

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA
INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA**

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE
ACTINOBACTERIAS PROMOTORAS
DEL CRECIMIENTO VEGETAL:
EFECTO BIOFERTILIZANTE**

Iluminada Cantero García

CURSO 2017/2018

Dirigido por: Carmen Mengual Navarro-Soto y Francisca Suárez Estrella

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	4
I.1. PLAGUICIDAS Y FERTILIZANTES	5
I.2. AGRICULTURA SOSTENIBLE: EMPLEO DE RIZOBACTERIAS	9
I.2.1. Promoción directa del crecimiento vegetal	13
I.2.2. Promoción indirecta del crecimiento vegetal	19
I.2.3. Rizorremediación.....	24
I.3. USO DE ACTINOBACTERIAS COMO HERRAMIENTA DE BIOSOSTENIBILIDAD.....	25
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
III.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ACTINOBACTERIAS.....	29
III.2. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA.....	30
III.3. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO: ENSAYO CUALITATIVO	30
III.4. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS PGPRs	31
III.4.1. Crecimiento en medio libre de nitrógeno	31
III.4.2. Capacidad para solubilizar fosfatos.....	32
III.4.3. Producción de sideróforos	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
IV.1. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA	33
IV.2. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO: ENSAYO CUALITATIVO	35
IV.3. CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO	36
IV.4. CAPACIDAD DE SOLUBILIZAR FOSFATOS.....	37
IV.5. PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS.....	39
V. CONCLUSIONES	41
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ABREVIATURAS

ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
AIA	Ácido indolacético
ARA	Actividad reductora de acetileno
C	Carbamatos
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
ePGPRs	Rizobacterias extracelulares promotoras del crecimiento vegetal
EPS	Exopolisacáridos
ERS	Eficiencia relativa de solubilización
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
iPGPRs	Rizobacterias intracelulares promotoras del crecimiento vegetal
OC	Organoclorados
OF	Organofosforados
P	Piretrinas
PGPRs	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
PBC	Bifeniles policlorados
PVK	Pikovskaya
RPCV	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
RSI	Resistencia sistémica inducida
YEP	Peptona de extracto de levadura

RESUMEN

La agricultura actual está basada en el uso intensivo de agroquímicos tales como fertilizantes y plaguicidas, los cuales además de minimizar la propagación de plagas y enfermedades, han permitido alcanzar y mantener las altas tasas de producción de insumos necesarios para hacer frente a los requerimientos alimenticios de la población mundial en continuo crecimiento. Sin embargo, a pesar de los beneficios que proporcionan estos compuestos, su uso excesivo e indiscriminado ha originado problemas importantes, muchos de ellos de carácter irreversible, tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Ante tal problemática se ha puesto en marcha la búsqueda de alternativas sostenibles que permitan mantener y/o aumentar la producción agrícola, aprovechando los recursos propios del suelo y los sistemas naturales, preservando siempre el medio ambiente. Una de estas alternativas está enfocada en el empleo de microorganismos que normalmente viven asociados a las plantas, entre los que destacan unas bacterias rizosféricas que tienen reconocida acción sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, las PGPRs. Estas bacterias presentan una serie de mecanismos complejos a través de los cuales estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas de forma directa e indirecta además de protegerlas frente al ataque de patógenos. Dentro de este grupo es destacable el papel de las actinobacterias, bacterias productoras de un gran número de biomoléculas de interés que debido a su actividad biofertilizante y biopesticida en los últimos años se han convertido en organismos de alto interés agrícola. El presente trabajo se centra en el aislamiento y selección de actinobacterias procedentes de suelo rizosférico de huerto ecológico, además de la evaluación de capacidades como potenciales biofertilizantes, como son la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y la producción de sideróforos. De las trece cepas aisladas y evaluadas, cuatro (A, B, D y F) destacaron principalmente por su rápido crecimiento y/o por presentar una o más de las características evaluadas, por lo que fueron seleccionadas para un futuro bioensayo.

Palabras clave: Agroquímicos, PGPRs, actinobacterias, biofertilizante, biopesticida.

ABSTRACT

Current agriculture is based on the intensive use of agrochemicals such as fertilizers and pesticides, which in addition to minimizing the spreading of pests and diseases, has allowed to reach and maintain the high production rates that are necessary to meet the food requirements of a constantly growing world population. However, despite the benefits provided by these compounds, their excessive and indiscriminate use has caused important problems, many of them of an irreversible nature, both for human health and for the environment. Faced with this problem, the search for sustainable alternatives to maintain or increase agricultural production has been launched, taking advantage of there sources of the soil and natural systems, always preserving the environment. One of these alternatives is focused on the use of microorganisms that normally live in association with plants, among which are the PGPR, a kind of bacteria that help plant growth and development. These bacteria present a series of complex mechanisms through which they stimulate the growth and development of plants directly and indirectly as well as protecting against the attack of pathogens. Within this group, the role of the actinobacteria, a kind of bacteria that produce a large number of biomolecules of interest, is noteworthy due to their biofertilizer and biopesticide activity, which in recent years has become it in to organisms of high agricultural interest. The present work focused on the isolation and selection of actinobacteria from rhizospheric soil of ecological orchard, as well as the evaluation of capacities as potential biofertilizers, such as the solubilization of phosphates, nitrogen fixation and the production of siderophores. Of the thirteen strains isolated and evaluated, four (A, B, D and F) stood out mainly for their growtrh or for have one or more of the evaluated characteristics, so they were selected for a future bioassay.

Key words: Agrochemicals, PGPR, actinobacteria, biofertilizing, biopesticide.

I. INTRODUCCIÓN

Desde mediados del siglo pasado, particularmente en los países en desarrollo, resultaba evidente la necesidad de mantener un equilibrio entre la población mundial, cada vez mayor (se estima que la población crece en aproximadamente unos mil millones de personas cada 14 años), y los alimentos disponibles. Como consecuencia de tal situación, se vaticinaron hambrunas catastróficas, revoluciones, disturbios sociales y convulsiones económicas que barrerían áreas de diversos continentes. Afortunadamente todo esto se mitigó gracias al aumento del rendimiento en los granos de cereales que comenzó a finales de 1960. Este fenómeno, conocido como “revolución verde”, se debió en gran medida a la adopción generalizada de tecnologías desarrolladas para generar variedades de cultivos genéticamente mejorados, con mayores rendimientos, especialmente trigo y arroz, y al uso masivo de fertilizantes químicos y plaguicidas. La primera revolución verde fue definida como un proceso de modernización de la agricultura con un tremendo impacto en la producción de alimentos, las condiciones socio-económicas y la sostenibilidad ambiental (Khush, 2001).

Los efectos positivos de la revolución verde se plasmaron en la reducción de la pobreza y la disminución del precio de los alimentos, en gran parte debidos a las mejoras del germoplasma de los cultivos; no obstante el porcentaje de superficie sembrada con variedades mejoradas presentó disparidades geográficas. Al mismo tiempo tuvo consecuencias negativas, a menudo no debidas a la tecnología *per se*, sino más bien resultado de las políticas que se utilizaron para promover la rápida intensificación de los sistemas agrícolas, el uso masivo de productos químicos y la expansión de los cultivos en áreas que no podían sostener altos niveles de intensificación (Pingali, 2012). El aumento de los rendimientos evitó la conversión de bosques y matorrales en tierras de cultivo; sin embargo, ha dado lugar a una degradación ambiental continua, en particular del suelo, la vegetación y los recursos hídricos más allá de las áreas cultivadas, además de la elevada cantidad generada de gases de efecto invernadero (Burney et al., 2010).

I.1. PLAGUICIDAS Y FERTILIZANTES

Desde la antigüedad, el ser humano ha llevado a cabo prácticas que le permitiesen evitar o reducir daños en los cultivos, además de intentar obtener el máximo rendimiento posible de los mismos. El uso de compuestos con actividad fertilizante o plaguicida ha sido uno de los métodos empleados para alcanzar tales fines, sin embargo no sería hasta mediados del siglo pasado cuando estos compuestos alcanzarían una gran importancia. Ante una situación de gran demanda de alimentos y la necesidad de reducir pérdidas económicas debidas al ataque de agentes biológicos sobre los cultivos, la industria química de la mano de la revolución industrial, sacó al mercado una serie de compuestos sintéticos: por un lado, aquellos que presentaban actividad plaguicida, y por otro los que proporcionaban a las plantas nutrientes necesarios para un correcto crecimiento y desarrollo, los fertilizantes. Estos nuevos productos tuvieron una gran demanda, pues eran baratos y eficaces, aunque muchos de ellos extremadamente tóxicos (Rojas-Rodríguez, 2016).

El término plaguicida, hace referencia a toda aquella sustancia que tenga por objeto prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga, y comprende una gran variedad de compuestos que son clasificados en función de diversos criterios, entre los cuales los más empleados son la estructura química (Tabla 1) y la acción específica (Tabla 2). Atendiendo a la estructura química, se clasifican en diversas familias, que incluyen desde los compuestos organoclorados (OC) y organofosforados (OF), hasta compuestos inorgánicos. De todos ellos, se conocen cuatro familias de elevada importancia dada su incidencia negativa sobre la salud y la gran demanda de su uso; se trata de los organoclorados, los organofosforados, los carbamatos (C) y las piretrinas (P) (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas en función de la estructura química (modificado de Ramírez y Lacasaña, 2001)

FAMILIA QUÍMICA	EJEMPLO
Organoclorados (OC)	Dicloro difenil tricloroetano, Aldrín, Dieldrín, Endosulfán, Lindano
Organofosforados (OF)	Malatión, Diazinón, Clorpirifos, Diclorvos
Carbamatos (C)	Carbarilo, Metomilo, Propoxur
Piretrinas (P)	Cinerinas I Y II, Jasmolinas I y II, Piretrinas I y II

Los plaguicidas más ampliamente utilizados son los OC, los cuales son compuestos altamente contaminantes que presentan una elevada persistencia y lenta biodegradabilidad. Los OF se utilizan principalmente en el control de plagas como alternativa a los OC, ya que se degradan con mayor facilidad. Los C son otro grupo de plaguicidas relativamente inestables, con cierta selectividad y un tiempo corto de persistencia. Las P son plaguicidas obtenidos por secado, molienda y pulverización de la flor del crisantemo. Tienen una relativa selectividad, metabolismo rápido y no dejan residuos en la atmósfera. Dentro de las P destacan los llamados piretroides, piretrinas sintéticas consideradas más efectivas, estables y con menor efecto residual. Ejemplos de piretroides son la Cipermetrina, el Penvalerato, y la Permetrina (Ramírez y Lacasaña, 2001).

En la Tabla 2 se hace referencia a los distintos grupos generales de plaguicidas clasificados en función de su espectro de acción.

