzymes were mostly endophytic bacteria capable of hydrolyzing for cellulose, pectin and casein. Finally, the bacteria capable of inhibiting the growth of *Fusarium solani* were 13.8%, of *Klebsiella pneumoniae* 4.6% and *Staphylococcus aureus* 0.6%. In conclusion, it can be mentioned that 3 isolates presented biochemical characteristics with biotechnological potential for use in industrial processes.

**Keywords:** *Salicornia neei*, halophilic, antagonism, phosphate solubilization.



# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Planteamiento del problema .....	2
1.2.	Pregunta de investigación.....	2
1.3.	Justificación.....	3
1.4.	Objetivos .....	5
1.4.1.	Objetivo General .....	5
1.4.2.	Objetivos Específicos.....	5
1.5.	Hipótesis.....	6
2.	MARCO TEÓRICO.....	7
2.1.	Mecanismos promotores del crecimiento vegetal .....	8
2.2.	Solubilización del fosfato .....	9
2.3.	Capacidad antimicrobiana .....	9
2.4.	Enzimas que degradan proteínas .....	10
2.5.	Enzimas que degradan pectinas.....	11
2.6.	Enzimas que degradan la pared celular vegetal.....	12
3.	METODOLOGÍA .....	13
3.1.	Zona de muestreo, aislamiento bacteriano y condiciones de cultivo .....	13
3.1.1.	Muestras provenientes de la Rizosfera.....	14
3.1.2.	Muestras de Raíces Provenientes de <i>S. neei</i> .....	15
3.2.	Factores de crecimiento de los aislados frente a estrés abiótico .....	16
3.2.1.	Temperatura .....	16
3.2.2.	Salinidad.....	17
3.3.	Análisis del potencial de la capacidad de promover el crecimiento de vegetal PGPR de los aislados.....	18
3.3.1.	Producción de ácido hidrocianico (HCN) .....	18
3.3.2.	Producción de celulasa, pectinasa y proteasa.....	18
3.3.3.	Solubilización de fosfato.....	18
3.4.	Antagonismo microbiano .....	18
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
4.1.	Tinción de Gram y morfología bacteriana .....	20
4.2.	Factores de crecimiento de los aislados frente a estrés abiótico .....	21

4.2.1.	Temperatura .....	21
4.2.2.	Salinidad.....	22
4.3.	Análisis del potencial de la capacidad de promover el crecimiento de vegetal PGPR de los aislados .....	24
4.3.1.	Producción de ácido cianhídrico HCN.....	25
4.3.2.	Actividad celulolíticas.....	26
4.3.3.	Actividad pectinolíticas.....	26
4.3.4.	Actividad proteolítica.....	27
4.3.5.	Solubilización de fosfato.....	27
4.4.	Antagonismo microbiano .....	29
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
5.1.	Conclusiones .....	33
5.2.	Recomendaciones .....	34
6.	BIBLIOGRAFIA .....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación simplificada de los mecanismos PGRP.....	8
Figura 2. Representación gráfica de recorrido para el muestreo.....	14
Figura 3. Representación simplificada de metodología empleada.....	15
Figura 4. Distribución de los aislados frente al patógeno.....	17
Figura 5. Aislamiento bacteriano.....	18
Figura 6. Tinción Gram.....	19
Figura 7. Aislados sometidos a gradientes de temperatura.....	20
Figura 8. Representación porcentual de los aislados sometidos a temperatura.....	20
Figura 9. Representación porcentual de los aislados sometidos a NaCl.....	21
Figura 10. Fotografía de los aislados sometidos a NaCl.....	22
Figura 11. Representación porcentual de los aislados bacterianos a HCN.....	24
Figura 12. Representación porcentual de la capacidad enzimática.....	26
Figura 13. Capacidad de producción de proteasas de las cepas aisladas.....	27
Figura 14. Antagonismo microbiano.....	28
Figura 15. Representación porcentual de antagonismo .....	28
Figura 16. Representación porcentual de inhibición del patógeno.....	28
Figura 17. Representación de la tasa de inhibición del patógeno.....	29

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Microorganismo utilizados para ensayos de antagonismo .....	17
Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos de todos los aislados que lograron crecer en medio LB a diferentes temperaturas y concentraciones de salinidad.....	23
Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos de todos los aislados que lograron presentar características relevantes con posible interés biotecnológico .....	28

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**PGPB:** Plant growth promoting bacteria

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio

**Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>:** Fosfato de calcio

**Fe:** Hierro

**FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O:** Cloruro de hierro hexahidratado

**FePO<sub>4</sub>:** Fosfato de hierro

**g/L:** Gramos por litro

**g:** Gramos

**HCN:** ácido cianídrico

**h:** Horas

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Fosfato de potasio bibásico

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de potasio monobásico

**LB:** Luria-Bertani

**m:** Metro

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:** Sulfato de magnesio heptahidratado

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Dihidrogeno fosfato de sodio

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NaCO<sub>3</sub>:** Carbonato de sodio

**NaOH:** Hidróxido de sodio

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** Ion amonio

**°C:** Grados Celsius

**pH:** Potencial hidrogenico

**Pi:** Fosfato inorgánico

**YPD:** Medio extracto de levadura peptona dextrosa.

# 1. INTRODUCCIÓN

Por lo general el chaco paraguayo se caracteriza en presentar una superficie plana, y pendientes suaves en algunas regiones y relieves poco ondulados en otras. El ambiente adverso y la evaporación a través del tiempo, en gran manera, produjo formaciones de evaporitas, haciendo así que el suelo sea salino (Gómez Duarte 1986).

Los suelos con gran cantidad de sal se caracterizan por una vegetación adaptada a la salinidad en la que se encuentran involucrados mecanismos fisiológicos, mediante los cuales las plantas pueden adaptarse a los ecosistemas con estrés salino. Un estudio llevado a cabo por Redman et al. (2002), sugiere que la comunidad microbiana asociadas o que crecen en simbiosis, puede ser la pista para comprender la adaptación de las plantas a su hábitat. Existe bastante evidencia que los microorganismos encontrados en asociación con las plantas, que se desarrollan en ambientes hostiles, colaboran en la capacidad de tolerancia al estrés abiótico (Rodríguez et al. 2008). Los suelos salinos se consideran hábitats difíciles para el desarrollo de la vida, pero tales hábitats albergan comunidades microbianas activas y diversas.

Las bacterias que se hallan en el interior de las raíces desempeñan funciones importantes en la adaptación y evolución de las plantas a su entorno. Utilizan un mecanismo completo para la percepción, señalización y respuesta al estrés. La evidencia experimental suficiente demuestra que las plantas que crecen en ambientes desfavorables como los ambientes ricos en metales, las concentraciones de elevada salinidad, ambientes áridos y temperaturas elevadas pueden desarrollar diferentes capacidades de adaptación a la adversidad y esto puede deberse en parte a microorganismos simbióticos (Hollister, EB et al. 2010).

Los organismos que viven de forma simbiótica con las plantas son las conocidas como las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCP). Éstas ayudan a la tolerancia de las plantas a varias condiciones de estrés abiótico, como los ambientes secos y salados, aumentando la absorción de nutrientes de la planta por fijación de nitrógeno, solubilización, producción de ácidos cianhídrico,

suprimiendo los estresores bióticos mediante la producción de compuestos antimicrobianos contra bacterias u hongos patógenos de las plantas. (Bokhari et al., 2019). Los estudios en ecosistemas salinos han permitido la caracterización de algunas enzimas y nuevos organismos con un potencial mejorado para aplicaciones biotecnológicas. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue investigar el potencial biotecnológico de las bacterianas asociadas con *Salicornia neei*, tanto en la raíz como en la rizosfera, Paralelamente, se utilizaron ensayos bioquímicos para investigar el potencial biotecnológico de estos aislamientos, que eventualmente podrían usarse para varios propósitos. (Hollister, EB et al. 2010).

### **1.1. Planteamiento del problema**

Existen pocos estudios sobre la diversidad de microorganismos existente en nuestro país, sobre todo en suelos localizados en zonas donde las condiciones ambientales son extremas, como la elevada temperatura, poca disponibilidad de agua, alta radiación solar entre otros factores, que han demostrado la presencia de microorganismos con potencial biotecnológico. En el caso de Paraguay, su territorio se divide en dos regiones: Oriental y Occidental. La región Occidental o también conocido como Chaco presenta dos zonas, una denominada bajo Chaco que se caracteriza por ser húmeda, mientras que la zona alta presenta un suelo semiárido, con condiciones ambientales extremas. Por lo tanto, ésta última podría albergar microorganismos, asociadas a las plantas que pueden mejorar el crecimiento, protegerlas de enfermedades y estrés abiótico, mediante una variedad de mecanismos, produciendo metabolitos secundarios que podrían ser alternativas a los productos químicos utilizados a nivel industrial. Esta limitante en cuanto a la diversidad microbiológica con potencial biotecnológico que interactúan entre planta y bacterias en las raíces y la rizósfera, cercanos a las lagunas saladas del Chaco, constituye el principal enfoque de este trabajo de investigación.

### **1.2. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el potencial biotecnológico con el que cuentan las bacterias asociadas a las raíces y la rizósfera provenientes de *Salicornia neei* que se distribuyen en los saladares del Chaco árido del Paraguay?

### **1.3. Justificación**

Durante mucho tiempo se han realizado trabajos de investigación con un grupo muy limitado de microorganismos, principalmente aquellos que tienen una importancia desde el punto de vista de la salud pública. Sin embargo, desde hace unas décadas esto ha ido cambiando con el descubrimiento de nuevos microorganismos con actividades biológicas o metabolitos secundarios que producen de forma natural para su subsistencia en su hábitat como el suelo, o asociadas a las plantas que les permiten desarrollarse de manera simbiótica. Estas sustancias producidas podrían ser extraídas para su empleo, que quizás reemplacen o mejoran los mecanismos tradicionales de uso en diferentes áreas de la ciencia.

Por mencionar, la agricultura actual enfrenta desafíos, integrando enfoque ecológicos y biotecnológicos, para lograr mayores rendimientos de los cultivos y producir al mínimo los impactos sobre el ambiente. Para lograr una mayor producción agrícola se han incrementado las dosis de fertilizantes sintéticos empleados, lo cual pueden provocar pérdidas de la fertilidad de los suelos, afectando la salud del ecosistema, por estas razones las investigaciones se han volcado al desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas, provocando un interés creciente del sector agroindustrial por los microorganismos benéficos del suelo, ya que la asociación de microorganismos con las plantas se han demostrado que pueden estimular la germinación y el crecimiento de las plantas (Moreno Reséndez et al., 2018).

