



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 2.1. Situación actual de la agricultura..... | 3 |
| 2.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal | 4 |
| 2.2.1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal directos | 4 |
| 2.2.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal indirectos | 7 |
| 2.3. La rizosfera y las interacciones planta-microorganismo | 8 |
| 2.3.1. Bacterias endófitas..... | 9 |
| 2.4. Hongos formadores de micorrizas arbusculares..... | 10 |
| 2.4.1. <i>Tuber melanosporum</i> | 11 |
| 3. OBJETIVOS | 12 |
| 4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA | 13 |
| 4.1. Selección y manejo de cepas microbianas..... | 13 |
| 4.2. Determinación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal..... | 13 |
| 4.2.1. Fijación biológica de nitrógeno | 13 |
| 4.2.2. Solubilización de fosfatos..... | 14 |
| 4.2.3. Síntesis de auxinas | 14 |
| 4.2.4. Producción de sideróforos | 15 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 17 |
| 5.1. Selección y manejo de las cepas microbianas | 17 |
| 5.2. Capacidad de promoción del crecimiento vegetal..... | 18 |
| 5.2.1. Fijación biológica de nitrógeno | 18 |
| 5.2.2. Solubilización de fosfatos..... | 19 |
| 5.2.3. Síntesis de auxinas | 21 |
| 5.2.4. Producción de sideróforos | 23 |
| 5.3. Uso potencial de bacterias como biofertilizantes..... | 24 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 27 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 30 |
| 8. ANEXOS | 35 |

1. RESUMEN

La agricultura moderna, basada en sistemas de explotación intensivos y el abuso de sustancias químicas, genera graves daños medioambientales. Para revertir esta situación, es necesario implantar modelos de agricultura sostenible, empleando técnicas respetuosas con los ecosistemas. Una herramienta alternativa al uso de agroquímicos son los biofertilizantes, microorganismos que aportan distintos beneficios a los cultivos, como aumentar la biodisponibilidad de nutrientes en el suelo, promover el crecimiento vegetal o el biocontrol de patógenos.

En este estudio se seleccionaron cepas bacterianas aisladas del interior de trufas de la especie *Tuber melanosporum* susceptibles de tener propiedades de promoción del crecimiento vegetal mediante comparación con bibliografía existente, para posteriormente realizar un análisis *in vitro* de estas cualidades. La actividad promotora del crecimiento vegetal de las distintas cepas seleccionadas se evaluó mediante cuatro técnicas: la determinación de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, síntesis de auxinas y producción de sideróforos.

De las 27 cepas bacterianas estudiadas, tan sólo tres de ellas, pertenecientes a las especies *Variovorax soli*, *Acinetobacter rudis* y *Rhizobium pusense*, presentaron actividad multifuncional dado que reunieron más de una característica o capacidad promotora del crecimiento vegetal, aunque ninguna de ellas juntó las cuatro capacidades investigadas. Para establecer su uso potencial como biofertilizantes, serían necesarias pruebas posteriores para definir la formulación de los bioinoculantes, la capacidad de producción de biomasa o estudios *in vivo* de dichas capacidades en fase de vivero y en fase de campo.

ABSTRACT

Modern agriculture, based on intensive farming systems and the abuse of chemical substances, generates serious environmental damages. To reverse this situation, it is necessary to implement sustainable agricultural models, using techniques that respect the ecosystems. An alternative tool to the use of agrochemicals are biofertilizers, microorganisms that provide different benefits to crops, such as increasing the bioavailability of nutrients in the soil, promoting plant growth or biocontrol of pathogens.

In this study, bacterial strains isolated from the inside of *Tuber melanosporum* truffles species susceptible to have plant growth-promoting properties were selected by comparison with existing scientific literature, to subsequently carry out an *in vitro* analysis of these qualities. The plant growth-promoting activity of the different strains selected was evaluated using four techniques: determination of nitrogen fixation, phosphate solubilization, auxin synthesis and siderophore production.

Just 3 of the 27 bacterial strains studied, belonging to the species *Variovorax soli*, *Acinetobacter rudis* and *Rhizobium pusense*, showed multifunctional activity since they had more than one characteristic or plant growth promoting capacity, although none of them combined the four capacities studied in this work. Further tests would be necessary to establish their potential use as biofertilizers, as defining the bioinoculants formulation, determining the biomass production capacity or carrying *in vivo* studies in the nursery and in the field of these capacities.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Situación actual de la agricultura

La revolución verde iniciada en el siglo XX trajo consigo un aumento de la producción de alimentos gracias a sistemas de explotación intensivos y al uso de novedosas técnicas como la aplicación de fertilizantes químicos y fitosanitarios, y la selección de variedades derivando en la pérdida de diversidad en favor del monocultivo (Scattareggia, 2016; Backer *et al.*, 2018). Sin embargo, el abuso de estos productos químicos ha dado lugar a daños medioambientales como la contaminación de los suelos y acuíferos subterráneos, el desequilibrio de la microbiota nativa, la aparición de resistencias en los patógenos y otras modificaciones de los ecosistemas (Porcel Rodríguez, 2017). Por todo ello, se ha hecho patente la necesidad de una nueva revolución verde que conlleve un menor impacto medioambiental, y la búsqueda de nuevas herramientas para una producción sostenible.

Esta premisa está relacionada con el Pacto Verde Europeo, la estrategia del Campo a la Mesa, y los Objetivos de Desarrollo Sostenible, que son una serie de propuestas integradas en distintas áreas cuyo propósito es poner fin a la pobreza y asegurar la alimentación, proteger el planeta, y garantizar que todas las personas gocen de paz y prosperidad con el horizonte puesto en el año 2030. Dentro de estos objetivos, podemos encontrarnos con distintas propuestas para garantizar la salud de las personas y los ecosistemas, conservar los recursos naturales, luchar contra el cambio climático, invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.

Una posible alternativa para obtener mayores rendimientos de cultivo empleando menor cantidad de agroquímicos es el uso de biofertilizantes. Se trata de microorganismos que aportan distintos beneficios a los cultivos como aumentar la biodisponibilidad de distintos elementos básicos contribuyendo a su nutrición y restaurando así la dinámica de suelos deteriorados por la explotación intensiva (Guzmán *et al.*, 2012; Scattareggia, 2016). A su vez, también pueden actuar sintetizando reguladores que promueven el crecimiento vegetal o inhiben el desarrollo de patógenos vegetales (Porcel Rodríguez, 2017). El uso de estas bacterias aumenta el rendimiento de los cultivos y consigue una disminución, e incluso la sustitución, del uso de fertilizantes químicos (León Mendoza, 2014; Benjumeda Muñoz, 2017). Además, es una tecnología sostenible que está ganando interés globalmente ya que es aplicable en agricultura orgánica y ecológica, y cuenta con una buena aceptación entre los consumidores (Vasseur-Coronado *et al.*, 2021). Por otra parte, además del uso agrario, también pueden tener aplicaciones a nivel medioambiental, dado que algunos microorganismos tienen la capacidad para descontaminar suelos de metales pesados y otros contaminantes, gracias a un proceso que se conoce como biorremediación (Benjumeda Muñoz, 2017).

2.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Parte de los microorganismos empleados como biofertilizantes han sido aislados de la rizosfera, que es como se conoce al volumen de suelo donde se desarrollan las raíces de las plantas y existe presencia de los nutrientes exudados por éstas. La rizodeposición (Brescia *et al.*, 2020), nombre que se le da a la liberación de estos compuestos radiculares (entre los que se encuentran azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos), tiene una influencia directa sobre las poblaciones microbianas, cuyas concentraciones llegan a ser superiores a 10^9 UFC/g de peso seco de suelo (Benjumeda Muñoz, 2017). A estos microorganismos se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Entre estas bacterias se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Rhizobium*, entre otros (Navarro-Ródenas *et al.*, 2016). Los mecanismos que tienen estas bacterias para la promoción del crecimiento vegetal pueden clasificarse en directos e indirectos (Figura 1).

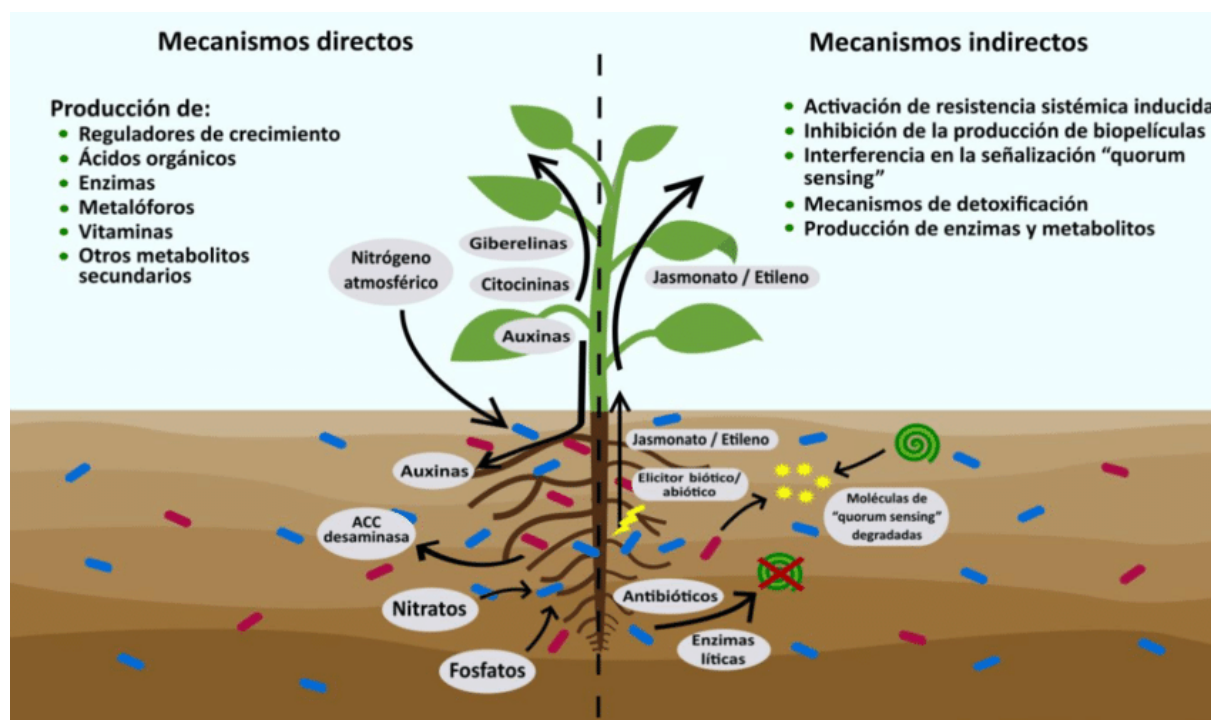


Figura 1. Funciones que desempeñan las PGPR en la rizosfera (Chávez-Díaz, I.F. *et al.*, 2020).

2.2.1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal directos

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal directos incluyen el aumento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas, como pueden ser nitrógeno, fósforo y hierro; y la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, como lo son las auxinas, giberelinas y citoquininas. A continuación se desarrollan algunos de ellos.

Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para los vegetales, ya que forma parte de moléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos, entre muchas otras. A su vez, es un elemento limitante en su desarrollo, dado que tan solo un pequeño porcentaje del nitrógeno del suelo se encuentra biodisponible para las plantas (Taulé, 2011). La principal fuente de este nutriente en el suelo es la materia orgánica que es oxidada por los microorganismos para liberarlo. Sin embargo, en suelos deficientes en materia orgánica, es necesario encontrar una alternativa (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009). Se puede añadir en forma de fertilizantes nitrogenados, pero en este caso el cultivo no aprovecha todo el aporte y la parte sobrante acaba siendo transportada hacia acuíferos causando problemas de eutrofización (Taulé, 2011). Por tanto, el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno puede ser una alternativa respetuosa con el medio ambiente (Park *et al.*, 2005).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es el proceso mediante el cual los microorganismos diazótrofos convierten el nitrógeno atmosférico (componente mayoritario de la atmósfera) en amonio, el cual es asimilable por las plantas. La FBN la lleva a cabo la enzima nitrogenasa, que es capaz de reducir el N_2 en NH_3 (Taulé, 2011). Dentro de los microorganismos diazótrofos podemos encontrar dos categorías: bacterias simbióticas, como las que se encuentran en los nódulos de las leguminosas; y fijadoras de nitrógeno de vida libre (Benjumeda Muñoz, 2017).

