

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AEROBIAS ESTRICTAS ASOCIADAS
AL SUELO DE CIRUELO EUROPEO EN CONDICIONES HÍDRICAS
CONTRASTANTES**

POR

MATÍAS GONZALO ARAVENA LAGOS

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**CHILLÁN CHILE
2024**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AEROBIAS ESTRICTAS ASOCIADAS
AL SUELO DE CIRUELO EUROPEO EN CONDICIONES HÍDRICAS
CONTRASTANTES**

POR

MATÍAS GONZALO ARAVENA LAGOS

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2024**

Aprobada por:

Profesor Asociado. Macarena Gerding G.
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Guía

Profesor Asociado. Arturo Calderón O.
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Asesor

Profesor Asociado, Marisol Vargas C.
Ing. Agrónomo, Dr.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo. M. Sc.

Decano

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	6
Resultados y Discusión	11
Conclusiones	18
Referencias	19

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Proporción (%) de bacterias aerobias estrictas con respecto al total de bacterias aerobias bajo dos condiciones hídricas (DRY y WET) en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD)	12
Figura 2 Población de bacterias aerobias estrictas, bajo dos condiciones hídricas (DRY y WET) y a dos profundidades diferentes (20 y 40 cm) en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD)	13
Figura 3 Porcentaje de bacterias aerobias estrictas con habilidad para fijar nitrógeno atmosférico (Nfix), solubilizar fósforo (Psob), solubilizar potasio (Ksob), producir ácido indol acético (AIA), producir ACC-desaminasa (ACCd) y generar antibiosis frente a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	14
Figura 4 Porcentaje de bacterias aerobias estrictas a diferentes profundidades (20 y 40 cm) en distintos tratamientos de riego (DRY y WET) en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD)	16
Figura 5 Cantidad de producción de ácido indolacético (ppm) de diferentes cepas de bacterias aerobias estrictas aisladas desde suelo de un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD)	18

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AEROBIAS ESTRICTAS ASOCIADAS AL SUELO DE CIRUELO EUROPEO EN CONDICIONES HÍDRICAS CONTRASTANTES

CHARACTERIZATION OF OBLIGATE AEROBIC SOIL BACTERIA IN ASSOCIATION WITH EUROPEAN PLUM TREE UNDER CONTRASTING WATER CONDITIONS

Palabras índice adicionales: PGPB, ácido indolacético (AIA), ACC desaminasa, fijación de nitrógeno.

RESUMEN

Los microorganismos del suelo juegan roles fundamentales en el crecimiento de los cultivos, pero sus poblaciones pueden verse afectadas positiva o negativamente por cambios en las condiciones climáticas y edáficas. El objetivo de esta tesis fue caracterizar bacterias aerobias estrictas aisladas de un suelo con condiciones hídricas contrastantes, en cuanto a sus atributos promotores de crecimiento vegetal. Se cuantificó bacterias aerobias estrictas (AE) en suelos sometidos a dos condiciones hídricas (DRY y WET) en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad. El porcentaje de bacterias AE fue significativamente más bajo en la condición WET ($P \leq 0,05$), aunque no se encontraron diferencias en las UFC por gramo de suelo. Las bacterias AE fueron caracterizadas en cuanto a su habilidad para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y potasio, además de evaluar la capacidad de producir la enzima ACC desaminasa. También se evaluó la producción de ácido indol acético y el antagonismo frente a *Pseudomonas syringae pv. syringae*, uno de los principales patógenos del ciruelo. Demostrándose que las bacterias AE cumplen roles principalmente asociados a la fijación biológica de nitrógeno y la producción de la enzima ACC-desaminasa y se determinó que la condición WET disminuyó las poblaciones de bacterias aerobias estrictas.

SUMMARY

Soil microorganisms play fundamental roles in crop growth, but their populations can

be positively or negatively affected by changes in climatic and edaphic conditions. The objective of this thesis was to characterize obligate aerobic bacteria isolated from a soil with contrasting water conditions, in terms of their plant growth promoting attributes. Obligate aerobic bacteria (OAB) were quantified in soils subjected to two water conditions (DRY and WET) in a European plum orchard at super high density. The percentage of OAB was significantly lower in the WET condition ($P \leq 0.05$), although no differences in CFU per gram of soil were found. The OAB were characterized in terms of their ability to fix nitrogen, solubilize phosphorus and potassium, in addition to evaluating the ability to produce the enzyme ACC-desaminase. Indole acetic acid production and antagonism against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, one of the main plum pathogens, were also evaluated. It was demonstrated that OAB play roles mainly associated with biological nitrogen fixation and the production of the ACC desaminase enzyme, and it was determined that the WET condition decreased the populations of obligate aerobic bacteria.

INTRODUCCIÓN

El suelo es un ecosistema natural en el que proliferan una gran variedad de microorganismos (Gómez *et al.*, 2014). Gran parte de estos microorganismos interactúan con las raíces de las plantas y constituyentes del suelo en la interfase raíz-suelo. Este conjunto de interacciones entre suelo, raíces y microorganismos da lugar al desarrollo de un ambiente dinámico, donde una variedad de formas microbianas puede desarrollarse activamente y en equilibrio (Pedraza *et al.*, 2010). Las bacterias del suelo, que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas se les denomina Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB del inglés Plant Growth Promoting Bacteria) (Spaepen *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2014). Las PGPB tienen la capacidad de colonizar activamente el sistema radicular para favorecer y/o mejorar su crecimiento y rendimiento (Berendsen *et al.*, 2012).

Los mecanismos de acción de las PGPB pueden ser directos o indirectos y también una combinación de ambos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012; Parray *et al.*, 2016). Dentro de los mecanismos indirectos se encuentra la acción biocontroladora, ya que hay rizobacterias que disminuyen o eliminan microorganismos fitopatógenos

mediante la producción de sustancias antimicrobianas, de sideróforos y/o de enzimas líticas. Además pueden reducir poblaciones de potenciales patógenos a través de competencia por nutrientes o espacio, así como por estimulación de las defensas naturales de la planta mediante mecanismos conocidos como resistencia sistémica inducida frente al ataque por fitopatógenos mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles como el ácido jasmónico, ácido salicílico y el etileno que participan en la protección de las plantas a diferentes enfermedades (Kloepper *et al.*, 1993; Glick, 1995; Shah, 2009; Esquivel-Cote *et al.*, 2013).

Los mecanismos directos permiten aumentar la disponibilidad de nutrientes en la solución de suelo (Pedraza *et al.*, 2010) o también promover el desarrollo de la planta a través de la producción de sustancias reguladoras del crecimiento. Algunos ejemplos de estos mecanismos son síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas) (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000), fijación de nitrógeno (Zhang *et al.*, 2006), solubilización de fósforo y potasio del suelo (Idriss *et al.*, 2002), y aumento de la actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACC) desaminasa (Glick, 1995; Dobbelaere *et al.*, 2003).

La fijación biológica de nitrógeno es el proceso por el cual algunos microorganismos utilizan el nitrógeno contenido en el aire, reduciéndolo a amoníaco a través de una enzima llamada nitrogenasa. Esta cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ bajo la reacción general: $N_2 + 10NH_4^+ + 8e^- + nMgATP \rightarrow NH_4^+ + H_2 + nMgADP + nPi$ ($n \geq 16$). Para ello requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol por H_2 producido por mol de N_2 reducido (Paredes, 2013).

