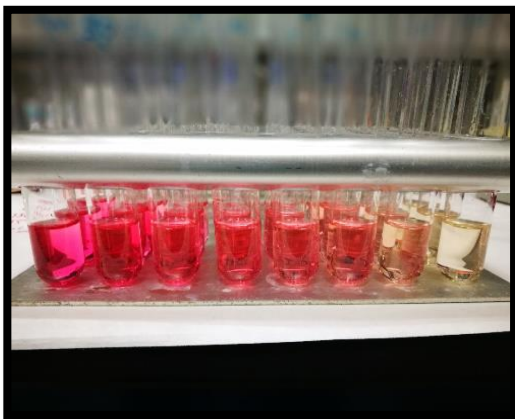


BÚSQUEDA DE AGENTES ESTIMULANTES DEL
CRECIMIENTO VEGETAL A PARTIR DE COMPOST
PROCEDENTE DE RESTOS HORTÍCOLAS:
PRODUCCIÓN DE VITAMINAS Y FITOHORMONAS



PATRICIA VASCO DELGADO

2017



ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

**Máster Universitario de Investigación en
Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos**



BÚSQUEDA DE AGENTES ESTIMULANTES DEL
CRECIMIENTO VEGETAL A PARTIR DE COMPOST
PROCEDENTE DE RESTOS HORTÍCOLAS:
PRODUCCIÓN DE VITAMINAS Y FITOHORMONAS

Vº Bº DIRECTOR

Fdo.: Joaquín Moreno Casco
Catedrático de Microbiología
Escuela Politécnica Superior
Universidad de Almería

Vº Bº CODIRECTOR

Fdo.: Francisca Suárez Estrella
Doctora en Ciencias Biológicas
Escuela Politécnica Superior
Universidad de Almería

ALUMNO

Patricia Vasco Delgado

Agradecimientos

Primero me gustaría agradecerle al director de este proyecto, Joaquín Moreno, por la oportunidad que me ha brindado de vivir esta experiencia y de poder trabajar con él y el resto del equipo. También quería agradecerle, su ayuda y dedicación a lo largo de todo este proyecto.

A Francisca Suárez, co-directora de este trabajo, agradecerle su trabajo infatigable y auténtica dedicación que me ha dado durante los últimos meses. Gracias no solo por todos los conocimientos que me ha aportado, que no han sido pocos, sino por ser un referente tanto en lo profesional como en lo personal.

Por supuesto a Nieves. Sin su ayuda, su trabajo, su dedicación, sus ánimos, en definitiva, sin ella este trabajo no hubiera sido posible.

A María José, María, Macarena, Juan, Enrique, Ana y Ani por su compañerismo, por estar siempre dispuestos a ayudarme en todo lo que necesitara y por enseñarme todo lo que les fue posible en el tiempo que estuve con ellos. Gracias por hacerlo todo más fácil y también más ameno.

También agradecerle al resto de personas del laboratorio que han coincidido conmigo pues todos han aportado su granito de arena en este trabajo.

A mi familia por su apoyo incondicional una vez más y como siempre.

A mis amigos Juan Pedro, Noelia, Sandra, Ana María, María José, Rocío, Mireya, Andrea y Anaís, por estar siempre dispuestos a echarme una mano y a sacarme una sonrisa.

A mi entrenador y mis compañeras de equipo, en especial a Bego y Raquel, por animarme y darme ese empujoncito para seguir adelante siempre.

A Sheila, por ser mi apoyo incondicional, por cada palabra de aliento, por cada abrazo, por hacer todo esto posible y por hacerlo más fácil.





UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a la alumna **D^a. Patricia Vasco Delgado**, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Búsqueda de agentes estimulantes del crecimiento vegetal a partir de compost procedente de restos hortícolas: producción de vitaminas y fitohormonas”, bajo la dirección de D. Joaquín Moreno Casco y D^a. Francisca Suárez Estrella, debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 23 de junio de 2017

La Directora del Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valoración de Residuos Orgánicos



 Miguel Hernández
 DE ELCHE
 FACULTAD DE ORIHUELA
 DEPARTAMENTO DE
 AGROQUÍMICA Y
 MEDIO AMBIENTE

Fdo.: Concepción Paredes Gil

TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MASTER

IDENTIFICACIONES

Autor: Patricia Vasco Delgado

Título: Búsqueda de agentes estimulantes del crecimiento vegetal a partir de compost procedente de restos hortícolas: producción de vitaminas y fitohormonas

Title: Searching of stimulants of plant growth from compost from vegetable remains: production of vitamins and phytohormones.

Director/es del TFM: Joaquín Moreno Casco y Francisca Suárez Estrella

Año: 2017

Titulación: Master en Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos

Tipo de proyecto: Trabajo Fin de Máster

Palabras claves: PGPR, PGPF, Niacina, Biotina, Ácido Pantoténico, Ácido Indolacético, AIA.

Keywords: PGPR, PGPF, Niacin, Biotin, Pantothenic Acid, Indolacetic Acid, AIA.

Nº citas bibliográficas: 68

Nº de tablas: 2

Nº de figuras: 8

RESUMEN

El incremento de las prácticas agrícolas intensivas ha provocado una disminución de la materia orgánica en los suelos agrícolas, lo que a su vez ha causado una pérdida de la fertilidad de los mismos. Una solución a este problema es la adición de materia orgánica al suelo mediante la aplicación de compost, que modifica tanto las propiedades físico-químicas como nutricionales del suelo, afectando a los niveles poblacionales microbianos. En respuesta a esta necesidad de generar cultivos limpios, se ha implementado el uso de microorganismos beneficiosos del suelo, también denominados promotores del crecimiento vegetal o PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria).

Se conoce que alrededor del 2 al 5% de las rizobacterias ejercen un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas. Las PGPR pueden promover el crecimiento de las plantas de manera directa, produciendo un metabolito o actividad capaz por sí misma de estimular el crecimiento vegetal, o de forma indirecta, cuando producen un metabolito que afecta a otros factores rizosféricos provocando una mejora o estimulación del crecimiento de la planta.

Dentro de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se encuentran especies pertenecientes a un gran número de géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. No sólo las bacterias pueden ejercer esta actividad beneficiosa, sino que también algunos hongos han demostrado tener similares características. A estos se les denomina PGPF (Plant Growth Plant Fungi). Numerosos hongos PGPF se han identificado hasta el momento, pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Phoma*.

En este estudio, han sido seleccionadas 10 cepas microbianas, 7 bacterias y 3 hongos, procedentes de un proceso de compostaje de restos vegetales, para evaluar su capacidad como posibles agentes promotores del crecimiento vegetal. En este sentido, se estudió su capacidad para producir las vitaminas Niacina, Biotina y Ácido Pantoténico, así como Ácido Indolacético, como principal representante de las fitohormonas.

Los resultados muestran que todas las cepas fueron capaces de producir al menos una de las vitaminas analizadas. Entre las cepas bacterianas, destacan *P. stutzeri* TER3A, *P. stutzeri* MESA2 y *B. licheniformis* MESD2, capaces de producir Niacina, Biotina, Ácido Pantoténico y Ácido Indolacético. Cabe mencionar además, el protagonismo alcanzado por los hongos seleccionados, los cuales superaron incluso a las bacterias en términos de producción de vitaminas.

ABSTRACT

The increase in agricultural practices has led to a decrease of organic matter in agricultural soils which causes a loss of fertility. A solution to this problem is the addition of organic matter to the soil by the application of compost, which modifies the physical-chemical properties and the nutritional properties of the soil, affecting microbial population levels. In response to this need to generate clean crops, the use of beneficial soil microorganisms, also called PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) has been implemented.

About 2 to 5% of the rhizobacteria exert a beneficial effect on plant growth. PGPRs may induce plant growth promotion directly, by producing a metabolite or activity able to stimulate plant growth, or indirectly, by producing a metabolite that changes other rhizospheric factors causing an improvement or stimulation of the growth of the plant.

Within plant growth promoting bacteria there are species belonging to a large number of bacterial genera such as *Azobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Bacillus*. Not only bacteria can do this beneficial activity, also fungi have been shown to have the same characteristics as PGPRs. These fungi are called PGPF. Several PGPFs have been identified until now, belonging to the genera *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Phoma*.