Solubilización de fosfatos

El fósforo es, después del nitrógeno, el nutriente más importante para el correcto metabolismo de las plantas. Forma parte de moléculas como los ácidos nucleicos, además de los fosfolípidos de las membranas celulares y del ATP, involucrado en el transporte y almacenamiento de energía (Sánchez López *et al.*, 2012; Scattareggia, 2016). Es un elemento ampliamente distribuido en el suelo del que sólo una pequeña proporción está biodisponible para las plantas, ya que se encuentra inmovilizado. Las plantas pueden absorberlo en dos formas iónicas solubles ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}) (Benjumeda Muñoz, 2017), pero de normal se encuentra en forma de fosfatos ligado a distintos elementos como calcio, hierro o aluminio. Además, cuando es aplicado en forma de fertilizante puede pasar a su forma inmovilizada fácilmente (Tejera-Hernández *et al.*, 2013).

Dentro de las PGPR, existe un grupo de bacterias capaces de solubilizar el fosfato inorgánico gracias a distintos mecanismos. El más importante es la liberación de ácidos orgánicos, como el glucónico, cítrico y oxálico, que son sintetizados a partir del metabolismo de compuestos con carbono procedentes de los exudados radiculares o de la materia orgánica del suelo (Benjumeda Muñoz, 2017). Estos ácidos provocan que descienda el pH del medio, además de formar complejos insolubles con los iones

metálicos que forman los fosfatos, haciendo que el fósforo quede disponible (Scattareggia, 2016). De igual manera que ocurre con la liberación de ácidos orgánicos, los procesos de respiración celular y la asimilación de NH_4^+ generan una alta concentración de protones, por lo que se acidifica el medio y se libera el fosfato inmovilizado (Pérez Portuondo *et al.*, 2017). Otro de los mecanismos por los que una bacteria puede movilizar grupos fosfato es mediante la producción de sideróforos, los cuales pueden llegar a actuar sobre fosfatos de hierro, produciendo un aumento en la disponibilidad de dos elementos indispensables para el desarrollo de los vegetales (Scattareggia, 2016). Por último, ciertas bacterias son capaces de sintetizar unas enzimas llamadas fosfatasas hidrolizando el fósforo presente en la materia orgánica del suelo (Benjumeda Muñoz, 2017).

Regulación del crecimiento vegetal y síntesis de auxinas

Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos orgánicos producidos por las plantas que en bajas concentraciones intervienen en multitud de procesos fisiológicos, como la división y diferenciación celular, la elongación del tallo y raíces, el desarrollo de frutos, los tropismos, la dormancia y germinación de semillas o la abscisión de hojas, entre otros (Celis Bautista y Gallardo Echeverri, 2008). En agricultura se emplean estas moléculas obtenidas por síntesis química, pero dentro del marco de la agricultura ecológica se ha investigado el uso de microorganismos capaces de sintetizarlas (Venner Rodríguez y Martín Hernández, 2009). Los reguladores del crecimiento vegetal más importantes son las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, brasinoesteroides y los ácidos abscísico y jasmónico, y los efectos de todos ellos pueden variar según las interacciones que tengan entre sí (Celis Bautista y Gallardo Echeverri, 2008).

Las auxinas pertenecen al grupo de inductores del crecimiento vegetal, y están estrechamente relacionados con el desarrollo de las raíces (Venner Rodríguez y Martín Hernández, 2009). Dentro de este grupo de compuestos, el más importante es el ácido indol-3-acético o IAA (del inglés, *indole-3-acetic acid*), el cual puede ser sintetizado por distintos microorganismos a partir del triptófano. El IAA secretado por estas bacterias se suma al sintetizado por la propia planta, contribuyendo a la regulación de procesos como la elongación, división y diferenciación celular, así como al desarrollo de las raíces, aumentando en número y tamaño los pelos absorbentes e inhibiendo el crecimiento de brotes laterales, manteniendo así la dominancia apical (Celis Bautista y Gallardo Echeverri, 2008). De esta forma, se consigue que la planta aumente la captación de agua y nutrientes, y por lo tanto la promoción del crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Lara, Oviedo y Alemán, 2011). Al mismo tiempo, se produce un aumento en la cantidad de exudados radiculares que pueden ser empleados por los microorganismos en su metabolismo, lo que significa que existe un beneficio mutuo en la interacción

entre bacteria y planta (Schoebitz Cid, 2006). Por otra parte, las auxinas también intervienen en la dormancia y germinación de las semillas y en los tropismos, ayudando a que las raíces se establezcan en un menor tiempo y al anclaje de la planta al sustrato (Venner Rodríguez y Martin Hernández, 2009).

En los vegetales, la concentración de auxinas se encuentra entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Celis Bautista y Gallardo Echeverri, 2008). Si una bacteria secreta bajos niveles de IAA se producirán los efectos beneficiosos de desarrollo de las raíces, mientras que si como resultado de la suma de las auxinas sintetizadas por los microorganismos y las endógenas que produce la planta se da un gran aumento de la concentración, se inducirá la síntesis de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Este compuesto es un precursor del etileno, cuyo efecto inhibiría la elongación de las raíces y favorecería la formación de raíces laterales, anulando la promoción causada por el IAA (Venner Rodríguez y Martin Hernández, 2009).

2.2.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal indirectos

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal indirectos se basan en la inhibición del desarrollo de patógenos de las plantas, mediante la competencia por espacio y nutrientes (Taulé, 2011), la producción de sideróforos, antibióticos, cianuro (Navarro-Ródenas *et al.*, 2016) o enzimas hidrolíticas que actúan sobre la pared celular de hongos (Venner Rodríguez y Martin Hernández, 2009). Por otra parte, se pueden emplear estas bacterias para estimular las defensas de las plantas, ya que son capaces de inducir una resistencia sistémica contra una amplia gama de agentes causales. De esta forma se genera una resistencia que perdura en el tiempo pero que no es capaz por si sola de controlar la enfermedad (Cano, 2011). Si se emplean inóculos de microorganismos para aprovechar su capacidad de promoción indirecta, estaremos hablando de agentes de biocontrol.

Producción de sideróforos

El hierro es otro nutriente imprescindible para los vegetales, ya que está involucrado en procesos como la respiración y la fotosíntesis (Benjumeda Muñoz, 2017). En los suelos está presente en forma de óxidos e hidróxidos, que son compuestos insolubles dentro de un rango de pH biológico, por lo que no puede ser utilizado por plantas y microorganismos (Schwyn y Neilands, 1987). Como respuesta al estrés causado por concentraciones limitantes de hierro (Venner Rodríguez y Martin Hernández, 2009), diversos microorganismos han desarrollado la capacidad de producir sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular con una alta afinidad por el hierro (Milagres, Machuca y Napoleão, 1999). Gracias a la secreción de estas moléculas al medio, los microorganismos pueden unir iones

férricos de manera reversible y ponerlos biodisponibles para ser utilizados por las plantas (Gupta y Gopal, 2008). Además, debido a la limitada biodisponibilidad del hierro en los suelos, los sideróforos aportan una ventaja competitiva a los microorganismos capaces de sintetizarlos, y teniendo en cuenta que los sideróforos producidos por bacterias tienen por lo general una mayor afinidad al hierro que los producidos por hongos, pueden ayudar al biocontrol de patógenos (Venner Rodríguez y Martín Hernández, 2009). Dependiendo de la naturaleza química de sus grupos funcionales que le permiten captar los iones férricos, pueden dividirse en catecolatos, hidroxamatos y carboxilatos (Pérez-Miranda *et al.*, 2007; Loudon, Haarmann y Lynne, 2011).

2.3. La rizosfera y las interacciones planta-microorganismo

Los microorganismos del suelo tienen diversos efectos positivos sobre las plantas, como el aumento de la tolerancia al estrés biótico y abiótico, la mejora del rendimiento productivo de los cultivos, el aumento de la biodisponibilidad de nutrientes o la remediación del suelo. La expresión de estos factores está regulada por la comunicación entre estos microorganismos entre sí y con las plantas, lo que se conoce como *quorum sensing* (Cano, 2011). Esta comunicación se da a través de la secreción de distintos metabolitos y exudados por parte de los distintos organismos que habitan la rizosfera. Los exudados de las plantas incluyen compuestos basados en el carbono, como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y otras moléculas de mayor tamaño como es el caso de los mucílagos. Como estas sustancias pueden ser fácilmente empleadas por los microorganismos para su nutrición, las plantas son capaces de seleccionar activamente comunidades beneficiosas para su desarrollo. Al mecanismo que emplean los microorganismos para reconocer los exudados radiculares se le conoce como quimiotaxis (Schoebitz Cid, 2006). Esto se ha podido comprobar añadiendo exudados radiculares o sintéticos a diferentes medios de cultivo, en los que se observó una modificación en la composición de la microbiota del suelo (Brescia *et al.*, 2020).

Las interacciones que se dan entre las plantas, los microorganismos y el ambiente de la rizosfera son muy complejas, por lo que no es posible su comprensión total. Sin embargo, se pueden evaluar los efectos promotores del crecimiento vegetal generados por estos microorganismos para describir mecanismos globales de esta interacción (Cano, 2011).

Las PGPR pueden estar ubicadas en distintos niveles dentro del suelo: pueden encontrarse en la rizosfera (lo que podría llamarse bacterias de vida libre), invadiendo los tejidos de la planta (bacterias endófitas) o en simbiosis con la planta (como en el caso de los nódulos de las leguminosas). Esto muestra que hay distintos grados de interacción entre las plantas y los microorganismos. Una mayor

cercanía entre ambos significa una complejidad superior de la relación, y una posible evolución conjunta (Taulé, 2011).

2.3.1. Bacterias endófitas

Las bacterias endófitas se definen como bacterias que son capaces de penetrar en el interior de las plantas sin causar ningún daño aparente en las mismas. La colonización de este nicho supone un mayor aporte de nutrientes y una protección frente a distintas fuentes de estrés. Por otra parte, la planta obtiene efectos de promoción del crecimiento de una forma más directa, por lo que se piensa que puede existir una selección activa de entre las bacterias rizosféricas. Además, al competir con los patógenos por la colonización de las raíces, podrían ser empleados como agentes de biocontrol (Taulé, 2011).

Para que una bacteria llegue a colonizar las raíces de un vegetal, se deben dar una serie de procesos, como el reconocimiento de señales moleculares (quimiotaxis), el desplazamiento por el medio hasta llegar a las raíces, la adhesión a su superficie y la penetración y multiplicación en su interior.

La forma de alcanzar la superficie de la planta puede ser pasiva, si el microorganismo ya se encuentra adherido a la semilla o al material de propagación vegetativa (Taulé, 2011), o de forma activa, mediante distintos mecanismos. Si el ambiente es líquido, la bacteria se moverá gracias a flagelos. Esta movilidad se puede observar en medios de cultivo con un 0.3% de agar. Si el medio es sólido, la bacteria deberá llegar a la superficie radicular, y para ello se valdrá de estructuras como flagelos, pili de tipo IV o complejos de adhesión focal o la producción de agentes surfactantes (Amaya-Gómez *et al.*, 2020). Para estudiar esta forma de movimiento es necesario un medio que supla las necesidades nutricionales de las bacterias, además de concentraciones de agar entre 0.5 y 0.8%.

Una vez ha llegado la bacteria a la superficie de la raíz debe adherirse a ella. Para esto, utiliza estructuras como fimbrias y pili, además de la formación de biofilms: se recubren de capas de exopolisacáridos que actúan de barrera frente a factores de estrés ambiental, como los antimicrobianos y la desecación, permitiendo la persistencia de una alta densidad de población (Schoebitz Cid, 2006). Así mismo, facilitan el intercambio de nutrientes y señales entre microorganismos y planta.

Por otra parte, en el inicio de una interacción entre una planta y un microorganismo, ya sea beneficioso o patógeno, se produce la inducción de una respuesta sistémica, que desencadena una serie de defensas químicas por parte del vegetal, como la liberación de moléculas reactivas de oxígeno. Para

hacer frente a estas moléculas, las bacterias deben contar con sistemas de protección como enzimas antioxidantes (catalasa) o la capacidad de formar biofilms (Amaya-Gómez *et al.*, 2020).