**Tabla 2. Clasificación de plaguicidas atendiendo a su acción específica
(modificado de Rojas-Rodríguez, 2016)**

PLAGUICIDA	ACCIÓN ESPECÍFICA
Insecticidas	Contra insectos perjudiciales Catalogados según el estadio sobre el que actúan
Fungicidas	Se utilizan para acabar con los hongos y mohos perjudiciales tanto para plantas como animales
Bactericidas	Empleado para el control de bacterias patógenas
Acaricidas	De idéntico funcionamiento a los insecticidas pero empleados para repeler ácaros
Herbicidas	Para eliminar las plantas consideradas nocivas Pueden ser fitoreguladores y productos afines
Nematicidas	Mata nematodos parásitos de plantas y gusanos de suelo
Rodenticidas	Contra roedores
Molusquicidas	Para eliminar caracoles y otros moluscos

La clasificación de los productos denominados fertilizantes en función de su naturaleza, distingue dos grandes grupos:

- **Fertilizantes inorgánicos:** son sustancias de origen mineral obtenidas por medio de procedimientos industriales de carácter físico o químico. Este tipo de fertilizante aporta la mayor parte de nutrientes que la planta precisa y de forma casi inmediata (Salazar-Navarro, 2013).
- **Fertilizantes orgánicos:** productos obtenidos generalmente de fuentes naturales, como los residuos animales o vegetales. Este tipo de fertilizantes aportan nutrientes a largo plazo y en menor cantidad que los inorgánicos, pero mejoran las propiedades físico-químicas de los suelos. Ejemplos de este tipo de fertilizantes son el estiércol, el compost o la turba (Salazar-Navarro, 2013).

Por otro lado, el concepto actual de bioestimulante, no sólo hace referencia al origen biológico del producto sino también a su efecto sobre el crecimiento vegetal. Se

definen así los bioestimulantes como sustancias, microorganismos, mezcla de sustancias o de microorganismos que al aplicarse a las plantas, son capaces de mejorar la eficacia de éstas en la absorción y asimilación de nutrientes, tolerancia a estrés biótico o abiótico o mejorar alguna de sus características agronómicas, independientemente de su contenido en nutrientes (Gu et al., 2014).

Hoy en día, los fertilizantes y fitosanitarios químicos siguen constituyendo una práctica habitual en la agricultura convencional, y es que desde su descubrimiento, el empleo de estos compuestos ha aumentado de forma continuada, consecuencia de los beneficios directos e indirectos que presenta su uso. Estos compuestos mejoran la productividad vegetal: por un lado los fertilizantes químicos proporcionan a la planta los nutrientes necesarios para su correcto crecimiento y desarrollo, tales como nitrógeno o potasio, presentando una alta tasa de asimilación, por lo que son una buena solución cuando se cuenta con suelos pobres desde el punto de vista nutricional (García-Lozano, 2011). En cuanto a los plaguicidas sintéticos cumplen un papel importante al reducir notablemente las pérdidas de las cosechas mediante el control de las plagas y las enfermedades que éstas producen en los cultivos, los cuales se desarrollan en condiciones de menor competencia, dando lugar a frutos más uniformes y de mejor aspecto. El aumento de la eficiencia agrícola, resultado del uso de estos compuestos, influye sobre aspectos como el valor de los alimentos, determinando que sean más o menos accesibles económicamente hablando. Además, al producir más en menos superficie, deja libres de cultivo otros terrenos favoreciendo de esta forma al mantenimiento de la biodiversidad (Yagüe-González, 2008).

Sin embargo, el empleo de estos compuestos tiene un fuerte impacto no solamente sobre el ser humano sino también sobre el medio ambiente y su biota ya que son muy tóxicos y persistentes (Carvalho, 2017). La primera en poner esto de manifiesto fue Rachel Carson con su libro “Primavera silenciosa”, el cual provocó una inmensa controversia sobre el uso de compuestos químicos al alertar sobre los peligros asociados a su uso (Reyes-Sánchez, 2012).

Los plaguicidas representan un riesgo potencial para el ser humano. En la mayoría de los casos los efectos de su uso se traducen en intoxicaciones leves, sin

embargo se ha observado que una exposición prolongada a dosis bajas de ciertos plaguicidas está relacionada con el desarrollo a medio y largo plazo de diversos tipos de trastornos como son el cáncer, la supresión inmune y alteraciones reproductivas o del sistema nervioso (Aktar et al., 2009).

En cuanto al medio ambiente, el uso generalizado de agroquímicos ha sido asociado con la contaminación de agua, suelo y aire influyendo sobre la flora y fauna causando así un desequilibrio en el ecosistema. El suelo es lo más afectado, ya que recibe a estos compuestos por diferentes vías como aplicaciones directas, derrames, disposición final...influyendo sobre la fertilidad del suelo, que se ve reducida ya que también se ve afectada la microbiota asociada a ese suelo y que favorece el crecimiento vegetal, afectando también a la tasa de erosión, la cual se ve incrementada (Aktar et al., 2009).

A pesar de ser compuestos económicamente accesibles, de rápida actuación y fácil manejo, su influencia negativa sobre el ser humano y el medio ambiente ha llevado a la búsqueda de alternativas efectivas y más respetuosas con la naturaleza, aunque éstas presentan limitaciones que suelen suplirse mediante el empleo de agroquímicos (Calabi-Floody et al., 2018).

I.2. AGRICULTURA SOSTENIBLE: EMPLEO DE RIZOBACTERIAS

Ante la evidencia de una crisis ambiental, desde hace relativamente poco se ha puesto en marcha la búsqueda de nuevas alternativas que promuevan una agricultura más racional y responsable, que proporcione seguridad alimentaria a la población mundial en crecimiento sin afectar a la seguridad ambiental; este es el fin que persigue la agricultura sostenible (Calabi-Floody et al., 2018). La agricultura sostenible es aquella que preserva y mejora la calidad ambiental, es económicamente rentable para los agricultores, contribuye al bienestar de los hogares agrícolas y fomenta el desarrollo de la comunidad local (Lyson, 2002).

El interés por la sostenibilidad en la agricultura comenzó coetáneamente a la revolución verde; sin embargo sus orígenes se remontan siglos atrás ya que existen textos de la antigua Roma, Grecia, India y China en los que se habla acerca de conceptos y prácticas que hacen referencia a la sostenibilidad (Pretty y Pervez, 2014).

Entre las diferentes propuestas para alcanzar prácticas más sostenibles, autores como MacRae et al. (1989) y Lichtfouse et al. (2009) establecen una serie de estrategias que involucran cambios, desde un simple ajuste de la secuencia del manejo del cultivo a cambios fundamentales a nivel del sistema de la agricultura:

- Establecer estrategias multidisciplinarias que involucren tanto a los sistemas agrícolas como al sistema alimentario.
- Construir escenarios técnicos innovadores que dependan de las regulaciones biológicas en un esquema integrado de la producción de cultivos. Promoción de la biodiversidad mediante prácticas como el cultivo intercalado, la rotación, la agrosilvicultura, el compostaje y el abono verde.
- Reemplazar los productos químicos tóxicos y fertilizantes minerales por compuestos menos contaminantes, menos persistentes en el suelo y con menor consumo de energía.

La sociedad actual tiende a sistemas de producción integrada, es decir, reducir en la medida de lo posible el uso de químicos pero a veces, no es posible su total eliminación pues son necesarios para mantener la viabilidad económica del suelo. Un manejo adecuado permitiría llevar a cabo una agricultura más sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Entre las alternativas al uso de compuestos químicos sintéticos se encuentran las plantas genéticamente modificadas, el cultivo de leguminosas simbióticas y los biopesticidas (Gouda et al., 2018).

Dado el creciente interés por la reducción del uso de fertilizantes y agroquímicos, en los últimos años se ha puesto especial interés en el empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, en concreto los que se encuentran en la rizosfera (Benjumeda-Muñoz, 2017), convirtiéndose en una

herramienta importante para proteger la salud de las plantas y que sobre todo respeta el medio ambiente (Gouda et al., 2018).

La rizosfera puede ser definida como la porción del suelo influenciada por las raíces vegetales, sitio de máxima interacción entre microorganismos edáficos y entre éstos y los cultivos. Por ello, el conocimiento detallado de este ambiente y la caracterización de su biodiversidad constituyen pilares fundamentales para lograr agroecosistemas sostenibles. La población microbiana de la rizosfera es relativamente diferente a la que se encuentra en el entorno de la planta debido a la presencia de exudados de raíz que funcionan como fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano. Este ambiente colonizador incluye bacterias, hongos, protozoos y algas; sin embargo, las bacterias son el tipo de microorganismo más abundante (Vejan, 2016).

Con respecto a las bacterias presentes en la rizosfera, destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) más conocidas como PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*). Estas bacterias se pueden encontrar en el rizoplano y en los espacios entre las células de la corteza de la raíz, se trata entonces de rizobacterias extracelulares promotoras del crecimiento vegetal (ePGPRs), o situadas en las estructuras nodulares especializadas de las células de la raíz; en este caso son rizobacterias intracelulares promotoras del crecimiento vegetal (iPGPRs) (Gouda et al., 2018). Dentro de estos grupos pueden encontrarse géneros bacterianos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* (ePGPRs), *Frankia* o *Rhizobium* (iPGPRs) (Gupta et al., 2015). Las PGPRs ejercen efectos positivos sobre las plantas que colonizan: potencian el crecimiento vegetal, mejoran la disponibilidad de nutrientes, producen fitohormonas y otros tipos de compuestos como sideróforos, ácidos orgánicos volátiles, antibióticos y enzimas líticas (Gouda et al., 2018). De igual forma, los microorganismos asociados a ellas se benefician de esta interacción ya que las plantas liberan una gran variedad de compuestos orgánicos en la rizosfera que son utilizados como nutrientes por la comunidad microbiana (Dary, 2015).

Además de influir sobre el desarrollo de las plantas, las PGPRs están involucradas en el control de microorganismos fitopatógenos e insectos, la tolerancia a

la salinidad y la biorremediación de metales pesados (Vejan, 2016; Gouda et al., 2018). También es destacable su influencia en gran medida sobre las características del suelo, donde juegan un papel vital en la conversión de tierras no fértiles o de baja calidad en tierra cultivable (Gouda et al., 2018).

En cuanto a los modos de acción de las diferentes PGPRs, aunque están influenciados por una serie de factores bióticos (genotipo de la planta hospedadora, estados y mecanismos de desarrollo de la planta, otros miembros de la comunidad microbiana) y abióticos (composición del suelo, condiciones climáticas y manejo del suelo), pueden agruparse en dos categorías: mecanismos que promueven de forma directa el crecimiento vegetal y mecanismos que lo hacen de forma indirecta (Gouda et al., 2018) (Figura 1).