En el caso de la solubilización de fosfatos, en general, los microorganismos del suelo dinamizan el ciclo del fósforo a través de procesos de mineralización, inmovilización y solubilización, los cuales están relacionados con su metabolismo nutricional. Debido a que las fuentes orgánicas no son utilizadas directamente para la nutrición microbiana, éstas deben primero hidrolizarse por la acción de enzimas fosfatasas, producidas y secretadas al suelo por los microorganismos. La solubilización del fósforo del suelo es el proceso por el cual las reacciones de precipitación se revierten, liberando fósforo en la solución del suelo, mediado

generalmente por la acción metabólica de los microorganismos y las raíces de las plantas (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014). Los principales mecanismos relacionados con la solubilización de potasio mineral incluyen la producción de ácidos orgánicos como ácido oxálico, ácido tartárico, ácido glucónico, entre otros y la producción de protones (Saiyad *et al.*, 2015).

Dentro de las bacterias del suelo, algunas pueden inducir tolerancia a estrés en plantas a través de diferentes mecanismos de acción. Uno de estos es la producción de la enzima ACC desaminasa, que convierte el ACC, precursor del etileno, en α -acetobutirato y amonio (Bleecker y Kende, 2000). Este último es utilizado por plantas y bacterias como fuente de nitrógeno. Las plantas, para mantener el equilibrio entre los niveles de ACC interno y externo, exudan más ACC y como resultado disminuye la biosíntesis de etileno dentro de la planta (Penrose y Glick, 2001).

Además de las plantas, una proporción significativa de bacterias de la rizosfera tienen el potencial de producir AIA. El cual, juega un papel crucial en la capacidad de rizobacterias para colonizar cultivos hospedantes, teniendo como función la movilidad, señalización y fijación a las raíces de las plantas (Etesami y Glick, 2024). Existen bacterias que se encuentran adheridas a la superficie de las semillas o de las raíces empleando al triptófano contenido en los exudados para sintetizar y liberar ácido indol-3-acético (AIA) (Glick *et al.*, 1998). Este AIA exógeno junto con el AIA endógeno de las plantas estimula la proliferación y elongación celular vegetal. El AIA liberado por las bacterias afecta principalmente al sistema radicular, aumentando su volumen, peso, número de raíces laterales, pelos radicales y el área de superficie en contacto con el suelo. Todos estos cambios conducen a un aumento en su capacidad de explorar el suelo para el intercambio de nutrientes, de esta manera, mejoran la nutrición de la planta y su capacidad de crecimiento. Además, se ha encontrado que esta auxina actúa como una molécula importante en la señalización e interacción planta-microorganismo (Raheem *et al.*, 2018).

El mantenimiento de la viabilidad, diversidad de la población y el funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo es esencial para la agricultura sustentable (Giri *et al.*, 2005). Sin embargo, la funcionalidad y sobrevivencia de los microorganismos en los sistemas agrícolas está determinada por factores bióticos,

como la competencia con otros microorganismos, composición biológica del suelo y el reconocimiento planta-microorganismo. Además, factores abióticos, como el clima, características físicas y químicas del suelo, influyen directamente en el tipo de interacción de estos microorganismos y la expresión de los efectos benéficos o perjudiciales determinantes en el desarrollo de las plantas (Marschner y Timonen, 2005; Harman, 2006; Hoitink *et al.*, 2006; Siddiqui y Akhtar, 2008; Radjacommare *et al.*, 2010).

Los manejos agrícolas pueden modificar la biodiversidad y alterar la estructura de las comunidades microbiológicas del suelo (Kennedy y Smith, 1995; García de Salamone *et al.*, 2006). Suelos agrícolas que están sometidos a la mecanización continua, monocultivo, sobre riego, déficit hídrico, aplicación de agroquímicos y fertilizantes sintéticos, compactación y quemadas, tienen bajas poblaciones microbianas lo que afecta negativamente su fertilidad (Higuera, 2008). En particular variaciones en el contenido hídrico del suelo pueden provocar cambios en las poblaciones bacterianas que viven en condiciones aerobias y anaerobias, tanto por anegamiento o por desecación (Qin *et al.*, 2019). En estudios previos, realizados en huertos de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var. D'Agén injertadas sobre el portainjerto Rootpack-20 (*Prunus besseyi* x *Prunus cerasifera*) en super alta densidad (SHD), ubicado en la comuna de Peralillo, Región de O'Higgins, Chile. Regado por goteo, bajo condiciones hídricas contrastantes y dos manejos de riego (DRY y WET) se logró determinar alteraciones significativas en la proporción de bacterias anaerobias/aerobias del suelo. Tendiendo a ser superiores en condiciones de riego excesivo las bacterias aerobias y disminuyendo significativamente las poblaciones de bacterias aerobias estrictas del género *Azospirillum* en la condición de riego WET (Huepe, 2023; Leyton, 2023). En particular los huertos de super alta densidad (SHD) otorgan ventajas como una mayor densidad de plantación, incremento de la precocidad, altos rendimientos de fruta de calidad óptima y una mejor distribución de la luz en la canopia (Mir *et al.*, 2018). Por otro lado, el uso de portainjertos enanizantes no sólo puede reducir el tamaño en la planta sino también cambiar las relaciones hídricas del huerto y su respuesta a las prácticas de riego. Por ejemplo, huertos con árboles pequeños consumen menos agua por planta que

huertos con árboles grandes debido a una menor superficie foliar expuesta a la radiación solar y a cambios en la conductividad hidráulica del xilema (Álvarez *et al.*, 2020; Hayat *et al.*, 2021).

Sin embargo, se desconoce el rol que las bacterias aerobias estrictas, que tienden a desaparecer bajo esas condiciones, están cumpliendo en beneficio de las plantas. El objetivo de esta tesis es caracterizar bacterias aerobias estrictas aisladas desde suelos sometidos a dos condiciones hídricas en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad, en cuanto a sus atributos promotores del crecimiento vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antecedentes generales

El muestreo de suelos se llevó a cabo en un huerto de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var. D'Agén injertadas sobre el portainjerto Rootpack-20 (*Prunus besseyi* x *Prunus cerasifera*), regado por goteo, ubicado en la comuna de Peralillo, Región de O'Higgins, Chile, en un suelo del orden Alfisol (Casanova *et al.*, 2013).

El aislamiento y caracterización de las bacterias se realizó en el laboratorio de Microbiología Agrícola en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, campus Chillán.

Muestreo de suelo

Se colectaron muestras de suelo desde la zona de raíces, en un huerto de ciruelo en diseño de super alta densidad (SHD), con un marco de plantación de 3 x 1 m, conducidas en forma de seto continuo. En el huerto se encontraba establecido un experimento en diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones y dos tratamientos de riego: Húmedo (WET) y Déficit Moderado Tardío (DRY). El tratamiento WET correspondió al riego comercial, en donde el objetivo fue suplir el 100 % de la evapotranspiración del cultivo (ET_c), manteniendo valores de potencial hídrico del tallo óptimos para ciruelo, entre -1,0 y -0,8 MPa (McCutchan y Shackel, 1992) durante toda la temporada 2021/22. El tratamiento DRY siguió una estrategia en la cual se regó como el tratamiento WET hasta diciembre 2021, luego se restringió el riego hasta alcanzar valores de potencial hídrico del tallo entre -1,4 y -

1,2 MPa, representativos de un estrés hídrico moderado-severo. Una vez alcanzado estos valores, se regó hasta alcanzar un estado hídrico similar al del tratamiento WET, para luego, nuevamente ser restringida la aplicación de agua hasta alcanzar un estrés hídrico moderado-severo.