Para la colonización, las bacterias buscan sitios de potencial ingreso a la raíz, como son las áreas de elongación radicular y las bases de los pelos absorbentes (Schoebitz Cid, 2006), así como heridas producidas por distintos agentes causales. También se han podido observar ciertos microorganismos capaces de secretar enzimas celulolíticas y pectinolíticas usadas para penetrar en la planta (Taulé, 2011). El hábitat final de las bacterias con capacidad de colonizar las raíces es el espacio intercelular de los tejidos.

2.4. Hongos formadores de micorrizas arbusculares

Otro de los organismos que se puede encontrar en la rizosfera formando asociaciones con las plantas son los hongos formadores de micorrizas arbusculares o AMF (del inglés, *Arbuscular Mycorrhizal Fungi*). Entre los beneficios que tienen estos hongos sobre las plantas se encuentran el incremento en la absorción de agua y nutrientes, así como en el desarrollo de los pelos radiculares, la solubilización de minerales y la protección frente al estrés por factores ambientales y frente a patógenos (Cano, 2011). Además, estos AMF son capaces de modificar la composición de los exudados radiculares, alterando las poblaciones de microorganismos y generando una micorrizosfera. Según distintas investigaciones, esto se traduce en una disminución en el número de especies y número total de bacterias (Welc *et al.*, 2010).

No obstante, también se han encontrado rizobacterias asociadas a esporas de AMF. Estas bacterias tienen un carácter multifuncional, ya que son capaces de facilitar la asociación entre los hongos y las plantas, promover el crecimiento vegetal y actuar como agentes de biocontrol (Cano, 2011). Pese a la extensa bibliografía sobre PGPR, existen pocos trabajos en los que se estudie su asociación con hongos formadores de micorrizas.

Según las investigaciones de Navarro-Ródenas *et al.* (2016), se descubrió que las bacterias asociadas a la rizosfera de la planta *Helianthemum almeriense* colonizada por una especie del género *Terfezia*, trufas del desierto, eran capaces de mejorar el ratio de supervivencia de las plántulas, así como de aumentar en etapas posteriores el crecimiento de las raíces y el porcentaje de micorrización. Postularon que no se podían relacionar estos efectos con un solo mecanismo de promoción del crecimiento vegetal, sino más bien con una combinación de estos. También comentan la posible relación entre las auxinas sintetizadas por las PGPR y la producción de micorrizas, que, según lo descrito por Roth-Bejerano, Navarro-Ródenas y Gutiérrez (2014), ocurren cuando se combinan altos

niveles de auxinas fúngicas con el aumento en la sensibilidad de las raíces a las auxinas por concentraciones bajas de fosfato. Finalmente, descubrieron una bacteria del género *Pseudomonas* que no promovía el crecimiento vegetal, pero sí mejoró la colonización por parte de las micorrizas. A las bacterias con esta capacidad se les conoce como MHB (del inglés, *Mycorrhizal Helper Bacteria*).

2.4.1. *Tuber melanosporum*

La trufa negra es el cuerpo fructífero de la especie de hongo micorrícico *Tuber melanosporum*. Se trata de un alimento muy apreciado gastronómicamente en todo el mundo por su intenso y reconocible aroma. Es esta cualidad la que le aporta un elevado valor económico, el cual ronda los 400-1200 €/kg. Este hongo se puede encontrar formando asociaciones simbióticas con especies de árboles del género *Quercus*, como el roble pubescente (*Q. pubescens*) o la encina (*Q. ilex*), o con el avellano (*Corylus avellana*).

En los últimos años se ha observado un descenso en la producción de trufas procedentes de truferas silvestres, como consecuencia de diversos factores que provocan su deterioro. Entre estos factores se encuentran la sobreexplotación, la mecanización y las sequías durante los meses de verano (Reyna, 2000). Por otra parte, en la actualidad el interés por las trufas está creciendo debido a aspectos como su valor económico y a que contribuye a fijar la población en el medio rural, haciendo frente a la despoblación.

El cuerpo fructífero de *T. Melanosporum* es de aspecto globoso y se divide en dos partes. El peridio es la parte exterior, que en estado inmaduro es de color rojizo y torna a negro al alcanzar la madurez. La gleba, la parte interna, cuenta con venas estériles de color blanco, sobre un fondo de tonalidades claras en estado inmaduro que se oscurecen con la maduración, desarrollando un color negro violáceo.

Se ha observado que la carga microbiana en el exterior de la trufa es muy superior a la de su interior, teniendo el peridio poblaciones que pueden llegar a 10^9 UFC/g, mientras que la gleba cuenta con solo de 10^1 a 10^3 UFC/g. Esta diferencia puede estar justificada por la estructura estriada del peridio, la cual facilita la colonización por parte de los microorganismos (Rivera *et al.*, 2010). Por otra parte, se encontró que los grupos microbianos más abundantes en la micorrizosfera de estos hongos son el género *Pseudomonas*, la familia *Enterobacteriaceae* y la micobiota. Estos microorganismos son capaces de interaccionar con las trufas, mejorando su desarrollo gracias al aumento de la biodisponibilidad de nutrientes. Es por ello que estos microorganismos tienen un papel importante en la formación de micorrizas, el desarrollo de los cuerpos fructíferos y en la etapa madurativa, donde termina de evolucionar el perfil aromático de la trufa.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es determinar la capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) *in vitro* de una colección de cepas bacterianas aisladas de glebas de diversos carpóforos de *Tuber melanosporum*.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales (Figura 2):

1. Selección de aquellas cepas que, por comparación con la bibliografía científica, pudieran tener capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR). Se utilizó para ello un banco de 108 cepas identificadas por PCR y aisladas del interior o gleba de carpóforos de trufa negra (*T. melanosporum*) por Andrés (2017) en un trabajo precedente (TFM).
2. Puesta a punto de las técnicas precisas para valorar la capacidad PGPR: fijación biológica del nitrógeno, solubilización de los fosfatos, síntesis de auxinas y producción de sideróforos.
3. Aplicar dichas técnicas para determinar cuáles de las especies bacterianas seleccionadas tienen realmente capacidad PGPR.



Figura 2. Representación gráfica de los objetivos parciales. Creada con BioRender.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA

4.1. Selección y manejo de cepas microbianas

Para la elaboración de este trabajo se utilizó la colección de cepas, compuesta por 108 referencias, recopilada por Andrés (2017) en su Trabajo de Fin de Máster “Caracterización de la microbiota asociada al ciclo biológico de la trufa negra e influencia sobre el desarrollo vegetativo y la fructificación”. Estas bacterias fueron aisladas de la gleba de trufas sanas de la especie *Tuber melanosporum*, y se mantuvieron conservadas en crioviales Cryoinstant (Deltalab, España) a -80°C.

La selección de cepas para los ensayos PGPR se realizó mediante revisión de la literatura existente, comparando las cepas de la colección con otros estudios de actividad PGPR que hiciesen referencia a los géneros y especies de este trabajo. Para la búsqueda de esta información se emplearon distintos portales científicos como ScienceDirect, ResearchGate o Google Scholar, introduciendo en los campos de búsqueda el género o la especie aislada acompañada de los términos “PGPR”, “rhizobacteria” o “biofertilizer”.

Las cepas seleccionadas se descongelaron en condiciones de refrigeración y se inocularon en tubos que contenían 5 mL de medio líquido TSB (Caldo Tripticasa Soja) (VWR Chemicals, EEUU). A continuación, se incubaron a 26°C hasta la presencia de turbidez, indicador de crecimiento microbiano. Las cepas que no presentaron turbidez se inocularon de nuevo en tubos con medio TSB suplementado con extracto de levadura (Labkem, España) o en tubos con caldo *Rhizobium* (Anexo I). Posteriormente, para comprobar la pureza de los aislamientos y poder trabajar con ellas en las pruebas de determinación de promoción del crecimiento vegetal, las bacterias se inocularon en placas con agar TSA (Agar Tripticasa Soja) (VWR Chemicals, EEUU) mediante la técnica de siembra en superficie por agotamiento. Para aquellas bacterias que no fueron capaces de desarrollar turbidez en el primer medio líquido se realizó una siembra en placas con agar TSA y agar *Rhizobium* a partir de los nuevos medios líquidos.

4.2. Determinación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal

Se evaluó la capacidad PGPR de las cepas seleccionadas en base a distintos ensayos *in vitro*; para ello se determinó la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la síntesis de auxinas y la producción de sideróforos.

4.2.1. Fijación biológica de nitrógeno

Para evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno de las distintas cepas microbianas, se realizó una siembra por agotamiento y en estría de las distintas cepas en placas con medio libre de nitrógeno, con

azul de bromotimol como indicador del cambio de pH (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009) (Anexo I). Las placas se incubaron a 26°C durante 7 días. Solo las bacterias que producen la enzima nitrogenasa y son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en forma de amonio producen un cambio de color de amarillo a azul (Pérez Portuondo *et al.*, 2017).

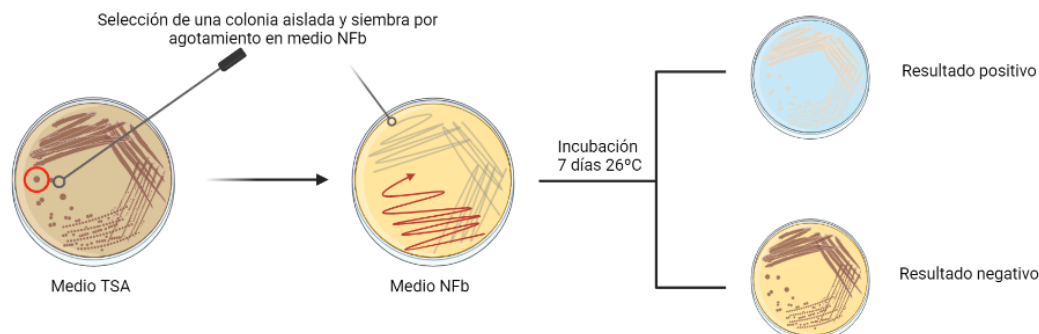


Figura 3. Protocolo para el ensayo de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno. Creada con BioRender.

4.2.2. Solubilización de fosfatos

Para evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos de las distintas cepas microbianas, se realizó una siembra por agotamiento y en estría de las distintas cepas en placas con medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) (Pérez Portuondo *et al.*, 2017) (Anexo I), el cual contiene una forma insoluble de fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Las placas se incubaron a 26°C durante 12 días. Una cepa se consideró capaz de solubilizar los fosfatos por la aparición de un halo translúcido alrededor de la colonia. Por otra parte, se repitió el ensayo con las mismas condiciones, pero añadiendo azul de bromofenol para favorecer la visualización de este halo y la positividad del mismo (Tejera-Hernández, Heydrich-Pérez y Rojas-Badía, 2013).

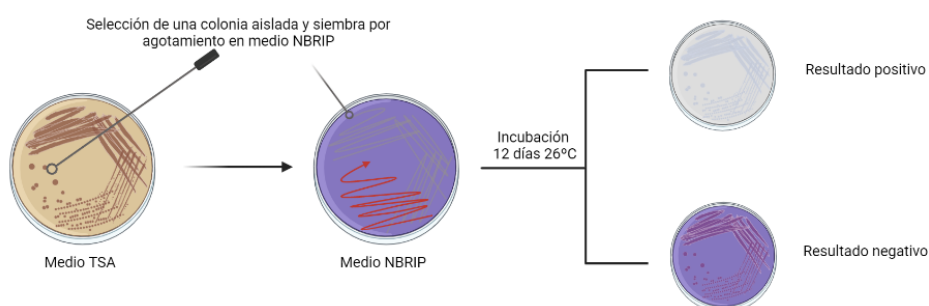


Figura 4. Protocolo para el ensayo de la capacidad de solubilización de fosfatos. Creada con BioRender.