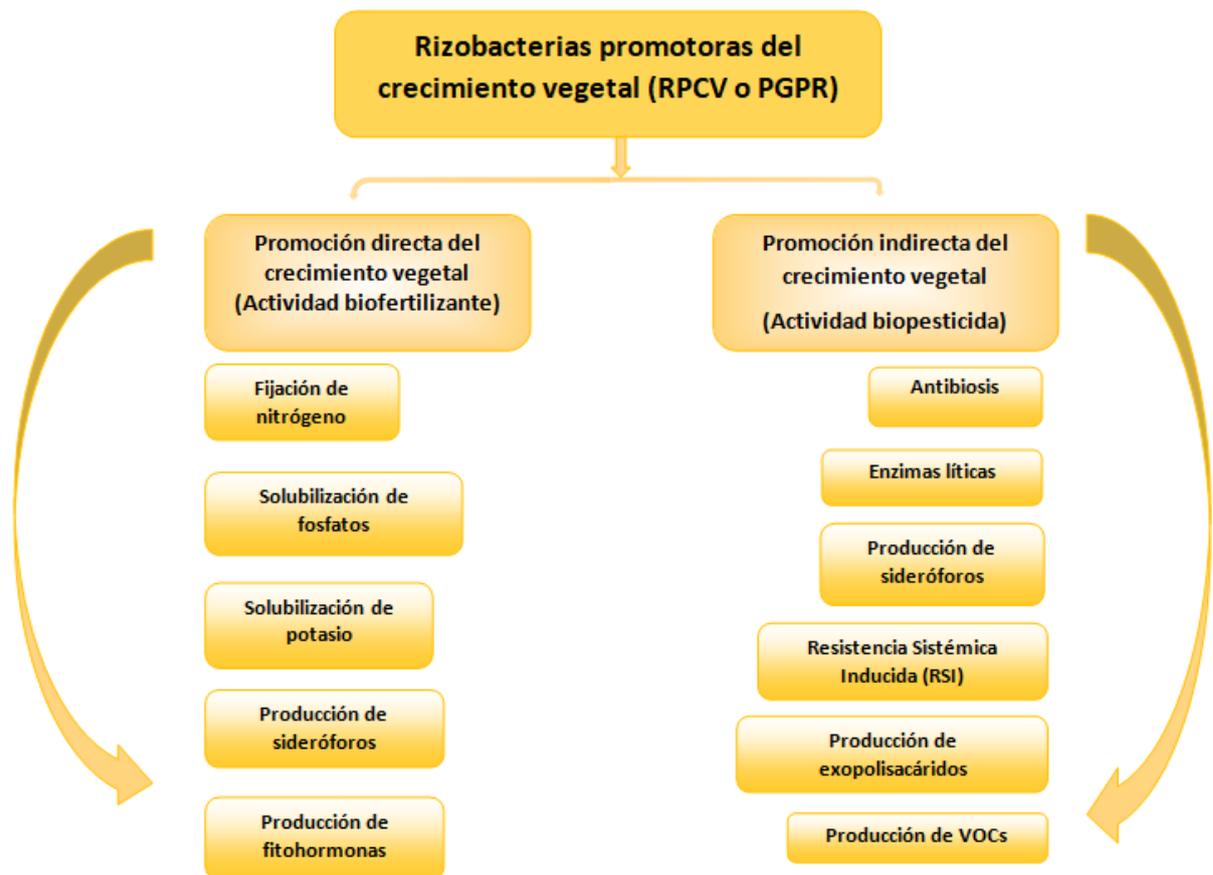


Figura 1. Diagrama del efecto promotor del crecimiento vegetal por PGPRs (Modificado de Gupta et al., 2015).

I.2.1. Promoción directa del crecimiento vegetal

La promoción directa del crecimiento y desarrollo vegetal mediante PGPRs involucra mecanismos en los que la bacteria facilita la absorción de nutrientes del medio o bien, sintetiza un compuesto que estimula el crecimiento vegetal. En definitiva, el microorganismo produce un metabolito que por sí mismo es capaz de modificar la fisiología de la planta y por tanto, requiere su mediación. Pueden englobarse como mecanismos con actividad biofertilizante (Beneduziet al., 2012). Estos mecanismos engloban procesos como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y de potasio, la secreción de sideróforos y la producción de fitohormonas.

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para todas las formas de vida que, a pesar de encontrarse en una elevada proporción en la atmósfera, no está disponible de forma directa para las plantas ya que ninguna especie vegetal es capaz de fijar el dinitrógeno [N_2] hasta nitrógeno combinado (amoníaco [NH_3] o ión amonio [NH_4^+], según el pH del medio), que puede ser empleado por la planta para su crecimiento. La fijación biológica de nitrógeno tiene lugar mediante interacciones simbióticas y no simbióticas entre plantas y microorganismos (Gupta et al., 2015) (Figura 2).

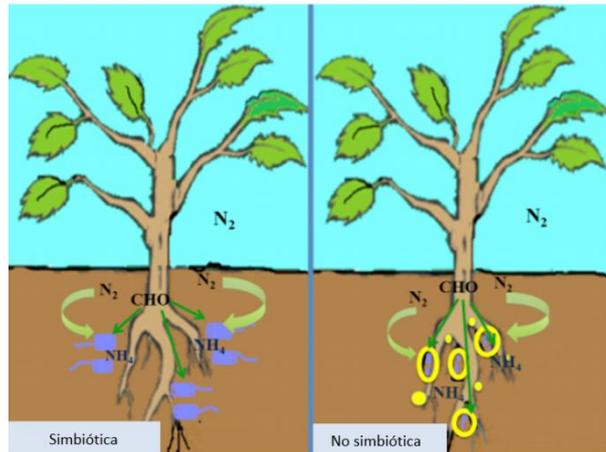


Figura 2. Esquema de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en plantas: Simbiótica (*panel izquierdo*) donde interaccionan bacterias mutualistas y no simbiótica (*panel derecho*), donde interaccionan bacterias de vida libre. En ambos casos las bacterias reciben fuente de carbono de las plantas (CHO) y a cambio ellas les proveen de nitrógeno combinado (NH_3 o NH_4^+) obtenido del proceso de la FBN (modificado de Molina-Romero et al., 2015).

Los microorganismos fijan el nitrógeno atmosférico mediante un complejo sistema multi-enzimático conocido como nitrogenasa, el cual es codificado por los conocidos como genes *nif* (Gupta et al., 2015).

En la fijación simbiótica de nitrógeno se establece una relación mutualista entre microorganismo y planta. El microorganismo accede a la raíz y forma nódulos en los que tiene lugar la fijación de nitrógeno hasta amonio, de tal forma que así está disponible para la planta. Ejemplos de PGPRs simbiotes pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* (asociadas con leguminosas) y *Frankia* (asociado con arbustos y árboles no leguminosos) (Gupta et al., 2015).

La fijación de nitrógeno no simbiótica se lleva a cabo mediante diazótrofos de vida libre, entre los que se incluyen especies de los géneros *Azospirillum* o *Azuarcus*. Este grupo de bacterias se encuentra cerca de la raíz pero no la invade (Gupta et al., 2015; Benjumbeda-Muñoz, 2017) (Figura 2).

Diversos estudios han demostrado que el empleo de microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, como las PGPRs, proporciona un enfoque integrado para la promoción del crecimiento vegetal, el mantenimiento y aumento del nivel de nitrógeno en suelo agrícola, así como de los rendimientos de las plantas (Gupta et al., 2015 ; Benjumeda-Muñoz, 2017).

Solubilización de fosfatos

El fósforo al igual que el nitrógeno es un elemento clave en la nutrición de las plantas. Juega un papel importante en procesos tales como la fotosíntesis, la transducción de la señal o la respiración. Aunque este ion se encuentra abundantemente en el suelo, tanto de forma orgánica como inorgánica, casi en su totalidad (entre un 95% y un 99%) está presente de forma insoluble, precipitado o inmovilizado por lo que las plantas, que sólo absorben el fosfato como ion monobásico (H_2PO_4^-) y dibásico (HPO_4^{2-}), son incapaces de utilizarlo (Gupta et al., 2015).

Para transformar el fosfato hasta una forma asimilable por las plantas, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal emplean diferentes estrategias (Gupta et al., 2015; Benjumeda-Muñoz, 2017) entre las que se encuentran:

- Secreción de compuestos de carácter complejante o disolvente de minerales: protones, iones hidroxilo, CO_2 o ácidos orgánicos (como los producidos en el metabolismo de los azúcares). Los microorganismos utilizan los azúcares que toman de los exudados de las raíces de las plantas, los metabolizan y liberan ácidos orgánicos, como el ácido málico, butírico, acético, glucónico o cítrico, que actúan como quelantes de cationes, principalmente de calcio, aunque también de hierro, aluminio y magnesio, que acompañan la liberación de fosfatos a partir de compuestos fosfáticos insolubles.
- Secreción de fosfato durante la degradación de los sustratos.
- Hidrólisis enzimática. Algunas bacterias tienen la capacidad de secretar al medio unas enzimas extracelulares, las fosfatasas, que hidrolizan el fosfato

orgánico procedente de la materia orgánica. Entre las fosfatasa destacan las fitasas. Estas enzimas son capaces de hidrolizar el hexafosfato de inositol o fitato, el mayor componente de las formas orgánicas de fosfato en el suelo (aproximadamente un 80% del total).

Como solubilizadores de fosfatos encontramos géneros como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* o *Pseudomonas* entre otros, cuya capacidad para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas ha sido confirmada en diversos estudios (Gupta et al., 2015; Benjumeda-Muñoz, 2017).

Solubilización de potasio

El potasio es el tercer gran macronutriente esencial para un correcto crecimiento vegetal. Sin los adecuados requerimientos, las plantas tienen un desarrollo pobre de la raíz, lento crecimiento, producen semillas más pequeñas y presentan bajos rendimientos. La concentración de este mineral en el suelo suele ser muy baja ya que más del 90% del potasio presente se encuentra en forma de rocas insolubles y minerales de silicato. Las PGPRs promueven el aumento de la disponibilidad de potasio al solubilizar las rocas de este mineral mediante la secreción de ácidos orgánicos (Gouda et al., 2018). Esto hace de los solubilizadores de potasio una buena alternativa como fertilizantes para reducir el uso de agroquímicos. Ejemplos de PGPRs solubilizadores de potasio son *Bacillus edaphicus*, *Pseudomas* sp.o *Paenibacillus* sp (Gupta et al., 2015).

Secreción de sideróforos

El hierro es un micronutriente esencial para casi todos los organismos de la biosfera, ya que entre otros aspectos actúa como cofactor en una serie de procesos importantes como la respiración, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. Sin embargo, a pesar de ser el cuarto elemento más abundante en la tierra, en suelos aeróbicos no

es fácilmente asimilable por bacterias y plantas (Gupta et al., 2015) debido a que en la mayoría de los minerales primarios del suelo el hierro se encuentra como Fe^{2+} que precipita como óxidos e hidróxidos de Fe^{3+} altamente insolubles (Aguado-Santacruz et al., 2012). Los microorganismos han desarrollado mecanismos especializados para la asimilación de hierro; un ejemplo lo encontramos en la producción de sideróforos (Gupta et al., 2015). Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular producidas por microorganismos bajo condiciones limitantes de hierro que mejoran la absorción mediante su transporte al interior celular. Las bacterias secretan estas moléculas quelantes que atraen el hierro hacia la rizosfera donde puede ser absorbido por la planta (Benjumeda-Muñoz, 2017). De las PGPRs productoras de sideróforos encontramos entre otras, bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Streptomyces* (Aguado-Santacruz et al., 2012).