In this essay, 10 bacterial strains from plant based-compost (7 bacteria and 3 fungi), were selected to evaluate their capacity as possible PGPR and PGPF. To do this, we studied

its ability to produce both the vitamins Niacin, Biotin and Pantothenic Acid and the phytohormone Indolacetic Acid.

The results showed that all strains analysed were able to produce at least one of the stimulants of plant growth. Among the bacterial strains stand out *P. stutzeri* (TER3A), *P. stutzeri* (MESA2) and *B. licheniformis* (MESAD2), which were able to produce at different concentrations all the vitamins and phytohormone studied. It is also worth mentioning the role played by the selected fungi, which even exceeded the bacteria in terms of vitamin production.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
A.	SOLUCIONES A LA PÉRDIDA DE MATERIA ORGÁNICA EN SUELOS DE INTERÉS AGRÍCOLA.....	1
B.	MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGRP: PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA).....	2
C.	BACTERIAS PRODUCTORAS DE VITAMINAS Y FITOHORMONAS.....	4
1.	BIOTINA (VITAMINA B7).....	4
2.	ÁCIDO PANTOTÉNICO (VITAMINA B5).....	5
3.	NIACINA (VITAMINA B3).....	6
4.	ÁCIDO INDOL ACÉTICO.....	7
II.	OBJETIVOS.....	7
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
A.	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE COMPOSTAJE.....	8
B.	COLECCIÓN DE CEPAS.....	8
C.	MEDIOS DE CULTIVO.....	9
1.	MEDIOS DE CULTIVO GENERALES.....	10
2.	MEDIOS DE CULTIVO PARA AUXÓTROFOS.....	11
3.	MEDIOS DE CULTIVO PARA MEDIDAS DE FITOHORMONAS: ÁCIDO INDOLACÉTICO.....	14
4.	REACTIVOS.....	15
D.	MÉTODOS DE MEDIDA Y CUANTIFICACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE VITAMINAS.....	16
1.	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NIACINA A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS.....	17

2.	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOTINA A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS.....	18
3.	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PANTOTÉNICO A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS.....	19
4.	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS.....	19
E.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
A.	ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINAS IN VITRO.....	21
1.	PRODUCCIÓN DE NIACINA A PARTIR DE BACTERIAS.....	21
2.	PRODUCCIÓN DE NIACINA A PARTIR DE HONGOS.....	23
3.	PRODUCCIÓN DE BIOTINA A PARTIR DE BACTERIAS.....	25
4.	PRODUCCIÓN DE BIOTINA A PARTIR DE HONGOS.....	27
5.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PANTOTÉNICO A PARTIR DE BACTERIAS..	29
6.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PANTOTÉNICO A PARTIR DE HONGOS.....	31
7.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO A PARTIR DE BACTERIAS.	33
8.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO A PARTIR DE HONGOS....	36
9.	CARACTERIZACIÓN FINAL DE LAS CEPAS SELECCIONADAS CON RESPECTO A SU CAPACIDAD PARA PRODUCIR VITAMINAS Y FITOHORMONAS.....	38
V.	CONCLUSIONES.....	39
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	40

I. INTRODUCCIÓN

A. SOLUCIONES A LA PÉRDIDA DE MATERIA ORGÁNICA EN SUELOS DE INTERÉS AGRÍCOLA

El incremento de las prácticas agrícolas en los últimos años no solo ha provocado la generación y acumulación de residuos, sino que también ha favorecido la disminución de la materia orgánica en los suelos agrícolas, y por tanto la pérdida del carácter fértil de los mismos.

Según Seoáñez *et al.*, (1999b) la adición de materia orgánica supone un refuerzo importante en los suelos degradados, ya que modifica sus características físicas y químicas. La materia orgánica tiene casi siempre un elevado contenido en nutrientes, mejora la capacidad de retención del agua del suelo y favorece la germinación. Existen múltiples fuentes de materia orgánica adecuadas para la restauración del suelo, como los abonos animales, los residuos vegetales, los residuos fúngicos, los residuos domésticos, la turba o el compost. En este último caso, la aplicación de compost modifica tanto las propiedades fisicoquímicas como las nutricionales del suelo, lo que afecta a los niveles poblacionales microbianos (Schloter *et al.*, 2003). Los factores a través de los cuales el compost ejerce ese efecto estimulante sobre la población microbiana del suelo son evidentes. La presencia de materia orgánica estabilizada contribuye a mejorar las características estructurales del suelo, incrementando de este modo su disposición para actuar como hábitat idóneo para la microbiota edáfica (Vargas-García y Suárez-Estrella, 2008).

A pesar de la existencia de múltiples alternativas tradicionales, se hace imprescindible la búsqueda y puesta a punto de nuevos métodos que permitan incrementar la productividad agrícola junto con el desarrollo de una agricultura sostenible (Swaminathan, 1991).

B. MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGRP: PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA)

En respuesta a la necesidad de generar cultivos limpios, con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que afecten la salud humana, se ha estado implementado el uso de los microorganismos beneficiosos del suelo, ya que éstos pueden promover el crecimiento de las plantas y también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos. Estos microorganismos son los denominados PGRP (Plant growth-promoting rhizobacteria), rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Peña y Reyes, 2007).

Las rizobacterias son bacterias que se encuentra en la rizosfera, es decir, en el volumen de suelo que se encuentra alrededor y bajo la influencia de las raíces de las plantas. Son capaces de multiplicarse y colonizar el nicho ecológico que se encuentra en torno a la raíz durante todas las etapas de crecimiento de la planta. La interacción entre bacteria y raíz puede influir significativamente en el crecimiento de la planta y en el rendimiento de los cultivos (Pinton *et al.*, 2001; Werner, 2001; 2004).

La presencia de rizobacterias en los suelos agrícolas puede tener un efecto neutro, perjudicial o beneficioso sobre el crecimiento de la planta. El efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas por parte de las rizobacterias se produce debido a la producción de metabolitos fitotóxicos, de fitohormonas, de mecanismos de competencia por nutrientes o debido a la inhibición de los efectos beneficiosos derivados de la presencia de micorrizas (Nehl *et al.*, 1996; Sturz and Christie, 2003)

Alrededor del 2 al 5% de las rizobacterias ejercen un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas. Estas son las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGRP, Plant growth-promoting rhizobacteria) (Kloepper y Schroth, 1978). En su inicio, el concepto PGRP se restringía a las bacterias de vida libre, para diferenciarlas así de los rizobios fijadores de nitrógeno. Sin embargo, según la bibliografía consultada, se puede considerar PGRP a cualquier bacteria colonizadora de las raíces vegetales que favorece, de algún modo, el crecimiento de la planta (Antoun y Prevost, 2005).

Las PGPR pueden promover el crecimiento de las plantas de manera directa o indirecta (Beauchamp, 1993; Kloepper, 1993; Kapulnik, 1996; Lazarovits y Nowak, 1997).

Los mecanismos directos son aquellos donde la bacteria produce un metabolito o actividad capaz por sí misma de estimular el crecimiento vegetal. Aquí se incluye la producción de volátiles bacterianos estimulantes y de fitohormonas, la disminución del nivel de etileno en la planta, la mejora del estado nutricional mediante la liberación de fosfatos y micronutrientes de fuentes insolubles, la fijación no simbiótica de nitrógeno, y la estimulación de mecanismos de resistencia a enfermedades vegetales (Jacobsen, 1997).

Los efectos indirectos, en cambio, se originan cuando los PGPR liberan algún metabolito que afecta a otros factores rizosféricos provocando una mejora o estimulación del crecimiento de la planta. De esta manera, actúan como agentes de biocontrol reduciendo las enfermedades, estimulando otras simbiosis beneficiosas, o protegiendo a la planta degradando xenobióticos en suelos contaminados (Jacobsen, 1997). Son, por tanto, estos mecanismos los que se atribuyen típicamente a los agentes microbianos denominados de “control biológico”.

Existen diferentes criterios para clasificar los agentes microbianos de control biológico. Somers *et al.* (2004) los clasificaron como:

- Biofertilizantes, los cuales aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas
- Fitoestimuladores, que fomentan el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas
- Rizodemiadores, que degradan los contaminantes orgánicos del entorno de las rizosfera
- Biopesticidas, que controlan las enfermedades vegetales gracias a la producción de antibacterianos y antifúngicos, entre otros mecanismos de control.