4.2.3. Síntesis de auxinas

La determinación de síntesis de auxinas por parte de microorganismos se basa en un ensayo colorimétrico con el reactivo de Salkowski, el cual produce la oxidación de compuestos indólicos gracias a sales férricas (Lara, Oviedo y Alemán, 2011). Como las auxinas solo producen efectos

promotores del crecimiento cuando actúan en bajas concentraciones, se empleó una formulación del reactivo más sensible, permitiendo detectar concentraciones de IAA entre 0.3 y 20 $\mu\text{g/L}$ (Glickmann y Dessaux, 1995) (Anexo I). Para evaluar la producción de auxinas, se inocularon las distintas cepas de bacterias en tubos Falcon que contenían medio mínimo de sales DF (Dworkin y Foster, 1958) suplementado con triptófano (Anexo I). Los microorganismos se incubaron a 26°C durante 4 días, tras este periodo de tiempo los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se mezcló 1 mL del sobrenadante con 1 mL del reactivo de Salkowski, y se incubaron las muestras en oscuridad durante 30 minutos. Los resultados positivos se muestran por la aparición de una coloración en el medio que va de rosa a fucsia, según la concentración de IAA presente (Glickmann y Dessaux, 1995).

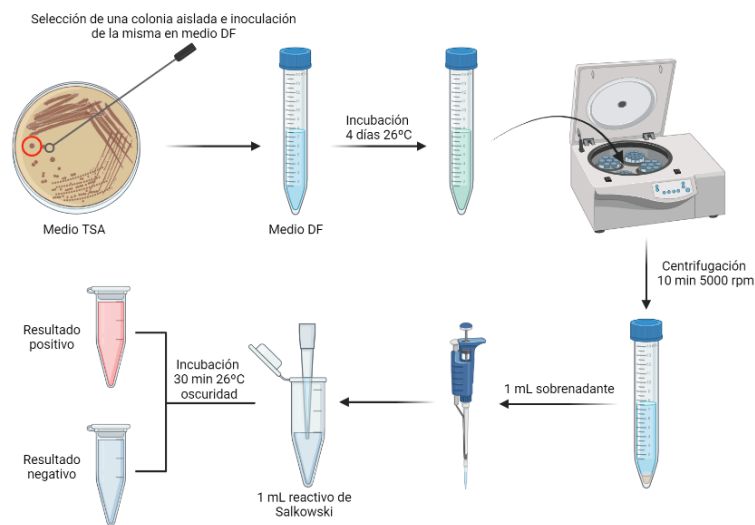


Figura 5. Protocolo para el ensayo de la capacidad de síntesis de auxinas. Creada con BioRender.

4.2.4. Producción de sideróforos

El método más empleado para la determinación de producción de sideróforos es el propuesto por Schwyn y Neilands (1987), que utiliza como indicadores cromo azurol S (CAS) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA). Estos forman un complejo con el ión férrico de color azul, pero en presencia de compuestos de mayor afinidad por el hierro, como es el caso de los sideróforos, libera el hierro del complejo anterior originando un cambio de color a amarillo. Sin embargo, el compuesto HDTMA empleado en el ensayo puede ser tóxico para ciertos microorganismos, como bacterias gram positivas y hongos, por lo que se buscó otra alternativa, como el ensayo O-CAS (del inglés *overlaid CAS*) (Milagres, Machuca y Napoleão, 1999; Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

Para ello, se realizó una siembra por agotamiento y en estría en los medios de cultivo más apropiados para cada microorganismo, en este caso en placas de TSA (VWR Chemicals, EEUU), o en placas de agar

Rhizobium aquellos microorganismos que no crecieron en este medio. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 a 72 horas y posteriormente se extendió sobre estas una capa de agar CAS (Anexo I). Al contrario que en el método original, el medio se elaboró con ausencia de nutrientes, ya que solo se emplea para mostrar el posible cambio de color. Además, se trabajó con una concentración baja de agar (0.9%) para facilitar la difusión de los sideróforos y acortar el tiempo necesario para la visualización de los resultados, permitiendo observar la positividad del ensayo en 24 horas.

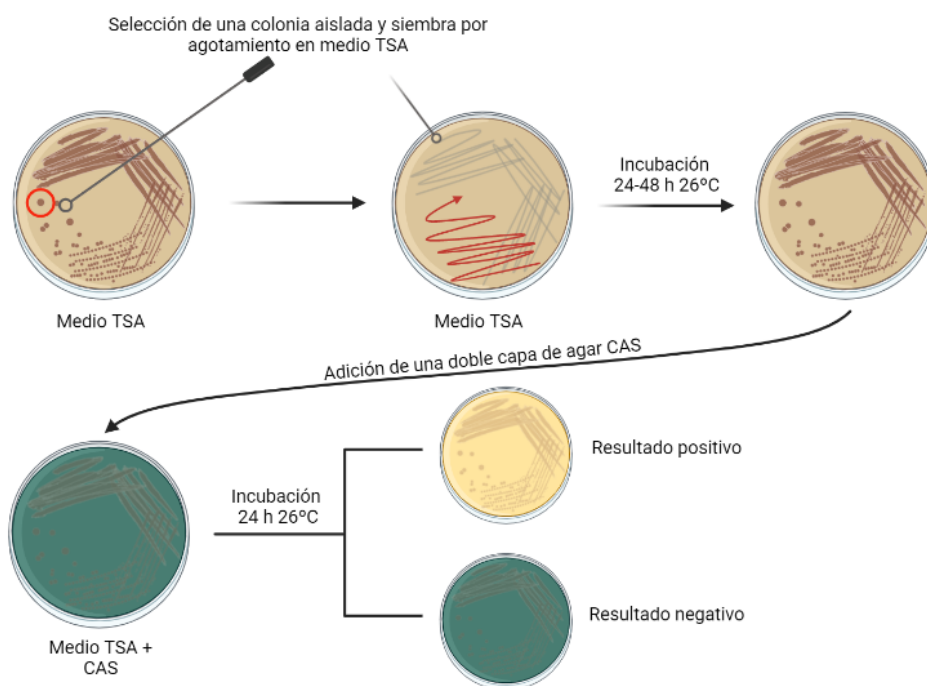


Figura 6. Protocolo para el ensayo de la capacidad de síntesis de auxinas. Creada con BioRender.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Selección y manejo de las cepas microbianas

Utilizando la información obtenida en la búsqueda bibliográfica sobre la capacidad PGPR de las bacterias aisladas, se seleccionaron un total de 27 cepas microbianas, las cuales pertenecían a 18 especies diferentes englobadas en 10 géneros (Tabla 1). Aunque como se discutirá más adelante con los resultados publicados por otros autores que han detectado actividad PGPR tanto en bacterias Gram + como en Gram -, cabe destacar que en este trabajo 19 de las cepas seleccionadas son Gram +, y tan sólo 8 Gram -. Algunas de las cepas aisladas se presentan en la Figura 7.

| Bacterias Gram + | | Bacterias Gram - | |
|---------------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|
| Especie bacteriana | Cod. Cepa | Especie bacteriana | Cod. Cepa |
| <i>Arthrobacter oxydans</i> | 1A | <i>Acinetobacter rudis</i> | 5C |
| <i>Bacillus circulans</i> | 6A, 7C | <i>Cupriavidus campinensis</i> | 2I |
| <i>Bacillus toyonensis</i> | 3N | <i>Rhizobium giardinii</i> | 2E, 6W |
| <i>Brevibacterium casei</i> | 1I | <i>Rhizobium pusense</i> | 7A |
| <i>Brevibacterium frigidotolerans</i> | 6E, 7K | <i>Variovorax soli</i> | 2A, 3C, 3K |
| <i>Kocuria palustris</i> | 3V, 6O | | |
| <i>Kocuria rhizophila</i> | 3W, 7Ñ | | |
| <i>Microbacterium flavescens</i> | 6B | | |
| <i>Microbacterium imperiale</i> | 5A | | |
| <i>Microbacterium maritopicum</i> | 6U, 7D | | |
| <i>Microbacterium saccharophilum</i> | 6T | | |
| <i>Microbacterium oxydans</i> | 3J, 3M | | |
| <i>Oceanobacillus sojae</i> | 2H | | |

Tabla 1. Cepas bacterianas seleccionadas y especies a las que pertenecen, clasificadas en Gram + y Gram -.



Figura 7. Aspecto colonial en agar TSA de algunas de las especies bacterianas seleccionadas.

Durante la primera incubación en medio líquido, las cepas bacterianas 2A (*V. soli*), 3C (*V. soli*) y 6W (*R. giardinii*) no presentaron turbidez, por lo que fueron inoculadas de nuevo en los medios líquidos TSB suplementado con extracto de levadura y caldo *Rhizobium*. Posteriormente, las bacterias de los tubos que presentaron crecimiento fueron inoculadas en los medios TSA y agar *Rhizobium*. De esta manera, la cepa 2A fue capaz de crecer en todas las combinaciones posibles, la cepa 3C a partir de ambos caldos únicamente en agar TSA y la cepa 6W a partir del caldo *Rhizobium* en ambos medios.

5.2. Capacidad de promoción del crecimiento vegetal

5.2.1. Fijación biológica de nitrógeno

El análisis de la capacidad de las bacterias para fijar el nitrógeno atmosférico se realizó mediante un ensayo colorimétrico que permitió determinar semicuantitativamente esta actividad en las cepas seleccionadas. Al observar que cada cepa presentaba distintas capacidades de fijación, dependiendo del viraje de color en la placa de Petri, se decidió clasificar los resultados en tres niveles, no fijadoras (-), poco fijadoras (+) y muy fijadoras (++). Como muestran los resultados de la Tabla 2, tan solo 9 cepas de las 27 estudiadas presentaron positividad a esta prueba, y por tanto considerarse como bacterias fijadoras de nitrógeno. Esto supone un 33% de positivos en el total de los microorganismos aislados.

| Código | Especie bacteriana | Ensayo | Código | Especie bacteriana | Ensayo |
|--------|-------------------------|--------|--------|--------------------------|--------|
| 5C | <i>A. rudis</i> | ++ | 5A | <i>M. imperiale</i> | - |
| 1A | <i>A. oxydans</i> | - | 6U | <i>M. maritypicum</i> | - |
| 6A | <i>B. circulans</i> | ++ | 7D | <i>M. maritypicum</i> | - |
| 7C | <i>B. circulans</i> | - | 3J | <i>M. oxydans</i> | ++ |
| 3N | <i>B. toyonensis</i> | - | 3M | <i>M. oxydans</i> | - |
| 1I | <i>B. casei</i> | ++ | 6T | <i>M. saccharophilum</i> | + |
| 6E | <i>B. frigotolerans</i> | + | 2H | <i>O. sojæ</i> | - |
| 7K | <i>B. frigotolerans</i> | - | 2E | <i>R. giardinii</i> | - |
| 2I | <i>C. campinensis</i> | - | 6W | <i>R. giardinii</i> | - |
| 3V | <i>K. palustris</i> | - | 7A | <i>R. pusense</i> | - |
| 6O | <i>K. palustris</i> | - | 2A | <i>V. soli</i> | - |
| 3W | <i>K. rhizophila</i> | - | 3C | <i>V. soli</i> | ++ |
| 7Ñ | <i>K. rhizophila</i> | + | 3K | <i>V. soli</i> | + |
| 6B | <i>M. flavescens</i> | - | | | |

Tabla 2. Resultados del ensayo de fijación de nitrógeno. Las distintas cepas bacterianas se clasifican en no fijadoras (-), poco fijadoras (+) y muy fijadoras (++)

La positividad de la prueba se debe al aumento en la concentración de NH_4^+ en el medio agarado, y al consecuente viraje del indicador (azul de bromotimol) a azul por el cambio de pH (Figura 8). Las bacterias 1I (*B. casei*), 3C (*V. soli*), 3J (*M. oxydans*), 5C (*A. rudis*), y 6A (*B. circulans*) mostraron una gran

capacidad de captación de Nitrógeno atmosférico, y las cepas 3K (*V. soli*), 6E (*B. frigotolerans*), 6T (*M. saccharophilum*) y 7Ñ (*K. rhizophila*) presentaron una actividad moderada.