Las bacterias asociadas a las plantas, tienen una capacidad única para sobrevivir y crecer con una considerable concentración de sal o tolerar altas temperaturas. Los organismos desarrollan mecanismos de adaptación específicas para las condiciones de estrés abióticos, permitiendo producir mayor capacidad y extracción de metabolitos con intereses comercial, industrial y salud pública, como la capacidad de producir biopolímeros, pigmentos, antimicrobianos y enzimas hidrolíticas.

Con este trabajo se pretende contribuir con el conocimiento, mediante la identificación de bacterias poco estudiadas a nivel local con posible potencial



biotecnológico que sean beneficiosas a nivel industrial, metabolitos promotores del crecimiento vegetal o actividad antimicrobiana para combatir patógenos.

## 1.4. Objetivos

### 1.4.1. Objetivo General

Analizar el potencial biotecnológico de las bacterias aisladas de las raíces y rizosfera de *Salicornia neei* del Chaco paraguayo.

### 1.4.2. Objetivos Específicos

- a) Aislar bacterias presentes en muestras de raíces (bacterias endofíticas) y rizosfera (suelo circundante), asociadas a *S. neei* del Chaco paraguayo.
- b) Clasificar las bacterias aisladas según su tipo de pared celular en Gram positivas o Gram negativos.
- c) Determinar la capacidad de crecimiento de las bacterias frente a estrés abiótico de temperatura y salinidad.
- d) Determinar la capacidad de solubilización de fosfato de las bacterias aisladas de las rizosfera y las raíces de *S. neei*.
- e) Determinar la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas (celulosa, pectina y proteasas) de los aislados bacterianos proveniente de las raíces y la rizosfera *S. neei*.
- f) Establecer la actividad antimicrobiana de los aislados bacterianos de las raíces y la rizosfera de la *S. neei*.

## **1.5. Hipótesis**

H0: Las bacterias asociadas a las raíces y la rizosfera provenientes de *S. neei* del Chaco seco paraguayo no presentan características bioquímicas con potencial biotecnológico.

H1: Las bacterias asociadas a las raíces y la rizosfera provenientes de *S. neei* del Chaco seco paraguayo presentan características bioquímicas con potencial biotecnológico.

## 2. MARCO TEÓRICO

Durante muchos años, científicos de todo el mundo han desarrollado y publicado estudios que tratan sobre el gran potencial que algunas bacterias tienen para promover el crecimiento de las plantas (García-Fraile et al. 2015). Muchas de estas bacterias son endófitas, es decir, viven dentro de las células vegetales. Las bacterias endófitas capaces de influenciar en el desarrollo de las plantas, se las denominan (Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal o Plant growth promoting bacteria PGPB). El potencial para mejorar la salud de las plantas ha llevado a un gran número de estudios que examinan su uso como inoculantes, principalmente en cultivos agrícolas (Gaiero et al. 2013; García-Fraile et al. 2015, 2017). Debido a estas cualidades, los PGPB son candidatos importantes para ser utilizados como inoculantes para reducir la necesidad de productos químicos, tales como pesticidas y fertilizantes, obteniendo gran importancia en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. En general, es más probable que los endófitos muestren mayores efectos promotores del crecimiento de las plantas que aquellas bacterias que colonizan exclusivamente la rizosfera (Chanway et al. 2000). Esto implica el requerimiento de características específicas para la competencia de dichos endófitos, es decir, la capacidad de colonizar con éxito la planta huésped. Las zonas de raíces laterales y las zonas largas de las raíces son zonas activas de colonización, puesto que, en esas zonas, las paredes celulares están en crecimiento, la entrada por espacios intercelulares es la más extendida dentro de las bacterias con comportamiento endofítico (Hurek y Reinhold-Hurek 2003). Existen mecanismos que utilizan las bacterias para ingresar dentro de sus huéspedes (las plantas), lo que les permite avanzar desde la rizosfera hasta la corteza del sistema radicular. Una vez que una bacteria alcanza la zona cortical de la raíz, una barrera como la endodermis puede bloquear la colonización hacia los tejidos internos y solamente algunas bacterias son capaces de pasar a través de la endodermis. Algunas bacterias pueden entrar pasivamente, ya que una parte de esta capa celular endodérmica está a menudo interrumpida, debido por ejemplo al crecimiento de las raíces secundarias (Gregory 2008; Compant et al. 2010). Por ejemplo, *Azorhizobium caulinodans* puede entrar en el interior de las raíces de arroz por las grietas existentes producidas por la

emergencia de las raíces laterales y después se mueven por los espacios intercelulares (Goormachtig et al. 2004).

La colonización de las raíces laterales del arroz también se observó con la inoculación de *Azospirillum brasilense*, donde la colonización fue estimulada por la naringenina (Gupta 2003).

## 2.1. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal

La estimulación del crecimiento debido a los microorganismos puede ser una consecuencia causada por mecanismos (Figura 1), como la fijación biológica de nitrógeno la producción de fitohormonas, la producción de sideróforos, la competencia de nutrientes y la adquisición sistemática de resistencia o inmunidad (Sevilla et al. 2001; Hurek y Handley 2002).

Comprender los efectos sinérgicos de las rizobacterias que promueven el crecimiento sobre las propiedades fisiológicas y bioquímicas pueden desempeñar un papel vital en la mejora de la tolerancia a la sequía, salinidad en garbanzos y trigo entre otros cultivos de importancia agroindustrial. El aumento inducido por los promotores de crecimiento vegetal evidenciados en el peso del brote y la raíz se ha demostrado previamente en los trabajos (Khan, Bano A y Zandi, P 2018; Abbasi, S., Bahierei A y Abbasi, F.,2011)



**Figura 1:** Representación simplificada de los mecanismos promotores del Crecimiento Vegetal que son generados por los microorganismos presentes en la rizosfera y las raíces de las plantas imagen adaptada de Cano A, 2011.

## **2.2. Solubilización del fosfato**

El fósforo es el segundo nutriente esencial de absorción necesarias en las plantas (Sharma et al. 2013). Este elemento es bastante insoluble en los suelos (Zou et al. 1992) y, en consecuencia, la agricultura tradicional se ha basado en la aplicación de fertilizantes químicos fosfatados. Lo que ocurre cuando se aplica como fertilizante a los campos, éste se convierte en insoluble y, no está disponible para las plantas (Norrish y Rosser 1983). Por lo tanto, el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato representan un eficaz sustituto para los fertilizantes químicos. Se han reportado cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium* como eficientes solubilizadoras de fosfato (Dastager et al. 2010). Cepas de los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* y *Erwinia* son reportados entre los más eficientes solubilizadores de fosfato en el suelo (Pereira, S. I. A. & Castro, P. M. L. 2014).

## **2.3. Capacidad antimicrobiana**

Se caracteriza por la inhibición o destrucción de un microorganismo por los productos metabólicos de otros, que incluyen antibióticos, enzimas líticas y enzimas detoxificadoras. Diversos autores han planteado que la capacidad de las cepas de *Pseudomonas spp.* de suprimir el desarrollo de patógenos en la rizosfera depende en gran medida de su habilidad para producir metabolitos de naturaleza antibiótica, tales como pyoluteorina, pyrrolnitrina, fenacina-1-ácido carbóxico y 2,4 diacetylphloroglucinol (Banger and Thomashow 1996; Picard et al. 2000). Berg et al. (2005) aislaron cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, capaces de producir el 2,4-diacetylphloroglucinol, la síntesis de estos metabolitos secundarios participa en el biocontrol de diversos fitopatógenos, junto con la síntesis de sideróforos por *Pseudomonas fluorescentes* ZUM80 presenta actividad inhibitoria frente a hongos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora*

(Santoyo et al.,2010). Además, con la adición de ácido cianhídrico desempeñan un importante papel en el control de enfermedades en trigo. Desde hace unos años se han ido encontrando más y más especies que producían antibióticos, siendo un gran número de ellos pertenecientes a las actinobacterias. Algunos de estos metabolitos sintetizados por actinobacterias han sido analizados por ser moléculas no descritas y su variedad es enorme, desde antifúngicos como la coronamycina proveniente de *Streptomyces* (Ezra D. 2004) a antibióticos como cefoxitina, estreptomycinina, tetraciclina, eritromicina (Evangelista-Martínez 2014).

No sólo son efectivos contra patógenos vegetales, sino que se han descubierto algunos con posible utilidad en medicina, que podría ser utilizados como nuevos medicamentos, sustituyendo a otros más largamente utilizados y con más posibilidades estableciendo tecnologías eficientes que pueden ser utilizadas para la producción de productos derivados de microorganismos. (Evangelista-Martínez y Moreno,2007).

#### **2.4. Enzimas que degradan proteínas**

Las celulasas, proteasas y amilasas se utilizan para la preparación de detergente para acelerar el proceso limpieza. Las celulasas microbianas ahora se fabrican comercialmente y están siendo utilizadas por diversas industrias, estas se complementan con los detergentes para la eliminación de la suciedad sin dañar y aumentar la suavidad de los tejidos, el proceso es amigable con el medio ambiente. Las bacterias, especialmente las especies de *Bacillus*, secretan enzimas extracelulares como amilasas, proteasas y lipasas de potenciales valores comerciales, las enzimas producidas por las bacterias son las más empleadas por su crecimiento en corto tiempo (Mukesh kumar et al., 2012).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas mediante la adición de agua a través de los enlaces peptídicos, y se encuentran ampliamente en plantas, animales y microorganismos (Niyonzima, FN y More, S. 2015). Las proteasas se clasifican en varios grupos según sus sitios activos y mecanismos catalíticos, como proteasa de serina, proteasa de cisteína, proteasas de aspártica, metaloproteasas, proteasas de treonina, proteasas de glutámica y proteasas

de asparagina. (Gupta, R., 2014). Los microorganismos, especialmente las bacterias y los hongos, constituyen la principal fuente de proteasas y se han estudiado ampliamente. Las proteasas no solo desempeñan funciones importantes en los procesos metabólicos celulares, sino que también albergan las características deseadas para aplicaciones industriales. Las proteasas de los microbios son enzimas industriales importantes y representan aproximadamente el 40–60% de las ventas totales de enzimas en todo el mundo (Vijay, K. E., Srijana, M., Kiran, K. K., Harikrishna, N. & Reddy, G. 2011).

Debido a sus amplias aplicaciones, muchas proteasas de microorganismos se han estudiado en las últimas décadas, y la mayoría de ellas se encuentran en cepas de *Bacillus* (Kumar, C. G. y Takagi, H. 1999). Además de la bacteria *Bacillus*, también se han encontrado proteasas de varias bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* (Rahman, R. N., Geok, L. P., Wong, C. F., Basri, M. & Salleh, A. B. 2010).