Producción de fitohormonas

Las fitohormonas o reguladores del crecimiento son sustancias orgánicas que en bajas concentraciones promueven, inhiben y modifican el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las PGPRs producen más de un tipo de fitohormonas, como por ejemplo las auxinas, las giberelinas, las citoquininas y el etileno (Franco-Correa, 2008).

Las auxinas juegan un papel clave en el desarrollo de las plantas. Se las conoce como hormonas de crecimiento vegetal porque tienen la capacidad de estimular el crecimiento diferencial en respuesta a estímulos de luz. El ácido indol acético (AIA) es la auxina natural más común encontrada en plantas. El AIA está involucrado en el crecimiento y desarrollo de las plantas, principalmente en una serie de procesos fisiológicos que incluyen el alargamiento y división celular, la diferenciación del tejido, fototropismo, gravitropismo y respuestas defensivas, destacando un importante papel en la formación del xilema y la raíz. La promoción del desarrollo del sistema radical característico de este tipo de reguladores del crecimiento vegetal, es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de determinadas bacterias rizosféricas. Se estima que el 80% de las bacterias de la rizosfera son capaces de

producir AIA. Estos microorganismos tienen el potencial de interferir en los procesos de incorporación de AIA en las plantas. La consecuencia para la planta depende de la cantidad de AIA producida y la sensibilidad del tejido de ésta a los cambios en la concentración de AIA. En bacterias, la producción de AIA ocurre a partir de triptófano, con diferentes vías de biosíntesis según la bacteria implicada. *Rhizobium* y *Pseudomonas* son algunos de los géneros capaces de sintetizar AIA (Franco-Correa, 2008; Vega-Celedón et al., 2016).

Las giberelinas influyen sobre la germinación mediante la interrupción del periodo de latencia de las semillas, la elongación del tallo, la floración, el desarrollo del fruto y la altura de la planta. PGPRs como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* o *Rhizobium* sp. son capaces de sintetizar estas fitohormonas (Molina-Romero et al., 2015).

Las citoquininas producidas por las PGPRs favorecen la división celular en la raíz, la elongación, diferenciación celular y el incremento del área de la raíz mediante la formación de raíces adventicias (Molina-Romero et al., 2015).

El etileno es una hormona muy importante en plantas ya que está involucrada en procesos de estrés, maduración, senescencia o abscisión. Cuando la planta se enfrenta a altas concentraciones de etileno sufre defoliación, inhibición de la elongación celular o senescencia entre otros procesos que merman su desarrollo. Las PGPRs facilitan y ayudan sustancialmente al crecimiento y desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés mediante la disminución de los niveles de etileno. Las PGPRs son capaces de producir la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, mediante la cual metabolizan el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (precursor del etileno) hasta alfa-cetobutirato y amonio, evitando así su transformación a etileno (Molina-Romero et al., 2015). La promoción del crecimiento vegetal es también estimulada por la generación del amonio. Esto ha permitido que las PGPRs que producen ACC desaminasa se empleen frecuentemente como inoculantes de plantas cultivadas en condiciones desfavorables para mejorar su crecimiento. La actividad desaminasa se ha identificado en géneros como *Rhizobium*, *Serratia* o *Pseudomonas* entre otros (Esquivel-Cote et al., 2013).

I.2.2. Promoción indirecta del crecimiento vegetal

La promoción indirecta del crecimiento vegetal involucra mecanismos mediante los cuales las PGPRs previenen o neutralizan los efectos nocivos de los organismos fitopatógenos, produciendo sustancias represivas que aumentan la resistencia del hospedador. En este caso, a diferencia de los mecanismos de promoción directa, la estimulación del crecimiento no requiere la participación de la planta; la bacteria libera algún metabolito que, a su vez, afecta a otros factores rizosféricos que revierten en una mejora o estimulación del crecimiento vegetal. Por tanto, pueden considerarse mecanismos de biocontrol (Gupta et al., 2015) (Figura 3).

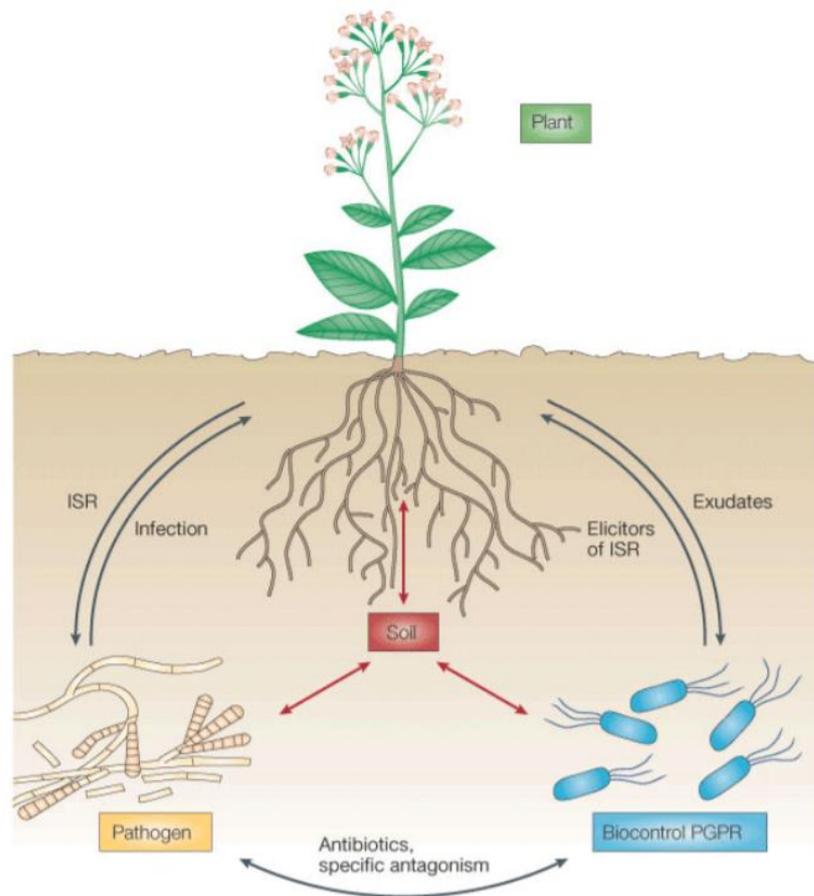


Figura 3. Interacciones entre las PGPRs como agentes de biocontrol, las plantas, los patógenos y el suelo (Benjumbeda-Muñoz, 2017).

Entre estos mecanismos de promoción indirecta del desarrollo vegetal destacan la antibiosis, la producción de enzimas líticas, sideróforos, exopolisacáridos (EPS) y compuestos orgánicos volátiles (COVs), así como la resistencia sistémica inducida (RSI) (Gupta et al., 2015).

Antibiosis

Este mecanismo se basa en la secreción de moléculas de amplio espectro capaces de eliminar o disminuir el crecimiento de algunos patógenos de plantas. Los mecanismos de acción de estos metabolitos incluyen: inhibición de la síntesis de la pared celular, la desestabilización estructural de la membrana celular y la inhibición de la formación del complejo de iniciación de la traducción de los fitopatógenos (Molina-Romero et al., 2015). Ejemplos de PGPRs productoras de antibióticos los encontramos, entre otros, en los géneros *Pseudomonas* y *Streptomyces*. El problema de depender demasiado de las PGPRs productoras de antibióticos como agentes de biocontrol es que algunos fitopatógenos pueden desarrollar resistencia a antibióticos específicos, por lo que para prevenir esto también se emplean cepas que sintetizan más de un antibiótico (Gupta et al., 2015).

Enzimas líticas

Las PGPRs pueden producir enzimas líticas como quitinasas, deshidrogenasas, β -glucanasas, lipasas, proteasas...etc, capaces de degradar la pared celular de los patógenos. A través de la actividad de estas enzimas, las rizobacterias promueven el crecimiento vegetal, concretamente a través de la protección de las plantas ante estreses bióticos y abióticos, pudiendo suprimir el desarrollo de hongos patógenos como *Botrytis cinerea* o *Fusarium oxysporum*. Esta capacidad que presentan las PGPRs como agentes de biocontrol ha sido ampliamente demostrada, especialmente en condiciones de campo (Gupta et al., 2015). De todas las enzimas líticas, las quitinasas presentan un especial interés ya que juegan papeles fisiológicos y ecológicos

importantes. Estas enzimas son glicosil hidrolasas presentes en una gran variedad de organismos tales como hongos, animales o en insectos, que las requieren para la degradación parcial de sus exoesqueletos viejos; también están presentes en plantas, que las emplean como mecanismo de defensa contra hongos patógenos; y en bacterias, las cuales producen quitinasas principalmente para degradar quitina y usarla como fuente de energía. Algunas quitinasas de bacterias quitinolíticas, son agentes potenciales para el control biológico de enfermedades de plantas causadas por diversos hongos fitopatógenos, ya que hidrolizan la quitina presente en la pared celular del hongo. Las bacterias fitopatógenas también pueden ser controladas por estas enzimas debido a que algunas presentan actividad lisozimial, lo cual permite la degradación de la pared celular bacteriana (Franco-Correa, 2008).

Bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son capaces de producir enzimas líticas (Benjumeda-Muñoz, 2017).

Producción de sideróforos

Como método indirecto la síntesis de sideróforos se contempla como un mecanismo para secuestrar el hierro disponible en el medio y con esto limitar el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Aguado-Santacruz et al., 2012).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que poseen la capacidad de producir sideróforos secuestran el hierro al formar un complejo Fe^{3+} -sideróforo, mediante un receptor específico localizado en la membrana bacteriana, lo cual ocasiona que este metal no se encuentre disponible para otros microorganismos que carezcan del sistema de asimilación específico para reconocer dicho complejo. De esta manera, al utilizar todo o la mayoría del hierro disponible en el suelo suprimen o inhiben el crecimiento de otros microorganismos patógenos (o benéficos) presentes en la rizosfera, constituyendo un mecanismo de defensa frente al estrés biótico. La capacidad de los sideróforos para actuar como supresores de patógenos depende de la planta, del fitopatógeno a controlar, la composición del suelo, la bacteria y la afinidad del sideróforo por el hierro (Aguado-Santacruz et al., 2012).

Producción de exopolisacáridos (EPS)

Ciertas bacterias sintetizan un amplio espectro de polisacáridos multifuncionales que incluyen polisacáridos intracelulares, polisacáridos estructurales y polisacáridos extracelulares (Gupta et al., 2015). Estos últimos, también llamados EPS son polímeros biodegradables de alto peso molecular, formados por residuos de monosacáridos y sus derivados (Gouda et al., 2018). En los rizobios son principalmente monosacáridos comunes, como la D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-ramnosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico (Noel-Echevarria, 2011).

