



Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth

Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal

Anguiano Cabello, J. C.¹, Flores Olivas, A.^{1,*}, Olalde Portugal, V.², Arredondo Valdés, R.¹, Laredo Alcalá, E. I.¹

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México; ²Cinvestav Irapuato, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Anguiano Cabello, J. C., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., Laredo Alcalá, E. I. (2019). Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth. *Revista Bio Ciencias* 6, e418. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418>



ABSTRACT

Bacillus subtilis are plant growth promoting rhizobacteria due to their production of metabolites such as auxins, siderophores, organic acids and antibiotics. There is no sufficient scientific evidence to know if all *B. subtilis* strains have the same growth promoting effect, regardless their capacity of producing different growth promoting metabolite concentrations. This research work aimed to assess the plant growth promoting capacity of the different *B. subtilis* test strains, as well as the production of siderophores, indolic acids, plant hormones and jasmonic acid. This research work focused on three *B. subtilis* strains (BSN, BS8 and BS14). We quantified the plant hormones in the fermentation broths using high-resolution liquid chromatography, and we detected the siderophores with chrome azurol. We used *S. Bacillus subtilis* to treat *Solanum lycopersicum* and *Arabidopsis thaliana* seeds, as well as *Solanum lycopersicum* seedlings inside a bioclimatic chamber. The results showed that every strain

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 20th 2017.

Accepted/Aceptado: April 18th 2019.

Available on line/Publicado: April 22nd 2019.

RESUMEN

Bacillus subtilis es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal por la producción de metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos. Sin embargo, en la literatura científica no existe suficiente evidencia en cuanto a esta bacteria, no obstante, se ha reportado que todas las cepas de *B. subtilis* tienen el mismo efecto promotor de crecimiento, aun cuando pudieran producir distintas concentraciones de metabolitos promotores de crecimiento. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el tipo de promoción de crecimiento de plantas que presenta cada una de las cepas de *B. subtilis*, así como la producción de sideróforos, fitohormonas indólicas y ácido jasmónico. Se utilizaron tres cepas de *B. subtilis* (BSN, BS8 y BS14). De los caldos de fermentación se cuantificaron las fitohormonas mediante cromatografía líquida de alta resolución y se detectaron sideróforos mediante medio cromo azurol S. Posteriormente se añadieron *Bacillus subtilis* a semillas de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*, y a plántulas de *Solanum lycopersicum* en cámara bioclimática. Los resultados mostraron que cada cepa promueve distintos parámetros. Algunas cepas son promotoras de la tasa de germinación, otras promueven las raíces o la longitud del tallo. Se concluye que las cepas de *Bacillus subtilis* deben elegirse dependiendo de la promoción de crecimiento deseado. La concentración de fitohormonas debe ser adecuada, ya que la deficiencia o exceso de ellos inhibe el crecimiento.

*Corresponding Author:

Alberto Flores Olivas. Agricultural Parasitology Department. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, C.P. 25315 Buenavista, Saltillo, Coahuila; Mexico. Phone: +52(844)353 3251. E-mail: aflooli50@gmail.com

promotes different parameters. Some strains promote high germination rates, while other strains promote root growth or stem elongation. Therefore, we must select *Bacillus Subtilis* strains according to the desired growth promoting effect. However, the plant hormones concentration must be the right one, because too much of too low concentration will inhibit plant growth.

KEY WORDS

Bacillus subtilis, phytohormones, siderophores, plant growth promotion.

Introduction

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) stimulate plant growth by direct and indirect mechanisms. Indirect promotion stems from the production of antibiotics and metabolites that enhance nutrient uptake (Glick *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2008). Direct promotion occurs by the production of phytohormones like auxins, cytokinins and gibberellins; as well as organic compounds and other compounds that increase plant immunity; such as jasmonic acid, salicylic acid and phytoalexins (Ahmad *et al.*, 2008; Rojas-Solis *et al.*, 2013).

In *Solanum lycopersicum* (tomato) we used *Azospirillum*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Agrobacterium* and *Streptomyces* PGPRs (Alfonso, *et al.*, 2005; Haas & Défago, 2005; Nihorimbere *et al.*, 2010; Rentería, 2013). These PGPRs can be applied alone or bio-formulated (Berg, 2009; Choudhary & Johri, 2008; Clayet-Marcel *et al.*, 2001). Regarding *Bacillus* genus, we used *B. subtilis* because it promotes tomato growth and acts as biological control against pathogens like *Fusarium oxysporum* (Airola, 2010).

Bacillus subtilis produces metabolites such as cytokinins, siderophores, auxins and antibiotics, among others. Plants can produce cytokinins endogenously, however, the exogenous addition of cytokinins increases their growth process (Arkhipova, *et al.*, 2005). Cytokinins induce amylase and protease activity, as well as auxin synthesis (Mantilla, 2007). Meanwhile, siderophores chelate environmental iron making it more available to the plants (Abdel-Aziz, 2013). Some siderophores are considered antibiotics because they limit the iron supply that pathogens need for growing (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). 3-indolic acetic acid (IAA)

PALABRAS CLAVE

Bacillus subtilis, fitohormonas, sideróforos, promoción de crecimiento de plantas.

Introducción

Las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR), estimula el crecimiento de plantas por mecanismos directos e indirectos. La promoción indirecta se produce mediante la producción de antibióticos y metabolitos que ayudan a la asimilación de nutrientes (Glick *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2008). La estimulación directa se realiza por producción de fitohormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas, compuestos orgánicos y compuestos que aumentan la inmunidad vegetal; como ácido jasmónico, ácido salicílico y fitoalexinas (Ahmad *et al.*, 2008; Rojas-Solis *et al.*, 2013).

En *Solanum lycopersicum* (tomate) se han utilizado PGPR de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Agrobacterium* y *Streptomyces* (Alfonso, *et al.*, 2005; Haas & Défago, 2005; Nihorimbere *et al.*, 2010; Rentería, 2013), los cuales pueden ser utilizados solos o en bioformulados (Berg, 2009; Choudhary & Johri, 2008; Clayet-Marcel *et al.*, 2001). Del género *Bacillus* se utilizan *B. subtilis* para promover el crecimiento del tomate y para el control biológico de patógenos como *Fusarium* (Airola, 2010).