En octubre de 2022, se colectaron muestras de suelo desde cada unidad experimental. Para ello, utilizando un barreno, se tomaron muestras de suelo de aproximadamente 300 g a dos profundidades (20 y 40 cm). Estas fueron depositadas en bolsas de polietileno y almacenadas en una caja a refrigerante (10 – 15 °C) hasta su llegada al laboratorio, donde fueron mantenidas en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

Recuento y aislamiento de bacterias aerobias

Las muestras de cada unidad experimental fueron homogeneizadas, y desde cada una de ellas se depositó una submuestra de 1 g de suelo en un matraz con 100 mL con solución salina estéril (0,89 % NaCl). La muestra se agitó a 150 rpm durante dos horas en un agitador orbital. Transcurrido este período, se realizaron diluciones en series de 10 hasta alcanzar la dilución 10^{-5} . Desde cada dilución se depositó 0,1 mL en placas Petri con agar selectivo para bacterias Thornton. Las placas fueron llevadas a incubación a 25 °C por 48 h o hasta que se visualizaron colonias en la superficie. Desde las diluciones que desarrollaron entre 30 y 300 se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia. Luego, desde cada unidad experimental se seleccionaron 25 colonias al azar que fueron subcultivadas en agar nutritivo estándar. A los aislados bacterianos obtenidos se les asignó un código numérico y luego fueron criopreservados en ultrafreezer a -80 °C, previo acondicionamiento en glicerol al 80 %, donde se mantuvieron hasta su caracterización.

Además, se depositó una submuestra de 50 g por cada unidad experimental en placas metálicas, las que fueron llevadas a un horno de aire seco a 60 °C hasta peso constante, para la determinación de peso seco de suelo.

Determinación de bacterias aerobias estrictas

Los 25 aislados obtenidos desde cada unidad experimental fueron evaluados en cuanto a su capacidad de crecer bajo condiciones aerobias y anaerobias, y de esa

forma seleccionar sólo aquellos aislados aeróbios estrictos. Para ello, se sembró cada cepa en dos placas Petri con agar nutritivo estándar (MERCK): (5 gL⁻¹) peptona, (3 gL⁻¹) extracto de levadura, (5 gL⁻¹) cloruro de sodio, (15 g) agar, (1.000 mL) agua destilada, y se enumeró cada cepa bacteriana para identificarla a lo largo de la investigación. Un set de placas con todos los aislados fue incubado a 25 °C en condiciones anaeróbicas usando una cámara GasPak™ EZ Anaerobe Container System Sachets, y el otro set de placas en condiciones aeróbicas en una incubadora a 25 °C. Se evaluó presencia o ausencia de colonia, y aquellas bacterias que crecieron en condiciones anaerobias fueron descartadas de futuras evaluaciones, al corresponder al grupo de bacterias anaerobias facultativas.

Cuantificación de bacterias fijadoras de Nitrógeno

Las bacterias AE aisladas se sembraron en el medio Agar Burk, (composición química: (0,8 gL⁻¹) K₂HPO₄, (0,2 gL⁻¹) KH₂PO₄, (0,2 gL⁻¹) MgSO₄·7H₂O, (0,05 gL⁻¹) CaSO₄, (0,05 gL⁻¹) FeSO₄, (0,001 gL⁻¹) Na₂MoO₄, (1,6 g) sacarosa, (15 g) agar, (1.000 mL) agua destilada, pH (7.4), contenido en placas Petri, para evaluar la capacidad de las bacterias de fijar nitrógeno (N) atmosférico. Para la siembra se utilizó un asa de diámetro estándar y una plantilla con 25 divisiones colocada en la base de la placa Petri, marcando un punto de referencia para evitar confusión en el momento de sembrar y al leer los resultados. Las placas fueron incubadas a 25 °C por 3 días.

Cuantificación de bacterias solubilizadoras de fósforo

Con el fin de evaluar la capacidad de las bacterias aerobias estrictas de solubilizar fósforo (P), se sembraron los aislados en el medio de cultivo Agar Pikovskaya (dextrosa 55 mM; Ca₃(PO₄)₂ 16,1 mM; KCl 2,68 mM; (NH₄)₂SO₄ 3,784 mM; MgSO₄·7H₂O 0,406 mM; extracto de levadura 0,05 % (p/v); MnSO₄ trazas 6,621 x 10⁻⁴ mM; FeSO₄ trazas 6,575 x 10⁻⁴ mM; agar 1,5 % (p/v); agua destilada 1.000 mL; pH 7,3). La siembra fue realizada siguiendo el mismo protocolo que para bacterias fijadoras de N y las placas fueron incubadas a 25 °C por 3 días. El ensayo completo se realizó en duplicado. Se consideró bacterias solubilizadoras de fosfato a aquellas que formaron un halo transparente alrededor de la colonia.

Cuantificación de bacterias solubilizadoras de potasio

Con el fin de evaluar la capacidad de las bacterias aerobias estrictas de solubilizar potasio (K), se sembraron los aislados en el medio de cultivo agar Aleksandrov modificado (5,0 g Glucosa, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,008 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,1 g $CaCO_3$, 2,0 g $Ca_3(PO_4)_2$ y polvo de feldespato de potasio como potasio mineral (2,0 g), y 18 g de agar - agar en 1000 mL de agua desionizada y un pH de 7.2, ajustado con NaOH 1N (modificado desde Hu *et al.*, 2006). Se consideró bacterias solubilizadoras de potasio a aquellas que formaron un halo transparente alrededor de la colonia.

Producción de ácido indol acético

Para determinar la cantidad de bacterias con la habilidad para producir AIA y además cuantificar el AIA producido, se confeccionó una curva de calibración con distintas concentraciones de AIA (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu g mL^{-1}$) y la absorbancia a cada concentración por medio de una reacción colorimétrica. Para ello, se mezcló 0,3 mL de cada dilución de AIA con 1,2 mL de reactivo de Salkowski (H_2SO_4 concentrado 150 mL; agua destilada 250 mL; $FeCl_3$ 0,5 M en H_2O destilada 7,5 mL; a una relación 4 mL de reactivo: 1 mL de muestra) en un tubo Eppendorf, utilizando como blanco una solución de agua destilada sin AIA. Después de 30 minutos se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Cesil, CE1020, Inglaterra).

Para evaluar la producción de AIA por parte de los aislamientos bacterianos, se depositaron 2 asadas de cada uno de ellos en tubos de ensayos con 3 mL de caldo nutritivo estándar (Merck) estéril (pH 7,27), con 3 repeticiones por aislamiento. Éstos se colocaron en una cámara de incubación (Binder, BD53, Alemania) (25 ± 2 °C) sobre un agitador orbital (Lab-Line Junior Orbit, 3520, EE. UU.) a 200 rpm durante 72 h. De la suspensión bacteriana obtenida se extrajeron 1,5 mL, los que fueron depositados en tubos Eppendorf, para ser centrifugados a 3000 rpm en una microcentrifuga (VWR/Hitachi, CT15RE, Japón) durante 15 minutos a 16 °C, precipitando las células bacterianas de la solución.