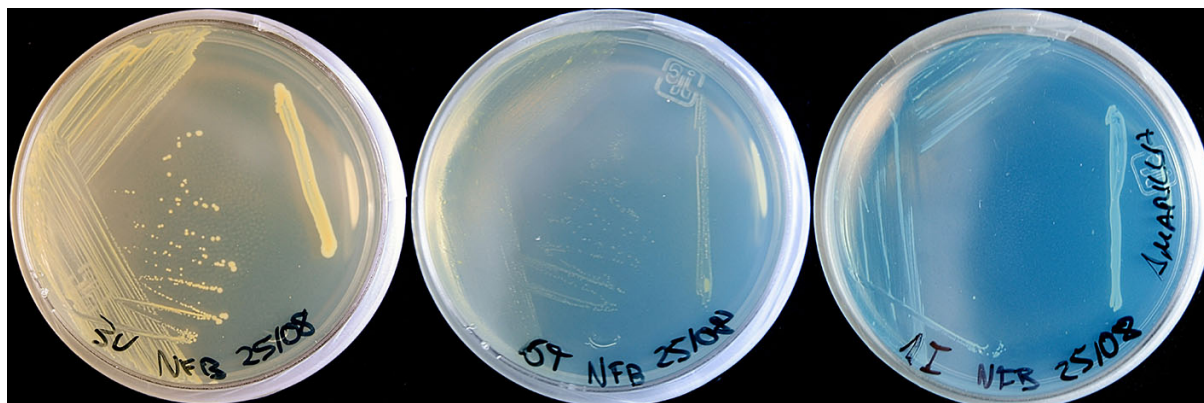


Figura 8. Resultados del ensayo de fijación de nitrógeno en medio NFb. Ejemplos de cepas bacterianas no fijadoras (3V), poco fijadoras (6T) y muy fijadoras (1I).

Estos resultados son coincidentes con los publicados por otros autores, que determinan capacidad de fijación biológica de nitrógeno en bacterias de los géneros *Acinetobacter* (cepa 5C) (Patel, Shah y Modi, 2017), *Bacillus* (cepa 6A) (Porcel Rodríguez, 2017) y *Variovorax* (cepas 3C y 3K) (Pereira, Barbosa y Castro, 2015), así como las especies *B. casei* (cepa 1I) (Ferreira *et al.*, 2021), *B. frigotolerans* (cepa 6E) (Khezzinejad, Khodakaramian y Shahryari, 2019), *K. rhizophila* (cepa 7Ñ) (Afridi *et al.*, 2021) y *M. oxydans* (cepa 3J) (Pereira, Barbosa y Castro, 2015). Por otra parte, los resultados negativos obtenidos para *O. sojae* (cepa 2H) y *K. palustris* (cepas 6O y 3V) corresponden con los obtenidos en distintas investigaciones (Sepúlveda Chavera *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2021). Un resultado negativo no indica que una bacteria no sea considerada PGPR y no pueda aportarle nitrógeno a un vegetal, puesto que también podría realizarlo mediante la ACC desaminasa, que convierte el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en NH_4^+ (Benjumeda Muñoz, 2017).

5.2.2. Solubilización de fosfatos

El ensayo de capacidad de solubilización de fosfatos se realizó por duplicado, mediante una evaluación semicuantitativa en base al tamaño y transparencia del halo de solubilización generado alrededor de la zona de crecimiento microbiano. La primera prueba se hizo sobre el medio NBRIP (Figura 9) y la segunda sobre el mismo medio añadiendo azul de bromotimol para facilitar la interpretación del resultado (Figura 10).

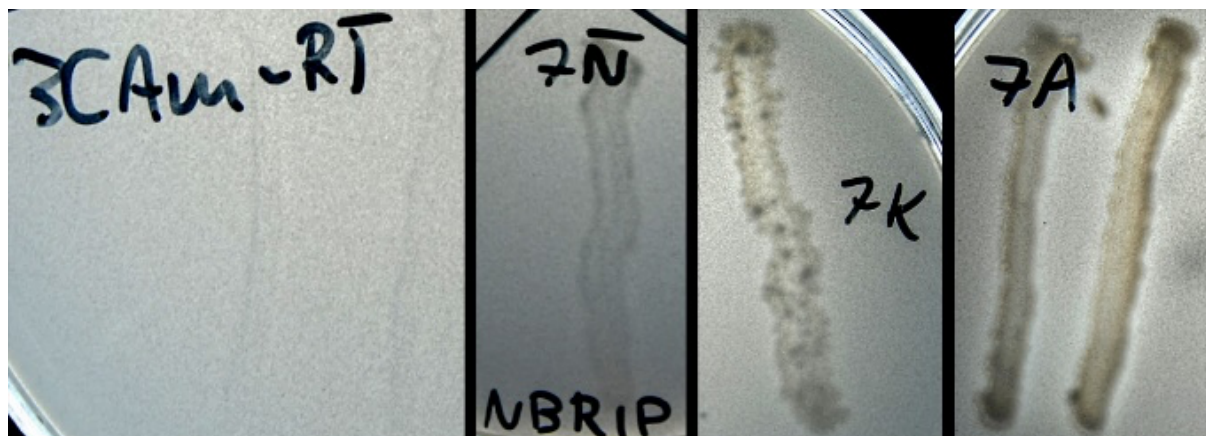


Figura 9. Resultados del ensayo de solubilización de fosfatos en medio NBRIP. Ejemplos de cepas bacterianas no solubilizadoras (3C), poco solubilizadoras (7Ñ), medianamente solubilizadoras (7K) y muy solubilizadoras (7A).

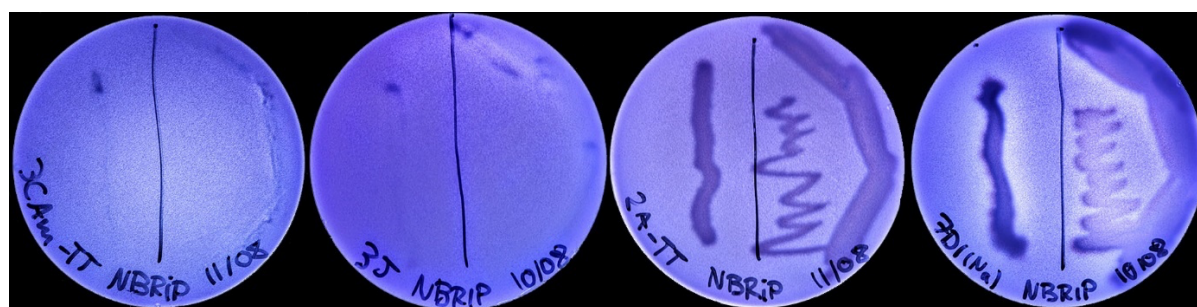


Figura 10. Resultados del ensayo de solubilización de fosfatos en medio NBRIP con azul de bromotimol. Ejemplos de cepas bacterianas no solubilizadoras (3C), poco solubilizadoras (3J), medianamente solubilizadoras (2A) y muy solubilizadoras (7D).

Los resultados de este ensayo, divididos entre los obtenidos del medio NBRIP y del medio NBRIP con azul de bromotimol añadido, se muestran en la Tabla 3. En esta determinación, 23 cepas de las 27 estudiadas se pueden considerar con capacidad de solubilización de fosfatos, lo que supone un 85% de los aislamientos estudiados. De todas ellas, las cepas 2E (*R. giardinii*), 3K (*V. soli*), 6W (*R. giardinii*), 7A (*R. pusense*) y 7D (*M. maritpicum*) mostraron una gran capacidad de solubilización de estas sales.

La diferencia en los resultados entre los dos ensayos, NBRIP y NBRIP con azul de bromotimol (NBRIP+) podría deberse a la interpretación personal ya que implica un cierto grado de subjetividad, aunque ambos resultados fueron determinados por las mismas personas, o a la cantidad de inóculo sembrada inicialmente, lo cual se podría evitar estandarizando la concentración de microorganismos empleando la escala de concentración microbiana McFarland y añadiendo un volumen fijo.

| Código | Especie bacteriana | Ensayo | | Código | Especie bacteriana | Ensayo | |
|--------|-------------------------|--------|--------|--------|--------------------------|--------|--------|
| | | NBRIP | NBRIP+ | | | NBRIP | NBRIP+ |
| 5C | <i>A. rudis</i> | + | + | 5A | <i>M. imperiale</i> | - | - |
| 1A | <i>A. oxydans</i> | + | + | 6U | <i>M. maritypicum</i> | ++ | ++ |
| 6A | <i>B. circulans</i> | ++ | - | 7D | <i>M. maritypicum</i> | + | +++ |
| 7C | <i>B. circulans</i> | - | - | 3J | <i>M. oxydans</i> | + | + |
| 3N | <i>B. toyonensis</i> | ++ | ++ | 3M | <i>M. oxydans</i> | + | + |
| 1I | <i>B. casei</i> | ++ | + | 6T | <i>M. saccharophilum</i> | + | + |
| 6E | <i>B. frigotolerans</i> | + | ++ | 2H | <i>O. sojae</i> | ++ | ++ |
| 7K | <i>B. frigotolerans</i> | ++ | + | 2E | <i>R. giardinii</i> | ++ | +++ |
| 2I | <i>C. campinensis</i> | - | - | 6W | <i>R. giardinii</i> | ++ | +++ |
| 3V | <i>K. palustris</i> | + | + | 7A | <i>R. pusense</i> | +++ | +++ |
| 6O | <i>K. palustris</i> | ++ | ++ | 2A | <i>V. soli</i> | ++ | ++ |
| 3W | <i>K. rhizophila</i> | + | ++ | 3C | <i>V. soli</i> | - | - |
| 7Ñ | <i>K. rhizophila</i> | + | ++ | 3K | <i>V. soli</i> | ++ | +++ |
| 6B | <i>M. flavescens</i> | + | + | | | | |

Tabla 3. Resultados del ensayo de solubilización de fosfato. Las distintas cepas bacterianas se clasifican en no solubilizadoras (-), poco solubilizadoras (+), medianamente solubilizadoras (++) y muy solubilizadoras (+++). NBRIP+: NBRIP con azul de bromotimol (0.025 g/L).

Según la bibliografía revisada, las bacterias que cuentan con esta propiedad pertenecen principalmente a los géneros *Acinetobacter* (cepa 5C) (Patel, Shah y Modi, 2017), *Arthrobacter* (cepa 1A) (Pereira, Barbosa y Castro, 2015), *Microbacterium* (cepas 6B, 6U, 7D, 3J, 3M y 6T) y *Rhizobium* (cepas 2E, 6W y 7A) (Benjumeda Muñoz, 2017), *Oceanobacillus* (cepa 2H) (Sepúlveda Chavera, Arismendi Macuer y Muñoz Torres, 2020) y *Variovorax* (cepas 2A y 3K) (Abdelkrim *et al.*, 2018); así como las especies *B. circulans* (cepa 6A) y *B. toyonensis* (cepa 3N) (Huasasquiche Sarmiento *et al.*, 2020), *B. casei* (cepa 1I) (Arora *et al.*, 2020), *B. frigotolerans* (cepas 6E y 7K) (Khezzrinejad, Khodakaramian y Shahryari, 2019), *K. palustris* (cepas 3V y 6O) (Ferreira *et al.*, 2021) y *K. rhizophila* (cepas 3W y 7Ñ) (Li *et al.*, 2020), *M. oxydans* (3J y 3M) (Ren *et al.*, 2019) y *R. pusense* (7A) (Chaudhary, Gera y Shukla, 2021). La actividad de las cepas bacterianas ensayadas por estos autores se corresponde con las cepas utilizadas en este trabajo. Por último, se ha encontrado un artículo que indica que *M. maritypicum* no es capaz de solubilizar el fosfato (Farh *et al.*, 2017), resultado que contrasta con la cepa 7D ensayada en este estudio.

5.2.3. Síntesis de auxinas

El análisis de la capacidad de las distintas cepas microbianas para sintetizar auxinas se realizó mediante un ensayo colorimétrico, pero al contrario de otros estudios en los que se puede valorar semicuantitativamente la cantidad de IAA producido, en la elaboración de este trabajo tan solo se

pudo discernir entre resultados positivos y negativos (Figura 11). Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 4.



Figura 11. Resultados del ensayo de síntesis de auxinas. Ejemplos de cepas bacterianas no productoras (izquierda) y productoras (derecha).

Como muestra la Tabla 4, únicamente 2 cepas de las 27 estudiadas se pueden considerar con capacidad de sintetizar auxinas, lo que supone tan solo un 7% de los aislamientos. Este resultado contrasta con un estudio que estima que el 80% de las bacterias rizosféricas son capaces de sintetizar IAA (Celis Bautista y Gallardo Echeverri, 2008).