Bashan y Holguín (1998) propusieron la división de los agentes promotores del crecimiento vegetal en dos clases: agentes PGPB estrictamente dichos (Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal), y agentes biocontrol, cuando se refiere a bacterias que controlan fitopatógenos, bien produciendo sustancias inhibidoras o bien incrementando la resistencia

natural de la planta. Esta clasificación puede incluir bacterias beneficiosas que no se encuentran en la rizosfera, y por lo tanto que no son consideradas ampliamente como rizobacterias.

Dentro de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se encuentran especies pertenecientes a un gran número de géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Tang, 1994; Probanza et al., 1996).

Un grupo de hongos ha demostrado tener las mismas características que las tradicionales PGPR. Estos hongos promotores del crecimiento de las plantas (denominados PGPF, del inglés "Plant growth-promoting fungi") son no patógenos, habitualmente encontrados en suelos, y que tienen efectos beneficios sobre los vegetales. Se han identificado varios PGPF hasta el momento, pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Phoma*. Los estudios de nuevos PGPF se han centrado en la búsqueda de cepas productoras de fitohormonas, cepas solubilizadoras de minerales, cepas productoras de enzimas de hidrolíticas, micoparásitos o inductores de resistencia sistémica vegetal. La colonización de las raíces se considera una de las características más importantes de los PGPF, de modo que les ayuda a interactuar con las plantas mejorando el crecimiento y la protección de las mismas (Dewan y Sivasithamparam, 1989; Hyakumachi, 1994; Masunaka et al., 2011).

C. BACTERIAS PRODUCTORAS DE VITAMINAS Y FITOHORMONAS

1. BIOTINA (VITAMINA B7)

La biotina es una vitamina hidrosoluble esencial para la vida de todos los organismos, la pueden sintetizar las plantas, la mayoría de las bacterias y algunos hongos (Alban et al., 2000), pero no los animales; y es capaz de regular su propia síntesis a concentraciones muy bajas (Knowles, 1989).

En todos los organismos sirve como cofactor de enzimas implicadas en la transferencia de CO₂ durante las reacciones de carboxilación, descarboxilación y transcarboxilación (Dakshinamurti y Chauhan, 1989; Knowles, 1989). En plantas, su función

clásica es como cofactor de las carboxilasas. Sin embargo, también se ha descubierto su participación en la defensa, la muerte, el crecimiento y el desarrollo celular (Li *et al.*, 2012; Maruyama *et al.*, 2012).

Pese a la función básica de la biotina como cofactor de carboxilasas, no se ha concretado aún su papel específico en la interacción planta-PGPB. Sin embargo, en algunas bacterias como *Sinorhizobium meliloti*, pese a no ser esencial, promueve su crecimiento en medios de cultivo artificiales y en el suelo (Heinz *et al.*, 1999). En este caso, cuando la biotina está disponible en la rizosfera de las plantas, favorece que la bacteria utilice su reserva de PHB (poli- β -hidroxibutirato), lo que la convierte en más competitiva en su entorno rizosférico. Esta inducción se produce gracias a la expresión de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa, que es imprescindible para la degradación del PHB en *S. meliloti*. Esta enzima se regula por la disponibilidad de biotina. El resultado de este proceso es un rápido catabolismo del PHB almacenado, en respuesta a la biotina exudada por parte de la planta, que permite a la bacteria colonizar rápidamente la rizosfera y contribuir de inmediato a la formación de nódulos radiculares y a la fijación de N_2 (Hofmann *et al.*, 2000).

La producción de biotina por parte de agentes promotores del crecimiento vegetal ha sido comprobada en *Pseudomonas fluorescens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium spp.*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus subtilis*, *Achromobacter sp.*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, and *Azospirillum spp.* (Dahm *et al.*, 1993; Entcheva *et al.*, 2002; Frappier y Marquet, 1981; González-López *et al.*, 1983; Guillén-Navarro *et al.*, 2005; Heinz *et al.*, 1999; Marek-Kozaczuk y Skorupska, 2001; Revillas *et al.*, 2000; Sakurai *et al.*, 1993; Streit y Entcheva, 2003; Sullivan *et al.*, 2001).

2. ÁCIDO PANTOTÉNICO (VITAMINA B5)

El Ácido Pantoténico es un precursor metabólico de la coenzima A (CoA) y la proteína transportadora de grupos acilos (ACP), que son cofactores necesarios para un gran número de enzimas metabólicas (White *et al.* 2001). La biosíntesis del Ácido Pantoténico ocurre en los microorganismos y las plantas, mientras que en los animales es obtenido en su dieta. En las bacterias, este ácido es sintetizado por la condensación de ácido pentoico, derivado de α -cetoisovalerato, un intermediario en la biosíntesis de valina y β -alanina,

producido por la descarboxilación del L-aspartato (Primerano y Burns, 1983; White *et al.*, 2001).

El papel del Ácido Pantoténico en la interacción planta-PGPB es poco conocido. Escasas investigaciones, en este sentido, se han llevado a cabo, desde aquellos primeros estudios de McBurney *et al.*, (1935), sobre la producción de Ácido Pantoténico por parte de la rizobacteria *S. meliloti*.

Entre los PGPB que producen Ácido Pantoténico se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium spp.*, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum Spp.* (Dahm *et al.* 1993; Marek-Kozaczuk y Skorupska 2001; Martínez-Toledo *et al.* 1996; Revillas *et al.* 2000; Rodelas *et al.* 1993; Sierra *et al.* 1999).

3. NIACINA (VITAMINA B3)

El término Niacina engloba un amplio descriptor de vitaminas que incluye el ácido nicotínico y una variedad de estructuras derivadas de la piridina (Kirkland, 2007). Las formas biológicamente activas de los compuestos de la niacina, la nicotina adenina dinucleótido (NAD) y la nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADP), intervienen en vías metabólicas vitales para la célula (Noctor *et al.*, 2006).

La función más importante de la niacina es la producción de cofactores que participan en una gran variedad de reacciones de oxidación-reducción (Kirkland, 2007). También favorece la promoción de la colonización de las raíces y la nodulación en el trébol rojo cuando es producida por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Marek-Kozaczuk y Skorupska, 2001).

Algunas de las bacterias conocidas como potenciales productoras de niacina son *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum*, *Sinorhizobium meliloti*, y *Rhizobium spp.* Se conoce que algunos de estos agentes promotores mitigan los efectos del estrés en muchas especies de plantas (Lucy *et al.*, 2004; Bashan y de Bashan, 2005; de Bashan y Bashan, 2008; de Bashan *et al.*, 2005;).

4. ÁCIDO INDOL ACÉTICO

El Ácido Indolacético (AIA) es la auxina natural más importante, la cual está presente en la mayoría de las plantas. Las auxinas son hormonas vegetales, también llamadas fitohormonas, que regulan diversos procesos del desarrollo vegetal gracias a su capacidad para estimular el crecimiento diferencial en respuestas a estímulos de luz. Son las fitohormonas que juegan el rol más importante en el desarrollo de las plantas y el AIA es una de las descritas como las auxinas naturales sintetizadas por plantas junto a otras como el ácido indol-3-butírico o el ácido fenilacético. Entre otros efectos, las auxinas influyen en el crecimiento, la división de tejidos, la elongación y división celular, las respuestas a la luz y a la gravedad, y el desarrollo de las raíces. El AIA afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas, principalmente en una serie de procesos fisiológicos que incluyen la división y expansión celular, diferenciación de tejido y vascular, fototropismo, gravitropismo, desarrollo de raíz lateral y dominancia apical, destacando un importante rol en la formación del xilema y la raíz (Davies, 1995; Castillo *et al.* 2005; Gray, 2004; Santner *et al.*, 2009;).

La biosíntesis de AIA no se limita a las plantas superiores, pues organismos como bacterias, hongos y algas son capaces de sintetizarla. El triptófano es el principal precursor en las vías de biosíntesis de AIA en bacterias (Lee *et al.* 2004).

Algunos microorganismos conocidos como sintetizadores de esta fitohormona son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc. (Patten y Glick, 1996).