## **2.5. Enzimas que degradan pectinas**

La pectinasa es una enzima industrial de importancia comercial, debido a que sus aplicaciones biotecnológicas abarcan amplios espectros en diversas industrias como biocombustibles, papel de pulpa, alimentos para animales, textiles, fibra, etc. (Rebello, S. *et al.* 2017).

Las industrias de biocombustibles demandan estas enzimas pectinolíticas junto con las xilanasas, pues desempeñan su papel accesorio a las enzimas celulasa centrales para mejorar la sacarificación de la biomasa vegetal, durante la producción de biocombustible (Thite, V. S. y Nerurkar, A. S.,2019).

Las pectinas son degradadas por enzimas pectinasas, estas enzimas son diversas. Los microorganismos son uno de los principales productores de estas enzimas (Alkorta *et al.*,1998; Naidu y Panda, 1998; Kashyap *et al.*, 2001).

En el procesado de frutas para obtener zumos o jugos, la adición de pectinasas, durante la producción de zumos comerciales con las mezclas enzimáticas con hemicelulasas, celulasas junto con las pectinasas, mejora la extracción del zumo, color, aroma y sabor, de esta forma se reduce el tiempo necesario para la filtración y



la clarificación del zumo, así como se aumenta el rendimiento en la extracción de éste (Kashyap D. et al., 2001).

Las pectinasas son empleadas en la producción de zumos de frutas en el proceso de vinificación. Las pectinasas son adicionadas en el prensado de las uvas, facilitando dicho proceso o sobre el vino durante su clarificación. (Kashyap D. et al., 2001).

Este proceso puede realizarse por la adición combinada de pectinasas, hemicelulasas y proteinasas, como alternativa a la clarificación natural. Las pectinasas también pueden potenciar la liberación de antocianinas, de importancia en los vinos tintos (Kashyap D. et al., 2001).

En el trabajo de Thite, V y Nerurkar, A ( 2019), se aisló tres cepas de *Bacillus* M35, R31 y J208 se han identificado como *B. safensis* M35, *B. altitudinis* R31 y *B. altitudinis* J208, se demostró que estas cepas producen una endoxilanasas y tres tipos de endopectinasas, es decir, poligalacturonato hidrolasa (PGasa), pectato liasa (PL) y pectina liasa (PL), las propiedades fisicoquímicas de estas enzimas revelaron diversas características junto con su característica libre de celulasa que otorga importancia industrial a las pectinasas.

## **2.6. Enzimas que degradan la pared celular vegetal**

La degradación de las paredes celulares de las plantas por los microorganismos tiene un papel importante en el ciclo del carbono. Los componentes principales de la biomasa lignocelulósica son celulosa (40-50%), hemicelulosa (20-40%) y lignina (20-30%). La celulosa es un polisacárido lineal formada a partir de moléculas de  $\beta$ -D-glucosa unidas mediante enlaces de glucosa  $\beta$ -1,4; se pueden agrupar en microfibrillas; son cristalinas y no solubles. Las hemicelulosas, son heteropolímeros con diferentes grados de ramificación, generalmente más fáciles de degradar enzimáticamente que la celulosa (Agger et al. 2010). Otro heteropolímero, es la lignina, es relativamente hidrófobo y aromático que consta de tres monolignoles. Las enzimas que se sabe que actúan sobre la lignina son en su mayoría oxidoreductasas (Horn et al. 2012, Guillén et al. 2005, Somerville et al. 2004; Parthasarathi y Bellesia 2011).

En el caso específico de los rizobios, se ha visto que poseen enzimas capaces de degradar la celulosa y otros polisacáridos presentes en la pared celular vegetal. Para su detección, se utilizan técnicas cualitativas de difusión en placas que ponen de manifiesto la capacidad de distintas cepas de rizobios de producir pectinasas, hemicelulasas y celulasas, incluso en concentraciones muy pequeñas (Jiménez-Zurdo et al. 1996; Michaud et al. 2002). La mejora de la sensibilidad de las técnicas ha permitido detectar y cuantificar actividades enzimáticas incluso cuando se produce en cantidades bajas permitiendo investigar con mayor facilidad el papel de dichas enzimas degradadoras (Mateos et al. 1992).

Se ha identificado genes relacionados con la actividad celulásica en cepas pertenecientes al género *Rhizobium* (Menéndez et al. 2016), así como en numerosas actinobacterias de los géneros *Actinosynnema*, *Cellulomonas* y *Streptomyces*, entre otros (Koeck et al. 2014).

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Zona de muestreo, aislamiento bacteriano y condiciones de cultivo**

El muestreo se realizó en el Departamento de Boquerón Chaco, en las cercanías de la Laguna Capitán, en las coordenadas -22.540873, -59.676123. Las muestras de suelo fueron colectadas durante períodos comprendido entre abril y agosto de 2019.

En el chaco predomina un clima de transición tropical a subtropical, vientos cálidos del norte, durante el invierno seco (mayo-octubre) se producen fuertes tormentas de arena y vientos fríos del sur, de manera escasa se producen vientos del norte y este. En el invierno del chaco es un periodo con pocas precipitaciones, sin embargo, durante el verano (noviembre-abril) las lluvias son intensas y cortas, con evaporación alrededor de 1700 mm y precipitación de 850 mm al año. (Harder et al. 2004 citado por Rabery Cáceres & Ratzlaff, 2013). Mientras que en el Chaco Central semiárido se caracteriza por la formación de lagunas, riachos y cauces con salinización, la vegetación que se desarrolla alrededor de las lagunas está compuesta

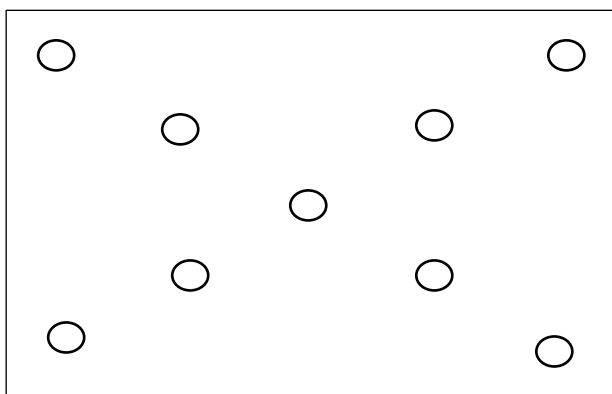
por especies adaptadas a la salinidad en el suelo, una de ellas es *Salicornia neei*. (Vogt. C, 2015).

Por estas características mencionadas, la adaptación a los suelos salinos y por el acceso se decidió aislar bacterias que estén asociadas a *S. neei*, para evaluar la capacidad de producción de metabolitos con capacidad promotora del crecimiento vegetal de la germinación y producción de raíces, que pueda ser utilizadas y aplicadas en cultivos vegetales de interés económico agroindustrial.

Para cumplir con la cantidad de muestra representativa se decidió coleccionar de manera aleatoria 10 plantas de *Salicornia neei*, según el recorrido de cuadrícula a 17 metros de las orillas de la laguna Salada, siguiendo el método (ver Figura 2) propuesto por Atlas Bartha R (2002). Las muestras de suelo provenientes de la rizósfera de las plantas y las raíces, fueron almacenadas en bolsas plásticas previamente esterilizadas.

### **3.1.1. Muestras provenientes de la Rizosfera**

Se utilizó 0,1 g de suelo provenientes de la rizósfera, se agregó agua estéril, se procedió a mezclar de forma enérgica y constante por unos segundos, siendo el procedimiento con modificaciones propuestas por Felestrino, E. (2013), luego se tomó 100 ul de esta solución y se introdujo en medio Luria-Bertani (LB) líquido, se incubó por 24 h. Posterior a la incubación con el método de dilución  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , se tomó 100ul de la dilución  $10^{-4}$  y se plaqueó en cajas de Petri 90x15mm con medio Luria-Bertani Agar (LBA). A continuación, se incubaron a 28°C por 10 días. Las colonias que se desarrollaron con diferentes formas y tamaños fueron transferidas en nuevas placas de Petri con medio LBA, para su posterior aislamiento. Las colonias aisladas fueron fotografiadas y agrupadas según su origen. Posteriormente a cada



aislado se le realizó la tinción de Gram. Todos los aislamientos fueron conservados en glicerol al 15% y almacenados a -20°C.

### Diagonal

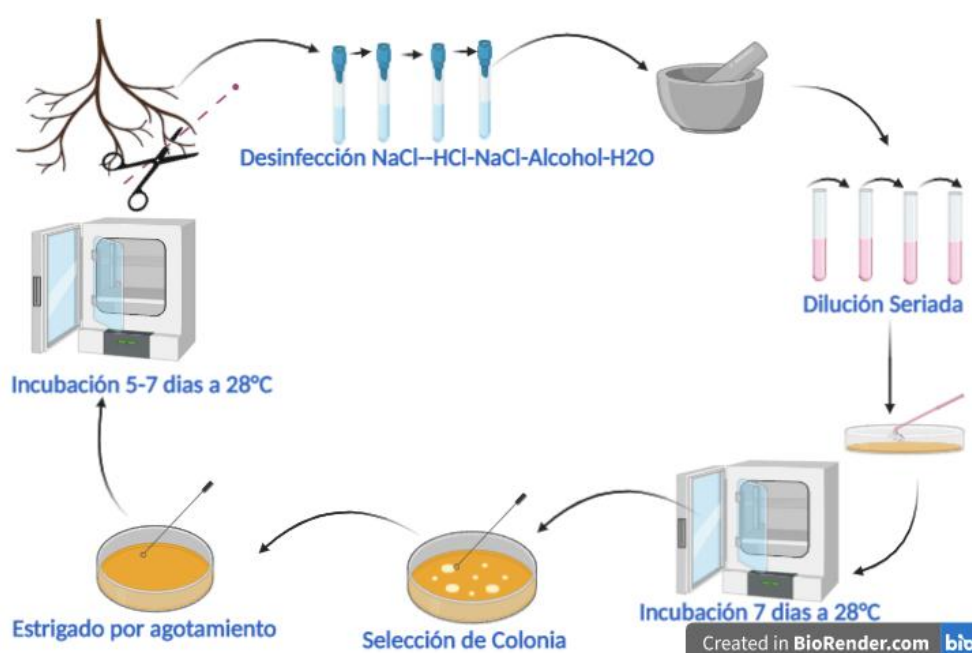
**Figura 2:** Recorrido propuesto por Atlas, R y Bartha R. (2002) para la colecta de la rizósfera y las raíces de *Salicornia neei*.