Chaudhary, Gera y Shukla (2021) indican que *Rhizobium pusense* tiene la capacidad de sintetizar IAA, resultado que coincide con la cepa 7A utilizada en este trabajo. Sin embargo, otro trabajo (Farokh *et al.*, 2011) que analiza la producción de auxinas de distintas cepas de *Acinetobacter*, demuestra que tan solo unas pocas de ellas tienen esta capacidad; en este caso la única cepa perteneciente a este género, *A. rudis* (5C) sí que fue capaz de sintetizar IAA.

| Código | Especie bacteriana | Ensayo | Código | Especie bacteriana | Ensayo |
|--------|-------------------------|--------|--------|--------------------------|--------|
| 5C | <i>A. rudis</i> | + | 5A | <i>M. imperiale</i> | - |
| 1A | <i>A. oxydans</i> | - | 6U | <i>M. maritypicum</i> | - |
| 6A | <i>B. circulans</i> | - | 7D | <i>M. maritypicum</i> | - |
| 7C | <i>B. circulans</i> | - | 3J | <i>M. oxydans</i> | - |
| 3N | <i>B. toyonensis</i> | - | 3M | <i>M. oxydans</i> | - |
| 1I | <i>B. casei</i> | - | 6T | <i>M. saccharophilum</i> | - |
| 6E | <i>B. frigotolerans</i> | - | 2H | <i>O. sojae</i> | - |
| 7K | <i>B. frigotolerans</i> | - | 6W | <i>R. giardinii</i> | - |
| 2I | <i>C. campinensis</i> | - | 2E | <i>R. giardinii</i> | - |
| 6O | <i>K. palustris</i> | - | 7A | <i>R. pusense</i> | + |
| 3V | <i>K. palustris</i> | - | 2A | <i>V. soli</i> | - |
| 3W | <i>K. rhizophila</i> | - | 3C | <i>V. soli</i> | - |
| 7Ñ | <i>K. rhizophila</i> | - | 3K | <i>V. soli</i> | - |
| 6B | <i>M. flavescens</i> | - | | | |

Tabla 4. Resultados del ensayo de síntesis de auxinas. Las distintas cepas bacterianas se clasifican en productoras (+) o no productoras (-).

Respecto al resto de especies ensayadas en este trabajo, en la bibliografía científica se encuentran diversidad de resultados respecto a la capacidad de producción de IAA. Diversos investigadores obtuvieron resultados positivos para *B. circulans* (cepas 6A y 7C) (Mehta *et al.*, 2010), *B. frigotolerans* (cepas 6E y 7K) (Wang *et al.*, 2021), *B. toyonensis* (cepa 3N) (Suliasih y Widawati, 2020), *K. rhizophila* (cepas 3W y 7Ñ) (Li *et al.*, 2020), *B. casei* (cepa 1I) (Płociniczak *et al.*, 2016), *M. oxydans* (cepa 3M) (Soares *et al.*, 2016) y bacterias del género *Variovorax* (cepas 2A, 3C y 3K) (Sun *et al.*, 2018). Estas diferencias entre la capacidad de las cepas estudiadas y las de la bibliografía consultada podrían deberse a que durante nuestros experimentos utilizamos un medio mínimo sin fuentes de carbono disponibles para los microorganismos más allá del triptófano, lo cual podría haber limitado su crecimiento y por ende su capacidad para metabolizar este compuesto en IAA.

5.2.4. Producción de sideróforos

El análisis de la capacidad de las bacterias para producir sideróforos se realizó mediante un ensayo semicuantitativo colorimétrico basado en el cambio de color de azul turquesa a amarillo (Figura 12).

Contrariamente al ensayo anterior, la totalidad de cepas estudiadas en este trabajo resultaron positivas para este ensayo coincidiendo con otros investigadores, los cuales obtuvieron resultados positivos para la mayoría de las cepas investigadas (Ferreira *et al.*, 2021; Gupta y Gopal, 2008; Sánchez López *et al.*, 2012). Sin embargo, este hecho contrasta con el resultado obtenido por Navarro-Ródenas *et al.* (2016), que determinaron que sólo el 25% de las cepas que estudiaron tenían la capacidad de producir sideróforos.

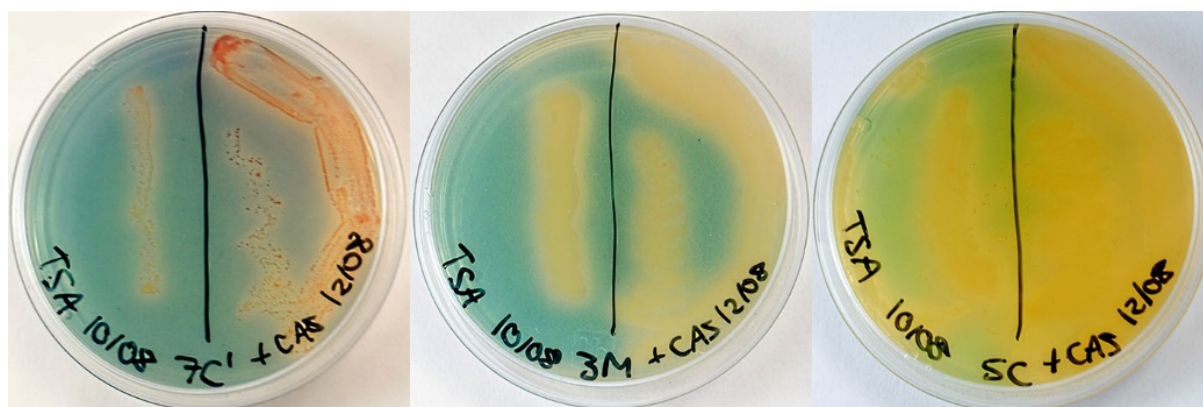


Figura 12. Resultados del ensayo de producción de sideróforos. Ejemplos de cepas bacterianas poco productoras (7C), medianamente productoras (3M) y muy productoras (5C).

Dado que presentaron diferentes grados de capacidad de producción de sideróforos, se establecieron 4 niveles de intensidad de quelación de hierro como muestra la Tabla 5: no productoras (-), poco productoras (+), medianamente productoras (++) y muy productoras (+++).

| Código | Especie bacteriana | Ensayo | Código | Especie bacteriana | Ensayo |
|--------|-------------------------|--------|--------|--------------------------|--------|
| 5C | <i>A. rudis</i> | +++ | 5A | <i>M. imperiale</i> | ++ |
| 1A | <i>A. oxydans</i> | +++ | 6U | <i>M. maritipicum</i> | ++ |
| 6A | <i>B. circulans</i> | + | 7D | <i>M. maritipicum</i> | +++ |
| 7C | <i>B. circulans</i> | + | 3J | <i>M. oxydans</i> | ++ |
| 3N | <i>B. toyonensis</i> | ++ | 3M | <i>M. oxydans</i> | ++ |
| 1I | <i>B. casei</i> | ++ | 6T | <i>M. saccharophilum</i> | ++ |
| 6E | <i>B. frigotolerans</i> | +++ | 2H | <i>O. sojae</i> | +++ |
| 7K | <i>B. frigotolerans</i> | +++ | 2E | <i>R. giardinii</i> | +++ |
| 2I | <i>C. campinensis</i> | +++ | 6W | <i>R. giardinii</i> | + |
| 3V | <i>K. palustris</i> | ++ | 7A | <i>R. pusense</i> | +++ |
| 6O | <i>K. palustris</i> | ++ | 2A | <i>V. soli</i> | ++ |
| 3W | <i>K. rhizophila</i> | ++ | 3C | <i>V. soli</i> | + |
| 7Ñ | <i>K. rhizophila</i> | ++ | 3K | <i>V. soli</i> | +++ |
| 6B | <i>M. flavescens</i> | + | | | |

Tabla 5. Resultados del ensayo de producción de sideróforos. Las distintas cepas bacterianas se clasifican en no productoras (-), poco productoras (+), medianamente productoras (++) y muy productoras (+++).

Comparando con los géneros y especies contemplados en este trabajo, diversos autores obtienen resultados coincidentes para las bacterias del género *Brevibacterium* (cepas 1I, 6E y 7K) (Noordman *et al.*, 2006), *Acinetobacter* (cepa 5C) (Farokh *et al.*, 2011); *Cupriavidus* (cepa 2I) (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2014); *M. oxydans* (cepas 3J y 3M) y *B. toyonensis* (cepa 3N) (Hernández Pacheco, 2015); *Variovorax* (cepas 2A, 3C y 3K) y *Microbacterium* (cepas 3J, 3M, 5A, 6B, 6T, 6U y 7D) (Pereira *et al.*, 2015); *M. maritipicum* (cepas 6U y 7D) (Farh *et al.*, 2017); *B. circulans* (cepas 6A y 7C) (Huasasquiche Sarmiento *et al.*, 2020); *K. rhizophila* (cepas 3W y 7Ñ) (Afridi *et al.*, 2021); *Rhizobium* (cepas 2E y 6W) (Chaudhary *et al.*, 2021), concretamente *R. pusense* (cepa 7A); *Oceanobacillus* (cepa 2H) y *K. palustris* (cepas 3V y 6O) (Ferreira *et al.*, 2021); y la Fundación Universitaria San Pablo-CEU (2008) registró una patente de *A. oxydans* (cepa 1A) como protector frente a estrés salino, que además es productora de sideróforos.

5.3. Uso potencial de bacterias como biofertilizantes.

De las cepas estudiadas, ninguna resultó positiva a las 4 pruebas. Sin embargo, todas las bacterias mostraron actividad PGPR en alguno de los ensayos. Las cepas que mostraron un mayor número de resultados positivos en los ensayos fueron 3K (*V. soli*), 5C (*A. rudis*) y 7A (*R. pusense*), esto implicaría un mayor potencial de actividad PGPR, y por tanto su posible uso como biofertilizantes. Al contrario, las cepas 7C (*B. circulans*), 5A (*M. imperiale*), 6B (*M. flavescens*), 3V (*K. palustris*), 3M (*M. oxydans*), 3K (*V. soli*) y 2I (*C. campinensis*) presentaron un único ensayo positivo de los cuatro realizados, y todos

ellos en el de capacidad de producción de sideróforos; de estas últimas, la única que mostró alta actividad enzimática (+++) fue *C. campinensis* (21).

Para desarrollar comercialmente la formulación de un bioinoculante se debe seguir un procedimiento de escalado, con diferentes etapas, para poder trasladar los resultados obtenidos en laboratorio al campo (Vasseur-Coronado *et al.*, 2021). En este trabajo se han estudiado las primeras fases de este proceso: se aislaron microorganismos de un cultivo objetivo ecosistema (en este caso la rizosfera de vegetales micorrizados con trufas), se hizo una selección de entre los microorganismos aislados y se estudió la capacidad PGPR de los mismos. A través de este proceso, disminuyó el número de cepas bacterianas con las que trabajar hasta quedarnos con las que mejores capacidades presentaron en los ensayos.

El siguiente paso en el desarrollo del producto es estudiar las características de estas bacterias *in vivo*, determinando cómo afectan estas bacterias en el desarrollo de las plántulas; su capacidad de colonización de las raíces (lo cual se puede corroborar ensayando su capacidad de producción de biofilms) y supervivencia y competencia con otros microorganismos del ecosistema; y su capacidad PGPR tomando medidas de la longitud y el peso de tallos y raíces. Estos ensayos se harían en condiciones controladas de vivero, siendo importante una siguiente fase trasladando estos experimentos al campo, y analizar cómo se comportan los microorganismos bajo diferentes condiciones ambientales.

Posteriores etapas incluyen encontrar un método rápido y barato para la producción en masa del inóculo, ya sea en medios líquidos, sólidos o semisólidos; realizar los estudios toxicológicos pertinentes para excluir microorganismos que puedan ser patógenos en humanos, plantas o animales; y realizar controles de calidad para asegurar la viabilidad de los microorganismos con el paso del tiempo y controlar aspectos como que los posibles microorganismos contaminantes se encuentren bajo límites tolerables (Nakkeeran *et al.*, 2005). Por otra parte, la formulación no debe ser necesariamente de una única cepa bacteriana, aunque puedan tener interacciones antagonistas entre sí y se traduzca en un descenso de la supervivencia y proliferación de los distintos microorganismos, su efecto en la promoción del crecimiento vegetal en muchas ocasiones es sumatorio (Cano, 2011).