Bacillus subtilis produce metabolitos como citoquininas, sideróforos, auxinas, antibióticos, entre otros. Las citoquininas pueden ser producidas endógenamente por la planta, pero la adición exógena de citoquininas aumenta el proceso de crecimiento (Arkhipova, *et al.*, 2005). Las funciones de las citoquininas son la inducción de la actividad amilasa y proteasa y la síntesis de auxinas (Mantilla, 2007). Mientras tanto, los sideróforos quelan el hierro ambiental y lo hacen más asequible para las plantas (Abdel-Aziz, 2013). Algunos sideróforos se consideran antibióticos porque limitan el hierro para el crecimiento de patógenos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). El ácido 3-indólico acético (IAA), una de las auxinas más importantes, controla el proceso como la división celular, la diferenciación del tejido vascular, la formación del dominio apical y el desarrollo del órgano (Blakeslee *et al.*, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2006). En cuanto a los antibióticos, *B. subtilis* es capaz de producir más de una docena de antibióticos con una gran diversidad de estructuras químicas, entre ellos surfactina, iturina A

is one of the most important auxins; it controls the cell division process, vascular tissue differentiation, formation of the apical domain and that organ's development (Blakeslee et al., 2005; Tsavkelova et al., 2006). Regarding antibiotics, *B. subtilis* can produce more than one dozen of antibiotics with a great diversity of chemistries, including surfactin, iturin A and bacillibactin (Stein, 2005), which are capable of controlling the growth of tomato's pathogens.

Nevertheless, authors like Bharucha & Patel (2013) and Buensanteai et al. (2008) have said that growth promotion depends on the balance between auxins and phytohormones (Buensanteai, et al., 2008). The presence of tryptophan, jasmonic acid and siderophores in the culture medium can improve auxin production (Bharucha & Patel, 2013) and therefore, regulate growth promotion.

Regarding *B. subtilis*, there is no sufficient scientific evidence to know if all the strains have the same growth promoting effect, regardless their capacity of producing different growth promoting metabolite concentration. The goal of this research work was to assess the plant growth promoting effect of *B. subtilis* test strains, as well as their production of siderophores, indolic phytohormones and jasmonic acid.

Material and Methods

Test strains and seeds.

We used three *B. subtilis* strains in this research work (BSN, BS14, and BS8). BSN strain was given by the Advanced Studies and Research Center of IPN ("Centro de Investigación y Estudios Avanzados" del Instituto Politécnico Nacional-CINVESTAV) Irapuato station; while BS8 and BS14 were provided by "Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro". The strains were activated in TGE medium (tryptone glucose yeast extract) at 28 °C (Calvo & Zuñiga, 2010). CINVESTAV Irapuato supplied the seeds of *Arabidopsis thaliana*.

B. subtilis' fermentation broth preparation.

The fermentation took place in Landy medium with tryptophan. Landy medium was prepared as follows: glutamic acid 5.0 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, NaCl 0.01 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g/L, and tryptophan (final concentration 5mM). We added micro-filtrated sterilized glucose solution (0.2

g/L) and bacillibactin (Stein, 2005). Los cuales son capaces de controlar el crecimiento de patógenos de tomate.

No obstante, autores como Bharucha & Patel (2013) y Buensanteai et al. (2008) han señalado que la promoción del crecimiento depende del equilibrio entre las auxinas y otras fitohormonas (Buensanteai et al., 2008). La presencia de triptófano, ácido jasmónico y sideróforos en el medio de cultivo puede mejorar la producción de auxinas (Bharucha & Patel, 2013), y por lo tanto regular la promoción de crecimiento.

En cuanto a *B. subtilis*, no existe suficiente evidencia científica, no obstante se conoce que las cepas de *B. subtilis* tienen el mismo efecto promotor de crecimiento, aun cuando pudieran producir distintas concentraciones de metabolitos promotores de crecimiento. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el tipo de promoción de crecimiento de plantas que presenta cada una de las cepas de *B. subtilis*, así como la producción de sideróforos, fitohormonas indólicas y ácido jasmónico.

Material y Métodos

Cepas y semillas utilizadas.

Fueron utilizadas tres cepas de *B. subtilis* para la presente investigación (BSN, BS14, and BS8). La cepa BSN fue proporcionada por el Centro de investigación y de estudios avanzados del IPN (CINVESTAV) unidad Irapuato, por su parte, BS8 y BS14 fueron provistas por el Departamento de parasitología molecular de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Las cepas fueron activadas en medio TGE (triptona glucosa extracto de levadura) a 28 °C (Calvo & Zuñiga, 2010). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron provistas por el CINVESTAV Irapuato.

Obtención de caldos de fermentación de *B. subtilis*.

La fermentación fue realizada en medio Landy adicionado con triptófano. El medio Landy fue preparado como sigue: ácido glutámico 5.0 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, NaCl 0.01 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g/L y triptófano (concentración final 5mM). Posteriormente, fue adicionada una solución de glucosa esterilizada por microfiltración (filtro de 0.2 μm) para una concentración final de 1 %. Fue realizado un preinóculo de *Bacillus* en 50 mL de medio Landy e incubado a 28 °C por 48 h. Del preinóculo fueron preparados los caldos de fermentación a una concentración de 1×10^7

µm filter) until reaching a final concentration of 1 %. The *Bacillus* grew in 50 mL of Landy medium. We incubated them at 28 °C for 48 h for pre-inoculation. The fermentation broths grew in 1x10⁷ CFU /mL's medium concentration and they underwent stirring at 120 rpm, under 25 °C during 72 h (Awais *et al.*, 2010).

Getting the cell-free supernatant.

In order to obtain the cell-free supernatant, we centrifuged *B. subtilis*' fermentation broths (BS8, BS14 and BSN) at 4 °C and 12,000 g (Centrifuge 5810/5810 R) during 10 min before filtering them for sterilization, using a 0.20-µm microfilter.

Detection of siderophores, using CAS.