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue detectar y cuantificar la producción de las vitaminas, Niacina, Biotina y Ácido Pantoténico, así como del Ácido Indolacético, fitohormona imprescindible en el desarrollo vegetal, por parte de 7 cepas bacterianas y 3 cepas fúngicas, procedentes de un proceso de compostaje de restos vegetales.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE COMPOSTAJE

Para el desarrollo de este proceso se utilizaron residuos vegetales, en concreto, restos de plantas de tomate, los cuales se limpiaron convenientemente de frutos, rafia y otros elementos no deseables y se dispusieron en la zona de la planta piloto reservada para el desecado. Una vez finalizado el desecado, el material fue molido a un tamaño de partícula adecuado de aproximadamente entre 5 y 15 mm.

La optimización de las condiciones de partida se realizó en función de las características fisicoquímicas de las materias primas, intentando alcanzar una relación C/N inicial en torno a 25. Dada la composición de esta especie vegetal, fue necesario adicionar un material estructurado con elevado contenido en C para mejorar el balance de nutrientes. El material seleccionado fue astilla de pino, el cual permitió alcanzar la relación C/N deseada. Por otro lado, la humedad fue ajustada a un valor próximo al 50%, teniendo en cuenta el propio contenido en agua de los materiales de partida.

Las pilas se ubicaron sobre una solera de hormigón armado que disponía de un sistema de aireación basal. De esta forma, las pilas fueron aireadas por presión, manteniéndose los niveles de oxígeno siempre en el rango demandado por la población microbiana. Las dimensiones de las pilas fueron de 1,0 m x 1,5 m x 1,2 m (ancho x largo x alto).

Durante la fase bio-oxidativa se administró un régimen de aireación forzada de 7,5-9,0 L/kg cada 4 horas junto con volteos periódicos para garantizar el adecuado aporte de oxígeno, así como la corrección de los niveles de humedad y la mezcla de los materiales aún no transformados. Durante todo el proceso se realizó un seguimiento de los parámetros de pH, humedad y temperatura para llevar a cabo un control óptimo del proceso.

B. COLECCIÓN DE CEPAS

Para llevar a cabo los ensayos de producción de las vitaminas y la fitohormona se seleccionaron 10 cepas microbianas a partir del proceso de compostaje descrito previamente. Dichas cepas fueron seleccionadas previamente siguiendo el criterio de

promoción de la germinación y de estimulación de la elongación radicular en semillas, tras la aplicación del método descrito por Zucconi *et al.*, (1981), para el cálculo del Índice de Germinación. También se tuvo en cuenta la capacidad de las cepas para solubilizar fosfatos en cultivo *in vitro* según metodología descrita por Nautiyal, (2006). La selección preliminar de las cepas no se incluye dentro de los resultados de este Trabajo Fin de Master, aunque se dirigió, lógicamente, a la búsqueda de cepas potencialmente promotoras de crecimiento vegetal.

Por otro lado, se solicitó a la Colección Española de Cultivos Tipo la cepa *Lactobacillus plantarum* CECT 220, con objeto de utilizarla como control en los ensayos de cuantificación de la producción de las vitaminas Niacina, Tiamina y Ácido Pantoténico. Dicha cepa es auxótrofa para sendas vitaminas, por lo que la ausencia de cualquiera de ellas provocaría la ausencia de crecimiento de la misma en los medios de cultivo destinados a este tipo de ensayos (apartado III.C.2.).

Tabla 1. Colección de cepas y procedencia

NOMBRE CIENTÍFICO	TIPO ¹	CÓDIGO	IG ²	SP ²	Procedencia ⁴
<i>Methanosarcina barkeri</i>	B	TER1A	132	-	Fase Termófila
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B	MESA2	121	-	Fase Mesófila (temperatura en ascenso)
<i>Bacillus licheniformis</i>	B	MESD2	120	+	Fase Mesófila (temperatura en descenso)
<i>Staphylococcus equorum</i>	B	MESA3A	122	-	Fase Mesófila (temperatura en ascenso)
<i>Bacillus aerophilus</i>	B	MESA3B	123	+	Fase Mesófila (temperatura en ascenso)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B	TER3A	128	-	Fase Termófila
<i>Bacillus stratosphaericus</i>	B	MES7	124	-	Fase Mesófila
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	H	TER1B	151	-	Fase Termófila
<i>Aspergillus fumigatus</i>	H	MESA4	142	-	Fase Mesófila (temperatura en ascenso)
<i>Penicillium dipodomycola</i>	H	MES5	135	-	Fase Mesófila

¹B: Bacteria; H: Hongo

²IG: Índice de Germinación (%)

³SP: Solubilizadores de fosfato (caracterización cualitativa)

⁴Procedencia: etapa a partir de la cual fue aislada la cepa durante el proceso de compostaje

C. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación, se detallan los medios de cultivo utilizados durante la realización de este trabajo. En todos los casos, los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a

121 °C y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos, salvo los medios utilizados para la determinación de vitaminas, los cuales se autoclavaron durante 10 minutos. Asimismo, los medios de cultivo fueron conservados en cámara fría a 4 °C y mantenidos en oscuridad.

1. MEDIOS DE CULTIVO GENERALES

A continuación, se indican los medios de cultivo generales, así como la composición y método de preparación de los mismos:

- **Medio de cultivo estándar para el crecimiento de bacterias aerobias, según metodología de la “American Public Health Association” (APHA)**
 - Extracto de levadura 2,5 g
 - Dextrosa 1 g
 - Peptona de caseína 5 g
 - Agar bacteriológico 15 g

Se preparó una suspensión de 23,5 g en 1 L de agua destilada y se calentó suavemente mientras se agitaba hasta conseguir una completa homogeneización. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C, 20 minutos y se repartió en placas de Petri.

- **Medio para el aislamiento y enumeración de lactobacilos (MRS)**
 - Peptona bacteriológica 7,5 g
 - Extracto de carne 7,5 g
 - Extracto de levadura 3,75 g
 - Glucosa 15 g
 - Acetato amónico 1,5 g
 - Citrato sódico 3,75 g
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15 g
 - $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,0375 g
 - K_2HPO_4 2 g
 - H_2O 750 mL

- Agar bacteriológico 11,5 g (sólo cuando se usó en placas de Petri)

Tras mezclar todos los componentes en un vaso de precipitado se procedió al ajuste de pH entre 6,2 y 6,5. Tras ajustar el pH se repartió en tubos para después taparlos con algodón hidrófobo. Para la preparación de medio sólido, se adicionó agar bacteriológico. Después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

- **Patata Dextrosa Agar (PDA)**
 - Infusión de patata 4 g
 - Dextrosa 20 g
 - Agar 15 g

Para preparar este medio se rehidrataron 39 g de un preparado comercial (Panreac Ref: 413758.1210) en 1 L de agua destilada. Se agitó vigorosamente y se calentó ligeramente hasta conseguir la solubilización parcial del preparado. Después se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

- **Caldo de Patata Dextrosado (PDB)**
 - Patata 400 g
 - Glucosa 40 g
 - Agua destilada 2000 mL

La elaboración de este medio de cultivo se llevó a cabo pesando 48 g de un preparado comercial (Becton, Dikson and Company, Ref.: 254920), el cual se mezcló con 2 L de agua destilada. La mezcla se repartió en matraces Erlenmeyer de 250 mL a razón de 50 mL por matraz, los cuales fueron esterilizados en autoclave.

2. MEDIOS DE CULTIVO PARA AUXÓTROFOS

- **Medio salino glucosado:**
 - Glucosa 5 g/l
 - Sales de Burk (A, B, C) 100 mL de cada sal
 - NH₄Cl 0,2%

Una vez mezclados los componentes se completó con agua destilada hasta 1 L, y se repartió en matraces a razón de 100 mL para después autoclavar a 121 °C durante 20 min.