Como el objetivo de este ensayo es establecer que beneficios pueden tener estos microorganismos sobre el desarrollo, germinación y crecimiento de las trufas y su árbol hospedador en aras de aumentar la producción de este hongo, se podrían añadir en la etapa de inoculación de las raíces con esporas de *Tuber melanosporum* en vivero, o posteriormente en campo de manera directa a través del riego o en forma de sustrato para inóculo, y observar que efecto tienen. Concretamente, el interés del uso de bacterias PGPR o MHB, desde un punto de vista bromatológico, será determinar si son capaces de

mejorar el perfil aromático de las trufas de cultivo, dado que hay autores que afirman que los microorganismos tienen una relación directa con los compuestos orgánicos volátiles de estos hongos (Splivallo *et al.*, 2015; Vahdatzadeh *et al.*, 2015).

6. CONCLUSIONES

1. De un total de 108 cepas bacterianas aisladas del interior (gleba) de trufas negras (*Tuber melanosporum*) e identificadas mediante PCR en un trabajo precedente, se han seleccionado 27. Esta selección se ha efectuado teniendo en cuenta su capacidad de promoción de crecimiento vegetal, a través de los datos existentes en la bibliografía científica.
2. A diferencia del caldo TSB, tanto el caldo TSB suplementado con extracto de levadura como el caldo *Rhizobium* se han comportado como medios mucho más aptos y apropiados para la regeneración y revitalización de algunas de las cepas aisladas tras su conservación a -80°C.
3. 9 de las 27 cepas bacterianas testadas (33%) se han comportado como fijadoras del nitrógeno, destacando 5 por su marcada actividad: *Acinetobacter rudis*, *Bacillus circulans*, *Brevibacterium casei*, *Microbacterium oxydans* y *Variovorax soli*,
4. El test de solubilización de fosfatos ha resultado ser positivo para la mayoría de las cepas investigadas (85%) destacando por su fuerte potencial de solubilización las especies pertenecientes al G^o *Rhizobium*.
5. Respecto a la prueba laboratorial de síntesis de auxinas, solo 2 cepas (7%) han presentado esta capacidad: *Acinetobacter rudis* y *Rhizobium pusense*. Estos datos no hacen más que añadir más controversia a la bibliografía existente puesto que si algunos autores señalan la marcada capacidad de producción de auxinas por parte de las bacterias de la rizosfera otros detectan todo lo contrario.
6. Sin embargo y en relación a la producción de sideróforos, las 27 cepas testadas han manifestado esta propiedad, y muchas de ellas (10) altamente productoras.
7. Teniendo en cuenta las pruebas “*in vitro*” efectuadas para comprobar el potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) de las 27 cepas testadas, destacar tres de ellas en este sentido: *Acinetobacter rudis*, *Rhizobium pusense* y *Variovorax soli*.
8. Es obvio que para certificar la aptitud de estas tres cepas seleccionadas como PGPR y su potencial uso como bioinoculantes serán precisas pruebas adicionales como su capacidad para la producción de biomasa y diferentes ensayos “*in vivo*”.

CONCLUSIONS

1. There were selected 27 bacterial strains, from 108, isolated from the gleba of black truffles (*Tuber melanosporum*) and identified by PCR in a previous work. This selection was made considering their ability to promote plant growth, through existing data in the scientific literature.
2. Unlike TSB broth, both TSB broth supplemented with yeast extract and the Rhizobium broth performed as much more appropriate media for the regeneration and revitalization of some of the isolated strains after their preservation at -80°C.
3. 9 of the 27 bacterial strains tested (33%) behaved as nitrogen fixers, 5 of which stood out for their marked activity: *Acinetobacter rudis*, *Bacillus circulans*, *Brevibacterium casei*, *Microbacterium oxydans* and *Variovorax soli*.
4. The phosphate solubilization test was positive for most of the strains investigated (85%), with the species belonging to the *Rhizobium* genera standing out for their strong solubilization potential.
5. With respect to the laboratory test for auxin synthesis, only 2 strains (7%) showed this capacity: *Acinetobacter rudis* and *Rhizobium pusense*. These data only add more controversy to the existing bibliography, since while some authors point out the marked auxin production capacity of rhizosphere bacteria, others detect the opposite.
6. However, and in relation to the production of siderophores, the 27 strains tested have manifested this property and many of them (10) highly productive.
7. Considering the "*in vitro*" tests carried out to verify the potential as plant growth promoting bacteria (PGPR) of the 27 strains tested, just three of them stand out in this sense: *Acinetobacter rudis*, *Rhizobium pusense* and *Variovorax soli*.
8. Obviously, to certify the suitability of these three selected strains as PGPR and their potential use as bioinoculants, additional tests such as the capacity for biomass production and different "*in vivo*" tests will be required.

7. VALORACIÓN PERSONAL

A lo largo de la elaboración de este trabajo, y ya desde el principio, he mejorado mi capacidad de buscar y gestionar información, consultando un gran número de referencias científicas, y apoyándome en el uso de un gestor bibliográfico. Una vez recopilada esta información, llegó la tarea de seleccionarla y de elaborar el diseño experimental de los ensayos, y posteriormente llevarlos a cabo, para lo cual tuve que demostrar espíritu crítico, autonomía y capacidad para resolver los problemas que iban apareciendo. Reunidos los datos de los ensayos, el paso siguiente fue saber interpretarlos, aplicando los conocimientos obtenidos durante el grado y la elaboración del propio trabajo; y desarrollar las conclusiones y redactar la memoria, proceso durante el cual mejoró mi capacidad para transmitir información.

Durante este trabajo he aprendido la importancia del conocimiento del ecosistema que habita bajo el suelo para poder desarrollar la agricultura de manera sostenible y respetuosa con el medio ambiente, y el efecto que tienen entre sí las múltiples interacciones de todos los organismos que coexisten en la rizosfera.

Quería agradecer a Pedro Marco y Domingo Blanco, profesores de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, por la tutela y los conocimientos que me han aportado; a Sandra, Sergio, Sergi y a todo el personal del CITA, por su apoyo durante mi estancia en el centro; y a mi familia y mis amigos, por acompañarme durante este camino.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdelkrim, S., Jebara, S. H., Saadani, O., Chiboub, M., Abid, G. y Jebara, M. (2018) "Effect of Pb-resistant plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on growth and lead uptake by *Lathyrus sativus*", *Journal of Basic Microbiology*, 58(7), pp. 579–589. doi:10.1002/jobm.201700626.

Afridi, M. S., van Hamme, J. D., Bundschuh, J., Khan, S., Khan, M. N., Salam, A., Waqar, M., Munis, M. F. H. y Chaudhary, H. J. (2021) "Biotechnological approaches in agriculture and environmental management - bacterium *Kocuria rhizophila* 14ASP as heavy metal and salt-tolerant plant growth-promoting strain", *Biología*, 76, pp. 3091–3105. doi:10.1007/s11756-021-00826-6.

Amaya-Gómez, C. V., Porcel, M., Mesa-Garriga, L. y Gómez-Álvarez, M. I. (2020) "A Framework for the Selection of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Based on Bacterial Competence Mechanisms", *Applied and Environmental Microbiology*, 86(14). Doi:10.1128/AEM.00760-20.

Arora, N. K., Fatima, T., Mishra, J., Mishra, I., Verma, S., Verma, R., Verma, M., Bhattacharya, A., Verma, P., Mishra, P. y Bharti, C. (2020) "Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils", *Journal of Advanced Research*, 26(2020), pp. 69–82. Doi:10.1016/j.jare.2020.07.003.

Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. y Smith, D. L. (2018) "Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture", *Frontiers in Plant Science*, 9(1473). Doi:10.3389/fpls.2018.01473.

Benjumeda Muñoz, D. (2017) *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Sevilla.

Brescia, F., Marchetti-Deschmann, M., Musetti, R., Perazzolli, M., Pertot, I. y Puopolo, G. (2020) "The rhizosphere signature on the cell motility, biofilm formation and secondary metabolite production of a plant-associated *Lysobacter* strain", *Microbiological Research*, 234(1264242). doi:10.1016/j.micres.2020.126424.

Cano, M. A. (2011) "Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión.", *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), pp. 15–31. doi:10.31910/rudca.v14.n2.2011.771.

Celis Bautista, L. X. y Gallardo Echeverri, I. R. (2008) *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos*. Trabajo de Fin de Grado. Pontificia Universidad Javeriana.

Chaudhary, T., Gera, R. y Shukla, P. (2021) "Deciphering the Potential of *Rhizobium pusense* MB-17a, a Plant Growth-Promoting Root Endophyte, and Functional Annotation of the Genes Involved in the Metabolic Pathway", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(617034). doi:10.3389/fbioe.2020.617034.

Chavez-Diaz, I. F., Zelaya-Molina, L., Cruz, C., Rojas-Anaya, Ed., Ramírez, S. y de los Santos-Villalobos, S. (2020). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro- biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), p. 1427. doi:10.29312/remexca.v11i6.2492.

InnoPlant (2021). *Funciones que desempeñan las PGPR en la rizosfera* [Figura]. Disponible en: <https://innoplant.es/2021/05/26/que-son-las-bacterias-pgpr/> (Consultado: 16-02-2022).

- Dworkin, M. y Foster, J. W. (1958) "Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen", *Journal of Bacteriology*, 75(5), pp. 592–603. doi:10.1128/jb.75.5.592-603.1958.
- Estrada-De Los Santos, P., Solano-Rodríguez, R., Matsumura-Paz, L. T., Vásquez-Murrieta, M. S. y Martínez-Aguilar, L. (2014) "*Cupriavidus plantarum* sp. nov., a plant-associated species", *Archives of Microbiology*, 196(11), pp. 811–817. doi:10.1007/s00203-014-1018-7.
- Farh, M. E.-A., Kim, Y.-J., Sukweenadhi, J., Singh, P. y Yang, D.-C. (2017) "Aluminium resistant, plant growth promoting bacteria induce overexpression of Aluminium stress related genes in *Arabidopsis thaliana* and increase the ginseng tolerance against Aluminium stress", *Microbiological Research*, 200(2017), pp. 45–52. doi:10.1016/j.micres.2017.04.004.
- Farokh, R. Z., Sachdev, D., Pour, N. K., Engineer, A., Pardesi, K. R., Zinjarde, S., Dhakephalkar, P. K. y Chopade, B. A. (2011) "Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6), pp. 556–566. doi:10.4014/jmb.1012.12006.
- Ferreira, M. J., Cunha, A., Figueiredo, S., Faustino, P., Patinha, C., Silva, H. y Sierra-Garcia, I. N. (2021) "The root microbiome of *Salicornia ramosissima* as a seedbank for plant-growth promoting halotolerant bacteria", *Applied Sciences*, 11(2233), pp. 1–28. doi:10.3390/app11052233.
- Fundación Universitaria San Pablo-CEU (2008). "Uso de *Arthrobacter oxydans* BB1 como protector frente a estrés salino". Inventores: Gutiérrez Mañero, F. J., Barriuso Maicas, J. y Ramos Solano, B. España: ES2269004B2.
- Glickmann, E. y Dessaux, Y. (1995) "A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), pp. 793–796. doi:10.1128/aem.61.2.793-796.1995.
- Gupta, A. y Gopal, M. (2008) "Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria", *Indian Journal of Agricultural Research*, 42(2), pp. 153–156. Disponible en: https://www.academia.edu/22419356/Siderophore_Production_by_Plant_Growth_Promoting_Rhizobacteria(Consultado: 28-12-2021).
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. y Bonilla, R. (2012) "Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*)", *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), pp. 182–190. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/32829> (Consultado: 27-12-2021).
- Hernández Pacheco, C. E. (2015) *Diversidad genética de bacterias endófitas cultivables en plantas de tomate (Physalis ixocarpa Brot.) con actividades antagónicas y promotoras de crecimiento vegetal*. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Huasasquiche Sarmiento, L., Moreno Díaz, P. y Jiménez Dávalos, J. (2020) "Caracterización y evaluación del potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)", *Ecología Aplicada*, 19(2), pp. 65–76. doi:10.21704/rea.v19i2.1557.
- Khezzrinejad, N., Khodakaramian, G. y Shahryari, F. (2019) "Characterization of potential plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Iran", *Biologia Futura BioFut*, 70(4), pp. 268–277. doi:10.1556/019.70.2019.30.
- Lara, C., Oviedo, L. y Alemán, A. (2011) "Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura", *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), pp.