For the siderophores detection, we used Brian *et al.* (2011) technique. The technique uses chrome azurol S (CAS) and hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA), as well as indicators (Abdel - Aziz, 2013).

Quantification of auxins and jasmonic acid by HPLC.

We used UV-coupled HPLC for the auxins (IAA, tryptamine, 3-indoleacetonitrile) and jasmonic acid quantification in *B. subtilis*' fermentation broth. The calibration curves required reactive standards within 1 to 1000 ppm range in mobile phase (methanol-water-acetic acid in a 60:40:1 ratio). 50 mL of the fermentation supernatant went into the sample preparation, adjusting the pH at 2.8 with HCl 1M. We did three extractions with 50 mL of ethyl acetate and we combined the organic phases before adding anhydrous sodium sulfate to remove moisture (Castillo *et al.*, 2005). The solvent was removed with a rotary evaporator at 60 °C. Finally, the residue was re-suspended with 2 mL of the mobile phase (methanol-water-acetic acid in a 60:40:1 ratio) before micro-filtration. The chromatographic separation included a reverse phase with C18 column, using the above-mentioned mobile phase (previously degassed) with 0.7 mL/min flow rate. We used UV of 296 nm to conduct the detection before the interpolation at the calibration curve (Castillo *et al.*, 2005).

Assessment of seed's growth promotion.

The seeds of *Solanum lycopersicum* and *Arabidopsis thaliana* were treated with cell-free supernatant and with fermentation broth, in order to assess the germination percentage. In order to assess the

CFU/mL en el medio, se agitaron a 120 rpm a 25 °C por 72 h (Awais *et al.*, 2010).

Obtención de sobrenadante libre de células.

Para la obtención de los sobrenadantes libres de células, los caldos de fermentación de *B. subtilis* (BS8, BS14 y BSN) fueron centrifugados a 4 °C y 12,000 g (centrífuga 5810/5810 R) por 10 min y posteriormente fueron filtrados para esterilización con un microfiltro de 0.20 µm.

Detección de sideróforos por medio CAS.

Para la detección de sideróforos se utilizó la técnica de Brian *et al.* (2011). La técnica está basada en el uso de cromo azurol S (CAS) y bromuro dehexadeciltrimetilamonio (HDTMA) e indicadores (Abdel-Aziz, 2013).

Cuantificación de auxinas y ácido jasmónico por HPLC.

Se utilizó HPLC acoplado a UV para la cuantificación de auxinas (IAA, triptamina, 3-indolilacetónitrilo) y ácido jasmónico en los caldos de fermentación de *B. subtilis*. Para las curvas de calibración se utilizaron estándares grado reactivo en un rango de 1 a 1000 ppm en fase móvil (metanol-agua-ácido acético en una relación 60:40:1). Para la preparación de las muestras, se tomaron 50 mL del sobrenadante de fermentación, se ajustó el pH a 2.8 con HCl 1M y se realizaron 3 extracciones con 50 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y se les añadió sulfato de sodio anhidro para remover la humedad (Castillo, *et al.*, 2005). El solvente fue removido con rotavapor a 60 °C. Finalmente, el residuo fue resuspendido con 2 mL de fase móvil (metanol-agua-ácido acético en una relación 60:40:1) y se microfiltró. La separación cromatográfica se realizó en fase reversa con una columna C18, utilizando la fase móvil mencionada (previamente desgasificada) con un flujo de 0.7 mL/min. La detección se realizó con un UV a 296 nm y se interpoló en la curva de calibración (Castillo *et al.*, 2005).

Evaluación de promoción de crecimiento en semillas.

Semillas de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana* fueron tratadas con sobrenadante libre de células y con caldo de fermentación para la evaluación del porcentaje de germinación. Para la evaluación de los sobrenadantes, se mezcló medio Murasige y Skoog (MS) con 1 mL del sobrenadante por caja, antes de la solidificación del medio, y posteriormente se colocaron las semillas previamente esterilizadas. Para la evaluación de los caldos de fermentación, las semillas previamente esterilizadas, se sumergieron durante 30 min en los caldos

supernatant, we mixed Murasige and Skoog (MS) medium with 1 mL of supernatant by box, before solidification and we planted the seeds previously sterilized. In order to assess the fermentation broths, the previously sterilized seeds were soaked during 30 minutes in the broths, before introducing the Petri dishes in the boxes with MS medium. The boxes were staggered in a bioclimatic chamber at 25 °C with a 16/8 light-darkness photoperiod. We measured the seed germination percentage after 7 days of starting the experiment. There were nine replicates (seeds) using a fully randomized ANOVA design; a significance level of 0.05 and Tukey's mean comparison test.

Assessment of growth promoting effect on seedlings treated with *B. subtilis*' fermentation broth.

We assessed the growth promoting effect by adding *B. subtilis*' fermentation broth to *Solanum lycopersicum* seedlings. The seeds of *Solanum lycopersicum* germinated in trays with peat moss substrate. 21 days after germination, we transplanted the seeds into containers with peat moss, perlite and vermiculite (3:2:1). We added 3 mL of the fermentation broth previously homogenized by stirring to the seedlings (BS8, BS14 and BSN) close to the roots, with a syringe. We had plants without treatments on Landy medium as control checks. Every treatment had seven replicates (Mena-Violante et al., 2009). After the treatments, we took daily measurements along the stem and the number of leaflets on those 60 days. On day 60, we assessed root length, seedling wet weight, root wet weight, seedling dry weight, stem and leaves wet weight, seedling moisture percentage and root moisture percentage (Gómez-Luna et al., 2012; Mena-Violante et al., 2009; Airola, 2010). The experiment used a fully randomized ANOVA design, with a significance level of 0.05 and Tukey's mean comparison test.

Results and Discussions

Siderophore synthesis.