Los EPS desempeñan varias funciones, entre ellas está la capacidad para formar biofilms, que protegen a las bacterias contra el estrés ambiental, el ataque de bacteriófagos y algunos protozoos depredadores de bacterias y de compuestos antimicrobianos. Otra función que pueden desempeñar es la capacidad de adherencia de las bacterias a superficies biológicas ayudando en la colonización bacteriana (Chávez-Valenzuela et al., 2018). Los EPS son capaces de agregar partículas de suelo, asegurando así el contacto entre las raíces de las plantas y las rizobacterias contribuyendo al mantenimiento de la planta bajo condiciones de estrés, también protegen contra la desecación mediante el mantenimiento del potencial hídrico. Algunos EPS pueden unir cationes, como el sodio, reduciendo su contenido disponible para ser absorbido por la planta. Los EPS son producidos por bacterias como *Rhizobium leguminosarum* (Gouda et al, 2018).

Producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs)

Estos compuestos se han identificado como moléculas volátiles de bajo peso molecular. Dentro de este grupo de moléculas se han encontrado aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, índoles, derivados de ácidos grasos, terpenos y jasmonatos. Aunque algunos COVs actúan de forma directa como fitohormonas, la mayoría estimula de forma indirecta el crecimiento vegetal. Los COVs producidos por las rizobacterias pueden actuar como moléculas señal que median la interacción microorganismo-planta. Cuando son producidos en suficiente concentración aumentan

la respuesta inmunitaria, estimulando específicamente la resistencia sistémica inducida (véase más adelante); regulan el crecimiento, la morfogénesis de la planta, la antibiosis y el biocontrol de fitopatógenos. Se ha propuesto que la biosíntesis activa de los COVs es un fenómeno cepa-específico (Molina-Romero et al., 2015).

Resistencia sistémica inducida (RSI)

Para sobrevivir a enfermedades ocasionadas por patógenos, las plantas desarrollan mecanismos de resistencia inducida basados en el reconocimiento del patógeno y una inmediata respuesta de señalización para activar las defensas (Gupta et al., 2015). Algunas bacterias no patógenas son capaces de desencadenar en la planta las mismas respuestas que una bacteria patógena pero sin la sintomatología asociada. De este modo, incrementan los niveles de ciertos metabolitos relacionados con los mecanismos defensivos de las plantas y en general, afectan al metabolismo secundario. Este fenómeno se denomina resistencia sistémica inducida y puede ser definido como un estado fisiológico de mayor capacidad defensiva provocado en respuesta a estímulos ambientales específicos y que confiere resistencia a las plantas, manifestándose cuando éstas se enfrentan a un patógeno (Gutiérrez-Mañero, 2016). Este tipo de resistencia se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por rizobacterias y se caracteriza por estar mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico y al etileno (Samaniego-Gómez et al., 2017). Aunque se creía que la RSI era independiente del ácido salicílico y de la expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad, varios estudios han puesto de manifiesto que algunas cepas PGPRs son capaces también de inducir defensas dependientes de ácido salicílico, rutas de defensa dependientes tanto del ácido salicílico como del etanol y el ácido jasmónico, al mismo tiempo, y rutas independientes de ambos. Esto demuestra que la RSI depende de los tres elementos (planta-PGPRs-patógeno) y que al variar cualquiera de los tres factores pueden variar las respuestas y alteraciones metabólicas (Gutiérrez-Mañero, 2016).

I.2.3. Rizorremediación

Otro aspecto en el que las PGPRs son de interés es el de la remediación ambiental, concretamente en la biorremediación. La biorremediación, también conocida como biodescontaminación, consiste en el empleo de organismos vivos o sus productos, que se utilizan de forma natural o artificial para remediar, destruir o inmovilizar contaminantes en el medio ambiente. Esta técnica surgió como alternativa a los métodos físico-químicos tradicionales para la limpieza de suelos contaminados, los cuales tienen un elevado coste. Entre los tratamientos de biorremediación, se pueden distinguir muchos tipos en función de la técnica empleada o de si ésta se realiza *in situ* o *ex situ*. Sin embargo, es importante diferenciar tres tipos: la bioaumentación, la fitorremediación y la rizorremediación (Rodríguez-Conde, 2011; Gouda et al., 2018). La bioaumentación es una técnica que comprende la incorporación de especies capaces de degradar un determinado compuesto, “reforzando” el tratamiento biológico, con el fin de reducir la carga contaminante. La fitorremediación consiste en el empleo de plantas para eliminar algún contaminante (Gouda et al., 2018), mientras que la rizorremediación consiste en una combinación de estas dos técnicas, pudiendo definirse como el proceso que implica la eliminación de agentes contaminantes por medio de la interacción entre las raíces de la planta y los microorganismos rizosféricos asociados a éstas. Actualmente se le considera el proceso de biorremediación más evolucionado (Dary, 2015).

La rizorremediación, es un proceso atractivo puesto que la raíz de la planta proporciona una gran superficie para la colonización microbiana, permitiendo a los microorganismos desplazarse en profundidad a través de las capas de suelo y, de esta forma, incrementar el contacto entre los microorganismos detoxificantes y los contaminantes de suelo (Dary, 2015).

Los microorganismos rizosféricos desempeñan una función crucial en la adaptación de la planta al estrés ambiental provocado por la presencia de contaminantes. Esto puede visualizarse desde dos puntos de vista: por un lado la actividad promotora del crecimiento de los microorganismos rizosféricos mitiga los efectos que la toxicidad de los contaminantes genera en la planta (crecimiento,

rendimiento...); por otro lado, en ambientes contaminados, la población rizosférica afecta a la movilidad y a la disponibilidad de los contaminantes en las proximidades de las raíces de la planta, haciendo que estos estén más accesibles a la absorción por la planta. Los exudados radicales también afectan a la disponibilidad de los contaminantes en la rizosfera por la producción de biosurfactantes (Dary, 2015).

En la actualidad, los estudios que utilizan PGPRs como herramientas para la biorremediación están restringidos a algunas especies microbianas como bacterias del género *Pseudomonas* y ciertas especies de *Bacillus*, por lo que es necesaria una mayor investigación de las PGPRs y su aplicación como biorremediadores para la eliminación de contaminantes a gran escala (Gupta et al., 2018).

I.3. USO DE ACTINOBACTERIAS COMO HERRAMIENTA DE BIOSOSTENIBILIDAD

Las actinobacterias representan un grupo heterogéneo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales. Estos microorganismos resultan ser abundantes en suelos, donde constituyen aproximadamente entre el 20% y el 60% de la población microbiana; sin embargo también se encuentran en ambientes acuáticos, dulces y marinos. Aunque en un principio fueron incluidos entre los hongos, su carácter procariótico sustenta muy bien su clasificación como bacterias, conformando el Orden *Actinomycetales* de la Clase *Actinobacteria*. Se caracterizan como bacterias gram positivas, principalmente aerobias aunque también las hay anaerobias, esporuladas, con un alto contenido en guanina más citosina (G+C) en su DNA y capaces de formar filamentos ramificados. Presentan un amplio espectro de morfologías, con rasgos parecidos tanto a bacterias como a hongos. Son heterótrofas, saprófitas y la mayoría de ellas mesófilas. Suelen ser descritos como microorganismos de crecimiento lento, que no pueden competir de forma eficiente por el carbono del suelo con bacterias u hongos de rápido crecimiento; sin embargo, son importantes en la mineralización del carbono y el nitrógeno y en la descomposición de la materia orgánica presente en el suelo. Presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de metabolitos denominados geosminas. También producen terpenoides,

pigmentos y enzimas extracelulares. Los principales géneros que se aíslan a partir de suelo son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora* que pueden estar presentes como conidios o como hifas vegetativas (Franco-Correa, 2008).

Desde el punto de vista biotecnológico estos microorganismos presentan un elevado potencial. La importancia de este grupo de bacterias radica en la producción de antibióticos y otras moléculas bioactivas como vitaminas o enzimas, siendo el principal grupo de organismos productores de metabolitos de interés, con el género *Streptomyces* a la cabeza (Franco-Correa, 2008). Sin embargo, debido a su diversidad y su asociación con el medio ambiente, en la última década estas bacterias han cobrado importancia en sectores como el agrícola y la biorremediación de sustancias tóxicas. Las actinobacterias son propuestas como una alternativa al uso de productos químicos como los fertilizantes y plaguicidas debido a que emplean mecanismos que influyen sobre las plantas, actuando sobre su crecimiento y desarrollo con actividad fertilizante y fitoestimulante, de tal forma que podrían cubrir la gran demanda de alimentos al mismo tiempo que favorecen la reducción de la contaminación, o como herramienta de control biológico protegiendo a las plantas de organismos patógenos, lo que favorece también a la producción y mejora el control de enfermedades (Evangelista-Martínez et al., 2017). Debido a que presentan características como PGPRs, recientemente han sido consideradas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Sathya et al., 2017). Estudios como el de Mengual Navarro-Soto (2015) confirman que las características de estas bacterias como biofertilizantes hacen de ellas una herramienta muy útil en procesos de reforestación.

En cuanto al biocontrol, en el área agrícola es importante contar con estrategias para enfrentar enfermedades de las plantas causadas por organismos fitopatógenos como bacterias y hongos. Una de las estrategias consiste en el empleo de microorganismos que además de antibiosis, puedan antagonizar el crecimiento de fitopatógenos. En este punto destacan las actinobacterias, las cuales además de ser grandes productoras de compuestos antimicrobianos, son capaces de activar en la planta genes de defensa contra enfermedades y sintetizar una gran variedad de enzimas que les permiten degradar un amplio rango de compuestos tanto naturales

como sintéticos. Mediante sus enzimas hidrolíticas, estos microorganismos son capaces de degradar los compuestos que forman parte de las paredes de hongos como la quitina, un polisacárido de carácter recalcitrante presentando actividad antifúngica (Evangelista-Martínez et al., 2017). También se emplean para eliminar restos vegetales ricos en celulosa, lignina y almidón que se acumulan en el suelo y que suelen eliminarse mediante quemas a cielo abierto generando emisiones críticas de CO₂ (Abdulla y El-Shatouru, 2007).

Por otro lado, las actinobacterias cumplen un importante papel en biorremediación, donde algunos géneros son empleados con el fin de minimizar los efectos de compuestos tóxicos como son los metales pesados, herbicidas, pesticidas, hidrocarburos del petróleo, detergentes, bifenilos policlorados (PBC) y otras moléculas de excesiva complejidad, un ejemplo lo encontramos en las especies pertenecientes al género *Arthrobacter*, las cuales son resistentes a la desecación y a la deficiencia de nutrientes o el género *Rhodococcus*, ampliamente distribuido en suelos y aguas (Evangelista-Martínez et al., 2017).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El mal uso agrícola de los suelos a lo largo del último siglo debido al empleo intensivo de fertilizantes químicos y fitosanitarios ha provocado una situación ambiental insostenible, con elevados niveles de contaminación que influyen sobre la fertilidad de los suelos. Ante la necesidad del desarrollo de un sistema agrícola sostenible, se puso en marcha la búsqueda de alternativas que fomentaran el aumento de la producción de los cultivos sin dejar de lado la preservación del medio ambiente. Fruto de la investigación científica se puso de manifiesto la existencia de microorganismos rizosféricos capaces de influir en el crecimiento y desarrollo vegetal. Son las conocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs, las cuales son capaces de aumentar los rendimientos de las plantas a la par que actúan como mecanismos de biocontrol protegiéndolas de agentes externos. La razón de focalizar el presente trabajo en la búsqueda concreta de actinobacterias que presenten mecanismos promotores del crecimiento vegetal y no cualquier otro tipo de rizobacterias, radica en que se busca producir de forma exclusiva un producto con actividad biofertilizante, y estas bacterias, a pesar de ser microorganismos muy conocidos, principalmente por su capacidad para sintetizar moléculas biológicamente activas y su elevada proporción en el suelo, la información concerniente a sus capacidades como PGPRs es bastante limitada, lo que las convierte en un campo muy atractivo por explotar.