### 3.1.2. Muestras de Raíces Provenientes de *S. neei*

Se tomaron 5 fragmentos de las raíces de las plantas *S. neei*, aproximadamente de 1,0 - 0,5 cm. Las muestras de las raíces de las plantas fueron desinfectadas mediante una secuencia de soluciones: 9 g/L NaCl – 2 min, 70% de alcohol – 2 min, 2,5% Hipoclorito de Sodio – 2 min y 9 g/l NaCl – 2 min. (ver Figura 3).

Luego macerados en un mortero, para luego depositar en un medio líquido Luria-Bertani, que se incubaron a 28°C durante 24 h. (Felestrino,2013).

A continuación, una alícuota de 100 ul, se inoculó en medio selectivo LB agar que contenía clotrimazol, para evitar la formación de hongos. Todas las placas se incubaron a 28 ° C durante un período de hasta 10 días, las bacterias que fueron desarrollándose durante los días de crecimiento fueron aislados en nuevas placas con LBA selectivo. Las bacterias aisladas fueron, teñidas según el procedimiento para la tinción de Gram, fotografiadas y agrupadas según su origen. Todos los aislamientos fueron catalogados, conservados en glicerol al 15% y almacenados en - 20° C.



**Figura 3:** Resumen representativo de la metodología empleada en el aislamiento bacteriano de las raíces de *Salicornia neei*.

## 3.2. Factores de crecimiento de los aislados frente a estrés abiótico

### 3.2.1. Temperatura

Para estudiar la tolerancia a diferentes temperaturas de los aislados, en placas de LBA fueron sembradas las bacterias de estudio e incubadas a 4, 28, 37 y 55°C, durante 2 días, luego se procedió a la visualización del desarrollo y crecimiento bacteriano (Rodríguez-Valera, 1980).

### **3.2.2. Salinidad**

Para el estudio de la capacidad de tolerancia de las cepas aisladas a la salinidad, se controló el crecimiento bacteriano de cada aislado en placas de LBA en el cual se añadieron distintas concentraciones de cloruro sódico: 2, 2,5, 4,5 y 7%. (Rodríguez-Valera, 1980).

### **3.3. Análisis del potencial de la capacidad de promover el crecimiento de vegetal PGPR de los aislados**

#### **3.3.1. Producción de ácido hidrociánico (HCN)**

Siguiendo el método propuesto por Bakker y Schippers (1987), en un medio LB líquido suplementado con 4,4g/L de glicina y 0.081 g/L de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , en una placa multipocillos, se agregaron 50 ul de dicha solución con las cepas en estudio, luego se dejó en crecimiento durante dos días a 28°C. Posteriormente se agregó 100 ul de solución de ácido pícrico al 5% y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, para luego controlar el cambio de coloración de amarillo a marrón que es indicativo de producción de HCN.

#### **3.3.2. Producción de celulasa, pectinasa y proteasa**

La actividad enzimática se determinó en placas de Petri de 90x15 mm que contenían medio de base con ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g/l, agar 15 g/l, extracto de levadura 1 g/l) suplementado con 2 g / l (carboximetilcelulosa, pectina y caseína) con el pH ajustado a 6,0. Para la visualización de los halos formados se empleó el rojo congo para la determinación de la producción de celulasa (Feoli M, Gómez Z y Muñoz M; 1997).

#### **3.3.3. Solubilización de fosfato**

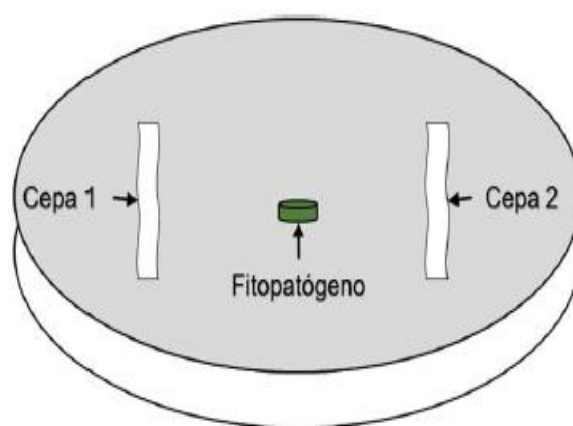
La capacidad para solubilizar fosfatos se evaluó en el medio que contenía (Extracto de levadura 5 g/l, Glucosa 10 g/l, 2g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , Agar 15 g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 gr de NaCl,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  , 0,5 g/l. Los aislados se sembraron en dicho medio, y se incubaron a 28°C durante 4 días. (Peix et al. 2004).

### **3.4. Antagonismo microbiano**

Para el ensayo de inhibición del crecimiento de patógenos, se realizaron pruebas con los siguientes microorganismos *Fusarium solani* (Cepa no referenciada, identificada y aislada en el instituto de Higiene de Chile), *Staphylococcus aureus* metilino resistente (ATCC 43300) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), utilizando el método de arrastre (Tabla 2).

La metodología utilizada para este ensayo fue la empleada por (Benítez et al., 2007). Se inocularon dos aislados bacterianos distintos (previo a su identificación)

en placas Petri con medio YPD haciendo dos líneas paralelas, cada una a 1 cm de distancia del borde de la placa Petri (Figura 4). Seguidamente, se colocó un disco del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* en el centro de la placa a la distancia de 3 cm de los aislados bacterianos y se incubó a temperatura de 28°C, hasta el 6to día se observó algún efecto sobre el crecimiento del fitopatógeno. Se procedió a medir el crecimiento del fitopatógeno al 6to, 9no y 12mo día de crecimiento.



**Figura 4:** Disposición de los aislados frente a *Fusarium solani*.

Mediante la utilización de una fórmula se calculó el porcentaje de inhibición de los aislados

$$\text{Ecuación 1} \quad \% \text{ Inhibición} = \left( \frac{D.C.C. - D.C.P.}{D.C.C.} \right) * 100$$

Dónde: D.C.C.: Diámetro de la colonia control (cm) y D.C.P.: Diámetro de la colonia problema (hongo en presencia de los antagonistas) (cm).

Organismo	Hospedador
<i>Fusarium Solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Homo sapiens</i>

**Tabla 1:** Microorganismos utilizados para el ensayo de antagonismo.



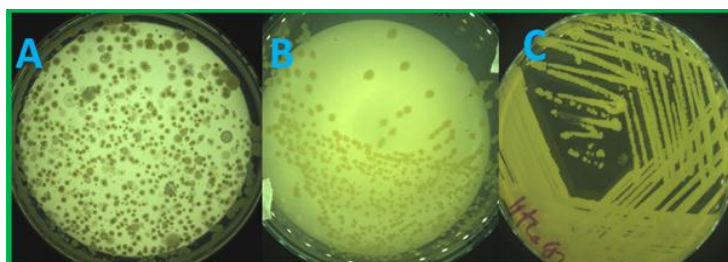
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Tinción de Gram y morfología bacteriana

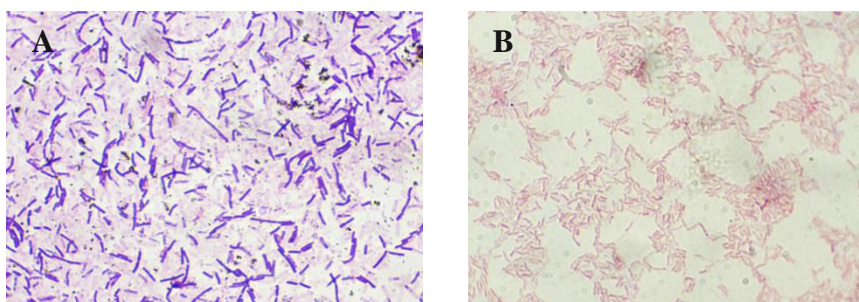
A partir de las raíces de *S. neei* y el suelo circundante a las raíces se aislaron un total de 64 colonias bacterianas en medio LB agar por agotamiento de asa, hasta obtener cultivos puros a partir de colonias basados en la variedad de formas y tamaño (Figura 5).

La morfología celular se observó al microscopio óptico, mediante tinción de Gram. Las bacterias aisladas tanto de las raíces como de la rizosfera se dividieron en Gram positivas (Figura 6) con un total de 61 (95,3%) y Gram negativas solo 3 (4,7%), de las cuales 30 (46,9%) provinieron del suelo circundante (Rizosfera) de las plantas y 34 (53,1%) de las raíces (Endófitas) de *Salicornia neei*, datos similares encontrados en Ajit y col. (2017), donde el número máximo de aislados bacterianos aislados de la raíz de una planta medicinal fue de 46,7%.

En un trabajo similar a este realizado por Rodríguez M y col; (2020) donde aislaron *Pseudomonas segetis* proveniente de *Salicornia europea* que es la primera vez que se reportó esta especie que ha sido aislada de un ambiente salino, producen compuestos que aumentan la capacidad para defenderse contra patógenos y capaces de producir degradación enzimática, varias bacterias *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Arthrobacter* y *Bacillus* ya están siendo empleadas para mejorar la tolerancia a la sal en cultivos agrícolas (Bharti N., 2016).



**Figura 5:** Aislamiento bacteriano, A) Aislamiento bacteriano por extensión en placa. B) Aislamiento bacteriano por agotamiento. C) Colonias puras por estriado para obtención de biomasa.



**Figura 6:** A) Aislado 72E (E: endofítica), Gram positiva vista al microscopio tras ser teñidas con la tinción de Gram; B) Aislado 32R (R: Rizosfera) Gram negativa vista al microscopio tras ser teñidas con la tinción de Gram.