- **Medio para el ensayo de Niacina**
 - Hidrolizado ácido de caseína 12 g
 - Dextrosa 40 g
 - Acetato de sodio 20 g
 - L-Cistina 0,4 g
 - DL-Triptófano 0,2 g
 - Sulfato de adenina 20 mg
 - Clorhidrato de guanina 20 mg
 - Uracilo 20 mg
 - Clorhidrato de tiamina 200 µg
 - Pantotenato de calcio 200 µg
 - Clorhidrato de piridoxina 400 µg
 - Riboflavina 400 µg
 - Ácido p-aminobenzóico 200 µg
 - Biotina 0,8 µg
 - Fosfato dipotásico 1 g
 - Fosfato monopotásico 1 g
 - Fosfato magnésico 0,4 g
 - Cloruro de sodio 20 mg
 - Sulfato ferroso 20 mg
 - Sulfato manganeso 20 mg

Para la elaboración de este medio, empleado en la determinación de Niacina, se pesaron 7,5 g de un preparado comercial (DIFCO™ Niacin Assay Medium, ref: 232210), en 100 mL de agua destilada. La mezcla se calentó con agitación frecuente y se hirvió de 2 a 3 minutos. A continuación, se repartió a razón de 5 mL en tubos de ensayo, que fueron posteriormente autoclavados a 121 °C durante 10 minutos.

- **Medio para el ensayo de Biotina**
 - Hidrolizado ácido de caseína 12g
 - Dextrosa 40 g
 - Acetato de sodio 20 g
 - L-cistina 0,2 g
 - DL-triptófano 0,2 g
 - Sulfato de adenina 20 mg
 - Clorhidrato de guanina 20 mg
 - Uracilo 20 mg
 - Clorhidrato de tiamina 2 mg
 - Riboflavina 2 mg
 - Niacina 2 mg
 - Pantotenato de calcio 2 mg
 - Clorhidrato de piridoxina 4 mg
 - Ácido p-aminobenzóico 200 µg
 - Fosfato dipotásico 1 g
 - Fosfato monopotásico 1 g
 - Sulfato de magnesio 0,4 g
 - Cloruro de sodio 20 mg
 - Sulfato ferroso 20 mg
 - Sulfato de manganeso 20 mg

Para la elaboración de este medio, empleado en la determinación de Biotina, se pesaron 7,5 g de un preparado comercial (DIFCO™ Biotin Assay Medium, Ref: 241910) y se suspendió en 100 mL de agua purificada. La mezcla se agitó vigorosamente y se hirvió durante 2-3 minutos. A continuación, se repartió en tubos de 5 mL, los cuales fueron autoclavados a 121 °C durante 10 minutos.

- **Medio para el ensayo de Ácido Pantoténico**
 - Hidrolizado ácido de caseína 10g
 - Dextrosa 40 g

- Acetato de sodio 20 g
- L-cistina 0,4 g
- DL-triptófano 0,2 g
- Sulfato de adenina 20 mg
- Clorhidrato de guanina 20 mg
- Uracilo 20 mg
- Clorhidrato de tiamina 200 µg
- Riboflavina 400 µg
- Niacina 1 mg
- Piridoxina 800 µg
- Ácido p-aminobenzóico 200 µg
- Biotina 1 µg
- Fosfato monopotásico 1 g
- Fosfato dipotásico 1 g
- Sulfato de magnesio 0,4 g
- Cloruro sódico 20 mg
- Sulfato ferroso 20 mg
- Sulfato de manganeso 20 mg

Para la elaboración de este medio empleado en la determinación de Ácido Pantoténico, se pesaron 7,3 g de un preparado comercial (DIFCO™ Pantothenate Assay Medium, Ref: 260410) y se mezclaron con 100 mL de agua purificada. La metodología aplicada para la preparación de este medio de cultivo es idéntica a la descrita para el resto de vitaminas analizadas.

3. MEDIOS DE CULTIVO PARA MEDIDAS DE FITOHORMONAS: ÁCIDO INDOLACÉTICO

- **Caldo de Triptona de Soja (TSB)**
 - Digerido pancreático de caseína 17,0 g
 - Digerido papaínico de soja 3,0 g
 - Dextrosa 2,5 g

- Cloruro de sodio 5 g
- Fosfato dipotásico 2,5 g

Se resuspendieron 30 g de un preparado comercial (Becton, Dickinson and Company, ref: 211825) en 1 L de agua destilada. Se agitó la mezcla vigorosamente a la vez que se calentó ligeramente para su disolución completa. Después se procedió con el ajuste del pH hasta alcanzar un valor final de $7,3 \pm 0,2$. La mezcla se repartió en matraces de 100 mL a razón de 25 mL por matraz, que finalmente fueron autoclavados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.

4. REACTIVOS

- Sales de Burk:

- Solución A:
 - K_2HPO_4 6,4 g
 - KH_2PO_4 1,6 g
- Solución B:
 - NaCl 2 g
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g
 - $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- Solución C:
 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g
 - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g

Cada solución se disolvió en un 1 L de agua destilada y se autoclavó a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min.

- Reactivo de Salkowsky

- FeCl_3 (0,5 M) 1 mL
- H_2SO_4 (concentrado) 30 mL
- Agua destilada 50 mL

Se preparó una solución FeCl_3 0,5 M diluyendo 0,406 g de FeCl_3 en 5 mL de agua. Después se mezclaron el resto de componentes en las cantidades indicadas y se conservó el reactivo protegido de la luz en una botella de cristal opaco.

- **Solución Salina al 0,9%**
 - Cloruro sódico (NaCl) 9 g
 - Agua destilada 1 L

Ambos componentes se mezclaron en un vaso de precipitado, y posteriormente se repartió en matraces, tubos o microtubos según uso. Se procedió a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 5 minutos para posteriormente ser conservada a 4 °C.

D. MÉTODOS DE MEDIDA Y CUANTIFICACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE VITAMINAS

Para llevar a cabo los ensayos de producción de vitaminas de origen microbiano, se prepararon cultivos de los microorganismos en un medio para el cultivo de organismos auxótrofos (apartado III.C.2). Las 10 cepas seleccionadas previamente para la realización de los ensayos de producción (Tabla 1) se sembraron en los medios específicos para la cuantificación de cada vitamina y en agitación a 120 rpm a 30 °C, durante 48 horas en el caso de las bacterias, y 5 días en el caso de los hongos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min, y finalmente filtrados bajo condiciones de asepsia con filtros estériles de 0,45 micras de diámetro de poro. El filtrado resultante de cada cepa, al que nos referiremos de ahora en adelante como extracto, fue congelado para su conservación hasta el momento de ser utilizado.

En paralelo, se preparó un cultivo de la cepa auxótrofa *Lactobacillus plantarum*, CECT 220, que serviría como un agente bioindicador de la producción de las distintas vitaminas analizadas en este trabajo. Para ello se realizó una siembra de *L. plantarum* CECT 220 en 10 mL de medio MRS y se incubó a 37 °C durante 24-48 h.

Tras el periodo de incubación se centrifugaron las células bajo condiciones de asepsia a 5000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante. Se lavaron las células 3 veces con 10 mL de solución salina estéril al 0,9 % y tras cada lavado se volvió a centrifugar en las condiciones anteriormente mencionadas. Después del tercer lavado, las células se resuspendieron en 10 mL de solución salina. Se tomaron 0,5 mL de dicha suspensión y se diluyeron en 100 mL de H₂O destilada estéril. 50 µl de esta suspensión se utilizaron como un inóculo estandarizado de la cepa indicadora.

1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NIACINA A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS

Para cuantificar la producción de Niacina por parte de las cepas seleccionadas se prepararon tubos con 5 mL de medio de auxótrofos para la Niacina (descrito en el apartado III.C.3), y se añadieron por triplicado distintas cantidades de los extractos de cada cepa (1, 2, 3, 4 y 5 mL). En caso necesario, se completó con agua destilada estéril hasta los 10 mL.

De forma paralela al ensayo de los extractos microbianos, se preparó una recta estándar de Niacina a concentraciones de 0 a 25 ng/mL. Para ello fue necesario la preparación de una solución stock de Niacina, mezclando 0,50 g de Niacina en 1 L de agua pura. La mezcla se agitó vigorosamente y se diluyó 1 mL de la suspensión anterior en 99 mL de agua destilada estéril. Se volvió a realizar la misma operación hasta conseguir una concentración final de 50 ng/mL. Cada punto de la recta patrón se preparó por triplicado.