Por estos motivos, el presente Trabajo Fin de Máster contó con los siguientes **objetivos:**

- Actualizar la información publicada acerca de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y de biocontrol mediante la utilización de actinobacterias.
- Aislar actinobacterias utilizando como fuente de partida muestras obtenidas de suelo rizosférico de diferentes cultivos procedentes de agricultura ecológica.
- Evaluar de manera preliminar la capacidad de las cepas aisladas de rizobacterias como potenciales biofertilizantes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ACTINOBACTERIAS

Las muestras empleadas para el aislamiento de potenciales actinobacterias se obtuvieron de suelo rizosférico procedente de diferentes plantas de un huerto ecológico. Los cultivos seleccionados fueron los siguientes (Figura 4):

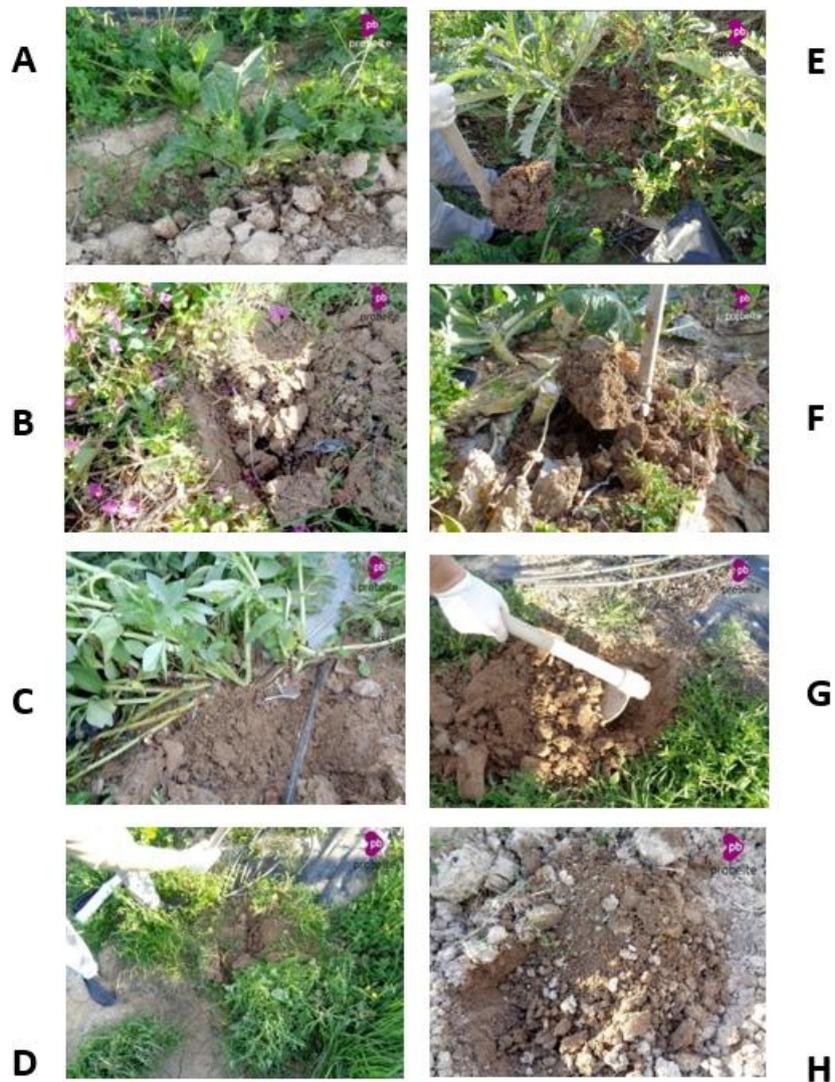


Figura 4. Cultivos de huerto ecológico. A: Acelga (*Beta vulgaris var. cicla*), B: Buganvilla (*Bougainvillea* sp), C: Haba (*Vicia faba*), D: Naranja (*Citrus x sinensis*), E: Alcachofa (*Cynara scolimus*), F: Coliflor (*Brassica oleracea var. Botrytis*), G: Jengolero (*Zizyphus jujuba*), H: Patata (*Solanum tuberosum*).

Para cada muestra obtenida se preparó una solución que contenía 1 gramo de suelo y 9 ml de solución salina al 0,9% (w/v). Las soluciones fueron homogeneizadas y calentadas a 50°C durante 10 minutos para estimular el crecimiento microbiano en un medio sintético. Se hicieron diluciones seriadas de las muestras y alícuotas de las mismas se sembraron en placas que contenían medio agar-avena (harina de avena 30 g/l, agar 20 g/l) suplementado con penicilina (25 mg ml⁻¹), nistatina (0,1%) y cicloheximida (50 mg ml⁻¹) de tal modo que se inhibiera lo máximo posible el crecimiento de otras bacterias (con la penicilina) y hongos (con la nistatina y la cicloheximida). Las placas se dejaron incubar durante una semana a 28°C (Mengual Navarro-Soto, 2015).

Tras la incubación, las cepas de actinobacterias se purificaron empleando el mismo medio de la siembra, agar-avena. Una vez purificadas, se utilizó una colonia de cada aislado como inóculo en matraces que contenían medio de cultivo líquido YEP (*Yeast Extract Peptone*) (extracto de levadura 10 g/l, bactopectona 10 g/l y NaCl 5 g/l), estableciéndose condiciones de temperatura y agitación óptimas para su crecimiento (Mengual Navarro-Soto 2015).

III.2. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA

Se realizó tinción de Gram y observación mediante microscopía óptica. Las características morfológicas se apreciaron en medio sólido utilizado para el aislamiento y se diferenciaron tomando como base la pigmentación de los micelios aéreos y de substrato, así como la presencia de hifas (Mengual Navarro-Soto 2015).

III.3. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO: ENSAYO CUALITATIVO

Se llevaron a cabo ensayos en medio líquido para evaluar de forma cualitativa el crecimiento de las actinobacterias seleccionadas. Para ello, las cepas se inocularon en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo caldo Luria-Bertani

(LB) (peptona de caseína 10 g/l, extracto de levadura 5g/l y NaCl 5g/l). Posteriormente se dejaron incubar a 28°C durante una semana en la que se realizó el seguimiento de los cultivos diariamente (Mengual Navarro-Soto, 2015). Dicho seguimiento consistió en la toma de muestras a partir de los cultivos de actinobacterias, y descripción macro y microscópica de la turbidez y producción cualitativa de micelio. Se consideró una escala de crecimiento cualitativa en función de la capacidad de producir micelio durante las primeras 24 horas de iniciar el cultivo (+++), entre 48-72 horas (++) y después de 72 horas (+).

En paralelo, las muestras recogidas periódicamente se visualizaron con microscopio óptico para confirmar la producción del micelio típico de actinobacterias.

III.4. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS PGPRs

Para determinar las capacidades de las diferentes cepas de actinobacterias aisladas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, se realizó un estudio en el que se evaluaron las siguientes propiedades:

III.4.1. Crecimiento en medio libre de nitrógeno

La evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico se llevó a cabo mediante la siembra en estría de cada cepa aislada en placas Petri, las cuales contenían medio sólido libre de nitrógeno (DL-ácido málico, KOH, K₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂, NaCl, FeSO₄, NaMoO₄, MnSO₄, agar). Las placas se dejaron incubar a 28°C durante dos semanas. Transcurrido ese tiempo se observó la presencia o ausencia de crecimiento, ya que esto se relaciona de forma directa con la capacidad de las bacterias para fijar nitrógeno y suplir la falta de fuentes nitrogenadas en el medio de cultivo (Mengual Navarro-Soto, 2015).

III.4.2. Capacidad para solubilizar fosfatos

Las cepas de actinobacterias se cultivaron en medio mínimo sólido basado en la composición del medio Pikovskaya (PVK) (glucosa, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, MgSO_4 , KCl, extracto de levadura, MnSO_4 , FeSO_4 y agar), usándose el fosfato de calcio como fuente de fósforo, suplementado con púrpura de bromocresol como indicador de pH permitiendo la visualización del halo de solubilización generado como consecuencia de la producción de ácidos orgánicos (Mengual Navarro-Soto, 2015).

Se realizó un ajuste del pH del medio a 7,5, se autoclavó y se vertió en placas Petri a razón de 30 ml por placa. Posteriormente, en el medio sólido se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro, las cuales se inocularon con 50 μl de suspensión bacteriana al 0,9%, a una concentración de aproximadamente 10^8 UFC ml^{-1} . Las placas se incubaron a 28°C durante 21 días tras los que se midieron los halos generados como consecuencia de la solubilización de fosfatos (Mengual Navarro-Soto, 2015).

Posteriormente se calculó la eficiencia relativa de solubilización (% ERS) para cada cepa utilizando la siguiente fórmula (diámetro halozona/diámetro colonia) x 100. El diámetro del pocillo corresponde al diámetro de la colonia y la halozona al diámetro de la colonia más el diámetro del halo que se forma a su alrededor a causa de la solubilización (Mengual Navarro-Soto, 2015).

III.4.3. Producción de sideróforos

Para evaluar cualitativamente la producción de sideróforos se utilizó el kit comercial SideroTecAssay TM (Emergen Bio) sobre los cultivos completos de las actinobacterias aisladas siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo constituye un test colorimétrico empleado para la detección de sideróforos secretados por bacterias y hongos o para la evaluación de quelantes de hierro sintéticos (Mengual Navarro-Soto, 2015).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA

Las trece cepas aisladas clasificadas, de la A a la M, fueron caracterizadas en base a los criterios descritos en el apartado III.2 de materiales (Tabla 3, Figura 5).