The three strains of *B. subtilis* were capable of producing siderophores, as demonstrated by the halos in CAS media (Figure 1). According to Bolívar-Anillo et al. (2016), the siderophores make the iron available for the plants and promote their growth. Siderophores production is important to suppress deleterious microorganisms, because they monopolize the iron available in the soil and in some cases, they seem to unleash an induced systemic resistance response in plants (Suarez-Moreno et al., 2012).

y posteriormente las cajas petri se colocaron en las cajas con medio MS. Las cajas fueron colocadas verticalmente en una cámara bioclimática a 25 °C con fotoperiodo de 16/8 h de luz-obscuridad. El porcentaje de germinación de semillas fue evaluado después de 7 días que inició el experimento. El experimento fue realizado con 9 réplicas (semillas) con un diseño ANOVA totalmente al azar con un nivel de significancia de 0.05 y comparación de medias de Tukey.

Evaluación de promoción de crecimiento en plántulas tratadas con caldos de fermentación de *B. subtilis*.

La promoción de crecimiento se evaluó adicionando caldo de fermentación de *B. subtilis* a plántulas de *Solanum lycopersicum*. Las plántulas de *Solanum lycopersicum* se germinaron en charolas con sustrato turba de musgo. A los 21 días después de la germinación se transplantaron a contenedores con turba de musgo, perlita y vermiculita (3:2:1). Se adicionó a las plántulas 3 mL del caldo de fermentación (BS8, BS14 y BSN), homogenizado por agitación antes de la adición, cerca de las raíces con ayuda de una jeringa. Se utilizaron plantas sin tratamiento y con medio Landy como control. Cada tratamiento fue realizado con 7 repeticiones (Mena-Violante et al., 2009). A partir de la aplicación del tratamiento se tomaron mediciones diarias del largo del tallo y número de foliolos por 60 días. En el día 60 se evaluaron: largo de raíz, peso húmedo de plántulas, peso húmedo de raíz, peso seco de plántula, peso seco de raíz, peso húmedo de tallo y hojas, porcentaje de humedad de plántulas y porcentaje de humedad de raíz (Gómez-Luna et al., 2012; Mena-Violante et al., 2009; Airola, 2010). El experimento fue realizado bajo un diseño ANOVA completamente al azar con un nivel de significancia de 0.05 y comparación de medias de Tukey.

Resultados y Discusiones

Síntesis de sideróforos.

Las tres cepas de *B. subtilis* fueron capaces de producir sideróforos, según los halos observados en los medios CAS (Figura 1). Según Bolívar-Anillo et al. (2016), los sideróforos hacen más asequible el hierro para las plantas y promueven el crecimiento de las mismas. La producción de sideróforos se considera importante en la supresión de microorganismos deletéreos al monopolizar el hierro disponible en el suelo, y en algunos casos parece desencadenar resistencia sistémica inducida en las plantas (Suárez-Moreno et al., 2012).

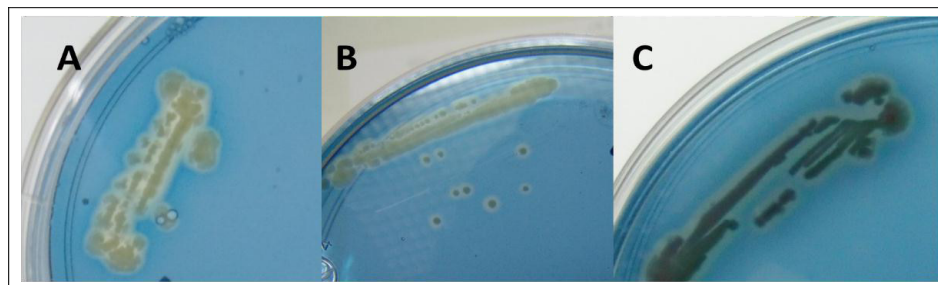


Figure 1. Siderophores halo in CAS medium. Where A is strain BS8, B is BS14 and C is BSN.

Figura 1. Halo de sideróforos en medio CAS. Donde A es la cepa BS8, B es BS14 y C es BSN.

Indole production.

In the quantification of indolic compounds, we observed that the test strains produce IAA and other indoles in variable concentrations. Table 1 shows the indole concentration in the strains. IAA concentration was high, as compared to the results of previous trials (Wahyudi *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2013) and that is why the strains had growth promoting effect. The presence of IAA precursors (Tryptamine and 3-indoleacetonitrile) indicate the strains' potential to produce more IAA under specific fermentation conditions. In general, auxin bacterial production, in particular IAA, has had a significant influence on plant growth and development (Sánchez *et al.*, 2012).

Jasmonic acid production.

From the three strains assessed, only BS8 produced jasmonic acid at a concentration of 54.48 ppm. Some growth promoting microorganisms like *Trichoderma* sp activate the plant defense mechanisms through jasmonic

Producción de índoles.

En la cuantificación de compuestos indólicos se observó que las cepas evaluadas producen IAA y otras índoles en concentraciones variables. La concentración de índoles en las cepas se presenta en la Tabla 1. La concentración de IAA fue elevada en comparación con estudios previos (Wahyudi *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2013), razón por la que las cepas tuvieron un efecto positivo en la promoción de crecimiento. La presencia de precursores de IAA (triptamina y 3-indolilacetónitrilo) indican el potencial de las cepas para producir más IAA bajo condiciones específicas de fermentación. En general, la producción de auxinas por las bacterias, especialmente el IAA, ha evidenciado influir significativamente en sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sánchez *et al.*, 2012).

Producción de ácido jasmónico.

De las tres cepas evaluadas solo la BS8 mostró producción de ácido jasmónico a una concentración de 54.48 ppm. Microorganismos promotores de crecimiento

Table 1.
IAA concentration, tryptamine and 3-indoleacetonitrile in *B. subtilis*
fermentation broth quantified by HPLC and expressed in $\mu\text{g/L} \pm \text{D.E. L.}$

Tabla 1.
Concentración de IAA, triptamina y 3-indolilacetónitrilo en caldos de fermentación
de *B. subtilis* cuantificado por HPLC. Expresado en $\mu\text{g/L} \pm \text{D.E. L.}$

	IAA	Tryptamine	3-indoleacetonitrile
BS8	129.53 \pm 3.23	387.64 \pm 29.84	352.64 \pm 19.37
BS14	147.80 \pm 3.03	136.74 \pm 50.20	194.33 \pm 8.73
BSN	113.39 \pm 6.8	605.54 \pm 39.60	118.04 \pm 4.74

acid, and they can take part in the production of salicylic acid, a messenger of acquired systemic resistance (Alcedo & Reyes, 2018) that also stimulates plant's growth.