Posteriormente se retiró 0,3 mL del sobrenadante, el cual se depositó en un nuevo tubo Eppendorf donde se le adicionó 1,2 mL del reactivo de Salkowski, para después leer la absorbancia con la metodología descrita previamente y así determinar la concentración de AIA, interpolando en la curva de calibración.

Actividad de la enzima ACC deaminasa

Los aislados bacterianos se reprodujeron en tubos Eppendorf con caldo nutritivo y fueron incubados a 25 °C en agitación constante por 24 h. Una vez transcurrida la incubación, se centrifugaron los tubos a 1000 rpm por 5 minutos y luego se extrajo el caldo nutritivo sobrenadante con una micropipeta (1 mL), dejando solo el concentrado celular que contiene la población bacteriana. Luego se enrazó a 1 mL con el medio de sales mínimas Dworkin y Foster (DF) incubándola durante 12 h para reducir el contenido nutricional de las células. Todo el procedimiento descrito se realizó en cámara de flujo laminar.

Para identificar las bacterias productoras de ACC-deaminasa, se sembraron las bacterias, en 3 medios de cultivos agarizados contenidos en placas Petri: DF libre de nitrógeno, DF con nitrógeno adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2g y DF + ACC. En cada división de la placa se inoculó una gota de 10 μL de cada cepa. Esta inoculación se realizó en cada uno de los medios de cultivos con cuatro repeticiones. Las placas inoculadas fueron incubadas a 25 °C por 24 h.

Las cepas bacterianas con actividad ACC-deaminasa corresponden a todas aquellas que crecieron en el medio DF+ACC, pero no en el medio DF. El medio DF+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sirvió como medio control, en donde todas las cepas se desarrollaron.

Evaluación de la actividad antagonista

Se evaluó la habilidad de las bacterias para producir compuestos antibióticos frente a uno de los principales patógenos del ciruelo europeo *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* agente causal del cáncer bacteriano (Latorre, 2018).

El inóculo bacteriano fue preparado en tubos con 5 mL de caldo nutritivo, los que fueron inoculados con 50 μL de cultivo bacteriano descongelado, éstos permanecieron en agitación a 120 rpm durante dos días a 25 °C. Luego, de esta suspensión se extrajo 200 μL que fueron agregados a tubos con 50 mL de caldo nutritivo, permaneciendo en las condiciones de incubación antes descritas. Luego de 24 horas se midió la densidad óptica de estas suspensiones a 600 nm utilizando un espectrofotómetro y se ajustó la concentración a 1×10^7 UFC mL^{-1} . Para este ensayo se utilizaron placas Petri de 100 mm con 20 mL de medio APD+CN+AA, en dichas placas se sembró 100 mL del patógeno formando un césped bacteriano con

su densidad óptica previamente ajustada a 0,001. En estas mismas placas con el césped bacteriano sembrado se procedió a dividir en 8 y sembrar las bacterias PGPB, se utilizó una matriz de 8 divisiones y se inocularon 6 cepas PGPB por placa, agregando 10 μ L de cada suspensión bacteriana por casilla, en las últimas dos casillas se agregó 10 μ L de caldo nutritivo y 10 μ L de solución salina (0,89 % p/p de NaCl) respectivamente como control. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 25 °C y se observó diariamente, las bacterias que tuvieron capacidad de producir antibiosis formaron un halo alrededor de ella, lo que significa que el patógeno no pudo desarrollarse.

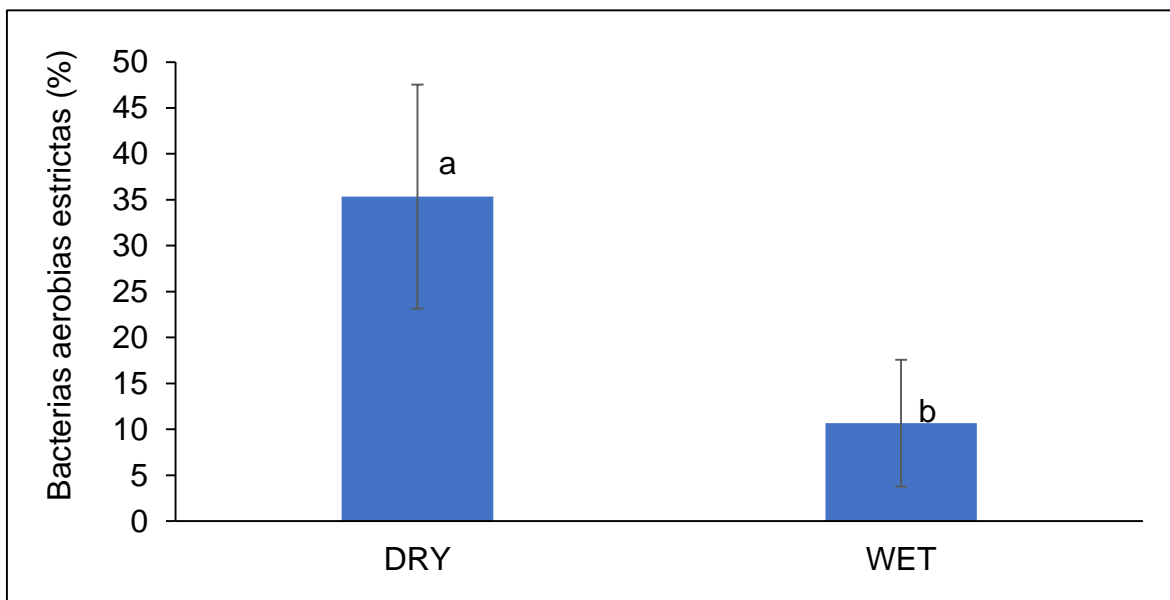
Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental del ensayo de terreno desde donde fueron obtenidas las muestras fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Los datos de recuento de bacterias aerobias estrictas, porcentaje de bacterias fijadoras nitrógeno, porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio, porcentaje de bacterias con actividad ACC desaminasa y porcentaje de bacterias antagonistas para *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* fueron sometidos a análisis de varianza (ANDEVA), previa comprobación de los supuestos de la ANDEVA. Los datos fueron comparados mediante test de Tukey, con un nivel de confianza del 95 %. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico Infostat®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde todas las muestras de suelo analizadas se obtuvo crecimiento de colonias bacterianas en condiciones aerobias, de las cuales entre un 10 y un 35 % correspondieron a bacterias aerobias estrictas (AE), es decir incapaces de crecer en ausencia de oxígeno. El análisis de varianza de los porcentajes de bacterias AE arrojó diferencias significativas entre las poblaciones aisladas desde suelos bajo condición de riego normal (WET) y déficit moderado tardío (DRY) siendo las poblaciones de bacterias AE mayores en la condición DRY ($P \leq 0,05$) (Figura 1), sin encontrarse diferencias entre profundidades de muestreo.