Tabla 3. Caracterización macro- y microscópica de las cepas aisladas

CEPA	MICELIO AÉREO	MICELIO DE SUBSTRATO	TINCIÓN DE GRAM	PRESENCIA DE HIFAS
A	Marrón y blanco	Marrón	+	+
B	Crema	Crema	+	+
C	Gris oscuro	Gris oscuro	+	+
D	Naranja oscuro	Naranja	+	+
E	Marrón y blanco	Marrón	+	+
F	Blanco	Amarillo-crema	+	+
G	Blanco grisáceo	Anaranjado	+	+
H	Blanco	Crema	+	+
I	Blanco	Marrón	+	+
J	Gris y blanco	Crema y marrón	+	+
K	Blanco y rojo	Rojizo	+	+
L	Blanco	Crema	+	+
M	Blanco	Amarillo	+	+

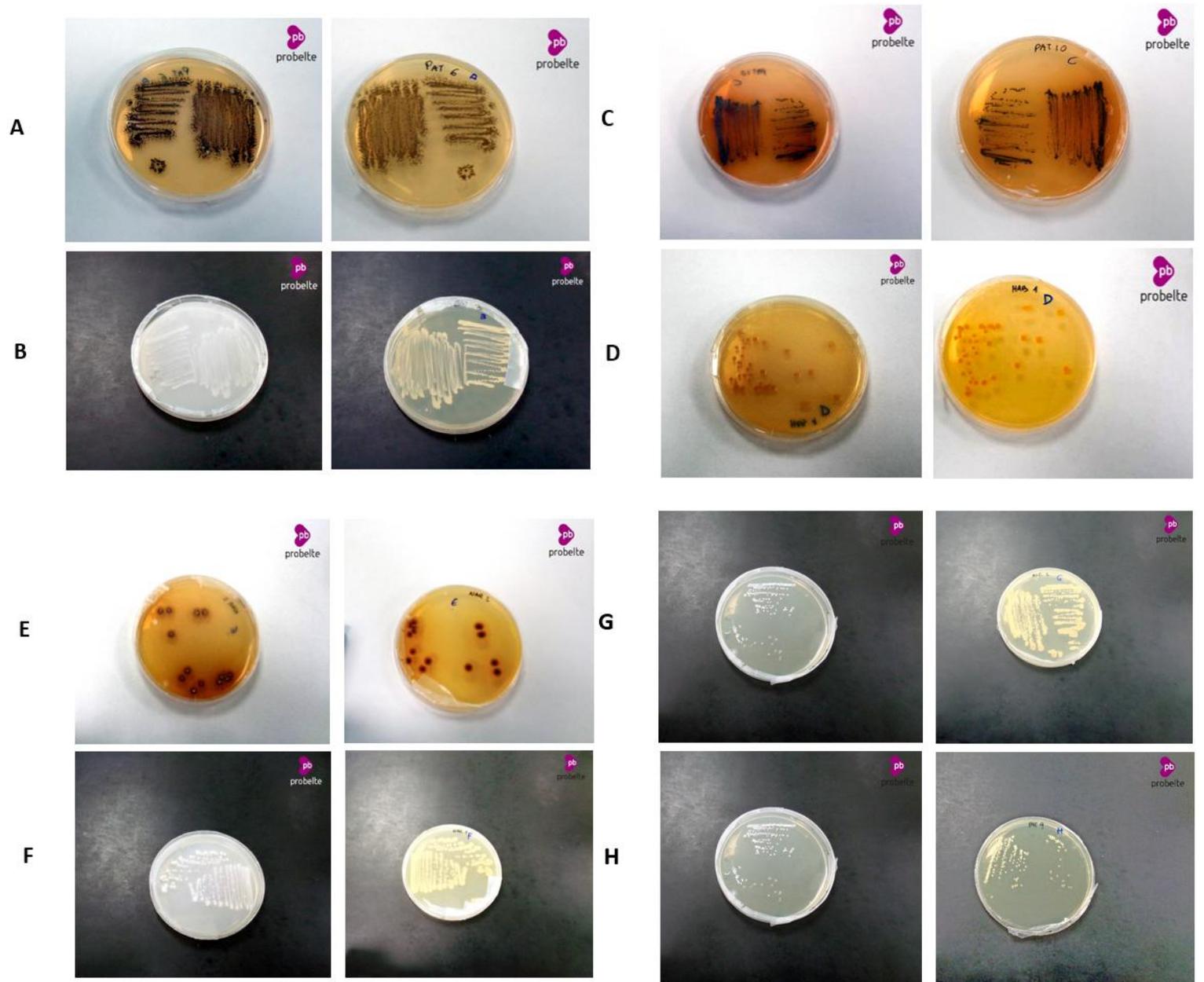


Figura 5. Imágenes del micelio aéreo y micelio de substrato de las cepas de la A a la D de actinobacterias aisladas.

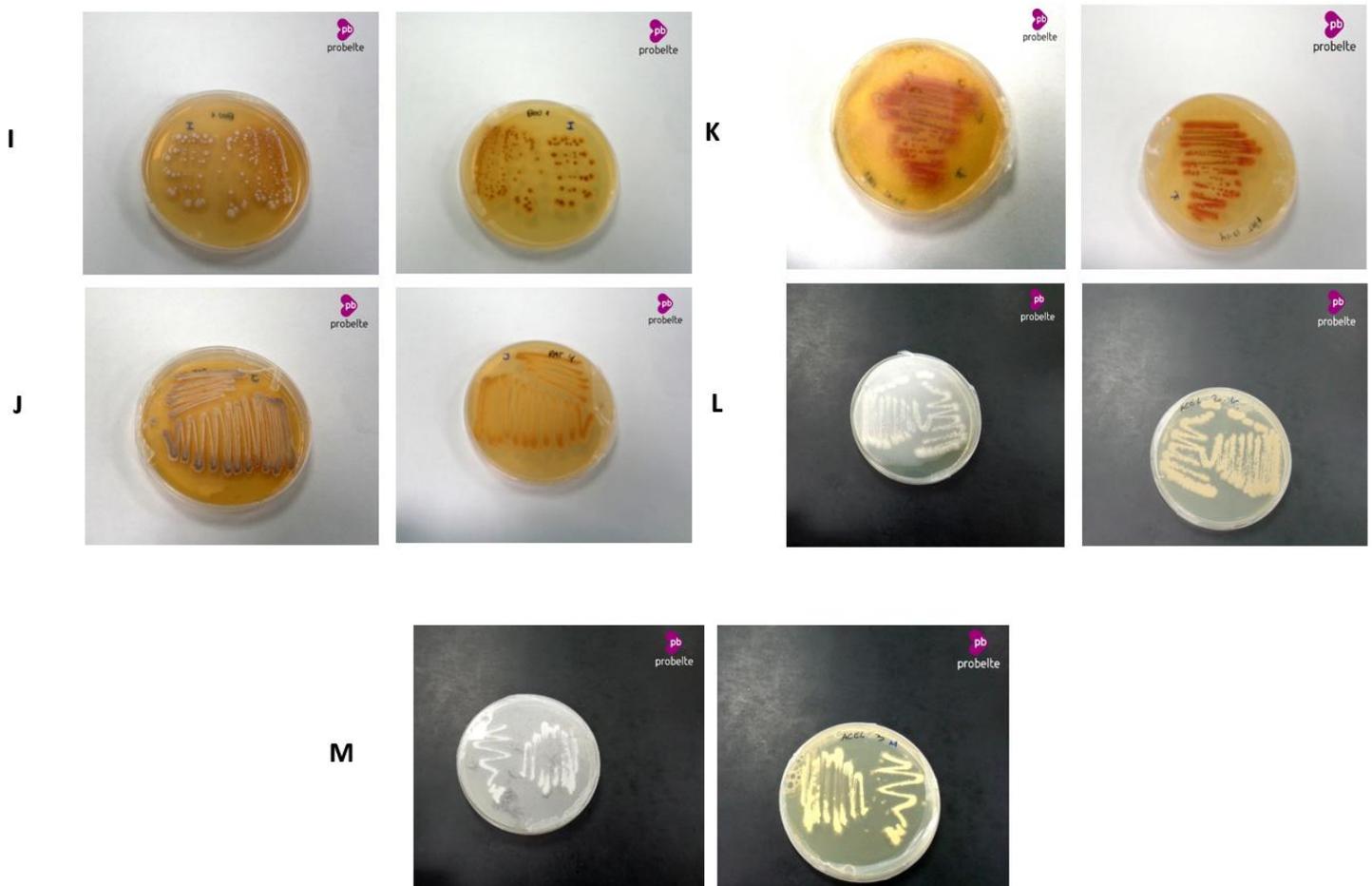


Figura 5. Continuación imágenes del micelio aéreo y micelio de substrato de las cepas de la A a la D de actinobacterias aisladas.

IV.2. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO: ENSAYO CUALITATIVO

Con respecto al comportamiento de las actinobacterias en medios de cultivo líquido, se llevó a cabo un análisis cualitativo que permitió analizar qué cepas producían micelio en menos tiempo. El criterio para seleccionar dichas cepas fue la turbidez de los cultivos, la formación de micelio en el matraz y la observación microscópica.

Aunque se realizaron muestreos diarios durante una semana, todas las cepas mostraron producción de micelio después de 96 horas. En la Tabla 4 se describen, de

forma cualitativa, los resultados obtenidos con respecto a la capacidad de la colección microbiana para producir micelio en medios de cultivo líquidos.

Tabla 4. Producción de micelio en medios de cultivo líquido (+++: 24 horas; ++: 48-72 horas; +: > 72 horas)

Cepa	Desarrollo de micelio	
	Observación macroscópica	Observación microscópica
A	+++	Micelio disperso por el medio.
B	+++	Micelio en pequeñas agregaciones.
C	+	Micelio en pequeñas agregaciones.
D	++	Micelio en pequeñas agregaciones.
E	+	Micelio en pequeñas agregaciones.
F	++	Micelio en pequeñas agregaciones.
G	+	Micelio en pequeñas agregaciones.
H	++	Micelio en pequeñas agregaciones.
I	+	Micelio en pequeñas agregaciones.
J	++	Micelio en pequeñas agregaciones.
K	++	Micelio en pequeñas agregaciones.
L	++	Micelio en pequeñas agregaciones.
M	+	Micelio en pequeñas agregaciones.

De las trece cepas evaluadas, solo dos (A y B) destacan por su rápido crecimiento, (dentro de las primeras 24 horas) pudiendo ser potenciales candidatas para su producción a nivel industrial.

IV.3. CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO

Dos semanas después de la inoculación de las diferentes muestras (cepas A-M) en el medio de cultivo libre de nitrógeno, se observó que todas las placas presentaban crecimiento de colonias, lo que significa que todas las cepas eran capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Se determinó cualitativamente el crecimiento de las bacterias

en medio libre de nitrógeno (Apartado III.4.1. de materiales y métodos), estableciendo una escala de crecimiento en función de la observación de mayor o menor biomasa microbiana: + (poco crecimiento), ++ (crecimiento moderado), +++ (elevado crecimiento) (Tabla 5).