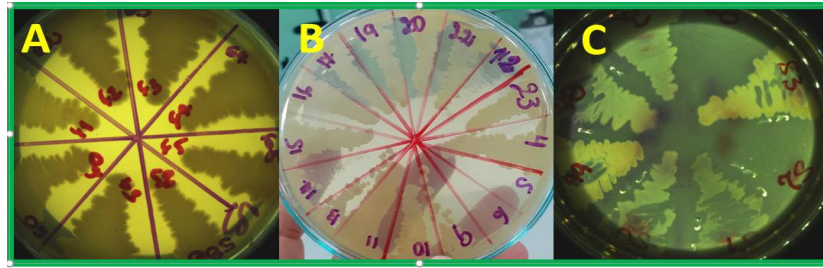
## 4.2. Factores de crecimiento de los aislados frente a estrés abiótico

### 4.2.1. Temperatura

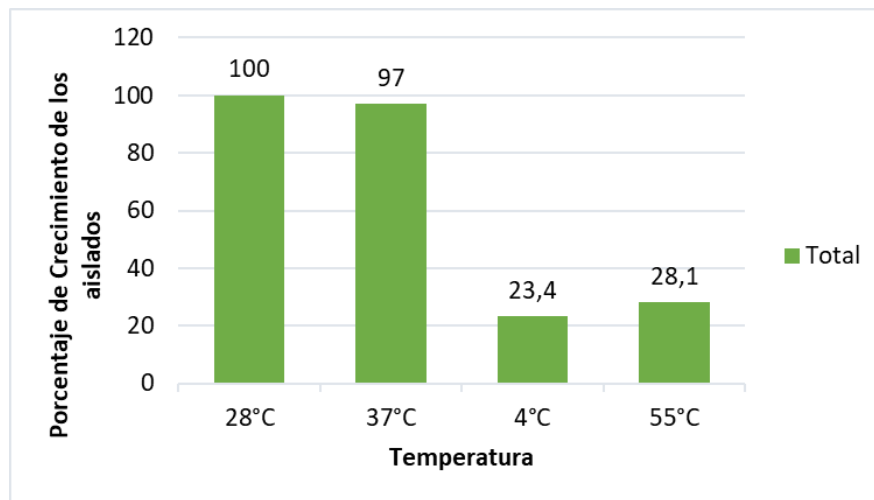
Todos los aislados fueron capaces de crecer a 28°C, mientras que a la temperatura de 4°C los aislados capaces de crecer fueron 34 (40,9%). A la temperatura de 37°C el 63 (75,9%) lograron crecer, mientras que a la temperatura de 55°C lograron crecer 20 (30,7%) en una cantidad excesiva (Figura 7).

Los aislados que lograron crecer a diferentes rangos de temperatura (Tabla 2) fueron únicamente de 6 (9,2%), esto sugiere que estos aislados tienen una adaptación al ambiente con temperaturas muy cambiantes (Figura 8).

Uno de los mecanismos que emplean los microorganismos para poder resistir en ambientes cambiantes son por adaptaciones en las composiciones de membrana celular, los fosfolípidos tienen enlaces de éter termoestables y cadenas de acilo ramificadas, reduciendo la permeabilidad de la membrana, ayudando a mantener los gradientes de iones bajo condiciones de estrés, haciendo posible la supervivencia. Actualmente las bacterias con estas adaptaciones son empleadas para la producción de etanol, isopropanol acetato como *Clostridium thermocellum*, *Geobacillus thermoglucosidarius*, *Halomonas campaniensis*. (Jacquemet, A. et al., 2009; Lin, P. et al. 2015; Cripps, R. E et al. 2009; Yue, H. T. et al. 2014).



**Figura 7:** Imagen representativa de los aislados sometidos al gradiente de temperatura: A) Aislados sometidos a 28°C, B) Aislados sometidos a 37°C y C) Aislados sometidos a 55°C.



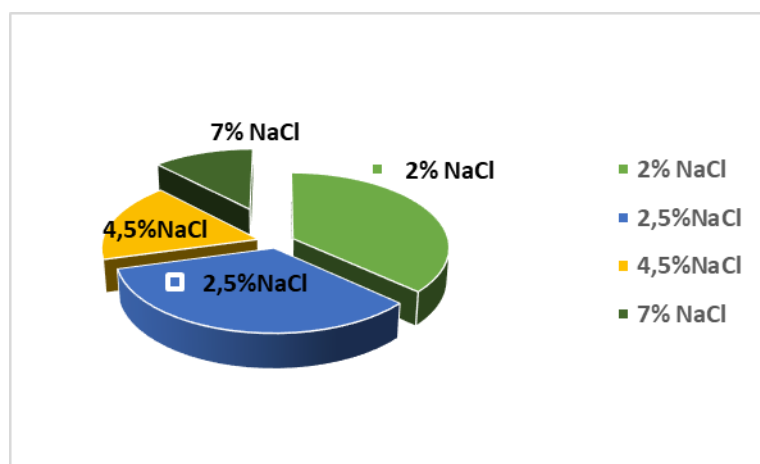
**Figura 8:** Representación porcentual de los aislados bacterianos que cuentan con la capacidad de crecer a diferentes temperaturas 4°C a 55°C.

#### 4.2.2. Salinidad

Los mecanismos adaptativos empleados por los microorganismos para poder sobrevivir en ambientes hipersalinos son la producción de osmolitos internos incluyendo ectoína, trehalosa y glicina, que equilibran el gradiente osmótico a través de la membrana celular. Otros microorganismos equilibran la presión osmótica al permitir que las sales se acumulen intracelularmente. Los proteomas de estos microorganismos evolucionaron con alto contenido de aminoácidos, que se cree para mantener la estabilidad y la actividad de las proteínas en altas concentraciones de sal (Lenton, S., et al, 2016).

Otra estrategia utilizada por los microorganismos es activar bombas de iones, la mayoría comúnmente antiportadores de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ , para mantener la homeostasis de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  (Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y, Dover, N, 2001).

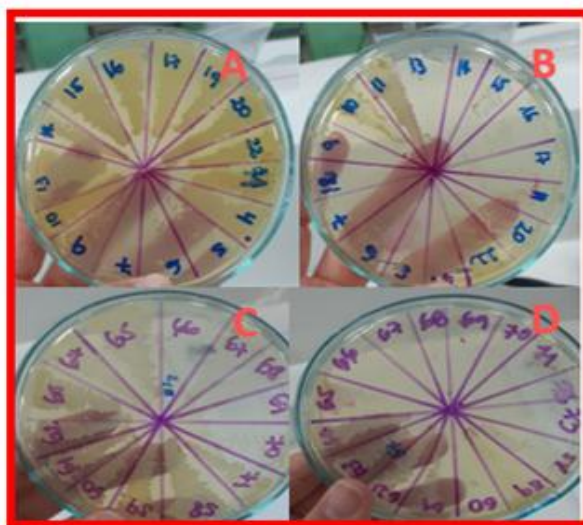
En el trabajo todos los aislados fueron capaces de crecer en un medio con 2% de NaCl, mientras que al aumentar la concentración a 2,5%, lograron crecer 59 que equivale al 92,2% (Figura 9). Al continuar aumentando la concentración a 4,5% de NaCl, los aislados que lograron crecer fueron 30 (46,8%). Sin embargo, a la concentración de 7% de NaCl, crecieron de manera excesiva 21 (32,8%) aislados, crecieron de manera escasa 8 (12,5%) aislados y no consiguieron crecer 44 aislados.



**Figura 9:** Representación porcentual de los aislados bacterianos que tienen la capacidad de crecer a diferentes concentraciones de NaCl.

Los aislados que lograron crecer a todas las concentraciones fueron 21 (32,8%), estos aislados demostraron una adaptación a gran cantidad de Sal (Figura 10), estos datos son esperados, puesto que la zona de muestreo forma parte de las lagunas saladas del chaco, estas bacterias podrían ser candidatos ideales para el cultivo de plantas en áreas salinas o con riego salino, para ello sería conveniente evaluar a estas bacterias que podrían ser capaces de interactuar beneficiosamente con plantas de cultivo tradicional en experimentos de invernadero. Esto podría tener un interés agroindustrial, en trabajos anteriores se destaca la importancia de la aplicación de bacterias halotolerantes aisladas del suelo salino, que proporciona una pista sobre los mecanismos por los cuales las bacterias mejoran la tolerancia a la sal, mediante la absorción de macronutrientes en el estudio realizado por, Safdarian et al., 2019, la presencia de *Arhrobacter nitroguajacolicus* en la semilla mejora la tolerancia a la sal en plántulas de trigo, produciendo mayor cantidad de raíces y brote, gracias a los genes implicados en la biosíntesis de la pared celular.

El estrés ambiental disminuye significativamente el contenido de azúcar en las hojas de las plantas, causando alteraciones fisiológicas y bioquímicas, dependiente del fotosistema II, puesto que la azúcar preserva la estructura de las macromoléculas y las membranas durante la deshidratación extrema, causada por la alta salinidad (Prado, F, Boero, C, Gallardo, M y González, JA; 2000). Las plantas de trigo sufren un proceso de peroxidación que daña la estructura y la función de la membrana celular de las células vegetales en cultivos en suelos con gran cantidad de sal (Singh.R y Jhan, P; 2016), Sin embargo, la inoculación de *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp mostró superar el estrés salino al reducir la peroxidación. El tratamiento con bacterias promotoras del crecimiento aisladas de suelos con estrés abiótico mejora la disminución en el contenido de proteínas, Ford B y Lea, P, 2007 demostraron una correlación positiva entre el aumento de la proteína demostrando tolerancia a la sequía y salinidad.



**Figura 10:** Las fotografías corresponde a los aislados analizados en las diferentes concentraciones de NaCl: A) Aislados a la concentración 2% de NaCl, B) Aislados sometidos a 2,5%. C) Aislados sometidos a 4,5% de NaCl, D) Aislados sometidos a la concentración de 7% de NaCl.

### **4.3. Análisis del potencial de la capacidad de promover el crecimiento de vegetal PGPR de los aislados**

Un total de 64 aislados se emplearon para los ensayos, estos sometidos a la estimulación indirecta del crecimiento vegetal ácido cianhídrico, producción de

enzimas hidrolíticas y de inhibición de crecimiento de los patógenos (*Fusarium solani* y *Klebsiella pneumoniae*).

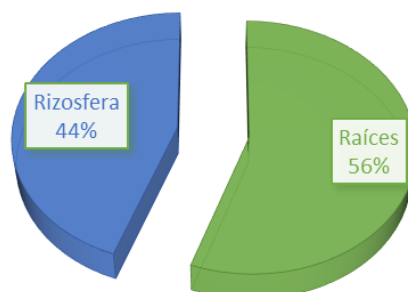
N° Aislados	Origen	Temperatura				Salinidad			
		4°C	28°C	37°C	55°C	2%	2,5%	4,5%	7%
4	R	+	+	+	+	+	+	+	-
5	R	+	+	+	+	+	+	-	-
6	R	+	+	+	+	+	+	-	-
7	R	+	+	+	+	+	+	-	-
9	R	+	+	+	+	+	+	-	-
10	R	+	+	+	+	+	+	-	-
14	R	+	+	+	+	+	+	d	-
15	R	+	+	+	+	+	+	d	-
16	R	+	+	+	+	+	+	+	D
17	R	+	+	+	+	+	+	+	D
80	E	+	+	+	+	+	+	+	+
81	R	+	+	+	+	+	+	+	+
82	R	+	+	+	+	+	+	+	+
83	R	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabla 2:** Resumen de los resultados obtenidos de todos los aislados que lograron crecer en medio LB a diferentes temperaturas y concentraciones de salinidad. Ref.: (R) Rizósfera, (E) Endofítico, (++) Crecimiento fuerte, (+) Crecimiento, (d) Crecimiento débil, (-) Sin crecimiento.