17–23. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000100003 (Consultado: 27-12-2021).

León Mendoza, L. H. (2014) "Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.)", *Scientia Agropecuaria*, 5(4), pp. 177–185. doi:10.17268/sci.agropecu.2014.04.02.

Li, X., Sun, P., Zhang, Y., Jin, C. y Guan, C. (2020) "A novel PGPR strain *Kocuria rhizophila* Y1 enhances salt stress tolerance in maize by regulating phytohormone levels, nutrient acquisition, redox potential, ion homeostasis, photosynthetic capacity and stress-responsive genes expression", *Environmental and Experimental Botany*, 174(104023). doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104023.

Louden, B. C., Haarmann, D. y Lynne, A. M. (2011) "Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection", *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), pp. 51–53. doi:10.1128/jmbe.v12i1.249.

Mantilla-Paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña-Venegas, Clara P., Murcia, U., Rodríguez, M. y Zambrano, M. M. (2009) "Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana", *Revista de Biología Tropical*, 57(4), pp. 915–927. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442009000400002 (Consultado: 27-12-2021).

Mehta, P., Chuhan, A., Mahajan, R., Mahajan, P. K. y Shirkot, C. K. (2010) "Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential", *Current Science*, 98(4), pp. 538–542. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/24111705> (Consultado: 14-02-2022).

Milagres, A. M. F., Machuca, A. y Napoleão, D. (1999) "Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay", *Journal of Microbiological Methods*, 37(1999), pp. 1–6. doi:10.1016/s0167-7012(99)00028-7.

Nakkeeran, S., Dilantha Fernando, W. G. y Siddiqui, Zaki A (2005) "Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases". En: Siddiqui, Z.A. (ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Nueva York: Springer, pp. 257–296.

Navarro-Ródenas, A., Berná, L. M., Lozano-Carrillo, C., Andrino, A. y Morte, A. (2016) "Beneficial native bacteria improve survival and mycorrhization of desert truffle mycorrhizal plants in nursery conditions", *Mycorrhiza*, 26(7), pp. 769–779. doi:10.1007/s00572-016-0711-6.

Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. y Sa, T. (2005) "Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea", *Microbiological Research*, 160(2), pp. 127–133. doi:10.1016/j.micres.2004.10.003.

Patel, P., Shah, R. y Modi, K. (2017) "Isolation and characterization of plant growth promoting potential of *Acinetobacter* sp. RSC7 isolated from *Saccharum officinarum* cultivar Co 671", *Journal of Experimental Biology y Agricultural Sciences*, 5(4), pp. 483–491. doi:10.18006/2017.5(4).483.491.

Pereira, S. I. A., Barbosa, L. y Castro, P. M. L. (2015) "Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in zinc and cadmium-contaminated soil", *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(7), pp. 2127–2142. doi:10.1007/s13762-014-0614-z.

- Pérez Portuondo, I., Meriño Reyes, L., Ábalos Rodríguez, C. A. y Pérez Silva, R. M. (2017) "Características promotoras de crecimiento vegetal en rizobacterias aisladas de suelos contaminados con compuestos fenólicos", *Revista Cubana de Química*, 29(1), pp. 73–88. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000100006 (Consultado: 27-12-2021).
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S. y Fernández, F. J. (2007) "O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection", *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), pp. 127–131. doi:10.1016/j.mimet.2007.03.023.
- Płociniczak, T., Sinkkonen, A., Romantschuk, M., Sułowicz, S. y Piotrowska-Seget, Z. (2016) "Rhizospheric bacterial strain *Brevibacterium casei* MH8a colonizes plant tissues y enhances Cd, Zn, Cu phytoextraction by white mustard", *Frontiers in Plant Science*, 7(101). doi:10.3389/FPLS.2016.00101/BIBTEX.
- Porcel Rodríguez, E. (2017) *Producción de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPBs) a partir de residuos de la industria agroalimentaria*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Almería.
- Ren, X.-M., Guo, S.-J., Tian, W., Chen, Y., Han, H., Chen, E., Li, B.-L., Li, Y.-Y. y Chen, Z.-J. (2019) "Effects of plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, Cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in Cu-contaminated agricultural soil", *Frontiers in Microbiology*, 10(1455). doi:10.3389/fmicb.2019.01455.
- Reyna, S. (2000). *Trufa, truficultura y selvicultura trufera*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Rivera, C.S., Blanco, D., Oria, R. & Venturini, M.E. (2010). Diversity of culturable microorganisms and occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* ascocarps. *Food Microbiology*, 27(2), 286–293. doi: 10.1016/j.fm.2009.11.001.
- Roth-Bejerano, N., Navarro-Ródenas, A. y Gutiérrez, A. (2014) "Types of Mycorrhizal Association". En Kagan-Zur, V. et al. (Eds.). *Dessert Truffles*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 69–80. doi:10.1007/978-3-642-40096-4_5.
- Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F. y Bonilla Buitrago, R. R. (2012) "Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero", *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), pp. 1401–1415. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000700009 (Consultado: 27-12-2021).
- Scattareggia, J. P. (2016) *Aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (Solanum lycopersicum L.)*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Nacional de Cuyo.
- Schoebitz Cid, M. I. (2006) *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp.)*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Austral de Chile.
- Schwyn, B. y Neilands, J. B. (1987) "Universal Chemical Assay for the Detection y Determination of Siderophores", *Analytical biochemistry*, 160(1), pp. 47–56. doi:10.1016/0003-2697(87)90612-9.

- Sepúlveda Chavera, G. F., Arismendi Macuer, M. y Muñoz Torres, P. (2020) "Endospore-forming bacteria present in a commercial stabilized poultry manure determines the *Fusarium* biocontrol and the tomato growth promotion", *Agronomy*, 10(1636). doi:10.3390/agronomy10111636.
- Soares, M. A., Li, H. Y., Kowalski, K. P., Bergen, M., Torres, M. S. y White, J. F. (2016) "Functional Role of Bacteria from Invasive *Phragmites australis* in Promotion of Host Growth", *Microbial ecology*, 72(2), pp. 407–417. doi:10.1007/S00248-016-0793-X.
- Splivallo, R., Deveau, A., Valdez, N., Kirchhoff, N., Frey-Klett, P. y Karlovsky, P. (2015) "Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma", *Environmental Microbiology*, 17(8), pp. 2647–2660. doi:10.1111/1462-2920.12521.
- Suliasih y Widawati, S. (2020) "Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) producing *Bacillus siamensis* from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 572(012025). doi:10.1088/1755-1315/572/1/012025.
- Sun, S.-L., Yang, W.-L., Fang, W.-W., Zhao, Y.-X., Guo, L. y Dai, Y.-J. (2018) "The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 Regulates the Level of Indole-3-Acetic Acid Synthesized from Indole-3-Acetonitrile", *Applied and Environmental Microbiology*, 84(16), pp. 298–316. doi:10.1128/AEM.00298-18.
- Taulé, C. (2011) *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción*. Tesis de Maestría. Universidad de la República (Uruguay).
- Tejera-Hernández, B., Heydrich-Pérez, M. y Rojas-Badía, M. M. (2013) "Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de arroz", *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), pp. 357–364. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212013000200012 (Consultado: 27-12-2021).
- Vahdatzadeh, M., Deveau, A. y Splivallo, R. (2015) "The role of the microbiome of truffles in aroma formation: A meta-analysis approach", *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), pp. 6946–6952. Doi:10.1128/AEM.01098-15.
- Vasseur-Coronado, M., du Boulois, H. D., Pertot, I. y Puopolo, G. (2021) "Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products", *Microbiological Research*, 245(126672). doi:10.1016/j.micres.2020.126672.
- Venner Rodríguez, C. E. y Martín Hernández, M. J. (2009) *Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp.* Trabajo de Fin de Grado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Wang, R., Wang, C., Feng, Q., Liou, R. M. y Lin, Y. F. (2021) "Biological Inoculant of Salt-Tolerant Bacteria for Plant Growth Stimulation under Different Saline Soil Conditions", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), pp. 398–407. doi:10.4014/JMB.2009.09032.
- Welch, M., Ravnskov, S., Kieliszewska-Rokicka, B. y Larsen, J. (2010) "Suppression of other soil microorganisms by mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in root-free soil", *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), pp. 1534–1540. doi:10.1016/j.soilbio.2010.05.024.

9. ANEXOS

Anexo I – Composición de los medios de cultivo

Caldo Rhizobium

| | |
|---------------------------------|---------|
| Extracto de levadura | 0,400 g |
| Manitol | 10,00 g |
| NaCl | 0,100 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,500 g |
| MgSO ₄ | 7,00 g |
| H ₂ O | 4,00 g |
| Agua destilada | 1 L |
| *Ajustar pH a 6,8 – 7,0 | |

Agar Rhizobium

| | |
|---------------------------------|---------|
| Extracto de levadura | 0,400 g |
| Manitol | 10,00 g |
| NaCl | 0,100 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,500 g |
| MgSO ₄ | 7,00 g |
| H ₂ O | 4,00 g |
| Agar | 15,00 g |
| Agua destilada | 1 L |
| *Ajustar pH a 6,8 – 7,0 | |

Medio libre de nitrógeno (NFb)

| | |
|---|---------|
| Ácido málico | 3,00 g |
| Glucosa | 2,00 g |
| NaCl | 0,100 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,500 g |
| MgSO ₄ *7 H ₂ O | 0,200 g |
| CaCl ₂ *2 H ₂ O | 0,200 g |
| EDTA-Fe, sol 1.64% | 4 mL |
| Azul de bromotimol, sol. 0.5% en KOH 0.2N | 2 mL |
| Solución de micronutrientes | 2 mL |
| Solución de vitaminas | 1 mL |
| Agar | 15,00 g |
| Agua destilada | 1 L |
| *Ajustar pH a 5,5 | |

Solución de micronutrientes

| | |
|---|---------|
| Na ₂ Mo ₄ *2 H ₂ O | 0,200 g |
| MnSO ₄ | 0,235 g |
| H ₃ BO ₃ | 0,28 g |
| CuSO ₄ *5 H ₂ O | 0,008 g |
| ZnSO ₄ *7 H ₂ O | 0,024 g |
| Agua destilada | 1 L |

Solución de vitaminas

| | |
|----------------|---------|
| Biotina | 0,100 g |
| Piridoxal-HCl | 0,200 g |
| Agua destilada | 1 L |

Medio NBRIP

| | |
|---|---------|
| Glucosa | 10,00 g |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 5,00 g |
| MgCl ₂ *6 H ₂ O | 5,00 g |
| MgSO ₄ *7 H ₂ O | 0,250 g |
| KCl | 0,200 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,100 g |
| Agar | 15,00 g |
| Azul de bromofenol** | 0,025 g |
| Agua destilada | 1 L |

*Ajustar el pH a 7,0

**Opcional para visualizar mejor el resultado del ensayo

Medio mínimo de sales DF suplementado con triptófano

| | |
|---|----------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2,00 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4,00 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 6,00 g |
| MgSO ₄ *7 H ₂ O | 0,200 g |
| FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0,001 g |
| H ₃ BO ₃ | 10,00 µg |
| MnSO ₄ | 10,00 µg |
| ZnSO ₄ | 70,00 µg |
| CuSO ₄ | 50,00 µg |
| MoO ₃ | 10,00 µg |
| Triptófano | 0,500 g |
| Agua destilada | 1 L |

Reactivo de Salkowski

| | |
|--------------------------------|---------|
| FeCl ₃ | 12,00 g |
| H ₂ SO ₄ | 7,9 M |
| Agua destilada | 1 L |

Agar O-CAS

| | |
|---|----------|
| CAS | 60,50 mg |
| HDTMA | 72,90 mg |
| PIPES | 30,24 g |
| FeCl ₃ *6H ₂ O, sol. 1mM en 10 mM HCl | 10 mL |
| Agar | 9,00 g |
| Agua destilada | 1 L |

*Ajustar pH a 6,8. Debe estar por encima de 6,0 para que el PIPES se disuelva bien