Finalmente, todos los tubos, tanto los de la recta patrón como aquellos a los que se les adicionaron los extractos microbianos, se inocularon con 50 µl del inóculo estandarizado de *L. plantarum* y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó turbidimétricamente la concentración de Niacina a una longitud de onda de 600 nm, por comparación con los valores obtenidos en la recta patrón (Marca: Biotek, Modelo: Eon).

Foto 1. Espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos (Marca: Biotek, Modelo: Eon)



2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOTINA A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS

Para determinar la producción de Biotina por parte de las cepas seleccionadas se prepararon tubos con 5 mL de medio para auxótrofos de Biotina (apartado III.C.3). Al igual que en el caso anterior, se adicionaron, distintas cantidades de extractos obtenidos a partir de cada cepa (1, 2, 3, 4 y 5 mL) y se completó con agua destilada estéril hasta 10 mL cuando fue necesario.

De forma paralela, se preparó una recta estándar de Biotina a concentraciones de 0-1 ng/mL. Para ello, se preparó una solución stock de Biotina mezclando 0,02 g de la vitamina en 1 L de agua destilada estéril. Se diluyó 1 mL de la suspensión anterior en 99 mL de agua destilada y se repitió la operación para conseguir una concentración final de la vitamina de 2 ng/mL.

Finalmente, se inocularon todos los tubos con el inóculo de *L. plantarum* y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h, transcurridas las cuales se determinó

turbidimétricamente la concentración Biotina a 600 nm, en comparación con su recta patrón.

3. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PANTOTÉNICO A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS

Para determinar la producción de Ácido Pantoténico por parte de las cepas seleccionadas se prepararon tubos con 5 mL de medio para auxótrofos de Ácido Pantoténico (apartado III.C.3). Siguiendo con los protocolos anteriores, los tubos se inocularon por triplicado con cantidades de extractos de cada cepa de entre 1 y 5 mL y se completaron hasta 10 mL con agua destilada estéril.

Para elaborar la recta patrón se preparó una solución stock de Ácido Pantoténico. Para ello, 0,1 g de pantotenato cálcico se adicionaron a 1 L de agua destilada estéril. 1 mL de dicha suspensión se diluyó en 99 mL de agua destilada estéril y se volvió a repetir la operación hasta conseguir una concentración final de 1 ng/mL. Con esta solución stock se preparó una recta de crecimiento estándar de 5 puntos por triplicado a concentraciones entre 0-0,5 ng/mL.

Finalmente, todos los tubos se inocularon con el inóculo estandarizado de *L. plantarum* y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h, transcurridas las cuales se determinó turbidimétricamente la cantidad de Niacina a una longitud de onda de 600 nm.

4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS

En este caso se siguió la técnica descrita por Gravel *et al.*, (2007). Para ello se prepararon cultivos líquidos de todas las cepas en 100 mL de medio de cultivo TSB, suplementado con triptófano (precursor del Ácido Indolacético), a razón de 800 µg/mL. Las bacterias se incubaron durante 72 horas a 30 °C y 120 rpm. Los hongos se incubaron durante 1 semana en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, la retirada de las células y el micelio mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, y filtrado posterior a 0,22 micras de diámetro de poro, se consiguió obtener un extracto estéril de cada cepa. Posteriormente se mezcló 1 mL de dicho extracto con 2 mL del reactivo

de Salkowsky (Gordon y Weber, 1951) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 535 nm. La concentración de AIA obtenida fue cuantificada mediante la comparación con una recta estándar de AIA.

Para la elaboración de la recta estándar o recta patrón de AIA, se prepararon distintas concentraciones de la fitohormona a partir de una solución stock previamente preparada. En este caso, se mezclaron 0,020 g de ácido-3-indolacético con 50 mL de agua destilada. Después, se prepararon los distintos puntos de la recta patrón a partir de la solución stock y completando con medio TSB hasta 1 mL. Finalmente, se añadieron 2 mL de reactivo Salkowsky y se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente, siguiendo el mismo procedimiento descrito para los extractos microbianos. Por último, se midió la absorbancia a 535 nm.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVII.II. El estudio de la influencia del factor cepa sobre las variables dependientes se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial a un intervalo de confianza del 95,0%.

También se utilizó el Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) para poder identificar los niveles dentro de cada factor que fueron significativamente diferentes y a qué nivel pertenecía cada cepa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

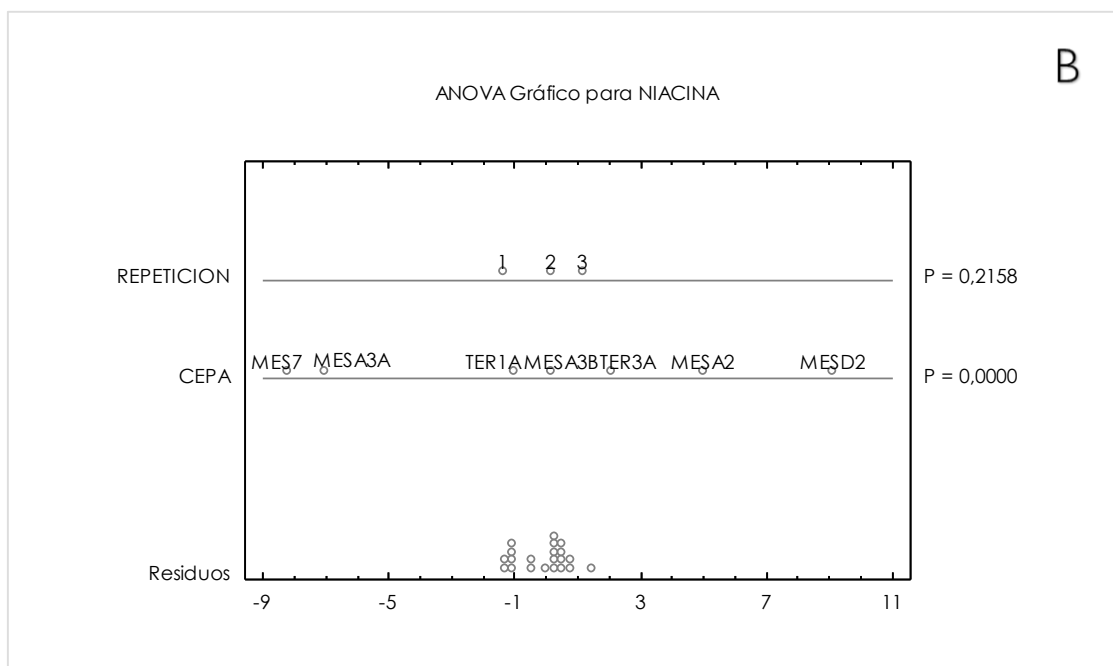
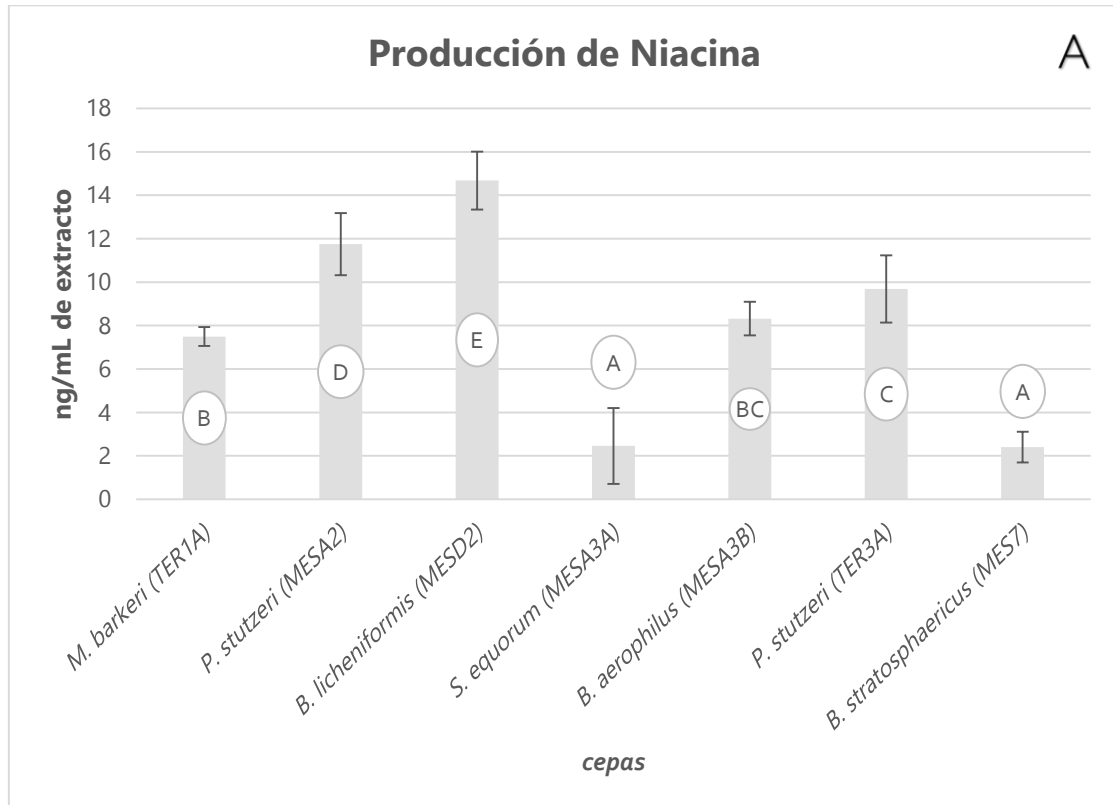
A continuación, se describen los resultados derivados de los ensayos de producción de vitaminas y Ácido Indolacético. Los resultados se han ordenado en función de la vitamina analizada y del grupo microbiano.

A. ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINAS IN VITRO

1. PRODUCCIÓN DE NIACINA A PARTIR DE BACTERIAS

En la Figura 1-A se muestra la producción media de Niacina a partir de las 7 cepas bacterias seleccionadas. En mayor o menor cantidad, todas ellas fueron capaces de producir la vitamina en un intervalo de 2 a 15 ng/mL, aunque se observaron ciertas diferencias entre ellas, hecho que se puso de manifiesto tras realizar el análisis estadístico de los resultados (Figura 1-B). Así, según el test de mínima diferencia significativa (test LSD), se obtuvieron 5 grupos de homogeneidad que difirieron con respecto a las cantidades de Niacina producida. En el grupo A se incluirían las cepas menos productoras, las cuáles fueron *Staphylococcus equorum* (MESA3A) y *Bacillus stratosphaericus* (MES7) con una producción en torno a 2 ng/mL. En el resto de grupos, se pudo observar una progresión ascendente de la producción, que oscila entre los 7,5 ng/mL del grupo de homogeneidad B, que incluye la cepa *Microbacterium barkeri* (TER1A) y los 14,7 ng/mL producidos por la cepa *Bacillus licheniformis* (MESD2), la cual se incluyó en el grupo E de homogeneidad.

Figura 1-A y 1-B. A. Producción media de Niacina a partir de las cepas bacterianas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de Niacina.

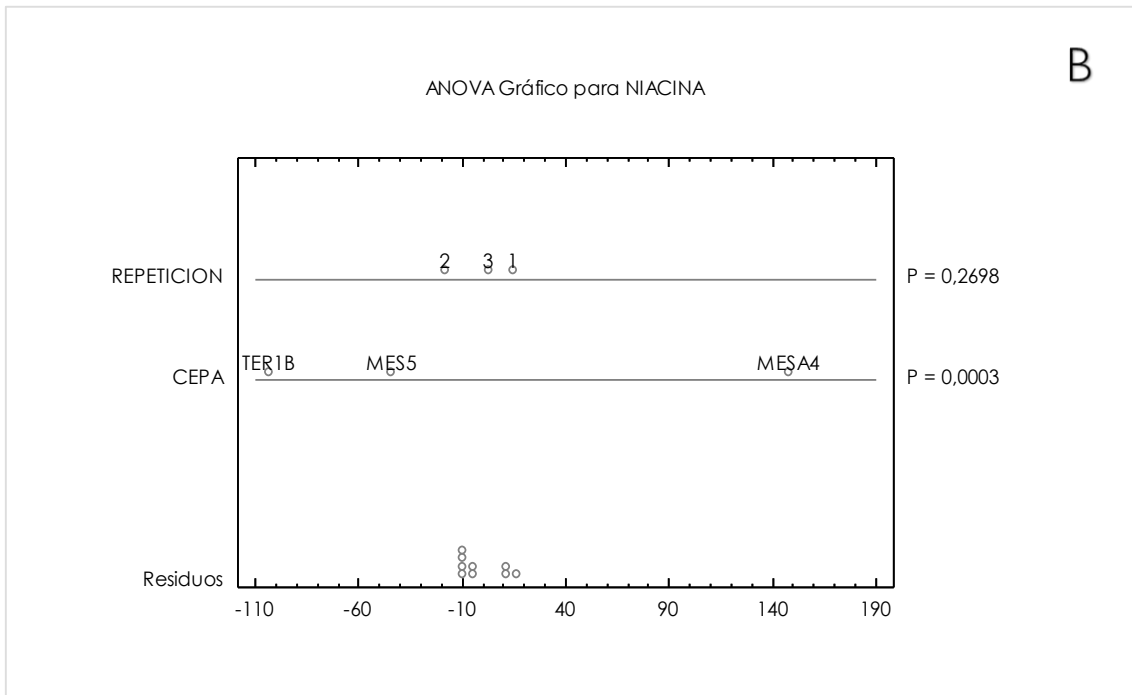
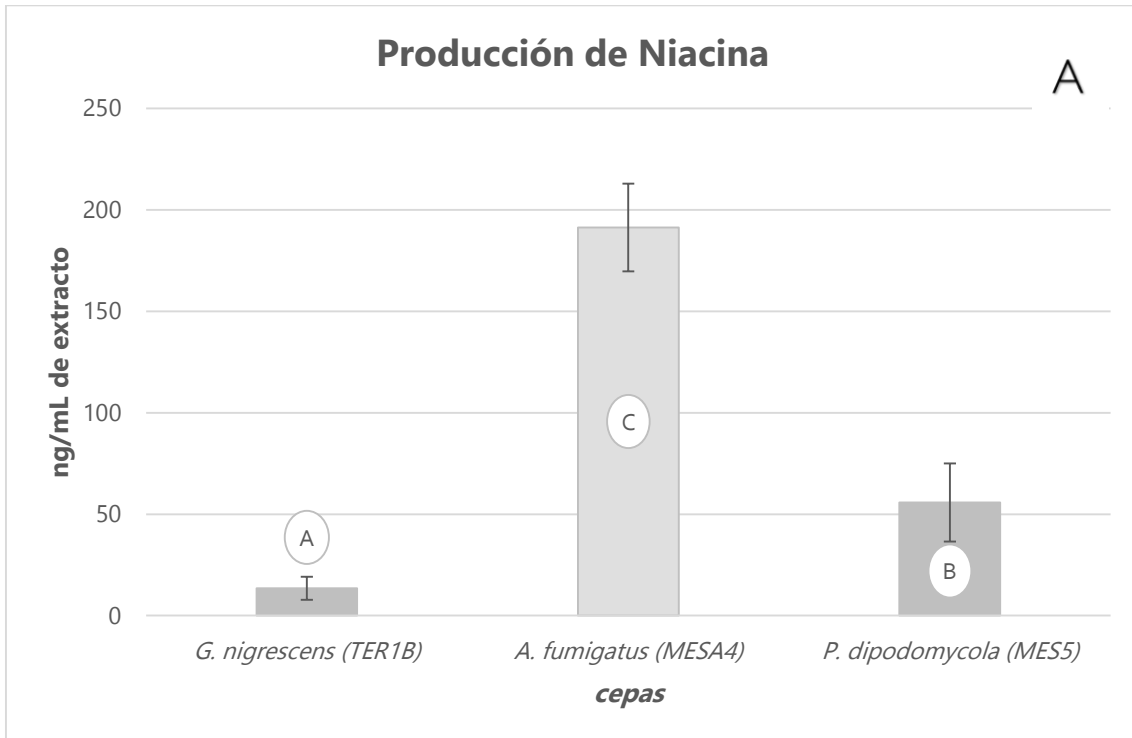


A partir de las investigaciones llevadas a cabo por Murcia *et al.*, (1997) con diversas cepas pertenecientes al género *Azotobacter*, se obtuvieron valores de producción de Niacina inferiores a $10 \text{ ng}/10^7$ Unidades Formadoras de Colonias, lo que podría corresponder aproximadamente a 1 mL de cultivo bacteriano estándar. Teniendo en cuenta dicha estimación, podría decirse que la producción de Niacina a partir las cepas seleccionadas concuerda con los datos obtenidos por Murcia *et al.* (1997), ya que todas las cepas, a excepción de las incluidas en el grupo A, muestran una producción que incluso supera lo indicado en bibliografía, como es el caso de las cepas *Pseudomonas stutzeri* (MESA2) y *Bacillus licheniformis*, con 11,7 y 14,7 ng/mL, respectivamente.