Germination percentage.

There was no increase in the germination percentage of *Solanum lycopersicum* seeds treated with *B. subtilis* and its metabolites. However, the germination percentage increased in *Arabidopsis thaliana* with the supernatant addition (metabolites) of strain BS14, and with the addition of germination broths BS8 and BS14. BSN caused a decrease in the germination percentages. Figure 2 shows the germination percentages of *Arabidopsis thaliana*.

como *Trichoderma* sp. activa el mecanismos de defensa de la planta a través del ácido jasmónico, pudiendo también intervenir en la producción del ácido salicílico, mensajero de resistencia sistémica adquirida (Alcedo & Reyes, 2018). De esta forma estimulan el crecimiento de plantas.

Porcentaje de germinación.

No se mostró incremento en los porcentajes de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* tratadas con *B. subtilis* o sus metabolitos. En cuanto a *Arabidopsis thaliana* el porcentaje de germinación incrementó con la adición del sobrenadante (metabolitos) de BS14, y con los caldos de fermentación de BS8 y BS14. BSN provocó un decremento en los porcentajes de germinación. Los porcentajes de germinación de *Arabidopsis thaliana* se muestran en la Figura 2.

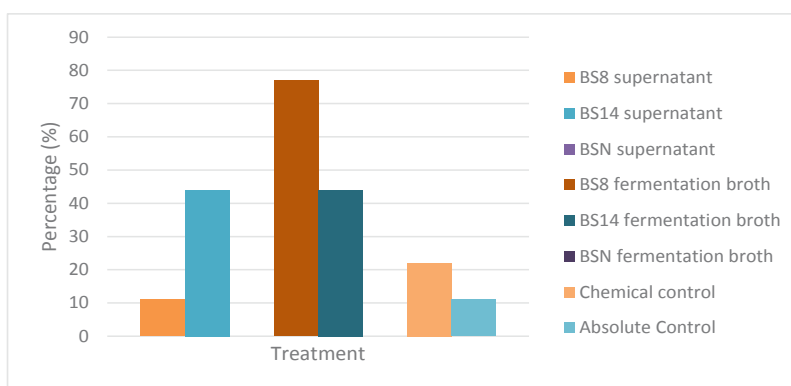


Figure 2. Germination percentages of *Arabidopsis thaliana* seeds after 7 days of adding the supernatants and *B. subtilis* strains' fermentation broth treatments.

Figura 2. Porcentajes de germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* a los 7 días de ser tratadas con sobrenadantes o caldos de fermentación de cepas de *B. subtilis*.

Liu *et al.* (2013), demonstrated that auxins reduce seed dormancy by stimulating abscisic acid signaling. The test strains had auxin production capacity (IAA, tryptamine and 3-indoleacetonitrile), so the germination percentage might be associated to these metabolites. After measuring the germination rates, the control seeds were contaminated with pathogens, while *B. subtilis* seeds remained free from pathogens. This effect might be attributed to the strains capacity of producing siderophores, which according to previous research works, have the capacity of controlling pathogens by limiting iron availability (Jung *et al.*, 2006; Cazorla *et al.*, 2007; Woo & Kim, 2008; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011).

Liu *et al.* (2013), demostraron que la dormancia de las semillas es reducida por la presencia de auxinas a través de la estimulación de señalización del ácido abscísico. Las cepas de estudio demostraron la capacidad para producir auxinas (IAA, triptamina y 3-indolilacetónitrilo), por lo que la promoción en el porcentaje de germinación esta posiblemente relacionada a estos metabolitos. Posteriormente a la toma de lecturas de germinación, las semillas control se contaminaron con patógenos, pero no aquellas semillas con tratamiento de *B. subtilis*, esto se puede atribuir a la capacidad de las cepas de producir sideróforos, que según investigaciones previas, tienen la capacidad de controlar patógenos por limitar la disponibilidad de hierro (Jung *et al.*, 2006; Cazorla *et al.*, 2007; Woo & Kim, 2008; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011).

Stem Length.

B. subtilis test strains produced longer stems in *Solanum lycopersicum* seedlings. The three treatments presented significant differences according the statistical analysis. BS8 (a) increased stem length by 45 %, BS14 (b) by 33 %, and BSN (c) by 17 % in comparison to the absolute control, CA (e).

Number of leaflets.

BS8 (a) produced the highest number of leaflets, followed by BS14 (b), BSN (bc) and the controls (bc) Figure 3). The increase in the number of leaflets relates to the presence of auxins in the fermentation broths. Auxins delay the abscission of organs (leaves, fruits and young fruits) by inhibiting the ethylene hormone (Van Doorn & Stead, 1997). The stem length and the leaflet number results proved that BS8 is the best treatment, maybe due to the production of other phytohormones like cytokinins. Previous research works have associated the accumulation of cytokinins to an increase in plant's weight (30 %), combined with high levels of hormones like IAA and abscisic acid (ABA) (Arkhipova *et al.*, 2005; Rojas-Solis *et al.*, 2013).

Root length.

Root length had no significant differences versus the control checks. However (Figure 3), BS8 produced higher quantity of secondary roots. Jordan & Cassareto (2006) mention that high concentrations of IAA promote stem elongation but inhibit root growth, while low concentrations of IAA induce root growth. Optimal concentration of IAA differs in every plant species. In this work, metabolite concentrations promoted stem length but did not promote root length.

Wet weight.

Wet root weight results do not show any significant difference among treatments. Regarding seedling wet weight, BS8 (a) is better than CA (b) and BS14 (b), but it is not better than CQ (ab) and BSN (ab). The effectiveness of BS8 in increasing wet weight could be due to the increase of L-tryptophan in the culture medium. o. Ali *et al.* (2009) found that different isolates of *Bacillus* sp. Increased IAA concentration by increasing L-tryptophan concentration.

Dry weight.

Root dry weight showed no significant differences. In the seedling dry weight trial, only treatment BS8 (a)

Largo de tallo.