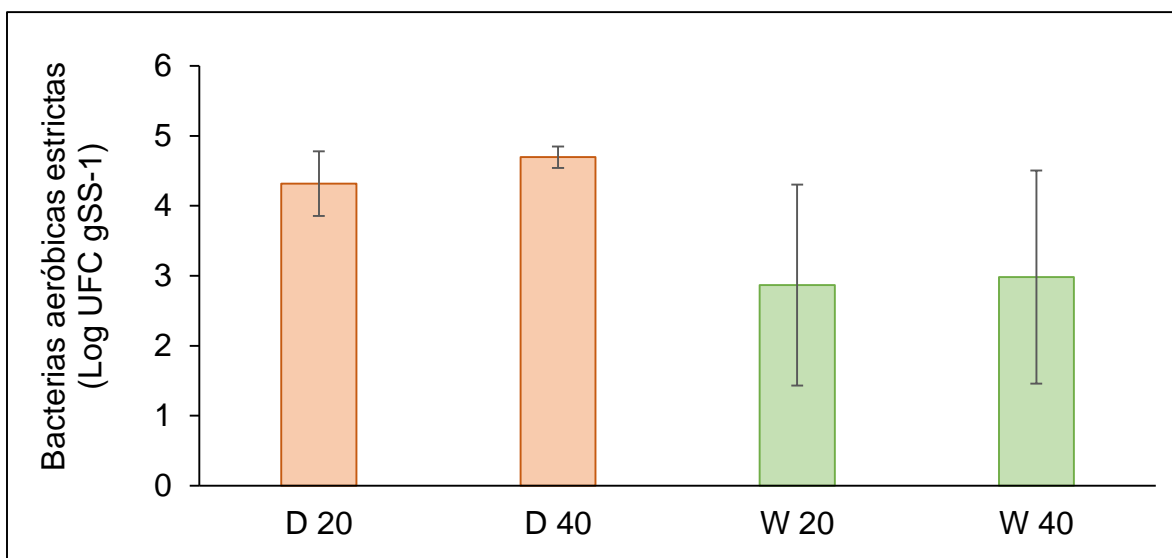
Figura 1. Proporción (%) de bacterias aerobias estrictas con respecto al total de bacterias aerobias bajo dos condiciones hídricas (DRY y WET) en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD).



* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Las poblaciones de bacterias AE en UFC por g de suelo, en condición WET y DRY fluctuaron entre 3 y 4,5 Log (UFC g SS⁻¹) mostrando una tendencia a disminuir en las parcelas WET aunque sin observarse diferencias significativas entre ambas condiciones hídricas ni en profundidad (20 y 40 cm) ($P > 0,05$) (Figura 2). En la condición WET se observó una mayor variabilidad en los recuentos entre parcelas aumentando el error estándar, lo que explica la ausencia de diferencias estadísticas a pesar de observarse una tendencia a mayores poblaciones en la condición DRY. Es importante señalar que la escala logarítmica presenta diferencias numéricas mucho mayores a la escala absoluta, por lo que, una diferencia desde 4,5 a 3 en la escala logarítmica significa una disminución de las poblaciones en un 97 %. La condición WET hizo que la población disminuyera de 3622 a 1000 bacterias aerobias estrictas por gramo de suelo.

Figura 2. Población de bacterias aerobias estrictas, bajo dos condiciones hídricas (DRY y WET) y a dos profundidades diferentes (20 y 40 cm) en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD).

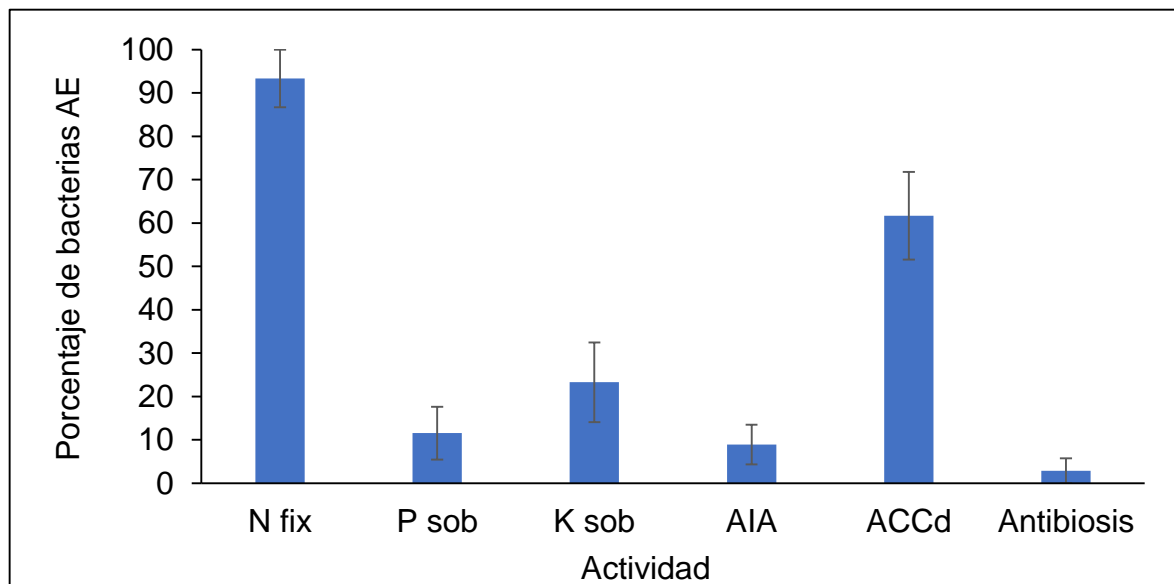


La disminución de la población de bacterias AE en la condición WET puede deberse a que éstas requieren oxígeno en todo momento para su desarrollo (Varela y Grotius, 2008). Por lo tanto, la mayor presencia de agua en los poros del suelo en la condición WET, provoca que bacterias que no tienen la capacidad de vivir en condiciones anaerobias tiendan a desaparecer. De esta manera, cuando la oxigenación de los suelos es baja, se pueden encontrar en mayor concentración bacterias anaerobias que tiene la capacidad de sobrevivir sin presencia de oxígeno (Corrales *et al.*, 2015). Mientras que las bacterias aerobias dependen de las condiciones de humedad, oxígeno y materia orgánica (Mayz-Figueroa, 2004). Tanto a nivel porcentual como de población (UFC), no se observó diferencias entre las profundidades de suelo, lo que indica que el nivel de aireación debió ser homogéneo y más que nada la condición de riego fue la determinante en la disminución en la población.

Con respecto al rol que pudiesen estar jugando las bacterias aerobias estrictas en el suelo y el cultivo, en la (Figura 3) se muestra que de las bacterias aerobias estrictas colectadas en ambas condiciones (DRY y WET), el 93 % tiene la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico, seguido de un 61,6 % que son capaces de producir la enzima ACC desaminasa y en proporciones mucho menores son solubilizadoras

de potasio con un 23 %, solubilizadoras de fósforo con un 11,5 %, productoras de ácido indolacético con un 8,9 % y por último solo un 2,8 % fueron antagonistas del patógeno *Pseudomonas syringae* pv *syringae*.

Figura 3. Porcentaje de bacterias aerobias estrictas con habilidad para fijar nitrógeno atmosférico (Nfix), solubilizar fósforo (Psob), solubilizar potasio (Ksob), producir ácido indol acético (AIA), producir ACC-desaminasa (ACCd) y generar antibiosis frente a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.



La fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es el proceso por el cual algunos microorganismos utilizan el nitrógeno contenido en el aire, reduciéndolo a amoníaco a través de una enzima llamada nitrogenasa para la producción de proteínas (Paredes, 2013). Las plantas no pueden utilizar directamente el nitrógeno molecular (N_2) gaseoso existente en la atmósfera, por lo tanto, para que pueda ser asimilado, debe romperse primero el enlace sumamente estable existente entre sus dos átomos de nitrógeno e incorporarse el nitrógeno formando amoníaco o nitratos (Danso y Eskew, 1984). A pesar de que la tasa de fijación de nitrógeno de las bacterias libres del suelo es relativamente baja en comparación a los rizobios simbióticos, estas bacterias son muy abundantes particularmente en la rizosfera (Rojas, 2008). Muchas de las bacterias fijadoras de N pueden además aportar al desarrollo de las plantas a través de la producción de fitohormonas y de la inducción de tolerancia a estrés (Fukami *et al.*, 2018). Por lo tanto, el hecho de que las

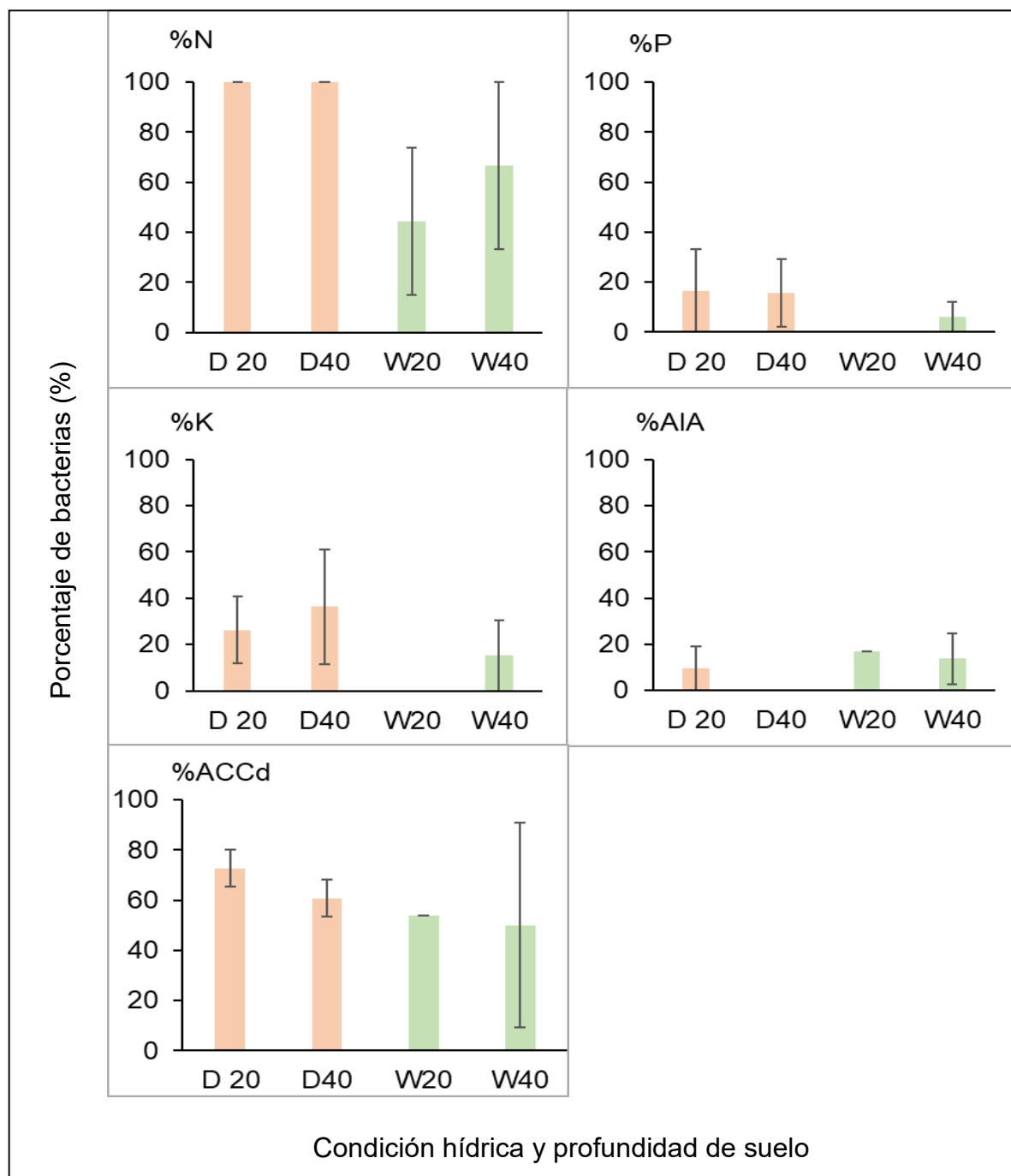
bacterias aeróbicas estrictas que están cumpliendo este rol tiendan a disminuir en la condición WET, podría tener relevancia a nivel nutricional para las plantas.

Por otro lado, bacterias con la capacidad de producir la enzima ACC desaminasa cumplen un rol importante en la protección de las plantas frente a distintos tipos de estrés. La enzima ACC desaminasa puede disminuir las concentraciones de etileno deletéreo en las plantas al desaminar el ACC, que es su precursor e incrementa la disponibilidad de amonio en la solución de suelo (Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Existen reportes que han mostrado que tratamientos con PGPB (Bacterias promotoras del crecimiento vegetal) que poseen la enzima ACC desaminasa reducen los niveles de estrés y confieren tolerancia a salinidad en cultivos que crecen en medios con altas concentraciones salinas (Saharan y Nehra, 2011; Gontia-Mishra *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2014).

Al analizar el porcentaje de bacterias AE en las dos profundidades de suelo y en las condiciones hídricas DRY y WET (Figura 4), no se determinó una diferencia significativa entre las poblaciones de bacterias fijadoras de N, P, K, AIA y con habilidad para producir la enzima ACC desaminasa, con los diferentes tratamientos ($P < 0,05$). Sin embargo, se observa que las bacterias fijadoras de N tienden a disminuir en la condición WET.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) requiere de un aporte considerable de ATP, que debe ser generado por fosforilación oxidativa, que a su vez exige la disponibilidad y consumo de importantes cantidades de oxígeno, pero es paradójico que el complejo enzimático responsable directo de la FBN: La nitrogenasa, sea una enzima que fácilmente se inactiva en presencia de oxígeno (Soto-Urzúa y Baca, 2001). Esto es contradictorio, ya que la condición de anaerobiosis favorece la condición de la nitrogenasa, pero podría explicarse con que la mayoría de las bacterias que fijan N son aerobias, por lo tanto, pueden tender a desaparecer en ambientes anaerobios. Según (Baldani *et al.*, 2014) las bacterias fijadoras de N más estudiadas y aisladas son *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derxia* y *Azotobacter*, todas ellas bacterias aerobias estrictas (Sturz *et al.*, 2000; Huergo *et al.*, 2008; Sumbul *et al.*, 2020; Gamit y Amaresan, 2022).

Figura 4. Porcentaje de bacterias aerobias estrictas a diferentes profundidades (20 y 40 cm) en distintos tratamientos de riego (DRY y WET) en un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD).