Tabla 5. Capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico

CEPA	CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO	CRECIMIENTO
A	Sí	+++
B	Sí	++
C	Sí	++
D	Sí	+
E	Sí	+
F	Sí	++
G	Sí	++
H	Sí	+
I	Sí	++
J	Sí	++
K	Sí	+
L	Sí	+
M	Sí	+

Todas las cepas mostraron una capacidad potencial para fijar nitrógeno atmosférico. Aunque la cuantificación de esta capacidad no ha sido el objetivo de este trabajo, sería muy útil determinar qué cantidad de nitrógeno es fijado por cada una de las cepas de la colección. Esto podría llevarse a cabo mediante un ensayo de reducción de acetileno a etileno (ARA) (Hardy et al., 1968), lo que permitiría conocer los nmol/ml de N₂ fijado mediante la extrapolación de los nmol de etileno producidos. Autores como Gage (2004), Valdés et al (2005) y Rey et al (2014) emplearon este método para confirmar la capacidad de fijar nitrógeno de cepas de actinomicetos de *Frankia* sp.

IV.4. CAPACIDAD DE SOLUBILIZAR FOSFATOS

El uso del medio selectivo Pikovskaya permitió la identificación y cuantificación de halos de solubilización de fosfatos, resultado de la acidificación del medio por parte

de las actinobacterias ensayadas, virando éste de púrpura a amarillo. El índice de la eficiencia relativa de solubilización (ERS) (Apartado III.4.2. de Materiales y Métodos) mostró que nueve de las trece cepas aisladas eran capaces de solubilizar fosfatos, presentando diferentes tamaños de halo (Tabla 6).

Tabla 6. Eficiencia relativa de solubilización de fosfatos (Media \pm error estándar)

CEPA	DIÁMETRO POCILLO (cm)	DIÁMETRO HALOZONA (cm)	% ERS
Control	0,6 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0
A	0,6 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0
B	0,6 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1	122,2
C	0,6 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0
D	0,6 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	150,0
E	0,6 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0
F	0,6 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	155,6
G	0,6 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1	105,6
H	0,6 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	72,2
I	0,6 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0	111,1
J	0,6 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	83,3
K	0,6 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	166,7
L	0,6 \pm 0,0	0,8 \pm 0,1	100,0
M	0,6 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0

Es de destacar que de las 9 cepas de actinobacterias con capacidad para solubilizar fosfatos, siete presentaron elevados índices de ERS, superiores al 100%, respecto a la placa control. La cepa K resultó la más eficiente con un valor próximo al 167%.

Franco-Correa (2008) pone de manifiesto en su trabajo que la capacidad de para solubilizar fosfatos de las actinobacterias estaría influenciada por sus requerimientos nutricionales, de tal forma que algunos nutrientes presentarían una

alta relevancia para la solubilización de fosfatos y otros no. Prieto-Correal et al (2015) destacan la capacidad de *Streptomyces* como solubilizadora de fosfatos mediante la evaluación de producción de ácidos orgánicos.

IV.5. PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

Empleando el ensayo colorimétrico de detección de sideróforos (Apartado III.4.3. de materiales y métodos), con las actinobacterias seleccionadas se obtuvo el resultado que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Valoración cualitativa de la producción de sideróforos

CEPA	PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS
A	No
B	No
C	No
D	Sí
E	No
F	Sí
G	Sí
H	No
I	Sí
J	Sí
K	No
L	No
M	No

La presencia de sideróforos se determinó mediante la confirmación del viraje a púrpura o rosa del reactivo original de color azul, lo que tiene lugar como consecuencia de la reacción de quelación férrica. En algunos casos fue el medio lo que cambió de color y en otros el micelio. Resultado de este análisis cualitativo se determinó que 4 de las 13 cepas aisladas eran productoras de sideróforos.

Mengual Navarro-Soto (2015) obtuvo un porcentaje mayor que este trabajo (31%) de cepas aisladas productoras de sideróforos, superando el 80%. En consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo, Franco-Correa (2008) corroboró la posible relación entre la producción de sideróforos y el incremento de la capacidad de fijar nitrógeno en el grupo de las actinobacterias.

V. CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado, se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. Numerosas actinobacterias aisladas de suelos rizosféricos muestran un importante potencial para actuar como agentes promotores del crecimiento vegetal; dicho potencial puede ser evaluado de forma cualitativa *in vitro* mediante la aplicación de metodologías simples y de respuesta rápida.

2. La fijación de Nitrógeno, la solubilización de fosfatos o la producción de sideróforos microbianos son algunos de los mecanismos por los cuales algunas actinobacterias pueden actuar como agentes biofertilizantes.

3. Mientras que la capacidad para fijar nitrógeno fue detectada de forma generalizada en el total de las cepas testadas, el porcentaje de cepas solubilizadoras de fosfatos y productoras de sideróforos descendió al 70% y 38% del total, respectivamente.

4. Las actinobacterias A y B demostraron capacidad para fijar nitrógeno, y desarrollar micelio típico en menos de 24 horas en medios de cultivo líquidos. Por otro lado, las cepas D y F mostraron una eficiencia relativa de solubilización superior al 150% así como también capacidad para producir sideróforos. Por tanto, sendas cepas fueron consideradas las mejores candidatas para llevar a cabo futuras investigaciones, tanto a escala industrial como en campo.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz RE (2012). IMPACTO DE LOS SIDERÓFOROS MICROBIANOS Y FITOSIDÉFOROS EN LA ASIMILACIÓN DE HIERRO POR LAS PLANTAS: UNA SÍNTESIS. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(1) :9-21.
2. Abdulla HM, El-Shatoury SA (2007). Actinomycetes in rice straw decomposition. *Waste Management* 27: 850-853.
3. Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2(1): 1-12.
4. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia L MP (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35(4): 1044-1051.
5. Benjumeda-Muñoz D (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones (Trabajo fin de grado). Universidad de Sevilla.
6. Burney JA, Davis SJ, Lobell DV (2010). Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 107(26): 12052-12057.
7. Calaby-Floody M, Medina J, Rumpel C, Condrón LM, Hernández M, Dumont M, Mora M (2018). Smart Fertilizers as a Strategy for Sustainable Agriculture. *Advances in Agronomy* 147: 119-157.
8. Carvalho FP (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6(2): 48-60.
9. Chávez-Valenzuela A, Méndez-Gómez M, Castro-Mercado E, García-Pineda E (2018). Efecto de lipopolisacáridos y exopolisacáridos de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita* (73): 29-41.

10. Dary M (2015). La simbiosis rizobio-leguminosa como bioherramienta para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Tesis de doctorado). Universidad de Sevilla.
11. Díaz de Villegas ME, Villa P, Frías A (2002). Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44(3-4): 112-117.
12. Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R, Huante P (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Fitotecnia Mexicana* 36(3): 251-258.
13. Evangelista-Martínez Z, Quiñones-Aguilar EV, Rincón-Enríquez G (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de ciencia y tecnología* 21(63): 39-51.
14. Franco-Correa M (2008). Evaluación de caracteres PGPRs en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas (Tesis doctoral). Universidad de Granada.
15. Gage DJ (2004). Infection and invasión of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(2): 280-300.
16. García-Lozano BA (2011). Biorreguladores de crecimiento, fertilizantes químicos y orgánicos en tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.) de invernadero (Tesis de doctorado). Universidad autónoma de Nuevo León.
17. Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS Patra JK (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research* 206: 131-140.
18. Gu DY, Wang XF, Ding FJ (2014). Plant biostimulants: a review on categories, effect and application. *Crop Science* 40: 1344-1349.

19. Gupta G, Singh-Parihar S, Kumar-Ahirwar N, Kumar-Snehi S, Singh V (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Microbiology and Biochemical Technology* 7(2): 096-102.
20. Gutiérrez-Mañero FJ (2016). Aplicación biotecnológica de bacterias rizosféricas: elicitación de sistemas defensivos sistémicos en relación con la producción de compuestos con interés farmacológico y alimentario (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.
21. Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968). The Acetylene-Ethylene Assay for N₂ Fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.
22. Khush GS (2001). Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics* 2(10): 815-822.
23. Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Souchère V, Alberola C, Ménassieu J (2009). Agronomy for sustainable agriculture: a review. *Agronomy for sustainable development* 29(1): 1-6.
24. Lyson TA (2002). Advanced agricultural biotechnologies and sustainable agriculture: A review. *Trends in Biotechnology* 20(5): 193-196.
25. MacRae RJ, Hill SB, Henning J, Mehuys GR (1989). Agricultural Science and Sustainable Agriculture: a Review of the Existing Scientific Barriers to Sustainable Food Production and Potential Solutions. *Biological Agriculture and Horticulture* 6: 173-219.
26. Mengual Navarro-Soto CM (2015). Aplicación de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in the Revegetation of Semiarid Areas (Tesis doctoral). Universidad de Murcia.
27. Molina-Romero D, Bustillos-Cristales MdR, Rodríguez-Andrade O, Morales García YE, Santiago-Sáenz Y, Castañeda-Lucio M, Muñoz-Rojas J (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17(2): 24-34.

28. Noel-Echevarría R (2011). Estudio de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPRs) como alternativa de aplicación a suelos con limitantes abióticas (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional de la Pampa.
29. Pingali PL (2012). Green Revolution: Impacts, limits and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 109(31): 12302-12308.
30. Pretty J, Pervez Bharucha Z (2014). Sustainable intensification in agricultural systems. *Annals of Botany* 114(8): 1571-1596.
31. Prieto-Correal GC, Prada-Salcedo LD, Cuervo-Patiño CL, Franco-Correa M (2015). Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A. *Revista Colombiana de Biotecnología* 17(1): 111-121.
32. Ramirez JA, Lacasaña M (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales* 4(2): 67-75.
33. Rey-Obando AM, Barahona-Rosales R, Chamorro-Viveros DR (2014). Producción de dos cepas de *Frankia* sp aisladas de *Alnus acuminata* H.B.K. por fermentación fed-batch. *Revista de investigación Agraria y Ambiental* 5(1): 81-92.
34. Reyes-Sánchez LB (2012). Aporte de la química verde a la construcción de una ciencia responsable. *Educación química* 23: 222-229.
35. Rodríguez-Conde S (2011). Potencial de las bacterias del suelo en la rizorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Tesis doctoral). Universidad de Granada.
36. Rojas-Rodríguez R (2016). Desarrollo de métodos para la reducción de la contaminación por plaguicidas en aguas subterráneas mediante la adición de residuos orgánicos a los suelos (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla.
37. Salazar-Navarro JM (2013). Operaciones auxiliares de abonado y aplicación de tratamientos en cultivos agrícolas UF0161. Capítulo1. IC (Ed).

38. Samaniego-Gómez BY, Reyes-Ramírez A, Moreno-Valenzuela OA, Tun-Suárez JM (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Protección Vegetal* 32(1): 10-22.
39. Sathya A, Vijayabharathi R, Gopalakrishnan S (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *Three Biotech* 7(102): 1-10.
40. Valdés M, Perez NO, Estrada-de Los Santos P, Caballero-Mellado J, Peña-Cabriales JJ, Normand P, Hirsch AM (2005). Non-*Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 460-466.
41. Vega-Celedón P, Canchignia-Martínez H, González M, Seeger M (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos tropicales* 37: 33-39.
42. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce AN (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. *Molecules* 21(5): 1-17.
43. Yagüe-González JI (2008). Seguridad alimentaria y medioambiental en el uso de fitosanitarios. *phytoma* (197).