Las cepas de *B. subtilis* evaluadas mostraron promoción en el largo del tallo de las plántulas de *Solanum lycopersicum*. Los tres tratamientos presentaron diferencias significativas según el análisis estadístico (Figura 3). BS8 (a) incrementó el largo del tallo en un 45 %, BS14 (b) en 33 %, y BSN (c) en un 17 % respecto al CA (e).

Número de folíolos.

BS8 (a) mostró el mayor número de folíolos, seguido de aquellos tratados con BS14 (b), BSN (bc) y los controles (bc) (Figura 3). El incremento en número de folíolos se relaciona a la presencia de auxinas en los caldos de fermentación. Las auxinas retrasan la abscisión de órganos (hojas, flores y fruto joven) por inhibición de la hormona etileno (Van Doorn & Stead, 1997). Como se muestra en las evaluaciones del largo del tallo y número de folíolos, BS8 es el mejor tratamiento, probablemente se debe a la producción de otro tipo de fitohormonas como citoquininas. En previos estudios se ha asociado la acumulación de citoquininas al incremento de peso de plantas (30 %), en complejo con altos niveles de hormonas como IAA y ácido abscísico (ABA) (Arkhipova *et al.*, 2005; Rojas-Solis *et al.*, 2013).

Largo de raíz.

No se observaron diferencias significativas en el largo de raíces respecto a los controles (Figura 3). No obstante, BS8 presentó mayor cantidad de raíces secundarias. Jordan & Cassareto (2006) indican que altas concentraciones de IAA promueven la elongación del tallo pero inhibe el crecimiento de raíz, mientras que bajas concentraciones de IAA induce el crecimiento de raíz. La concentración óptima de IAA depende de cada especie vegetal, sin embargo, en el presente trabajo, las concentraciones de metabolitos promovieron el largo del tallo pero no el largo de raíz.

Peso húmedo.

Los resultados del peso húmedo de raíz no muestran diferencia significativa entre tratamientos (Figura 3). En cuanto al peso húmedo de plántula, BS8 (a) es mejor que CA (b) y BS14 (b), pero no mejor que CQ (ab) y BSN (ab). La efectividad de BS8 en el incremento de peso húmedo se podría lograr incrementando la concentración de L-triptófano en el medio de cultivo. Ali *et al.* (2009) encontraron que diferentes aislamientos de *Bacillus* sp. aumentaron la concentración de IAA producido al aumentar la concentración de L-triptófano.

Peso seco.

No se observó diferencia significativa en el peso seco de raíz (Figura 3). En la prueba de peso seco de

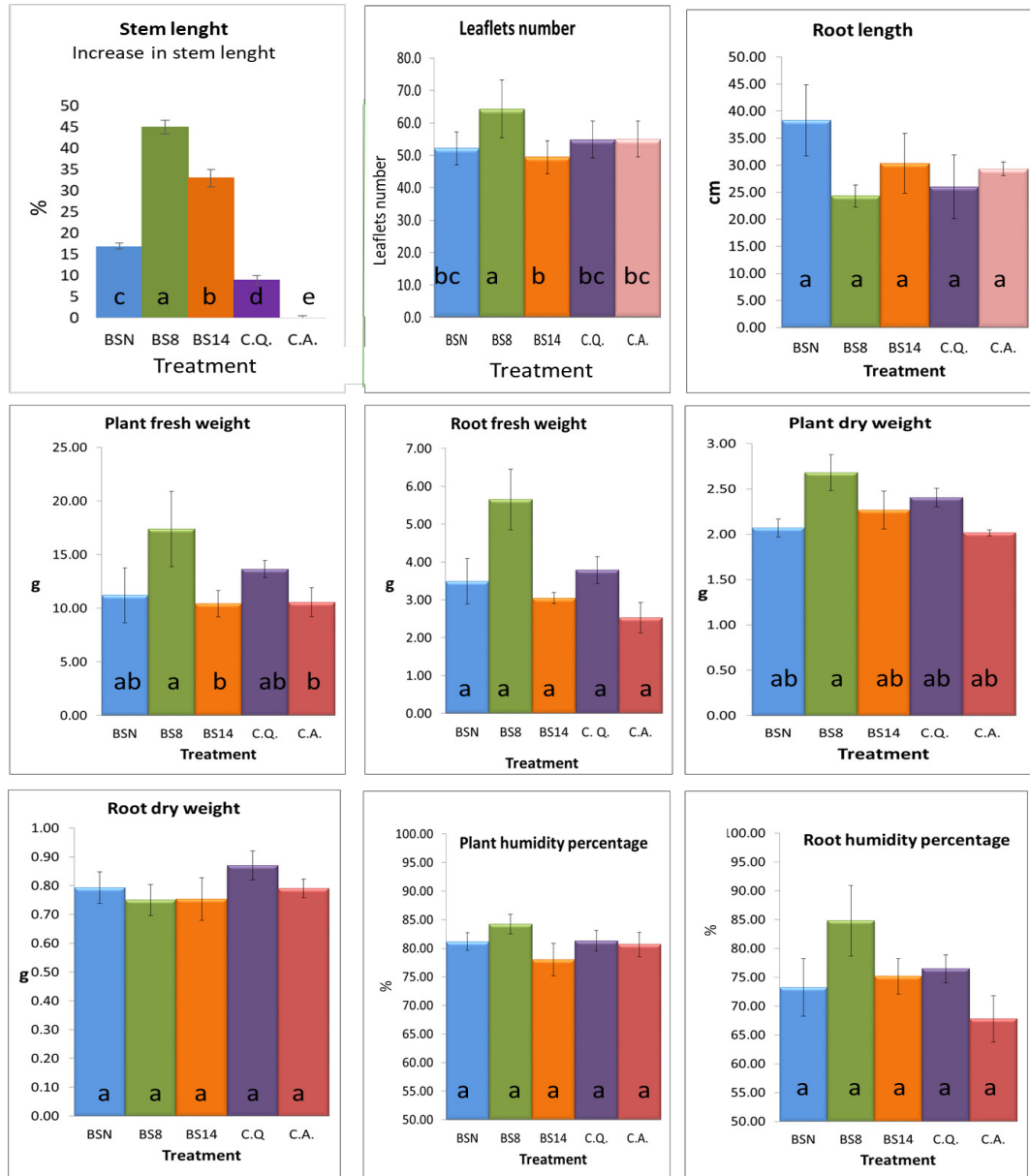


Figure 3. Agronomic parameters assessed in seedlings treated with *B. subtilis* strains (BSN, BS8, BS14) chemical control (C.Q.) and absolute control (C.A.).