#### 4.3.1. Producción de ácido cianhídrico HCN

El cianuro de hidrógeno HCN, es un compuesto volátil pueden propagarse a larga distancia, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal las producen para inhibir el crecimiento de bacterias antagónicas, protegiendo de esa manera a las plantas de los patógenos (Raza et al., 2016). Los aislados capaces de producir HCN fueron 18 (27,6%), de las cuales el 44% las bacterias productoras de HCN provienen de la rizosfera y el 56% de las raíces de *S. neei* (Figura 11), similares datos reportados en el estudio de Felestrino et, al 2017, un 22,72% de los aislamientos

fueron capaces de producir ácido cianhídrico de la planta *L. hypogaea*, datos corroborados por la prueba de volatilidad.



**Figura 11:** Representación porcentual de los aislados bacterianos que demuestran la capacidad de producción de HCN.

#### 4.3.2. Actividad celulolíticas

Las celulasas microbianas representan el grupo más destacado a nivel mundial en cuanto a enzimas, ya que tienen aplicaciones industriales. Para determinar la actividad Celulolíticas se empleó la técnica cualitativa de difusión en placas de agar con carboximetilcelulosa como sustrato. Del total de los aislados fueron capaces de formar halos que evidencia producción de celulasas 22 (34,3%).

Los aislados que producen celulasa presentan un halo visible de hidrólisis de carboximetilcelulosa no cristalina, de los 22 aislados el 81,8% son bacterias endofíticas, el 18,1% de los aislados provienen de la rizosfera (Figura 12).

#### 4.3.3. Actividad pectinolíticas

Las pectinasas producidas por bacterias representan un interés económico, debido a que son empleadas para producción de jaleas y jugos entre otras aplicaciones industriales. Para determinar la actividad pectinolítica, se empleó la técnica cualitativa de difusión en placas de agar con pectina como sustrato.

La aplicación de enzimas pectinolíticas crudas en diversos procesos industriales hace que estas enzimas sean comercialmente valiosas y exigen de un proceso de producción sea rentable, las cepas de *Bacillus safensis* y *Bacillus altitudinis* se estudiaron para la producción de pectinasas, los cultivos puros demostraron una producción de casi el 1% de pectinasas. (Thite, V., Nerurkar A.,

Baxi., N; 2020). En la literatura varias bacterias producen simultáneamente xilanasas y pectinasas como *Bacillus sp* y *Streptomyces sp* (Kashyap y col., 2000)

Los aislados que producen pectinasas presentan un halo visible de hidrólisis, que fueron desarrollados por un total de 30 aislados que corresponde a 46,9% fueron capaces de formar halos que evidencia producción de pectinasas.

Los 30 aislados que tuvieron capacidad de producción de pectinasas según el origen de aislamiento de bacterias endofíticas 59,3%, las bacterias aisladas provenientes de la rizosfera 40,6% (Figura 13).

#### **4.3.4. Actividad proteolítica**

Las proteasas microbianas representan un interés mundial, ya que tienen diversas aplicaciones industriales. Para determinar la actividad proteolítica se empleó la técnica cualitativa de difusión en placas de agar con caseína como sustrato. Las cepas que producen proteasas presentan un halo visible de hidrólisis. Del total de los aislados fueron capaces de formar halos que evidencia producción de proteasas tan solo fueron 4 (6,3%). De las 4 bacterias capaces de formar halos el 75% son aislados endofíticos y el 25% son bacterias provenientes de la rizosfera (Figura 13). Solo 7 (10,9%) fueron capaces de producir las tres enzimas hidrolíticas estudiadas.

Los resultados de los ensayos de producción de enzimas por la producción de enzimas proteolíticas producidos por microorganismos pueden actuar en la hidrólisis de proteínas de membrana y pared celular. (Tremacoldi CR 2009).

#### **4.3.5. Solubilización de fosfato**

La mayoría de los suelos contienen alta cantidad de fosfato, pero solo una pequeña porción está disponible para las plantas. Los aislados fueron sometidos a las pruebas de solubilización de fosfato, de los cuales solo 3 aislados (4,6%) fueron capaces de solubilizar fosfatos.

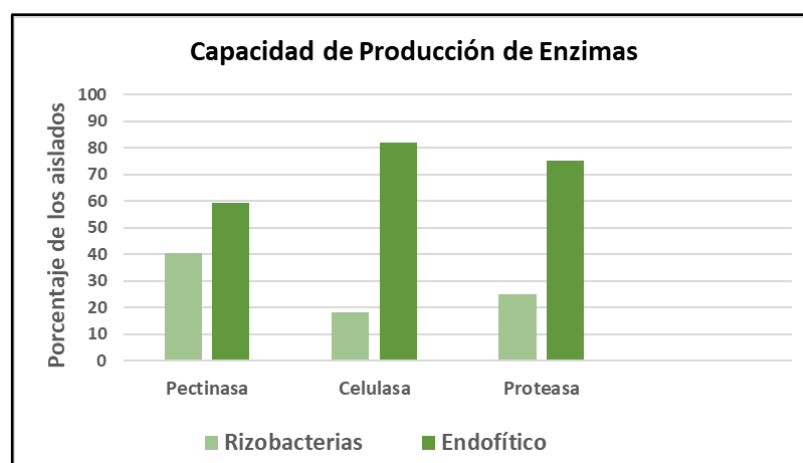
Según Das y col., 2003 *Pseudomonas putida* solubiliza el fósforo inorgánico, aumentando el suministro de fósforo a la planta, esto tiene un efecto en la producción de estrigolonas, que reduce la colonización de la raíz por los hongos micorrizicos promotores del crecimiento mejoran la colonización de la raíz (Yoneyama, K y col



2008). Mientras que en el trabajo realizado por Qessaoui R y col; 2019 aislaron 5 bacterias *Pseudomonas sp.* de la rizosfera que fueron capaces de solubilizar fosfato, producir sideróforos, amoníaco y ácido indol-3-acético aumentando la germinación de semillas, la altura de las plántulas y el diámetro de tallo en plantas de tomate.

En trabajos anteriores ejecutados por Richardson y col., 2011 y Zahir, ZA y col., 2009 en el que plantas de pastos y lentejas respectivamente, fueron tratadas con bacterias promotoras de crecimiento que mejoran la solubilidad de fósforo y potasio mejorando el desarrollo de las raíces y secreción de ácidos orgánicos, que son claves para la absorción de nutrientes atribuyendo mayor peso seco y por ende mayor rendimiento en los cultivos vegetales.

Las bacterias *Pseudomonas fluorescentes* y *Bacillus licheniformes* crecidos conjuntamente, interactuaron positivamente en la colonización de la rizosfera y la superficie de la raíz y estimulación del crecimiento en plantas de trigo, ambas bacterias son capaces de solubilizar el fosfato e inhibir el crecimiento de fitopatógenos (Ansari, F, Ahmad, I., 2019)



**Figura 12:** Representación porcentual de los aislados bacterianos que demuestran la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas dependiendo la zona de aislamiento.



**Figura 13:** Imagen representativa de los aislados capaces de producir proteasas.

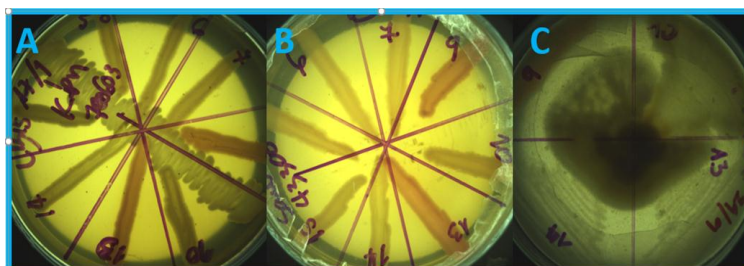
#### **4.4. Antagonismo microbiano**

A lo largo de los años se han ido encontrando bacterias que producen metabolitos secundarios, antibióticos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos, entre las bacterias más estudiadas se encuentran *Bacillus*, *Streptomyces ssp*, *Pseudomonas spp.*, (Rojas Badía et al., 2017; Hong et al., 2019; Guerra et al., 2011). El sistema inmune de los vegetales tiene un sistema complejo de producción de metabolitos que proporciona una defensa aumentando la capacidad para expresar una resistencia, lo que permite una respuesta más rápida y fuerte frente a los patógenos. Las rizobacterias y endofíticas promotoras del crecimiento vegetal inducen la resistencia sistémica frente a los patógenos del suelo (DAlessandro, M y col.,2013; Lioussanne, L.,2010)

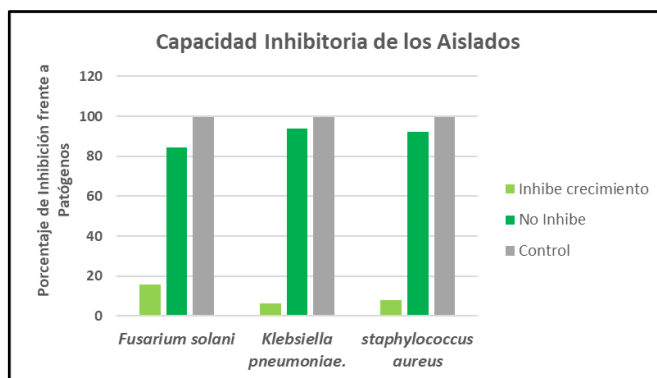
Los aislados que formaron un halo inhibitorio frente a *Fusarium solani* fueron unas 9 (13.8%). Fueron 3(4.61%) de los aislados fueron capaces inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 14).

En el trabajo realizado por Sandeep Sharma y col., 2019 identificaron una rizobacteria halotolerante que tiene efecto de estimulación de crecimiento en el maní, en los ensayos in vitro demostraron la activación de genes involucrados en la producción de etileno y la señalización de defensa contra *Aspergillus flavus*, en trabajos similares realizados por Cao, Y et al., (2018) caracterizaron dos aislados de *Bacillus velezensis* asociados a la rizosfera que producen tres compuestos de lipopéptidos responsables de la actividad antimicrobiana frente a *Fusarium oxysporum* y *Ralstonia solanacearum*, diversos autores reportan actividad antimicrobiana frente a *Fusarium Solani* por parte de bacterias aisladas como por ejemplo *Streptomyces sp* (Erza D, y col.,2004; El Gendy MMA y El Bondkly 2010).