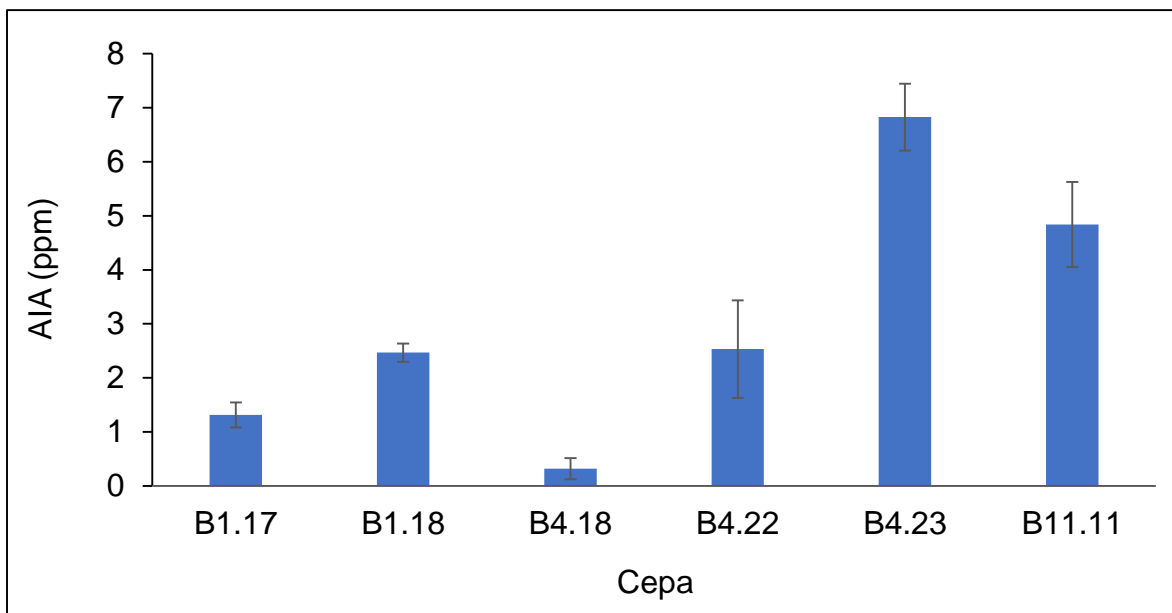
De esta manera se puede entender que la desaparición y disminución considerable de las poblaciones de bacterias cultivables con capacidad de fijar N atmosférico puede deberse a que los principales géneros que participan en este proceso son de naturaleza aerobia estricta, por lo que al haber un aumento en la

cantidad de agua en la solución de suelo disminuye el oxígeno disponible necesario para su subsistencia.

Las auxinas son el grupo principal de fitohormonas que actúan como reguladores del crecimiento vegetal, interviniendo en procesos fisiológicos como desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo, la caída de hojas, entre otros (Petrasek y Friml, 2009), siendo el ácido indolacético (AIA) la auxina natural más abundante y de mayor importancia fisiológica (Taiz y Zeiger, 2010). La habilidad de sintetizar esta hormona no es solo atributo de las plantas, sino que también una característica de muchas bacterias (Lehmann *et al.*, 2010). En general el porcentaje de bacterias con la capacidad de producir AIA fue bajo, debido a que cerca del 80 % de las bacterias rizosféricas producen AIA (Petten y Glick, 2002) y en este caso las bacterias con esta capacidad fueron menor al 10 % del total de bacterias. Cabe señalar que las bacterias aisladas en este estudio no son exclusivamente rizosféricas, sino que incluyen bacterias del suelo aisladas desde la zona de raíces, lo que podría explicar esta diferencia.

Si bien los géneros de bacterias PGPB asociados a la producción de AIA son *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Ahmad *et al.*, 2005), se han reportado especies de *Bacillus* como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* capaces de producir AIA en diversas cantidades (Elsorra *et al.*, 2004). Según el estudio de Lino (2011), el 20 % de las cepas de *Pseudomonas* sp evaluadas resultaron positivas en cuanto a producción de AIA, con valores que fluctúan entre 10,39 y 21,95 ppm. Valores similares fueron reportados por (Torres-Rubio *et al.*, 2000) en diferentes cepas de *Pseudomonas*. En la Figura 5 se muestran los niveles de AIA obtenidos con las cepas aisladas en esta investigación los cuales fluctuaron entre 1 y 7 ppm, valores que están por debajo de lo reportado para bacterias que realmente estimulan el crecimiento de las plantas. Siendo la cepa B4.23, aislada desde una condición WET a 40 cm, la que logró mayor producción ($P \leq 0,05$).

Figura 5. Cantidad de producción de ácido indolacético (ppm) de diferentes cepas de bacterias aerobias estrictas aisladas desde suelo de un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad (SHD).



* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Este trabajo de investigación confirma que el efecto de un manejo de riego excesivo puede afectar poblaciones que están cumpliendo roles benéficos para las plantas, de acuerdo con lo que se ha reportado en otros trabajos (Qin *et al.*, 2019). Futuros estudios permitirán determinar el impacto que las variaciones poblacionales de bacterias benéficas tengan en la producción.

CONCLUSIONES

1. En un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad la condición de riego “WET” disminuye las poblaciones de bacterias aerobias estrictas.
2. Las bacterias aerobias estrictas encontradas en el suelo de un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad, cumplen roles principalmente asociados a la fijación biológica de nitrógeno y a la producción de la enzima ACC desaminasa.
3. La condición “WET” en el suelo de un huerto de ciruelo europeo en super alta densidad, tiende a disminuir principalmente las poblaciones de bacterias que fijan nitrógeno.

REFERENCIAS

1. Aguado-Santacruz, G.A., B. Moreno-Gómez, B. Jiménez-Francisco, E. García-

- Moya and R.E. Preciado-Ortiz. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidóforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21.
2. Ahmad, F., I. Ahmad and M. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. *Turkey Journal of Biology*, 29, 29- 34.
 3. Ali, S., T.C. Charles y B.R. Glick. 2014. Mejora del daño causado por el estrés por alta salinidad causado por endófitos bacterianos promotores del crecimiento de las plantas que contienen ACC desaminasa. *Fisiología y bioquímica vegetal*, 80, 160-167.
 4. Álvarez, S., H. Martín, E. Barajas, J. Rubio and G. Vivaldi. 2020. Rootstock effects on water relations of young almond trees (cv. Soleta) when subjected to water stress and rehydration. *Water*, 12(12), 3319.
 5. Baldani, J., V. Reis, S. Videira, L. Boddey and V. Baldani. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384, 413-431.
 6. Berendsen, R.L., C.M. Pieterse and P.A. Bakker. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
 7. Bleecker, A.B. and H. Kende. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 1-18.
 8. Casanova, M., O. Salazar, O. Seguel and W. Luizo. 2013. *The Soils of Chile. World Soils Book Series. Springer, Dordrecht.*
 9. Corrales, L., D. Antolínez, J. Bohórquez y A. Corredor. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55-81.
 10. Danso, K.A and D.L. Eskew. 1984. Aumento de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno. *Agricultura y alimentación. OIEA*, 26(2), 29-33.
 11. Dobbelaere, S., J. Vanderleyden y Y. Okon. 2003. Efectos promotores del crecimiento de las plantas de los diazótrofos en la rizosfera. *Revisiones críticas en ciencias vegetales*, 22(2), 107-149.
 12. ElSORra, E., H. Bochow, R. Ross and T. Borriss. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus subtilis* FZB24, FZB42, FZB45 and FZB37. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111, 583–597.
 13. Esquivel-Cote, R., M. Gavilanes-Ruiz, R. Cruz-Ortega y P. Huante.