Figura 3. Parámetros agronómicos evaluados en plántulas tratadas con cepas de *B. subtilis* (BSN, BS8, BS14), control químico (C.Q.) y control absoluto (C.A.).

gave better results than CA (b). BS14 (ab), BSN (ab), CQ (ab) did not present significant differences other than the ones mentioned before. According to Marquina *et al.* (2018), the addition of tryptophan to the plants can promote a dry weight increase. Therefore, a higher concentration of tryptophan in the culture media could have promoted higher dry weights in the seedlings.

Moisture percentage.

We did not find any significant differences between the treatments and the control checks regarding the percentage of moisture in the roots and seedlings. These results lead to the dry and wet weights of roots and seedlings that had significant differences, with the exception of BS8 treatments.

The results show that it is possible to mix the test strains in bio-formulations to promote different agronomic parameters, other than the parameters they promote individually. The rhizobacteria interactions with the host proved positive interaction with *Bacillus* spp. to promote growth (Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

Conclusions

The concentration of growth promoting metabolites and their interaction with other metabolites (antagonism or synergism) have an impact on the growth of any particular parameter. Therefore, it is possible to use PGPR's metabolic profiles to predict their effect on plants. Bacteria that produce the right concentration of metabolites promote growth, whereas PGPRs that produce metabolites in too high or too low quantities, inhibit plant growth. Therefore, we conclude that in order to select a strain, it is necessary to define the parameter and the stage where we want to promote growth.

References

- Abdel-Aziz (2013). Extracellular Metabolites produced by a novel strain, *Bacillus alvei* NRC-14:5. Multiple plant-growth promoting properties. *J. Basic Appl. Sci. Res* 3(1): 670-682.
- Aguado-Santacruz, Gerardo, A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., and Preciado-Ortiz, R.E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1): 9-21. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802012000100004&script=sci_arttext&tlng=en

plántula, solo el tratamiento BS8 (a) fue mejor que CA (b), BS14 (ab), BSN (ab), CQ (ab) no presentaron diferencias significativas a los antes mencionados. Según los estudios de Marquina *et al.* (2018) la adición de triptófano a las plantas puede promover el incremento en el peso seco. Por lo que probablemente mayor concentración de triptófano en los medios de cultivo habría promovido el peso seco de las plántulas.

Porcentaje de humedad.

En cuanto al porcentaje de humedad de plántula y raíz no se observaron diferencias significativas de los tratamientos respecto a los controles (Figura 3). Esto se relaciona a los resultados obtenidos tanto de peso húmedo como seco de raíz y plántula. Las cuales en su mayoría no mostraron diferencia significativa a excepción de los tratamientos con BS8.

Los resultados muestran que las cepas evaluadas podrían ser mezcladas en bioformulados para promover diferentes parámetros agronómicos a los que promueven de forma individual. Se ha demostrado que las interacciones de las rizobacterias del hospedero interactúan favorablemente con *Bacillus* spp. para la promoción de crecimiento (Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

Conclusiones

Las concentraciones de los metabolitos promotores de crecimiento así como su interacción con otros metabolitos (antagonismo o sinergismo) influyen en el crecimiento de las plantas en un parámetro en particular. Por lo que la realización de perfiles metabólicos de las PGPR podrían ser utilizados para predecir el efecto que tendrán en la planta. Las bacterias que producen las concentraciones correctas de metabolitos promueven el crecimiento, mientras que las que producen metabolitos en cantidades deficientes o excesivas inhiben el crecimiento de plantas. Por lo que se concluye que para seleccionar una cepa se debe definir el parámetro y etapa en la que se quiere promover el crecimiento.

- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163: 173-81. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Airola, G.V.M. (2010). Compostas líquidas con bacterias promotoras de crecimiento en la nutrición de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis. Instituto Politécnico Nacional. Cd. De México, México.
- Alcedo, Y. C., & Reyes, I. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagro*, 30(1): 59-66 [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev30\(1\)/6.%20ms%201705.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev30(1)/6.%20ms%201705.pdf)
- Alfonso E.T., Leyva A.H. and Hernandez A. (2005). Microorganismo Benéficos como Biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2: 47-54. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2351591>
- Ali, B.; Sabri, A.; Ljung, K. and Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25(3): 519-526. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9918-9>
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., and Kudoyarova, G.R. (2005). Ability of bacterium *B. subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 272: 201-209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
- Awais M., Pervez, A., Yaqub, A., and Shah, M. M. (2010). Production of Antimicrobial Metabolites by *B. subtilis* immobilized in Polyacrylamide Gel. *Pakistan J. Zool*, 42(3): 267-275, [http://zsp.com.pk/pdf/267-276%20\(11\).pdf](http://zsp.com.pk/pdf/267-276%20(11).pdf)
- Berg, G. (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 11-18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- Bharucha, U., & Patel, K. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Investigacion Agricola* 2(3): 215–221. <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>
- Blakeslee, J.J., Ann P. W., and Murphy, A. (2005). mdr/PGP Auxin transport proteins and endocytic cycling. *Plant Endocytosis* 1: 159-176. https://link.springer.com/chapter/10.1007/7089_010
- Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., and Teherán-Sierra, L. G. (2016). Burkholderia tropica una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 19(2), 102-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>
- Brian, C., Daniel, H. and Aeron, M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Education*, 12(1), <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- Buensanteai, N., Yuen, G.Y. and Prathuangwong, S. (2008) The biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of soybean plant. *Thai Journal of Agriculture Science*. 41(3-4): 101-116. www.researchgate.net/profile/Natthiya_Buensanteai2/publication/268337617_The_Biocontrol_Bacterium_Bacillus_amyloliquefaciens_KPS46_Produces_Auxin_Surfactin_and_Extracellular_Proteins_for_Enhanced_Growth_of_Soybean_Plant/links/56e51f4408ae98445c1efdf.pdf
- Calvo P. & Zuñiga D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1): 31-39 <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v9n1/a04v9n1>
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J. and Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27:137-142,2005. [https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2255/1/AB27%20\(2005\)%20p%20137-142.pdf](https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2255/1/AB27%20(2005)%20p%20137-142.pdf)
- Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J.J., de Vicente, A., and Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization displaying biocontrol activity. *Journal of Applied*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>
- Choudhary, D. K. & Johri, B.N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological research*. 164(5), 493-513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Clayet-Marcel, J., Larcher, M., Bartrand, H., Rapior, S. and Pinochet, X. (2001). Plant growth enhancement by rhizobacteria. Nitrogen assimilation by plant: physiological, biochemical, and molecular aspects. En: JF Morot-Gaudry, editor. Science publishers Inc., Enfield.
- Glick, B. R., Karaturovic, D. M. and Newell, P. C. (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian journal of microbiology*, 41(6), 533-536. <https://www.researchgate.net/profile/Ber>