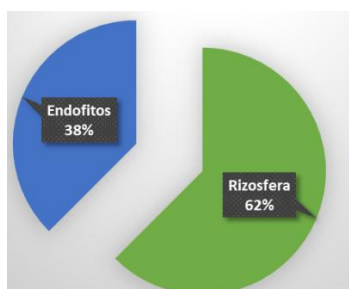
En otro estudio realizado por Ajit y col (2017) el 47% de los aislados de una planta medicinal mostraron actividad antimicrobiano contra diversos patógenos como *E. coli*, *C. albicans*, solo el 0.59% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, muy diferente al este ensayo realizado donde se obtuvo 7.81% (Figura 15) de los aislados demostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con características meticilino resistente, lo cual demuestra que estos aislados podrían tener una gran perspectiva en las industrias agrícola y farmacéutica.



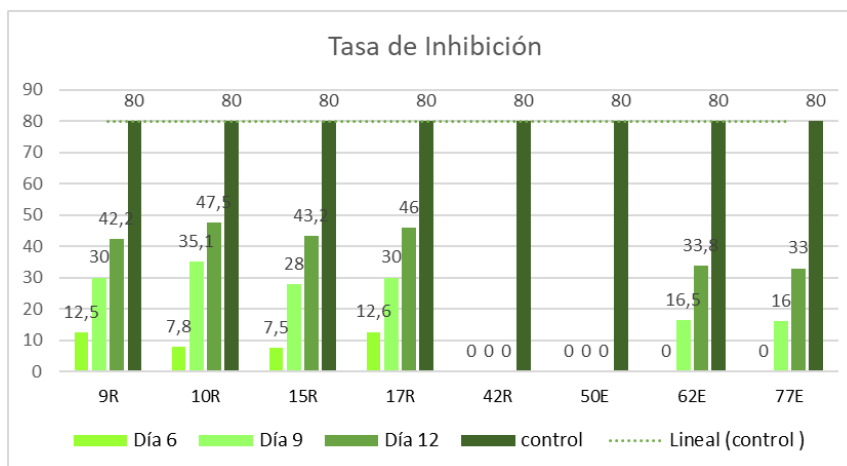
**Figura 14:** Se observa la inhibición del crecimiento en patógeno a 37°C de incubación A) Inhibición en el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* de las bacterias aislada. B) Observación de halos en la inhibición en el crecimiento contra *Fusarium solani* C) Inhibición del crecimiento en *S. aureus*.



**Figura 15:** Representación porcentual de inhibición del crecimiento de los aislados frente a patógenos.



**Figura 16:** Representación porcentual del origen de los aislados que presentan inhibición del crecimiento frente a *Fusarium solani*.



**Figura 17:** Representación de la tasa de inhibición del crecimiento de los aislados frente a *Fusarium solani*.

N° Aislado	Origen	Gram	T°C	S %	HCN	Celu	Pect	Prot	PO <sub>4</sub>	Ant
5	R	+	28	2,5	-	-	-	-	-	+
9*			37	7	+	+	-	+	-	+
7*			28	4,5	+	+	+	+	-	-
10			37	2,5	+	-	+	+	-	+
15			28	7	+	-	+	-	-	+
17			28	4,5	-	-	-	-	-	+
22			37	7	-	-	-	+	-	-
83			37	7	+	-	-	-	-	+
46			28	4,5	+	-	-	-	-	+
50			28	2,5	-	+	+	-	-	+
56*	E	+	37	2,5	+	+	+	-	-	+
57			28	2,5	-	+	+	-	-	+
58			28	4,5	-	-	+	-	-	+
62			37	7	-	+	+	-	-	+
73			28	37	-	+	-	+	-	-

**Tabla 3:** Resumen de los resultados obtenidos de todos los aislados que lograron presentar características relevantes con posible interés biotecnológico, (R) Rizosfera, (E) Endofítico, (\*) Aislados para PCR, (+) Crecimiento/con característica, (-) Sin crecimiento/característica, (T)

Temperatura, (S%) Porcentaje de salinidad, (Celu) Actividad celulítica, (Pect) Actividad pectinolítica, (Prot) Actividad proteolítica, (PO<sub>4</sub>) Producción de fosfato y (Ant) Capacidad antagonista.

Los resultados de inhibición de los aislados frente a Fitopatógeno *Fusarium solani* obtuvimos 8 aislados con la capacidad de inhibición del crecimiento del hongo, de los cuales 38% proviene de aislados endofítico y el 62% (Figura 16), corresponde a aislados provenientes de la rizosfera, obteniendo mejores resultados de inhibición del aislado 9R (Figura 17).

El mecanismo probable que utilizarían las bacterias como control biológico microbiano interactuando con las plantas induciendo resistencia o cebando plantas sin ninguna interacción directa con el patógeno objetivo, también podrían actuar a través de la competencia de nutrientes u otros mecanismos que modulan las condiciones de crecimiento del patógeno. Los antagonistas que actúan a través del hiperparasitismo y la antibiosis interfieren directamente con el patógeno (Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ., 2019). Dichas interacciones son cascadas altamente reguladas de eventos metabólicos donde podrían interactúa las bacterias benéficas produciendo metabolitos que interfieren en el crecimiento del patógeno.

Las rizobacterias pueden promover directa o indirectamente efectos positivos en las plantas. Indirectamente, suprimen los patógenos mediados por la competencia y la producción de compuestos antimicrobianos y enzimas líticas. Directamente, solubilizan minerales y causan una amplia gama de cambios en la rizosfera, lo que promueve una mayor eficiencia en la absorción de agua y macro y micronutrientes por parte de las plantas (Glick B.R. Hindawi., 2012), estimulando a un mayor rendimiento en cuanto al crecimiento vegetal, esto hace suponer el por qué para este ensayo obtuvimos mayor porcentaje de bacterias provenientes de la rizosfera y no así de la endofítico.

Con la ejecución de este trabajo de investigación se puede aceptar la hipótesis alternativa: “Las bacterias asociadas a las raíces y la rizosfera provenientes de *S. neei* del Chaco seco paraguayo presentan características bioquímicas con potencial biotecnológico”, debido a que se han demostrado que 3 bacterias aisladas (dos provenientes de la rizosfera y un aislado endofítico) presentaron características

bioquímicas (ver Tabla 3) con alta probabilidad de aplicación biotecnológica en procesos industriales.

## **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este trabajo representan unos de los primeros estudios de aislamientos bacterianos de una planta halotolerante *S. neei* en condiciones de estrés abióticos.

Se obtuvieron en total 64 aislados, siendo Gram positivas un total de 61 (95,3%) y Gram negativas solo 3 (4,7%), de las cuales 30 (46,9%) provinieron del suelo circundante (Rizosfera) de las plantas y 34 (53,1%) de las raíces (Endófitas).

El 9,2% de los aislados lograron crecer a diferentes rangos de temperatura, mientras que el 32,8% a concentraciones elevadas de NaCl.

Los aislados capaces de producir HCN fueron 18 (27,6%), de las cuales el 44% las bacterias productoras de HCN provienen de la rizosfera y el 56% de las raíces de *S. neei*. Mientras que los capaces de formar halos que evidencia producción de celulasas fueron 22 (34,3%) del cual el 81,8% son bacterias endofíticas y el 18,1% de la rizosfera. Los aislados con capacidad de producción de pectinasas fueron 30 (46,9%) siendo el 59,3% endofíticas y 40,6% de la rizosfera. En relación a la producción de proteasas fueron 4 (6,3%), correspondiendo el 75% a aislados endofíticos y el 25% de la rizósfera. Solo fueron 7 (10,9%) capaces de producir las tres enzimas hidrolíticas estudiadas. Los aislados bacterianos capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron mayoritariamente bacterias endofíticos capaces de hidrolizar para celulosa, pectina y caseína.

En cuanto a la solubilización del fosfato, solo 3 aislados (4,6%) fueron capaces de solubilizarlo.

Por último, las bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium solani* fueron 13,8%, el 4,6% de los aislados fueron capaces inhibir el crecimiento de

*Klebsiella pneumoniae* y solo el 0,6% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Finalmente se puede concluir que, del total de bacterias aisladas 3 de ellas presentaron características bioquímicas muy prometedoras como potencial biotecnológico para su uso en procesos industriales.

## **5.2. Recomendaciones**

El conocimiento de la diversidad endofítico y la rizosfera es importante no solo para comprensión de la ecología de la comunidad de microorganismos, así como para la innovación de aplicabilidad biotecnológica y productividad en la gestión de Interés agronómico.

1. Para ello deberíamos realizar pruebas *in vivo* de las bacterias aisladas con cultivos con interés agroindustrial en invernaderos.
2. Realizar todos los ensayos para la promoción del crecimiento vegetal como ser producción de nitrógeno, sideróforos, ácido indol acético entre otros.
3. Es vital la identificación de los aislados bacterianos para comparar con datos obtenidos de correlación con la literatura científica.
4. Realizar pruebas de patogenicidad de los patógenos controles sería una prueba de validación del método empleado en este estudio.
5. La prueba de volatilidad en la producción de HCN es importante ya que a partir de esos datos se puede determinar que los aislados productores de HCN efectivamente tendrían un efecto promotor en los crecimientos de los cultivos de interés agroindustrial.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abbasi, S., Bahiraei, A. y Abbasai, F. (2011). Un método altamente sensible para la determinación simultánea de niveles ultra traza de cobre y cadmio en muestras de alimentos y agua con luminol como agente quelante por voltamperometría de adsorción. *Comida Chem.* 129 (3), 1274-1280.
- Ansari, F.A., Ahmad, I.(2019). Fluorescent *Pseudomonas -FAP2* and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Sci Rep* 9, 4547
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. y Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochemistry*33; 21-28.
- Atlas, R. M y Bartha, R. (1981). Biogeochemical cycling, the carbon cycle. In: *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Addison-Wesley Publishing Company.pp.349-380.
- Agger J, Viksø-Nielsen A, Meyer A (2010) Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 58(10), 6141-6148.
- Ahemad, M. y Kibret, M. (2014). Mecanismos y aplicaciones de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas: perspectiva actual. *J · King Saud Univ Sci.* 26 (1), 1–20.



- Bharti, N., Shiv Shanker Pandey, Deepti Barnawal, Vikas Kumar Patel & Alok Kalra (2016). Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Sci Rep* 6, 34768.
- Bangera M, Thomashow L (1996) Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 9(2), 83-90.
- Bakker, A.W.; Schippers, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growthstimulation. *Soil Biology and Biochemistry*. Oxford, v.19, p.451 457, 1987.
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R (2005) Endophytic and ectophytic potato associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 215-229.
- Chanway C, Shishido M, Nairn J, Jungwirth S (2000) Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria.
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P. et al. (2018) Antagonismo de dos aislados de *Bacillus velezensis* que promueven el crecimiento de plantas contra *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum* . *Sci Rep* 8, 4360.

- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
- Cripps, R. E, Eley K , fugas de DJ , Rudd B , Taylor M , Todd M , Boakes S , Martin S , Atkinson T . (2009). Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metab. Eng.* 11, 398–408.
- Das, K., Katiyar, V. y Goel, R. (2003). Potencial de Solubilización 'P' del crecimiento de plantas que promueven mutantes de *Pseudomonas* a baja temperatura. *Microbiol Res.* 158 , 359-362.
- Dastager S, Deepa C, Pandey A (2010) Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 987-992.
- El-Gendy MMA, EL-Bondkly AMA. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamy-cin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. *J Ind Microbiol Bio-technol.* 2010; 37: 831–841.
- Evangelista-Martínez Z, Moreno A.E. (2007) Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Biotecnología.* 37-50.
- Evangelista-Martínez Z (2014) Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 1639-1647.

- Ezra D. (2004) Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* 150:785–793.
- Felestrino, Érica & Santiago, Iara & Freitas, Luana & Rosa, Luiz & Ribeiro, Sérgio & Moreira, Leandro. (2017). Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. *Frontiers in Microbiology*. 08. 10.3389/fmicb.2017.00172.
- Felestrino, E. B. (2013). Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microrganismo associados à interação *Langsdorffia hypogaea*-hospedeira-rizosfera. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Feoli M, Gómez Z, Muños A. (1997). Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* (26): 33-37.
- Gaiero J, McCall C, Thompson K (2013) Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American journal of botany*, 100(9), 1738-1750
- Glick B.R. Hindawi (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*; Publishing Corporation, Scientifica; p. 15.

- Guillén F, Martínez M, Gutiérrez A (2005) Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8, 195-204.
- Gregory P (2008) *Plant roots: growth, activity and interactions with the soil*. John Wiley & Sons.
- Gupta A, Gopal M, Thomas G V., et al (2014). Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. *PLoS One*. *PloS one*, 9(8), e104259.
- García-Fraile P, Menéndez E, Rivas R (2015) Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering* 2(3): 183-205.
- Goormachtig S, Capoen W, James EK, Holsters M (2004) Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6303–6308.
- Gupta, R., Beg, Q. K. & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(1), 15–32.
- Hassler M. (2019). World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version Nov 2018). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds.). Digital resource at [www.catalogueoflife.org/annual-](http://www.catalogueoflife.org/annual-)

checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.

Hurek T, Reinhold-Hurek B (2003) *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*, 106(2), 169-178.

Horn et al. 2012, Ahirwar NK, Gupta G, Singh V, et al (2015) Influence on growth and fruit yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants by inoculation with *Pseudomonas fluorescens* (SS5): Possible role of plant growth promotion. *IntJCurrMicrobiolAppSci* 4:720–730.

Jiménez-Zurdo J, Mateos P, Dazzo F (1996) Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(7), 917-921.

Jacquemet, A., Barbeau, J., Lemiègre, L. Benvegna, T. (2009). Archaeal tetraether bipolar lipids: structures, functions and applications. *Biochimie* 91, 711–717.

Lenton, S., Walsh, D. L., Rhys, N. H., Soper, A. K. & Dougan, L. (2016). Structural evidence for solvent stabilisation by aspartic acid as a mechanism for halophilic protein stability in high salt concentrations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 18054–18062.

Kashyap D, Vohra P, Chopra S, Tewari R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 77: 215-227.

Khan, N., Bano, A. y Zandi, P. (2018). Efectos de los reguladores del crecimiento de las plantas aplicados exógenamente en combinación con PGPR sobre la

fisiología y el crecimiento de las raíces del garbanzo (*Cicer arietinum*) y su papel en la tolerancia a la sequía. *Journal of Plant Interactions* 13 (1), 239–247.

Koeck DE, Pechtl A, Zverlov V V., Schwarz WH (2014) Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 29:171–183.

Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front Plant Sci.* 2019;10:845.

Kumar V, Kumar M, Sharma S, Prasad R (2017) Probiotics and Plant Health.

Kunova A, Bonaldi M, Saracchi M, et al (2016) Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seedgermination and plant growth. *BMC Microbiol* 16:272.

Lin, PP, Mi L , Morioka AH , Yoshino KM, Konishi S, Xu SC,. et al. (2015). Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. *Metab. Eng.* 31, 44–52.

Mateos P, Jimenez-Zurdo J, Chen J (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied and environmental microbiology*, 58(6), 1816-1822.

Menéndez E, Díez-Méndez A, Marcos-García M, et al (2016) *Rhizobium* Symbiotic Enzyme Cellulase CelC2: Properties and Applications. *New Futur developments Microb Biotechnol Bioeng Microb Cell Syst Prop Appl* 53:81–89.

- Michaud P, Belaich A, Courtois B, Courtois J (2002) Cloning, sequencing and overexpression of a *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS carboxymethyl-cellulase gene. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(6), 767-771.
- Moreno Reséndez, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., Cano Ríos, P., Moreno Reséndez, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria: A biofertilization alternative for sustainable agriculture. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68.
- Mukesh kumar DJ, Priyadharshini DA, Suresh K, Saranya GM, Rajendran K, Kalaichelvan PT. (2012). Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase and alkaline protease by *Bacillus* sp. HPE 10 in a concomitant production medium. *Asian J Plant Sci*. 2:376–382
- Niyonzima FN, More S . (2015). Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Prep Biochem Biotechnol*. 45(3):233-58.
- Naidu, G S N. y Panda, T. (1998). Production of pectolytic enzymes. A review. *Bioprocess Engineering* 19, 355-361.
- Norrish K, Rosser H (1983) Mineral phosphate. *Soils: an Australian viewpoint*, 335-361.
- Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y, Dover, N. (2001).  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 144–157.

- Parthasarathi R, Bellesia G (2011) Insights into hydrogen bonding and stacking interactions in cellulose. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(49), 14191-14202.
- Percival, G. y Gerritsen, J. La influencia de los reguladores del crecimiento de las plantas en el crecimiento de raíces y brotes de árboles en contenedores después de la eliminación de las raíces. *J. Horti. Sci. Biotecnología* 73 (3), 353–359 (1998).
- Pereira SIA, Castro PML (2014) Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environ Sci Pollut Res* 21:14110–14123.
- Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, et al (2004) *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphatesolubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:847–850.
- Picard C, Cello F Di, Ventura M, Fani R (2000) Frequency and biodiversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 948-955.
- Prado, FE, Boero, C., Gallardo, M. y Gonzalez, JA. (2000). Efecto del NaCl sobre la germinación, el crecimiento y el contenido de azúcar soluble en la quinua de *Chenopodium Willd.* semillas Larva del moscardón. *Toro. Acad. Sinica* . 41.



- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, JN y col. Aplicaciones de nuevos aislados de Rhizobacteria Pseudomonas en agroecología a través de procesos fundamentales que complementan el crecimiento de las plantas. *Sci Rep.* 9, 12832 (2019).
- Rabery Cáceres, S H; Ratzlaff, Lenard Dyck. Período de barbecho del suelo y crecimiento radicular del cártamo *Carthamus tinctorius* L. en función al contenido de agua en el Chaco Central. *Investigación Agraria*, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 13-18, oct. 2013. ISSN 2305-0683
- Rahman RN, Geok LP, Wong CF, Basri M, Salleh AB. (2010) Molecular investigation of a gene encoding organic solvent-tolerant alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *J Basic Microbiol* ;50(2):143-9.
- Richardson AE, Simpson RJ. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology*. 156:989-96.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A., 1980. Aislamiento de bacterias extremadamente halófilas capaces de crecer en medios de finidos con fuentes únicas de carbono . *J. Gen. Microbiol.* 119, 535 – 538.
- Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L. et al. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Sci Rep* 10, 4121.
- Rojas Badía M , Sánchez Castro D, Rosales Perdomo K, Lugo Moya D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Rev. Protección Veg.*, Vol. 32, No. 2, ISSN: 2224-4697.

- Rebello, S; Mohandas A; EM A; Pandey A et al. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 16, 381–394.
- Safdarian, M., Askari, H., Shariati J., V. et al. (2019). Transcriptional responses of wheat roots inoculated with *Arthrobacter nitroguajacolicus* to salt stress. *Sci Rep* 9, 1792.
- Santoyo G, Valencia–Cantero E, Orozco–Mosqueda Ma C, Peña–Cabriales JJ y Farías–Rodríguez R. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoam.* vol.28, n.1. pp.53-60.
- Sevilla M, Burris R, Gunapala N (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(3), 358-366.
- Singh, RP y Jha, PN. (2016). Los múltiples PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 aumentan la resistencia sistémica y aumentan la tolerancia a la salinidad del trigo (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 11 (6), 0155026.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211.
- Thite, V.S., Nerurkar, A.S. & Baxi, N.N. (2020). Optimization of concurrent production of xylanolytic and pectinolytic enzymes by *Bacillus safensis* M35

and *Bacillus altitudinis* J208 using agro-industrial biomass through Response Surface Methodology. *Sci Rep* 10, 3824.

Thite, V. S & Nerurkar, A. S. (2019). Crude Xylanases and Pectinases from *Bacillus* spp. Along with Commercial Cellulase Formulate an Efficient Tailor-Made Cocktail for Sugarcane Bagasse Saccharification. *BioEnergy Res.*

Tremacoldi, C. R.; Lunz, A. M.; Costa, F. R. S.; Melo, L. G. L. (2009). Cancro do paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*) no estado do Pará. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, Supl., p. S214. Resumos do 42º Congresso Brasileiro de Fitopatologia

Vijay, K. E., Srijana, M., Kiran, K. K., Harikrishna, N., Reddy, G. (2011). A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. *Bioprocess Biosyst Eng* 34, 403–409.

Vogt, C. (2015). Clasificación de las comunidades halófilas de las estepas salinas en la cuenca del riacho Yakaré sur, Chaco Boreal, Paraguay. *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Parag.* Vol. 19, nº 2:100-100 41-49.

Yoneyama, K. y col. (2008). Estrigolactonas, señales de reconocimiento del huésped para plantas parásitas de raíz y hongos micorrízicos arbusculares, de plantas Fabaceae. *Nuevo Phytol.* 179, 484-494.

Yue, H. T. et al. (2014). A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnol. Biofuels* 7, 108.

Zou X, Binkley D, Doxtader K (1992) A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and Soil*, 147(2), 243-250.