2013. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(3), 251-258.
14. Etesami, H. y B.R. Glick. 2024. Ácido indol-3-acético bacteriano: un regulador clave para el crecimiento de las plantas, las interacciones entre plantas y microbios y la resiliencia adaptativa agrícola. *Investigación microbiológica*, 127602.
 15. Fukami, J., P. Cerezini and M. Hungria. 2018. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8(73), 1-12.
 16. Gamit, H.A. and Amaresan, N. 2022. Isolation and identification of derxia species from the soil sample. pp 57–61. In: Amaresan, N., P. Patel and D. Amin (Eds.). *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York.
 17. García de Salamone, I.E., R. Michelena, A. Rodríguez, I. Montemitolf, S. Gatti and M. Rorig. 2006. Ocurrencia de micorrizas en plantas de maíz, soja y trigo en sistemas de siembra directa. *Revista de la Facultad de Agronomía, universidad de Buenos Aires*, 26(1), 67-72.
 18. Giri, B., P.H. Giang, R. Kumari, R. Prasad and A. Varma. 2005. Microbial diversity in soils. pp. 19-55. In: Varma, A., and F. Buscot (Eds.). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin, Heidelberg.
 19. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.
 20. Glick, B.R., D.M. Penrose and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology*, 190(1), 63-68.
 21. Gómez, M.M., E.C. Mercado and E. G. Pineda. 2014. *Azospirillum* una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico-Agropecuarias*, 16(1), 11-18.
 22. Gontia-Mishra, I., S. Sasidharan and S. Tiwari. 2014. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*, 36, 889-898.
 23. Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopath*, 96, 190-194
 24. Hayat F., S. Iqbal, D. Coulibaly, M. Razzaq, M. Nawaz, W. Jiang, T. Shi and Z. Gao. 2021. An insight into dwarfing mechanism: contribution of scion-rootstock interactions toward fruit crop improvement. *Fruit Research*, 1(3), 1-11.

25. Higuera, M.D. 2008. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. Investigación aplicada y Desarrollo. Orius Biotecnología. Biotech. Villavicencio, Colombia.
26. Hoitink, H.A.J., L.V. Madden and A.E. Dorrance. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma spp.* Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopath*, 96, 186-189.
27. Hu, X., J. Chen and J. Guo. 2006. Two Phosphate- and Potassium-solubilizing Bacteria Isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 983–990.
28. Huepe, G. 2023. Caracterización de la microbiota asociada a dos portainjertos de ciruelo europeo bajo distintas condiciones hídricas. Memoria de título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
29. Huergo, L.F., R.A. Monteiro, A.C. Bonatto, L.U. Rigo, M.B.R. Steffens, L.M. Cruz and F.O. Pedrosa. 2008. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. pp: 17-35. In: Cassán, F.D. and I. García de Salamone (Eds.). *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Asoc. Argentina de Microbiología. Buenos Aires. Argentina.
30. Idriss, E.E., O. Makarewicz, A. Farouk, K. Rosner, R. Greiner, H. Bochow, and R. Borris. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, 148(7), 2097-2109.
31. Kennedy, A.C., and K.L. Smith. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and soil*, 170(1), 75-86.
32. Kloepper, J.W., S. Tuzun, L. Liu and G. Wei. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. *Pest management: biologically based technologies*. American Chemical Society Books, Washington, DC.
33. Latorre, B. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Ediciones UC. Santiago, Chile.
34. Lehmann, T., M. Hoffman, M. Hentrich and S. Pollmann. 2010. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: A widely distributed way of indole-3-acetic acid production. *European journal of Cell Biology*, 89(12), 895-905.
35. Leyton, N. 2023. Relación entre el estado hídrico de la planta y la abundancia relativa de bacterias aerobias y anaeróbicas del suelo en ciruelo europeo (*Prunus domestica L.*) Memoria de título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.

36. Lino, G.L. 2011. Selección de *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* y actinomicetos productores de Ácido Indol Acético (AIA) aislados de “Biol” de elaboración artesanal provenientes de Lima y Huancayo. Memoria de título Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Perú.
37. Marschner, P. and S. Timonen. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology*. 28:23-36
38. Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
39. McCutchan, H. and K. Shackel. 1992. Stem-water potential as a sensitive indicator of water stress in prune trees (*Prunus domestica* L. cv. French). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117, 607 – 611.
40. Mir, S., M. Shah and M. Mir. 2018. *Postharvest biology and technology of temperate fruits*. Springer Cham. Cham, Switzerland.
41. Paredes, M.C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Memoria de título Ingeniería en Producción Agropecuaria. Universidad Católica Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias. Argentina.
42. Parray, J.A., S. Jan, A.N. Kamili, R.A. Qadri, D. Egamberdieva and P. Ahmad. 2016. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant growth regulation*, 35(3), 877-902.
43. Patiño-Torres, C.O. y O.E. Sanclemente-Reyes. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288-297.
44. Pedraza, R.O., K.R. Teixeira, A.F. Scavino, I.G. De Salamone, B.E. Baca, R. Azcón, y R. Bonilla. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164.
45. Penrose, D. M. and B. R. Glick. 2001. Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(4), 368-372.
46. Petrasek, J. and J. Friml. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16), 2675-2688.
47. Petten, C.L. and B. R. Glick. 2002. Role of *pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-801.

48. Qin, K., X. Dong, J. Jifon and D. Leskovar. 2019. Rhizosphere microbial biomass is affected by soil type, organic and water inputs in a bell pepper system. *Applied Soil. Ecology*, 138, 80-87.
49. Radjacommare, R., S. Venkatesan and R. Samiyappan. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(1), 1-17.
50. Raheem, A., A. Shaposhnikov, A. A. Belimov, I.C. Dodd. And B. Ali. 2018. Auxin production by rhizobacteria was associated with improved yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64(4), 574-587.
51. Rojas, C. 2008. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. Memoria de título Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
52. Saharan, B.S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
53. Saiyad, S.A., Y.K. Jhala and R.V. Vyas. 2015. Comparative efficiency of five potash and phosphate solubilizing bacteria and their key enzymes useful for enhancing and improvement of soil fertility. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 5, 1-6.
54. Shah, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 459-464.
55. Siddiqui, Z. A. and M. S. Akhtar. 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 18(3), 279-290.
56. Soto-Urzúa, L., y B.E. Baca. 2001. Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(1), 37-49.
57. Spaepen, S., J. Vanderleyden, y Y. Okon. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv. Bot. Res.* 51, 283–320.
58. Steenhoudt, O. and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 487-506.
59. Sturz, A.V., B.R. Christie and J. Nowak. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, 19(1), 1-30.

60. Sumbul, A., R.A. Ansari, R. Rizvi, e I. Mahmood. 2020. Azotobacter: un biofertilizante potencial para el manejo de suelos y sanidad vegetal. Revista saudí de ciencias biológicas, 27(12), 3634-3640.
61. Taiz, L., and Zeiger, E. 2010. Plant Physiology 5th Edition Sinauer Associates. Sunderland. Sinauer Associates, Inc. UK.
62. Torres-Rubio, M.G., S.A. Valencia-Plata, J. Bernal-Castillo and P. Martínez-Nieto. 2000. Aislamiento de enterobacterias, *Azotobacter* sp. y *Pseudomonas* sp., productoras de ácido indol-3-acético y sideróforos, de la rizosfera del arroz colombiano. Revista Latinoamericana de Microbiología, 42 (4), 171-176.
63. Varela, G. and G. Grotiuz. 2008. Fisiología y metabolismo bacteriano. Editorial Cefa. Uruguay.
64. Zhang, J., W. Jia, J. Yang, and A. M. Ismail. 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. Field Crops Research, 97(1), 111-119.