- nard_Glick/publication/237194178_A_novel_procedure_for_rapid_isolation_of_plant_growth_promoting_pseudomonads/links/5b8d94d145851540d1c3d72c/A-novel-procedure-for-rapid-isolation-of-plant-growth-promoting-pseudomonads.pdf
- Gómez-Luna, B. A., Hernández-Morales A., Herrera Méndez C.H., G., Arroyo-Figueroa G., Vargas-Rodríguez, L. and Olalde-Portugal V. (2012). Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba. (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3. pp. 97-102. ISSN: 1665-0441. Disponible en: http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25aarticulosPDF/10.-AISLAMIENTO%20DE%20BACTERIAS%20PROMOTORAS-Blanca_Alejandro_Carlos_Gabriela_Lorena_Victor.pdf
- Haas, H. & D'Éfago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 307-319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Jordan M. & Casaretto J. (2006) Hormonas y Reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberilinas y Citocininas. Capítulo XV. Fisiología Vegetal. F.A. Squeo y L. Cardemil, eds. Ediciones Universidad de la Serena, Chile(2006)15;xx-xx. <http://listas.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/AuxinasgiberelinasyCitocininas.pdf>
- Jung, H. K., Kim, J. R., Woo, S. M., and Kim, S. D. (2006). An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *B. subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200629734295650.page>
- Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H. Q., Luan S., Li J., and He Z. H. (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38): 15485-15490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304651110>
- Luna Martínez, L., Martínez Peniche, R. A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu Medrano, S. M., and Pacheco Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1): 63-69. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000100007
- Mantilla M.E. (2007). Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Yoko ono) en período de enraizamiento. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 1-127 <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8381/tesis35.pdf?sequence=1>
- Marquina, M. E., Ramírez, Y., and Castro, Y. (2018). Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annum* L. Var. cacique gigante. *Bioagro*, 30(1), 3-16. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v42n2/0377-9424-ac-42-02-75.pdf>
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. and Mora, M. L. (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* 10(3): 293-319. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>
- Mena-Violante H., Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O., Gómez-Lim, M. A. and Olalde-Portugal, V. (2009). Fruit texture related changes and enhanced shelf-life through tomato root inoculation *B. subtilis* BEB-13BS. *Agrociencia*. <http://www.redalyc.org/html/302/30215549001>
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Cawoy, H, Brostaux, Y., Kakana, P., Jourdan, E. and Thonart, P. (2010). Beneficial effects of *B. subtilis* on field-grown tomato in Burundi: Reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion. *African Journal of Microbiology Research*, 4(11): 1135-1142. https://www.researchgate.net/profile/Helene_Cawoy/publication/208603658_Beneficial_effects_of_Bacillus_subtilis_on_field-grown_tomato_in_Burundi_Reduction_of_local_Fusarium_disease_and_growth_promotion/links/00b4952cc0c1733e63000000/Beneficial-effects-of-Bacillus-subtilis-on-field-grown-tomato-in-Burundi-Reduction-of-local-Fusarium-disease-and-growth-promotion.pdf
- Rentería, G. A. (2013). Nutrición de tomate y producción de licopeno (Tesis de Maestría) Ciencias con especialidad de Edafología. Colegio de Postgraduados. México.
- Rojas-Solis, D., Contreras-Pérez, M. and Santoyo, G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas* 15(2): 36-41. https://s3.amazonaws.com/academia.edu/documents/35324550/Mecanismos_promotores_de_Bacillus.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBiologicas_Diciembre_2013_15_2_36-41_Mec.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190703%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4

- [request&X-Amz-Date=20190703T193817Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=b8a9dff3fff8bcd882d661f0f655c97cafa363023e4fb336de7336939c0c2035](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342012000700009&script=sci_arttext)
- Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F. and 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), 1401-1415. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342012000700009&script=sci_arttext
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4): 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Suárez-Moreno, Z.R. et al. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. *Ecología Microbiana* . 63: 249-266 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9929-1>
- Tejera-Hernández, B., Marcia, M. Rojas-Badía, M. and Heydrich-Pérez (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 42(3): 131-138. <http://www.redalyc.org/html/1812/181222321004/>
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A. and Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry Microbiology* 42(2): 117-126. <https://link.springer.com/article/10.1134%2FS0003683806020013?LI=true>
- Van Doorn & Stead. 1997. Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental Botany* 48: 821–837. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.4.821>
- Wahyudi, A. T., Astuti, R. P., Widyawati, A., Meryandini, A. and Nawangsih, A. (2011) Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of . Microbiology and Antimicrobials* 3: 34-40. <http://www.academicjournals.org/journal/JMA/article-full-text-pdf/148DAF29759>
- Woo, S. M., & Kim, S. D. (2008). Structural Identification of Siderophore AH18 from *B. subtilis* AH18, a Biocontrol agent of *Phytophthora* Blight Disease in Red-pepper. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(4): 326-335. http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=MSMSBV_2008_v36n4_326
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., and Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *B. subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2): 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>