2. PRODUCCIÓN DE NIACINA A PARTIR DE HONGOS

Con respecto a la producción de Niacina a partir de las 3 cepas de hongos seleccionadas, se observaron resultados muy diferentes a los obtenidos para el caso de las bacterias. En la Figura 2-A, quedó patente el hecho de que las 3 cepas fúngicas fueron capaces de producir grandes cantidades de Niacina *in vitro*. Entre ellas, además, se establecieron notables diferencias con respecto a dicha producción. Los valores más bajos de producción, en torno a 20 ng/mL de extracto, correspondieron a la cepa *Gibellulopsis nigrescens* (TER1B). En orden de menor a mayor producción le siguió la cepa *Penicillium dipodomycola* (MES5), con una producción media que superó los 50 ng/mL. Finalmente, destacó la cepa *Aspergillus fumigatus* (MES4) con una producción en torno a los 200 ng/mL. El análisis estadístico, en consecuencia, reveló la presencia de 3 grupos de homogeneidad diferentes (test LSD).

Figura 2-A y 2-B. A. Producción media de Niacina a partir de las cepas fúngicas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de Niacina.



Si se compara la producción de Niacina por parte de las cepas de hongos con la producción por parte de bacterias del ensayo anterior, salta a la vista que la producción de origen fúngico de esta vitamina es mayor que la observada en el caso de las bacterias, destacando, por encima de todas, la cepa *Aspergillus fumigatus* (MES4), con una producción en torno a 200 ng/mL.

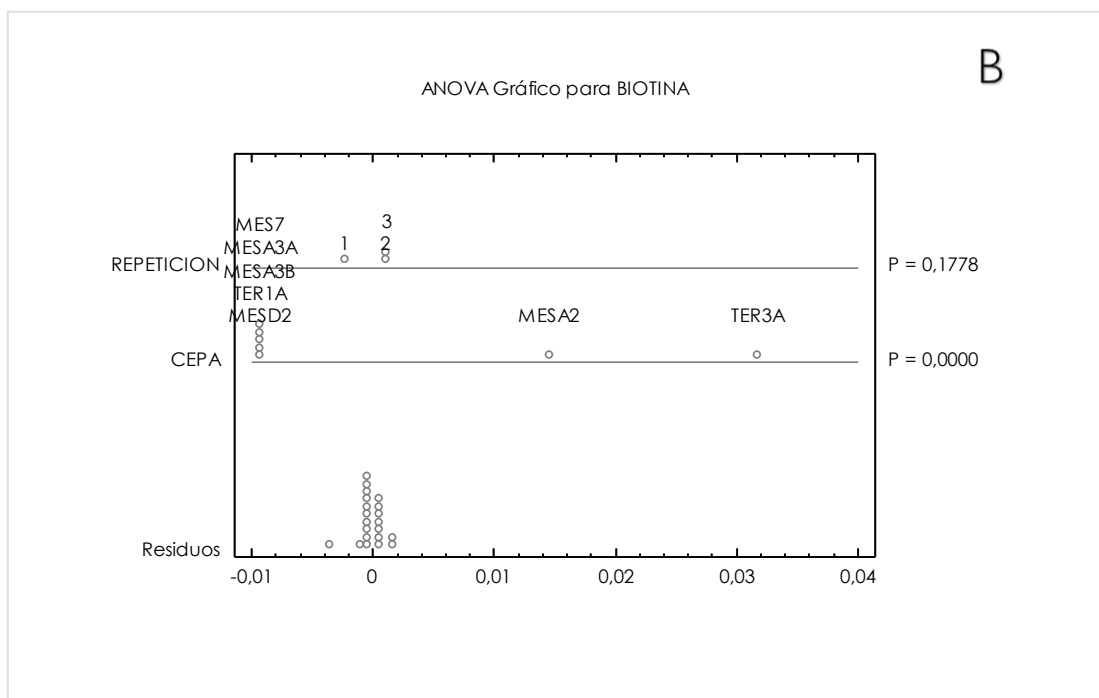
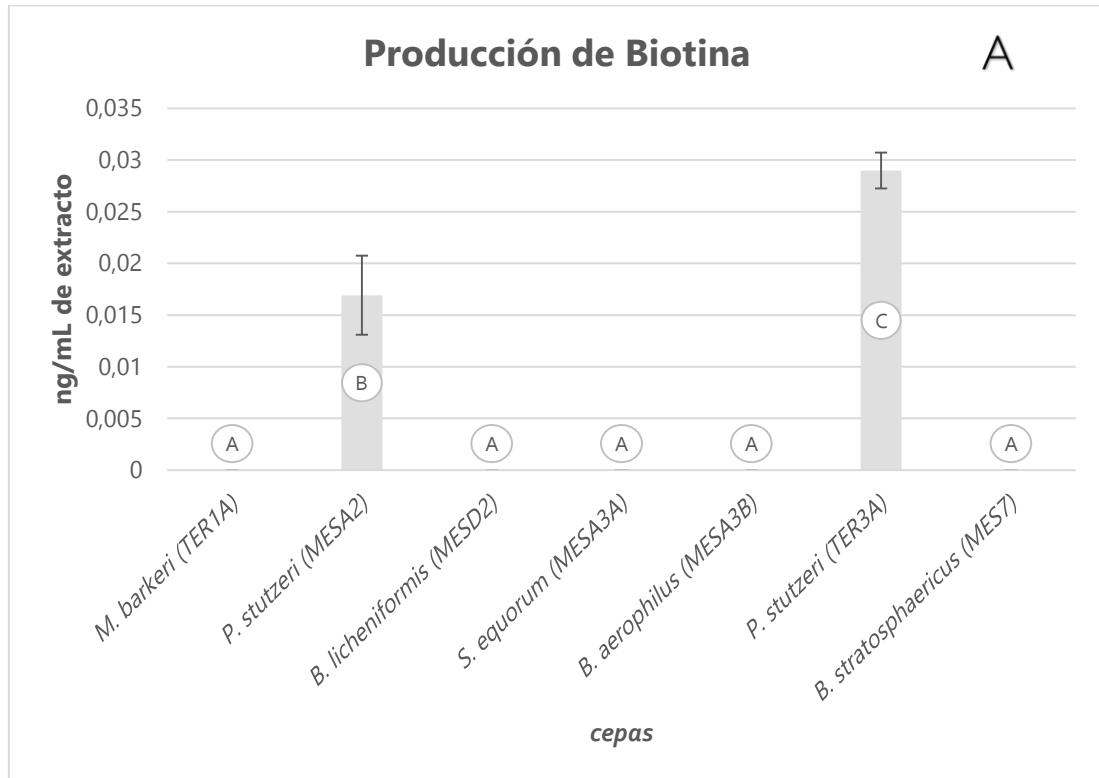
En investigaciones llevadas a cabo por Arcos (2010), se cuantificó la producción de Niacina por parte de numerosos microorganismos aislados de compost. La mayor producción de dicha vitamina se obtuvo a partir de las cepas *Bacillus pumilus* RSU231 y *Streptomyces griseus* RV523, estando dicha producción en torno a 100 ng/mL de extracto. Dos cepas de hongos, *Paecilomyces variotii* RSU312 y *Achremonium chrysogenum* RV532, también se mostraron como importantes productores de Niacina, con valores que oscilaron entre 40 y 80 ng/mL.

3. PRODUCCIÓN DE BIOTINA A PARTIR DE BACTERIAS

En la Figura 3-A se muestran los datos de producción media de Biotina por parte de las cepas de bacterias seleccionadas. En ella puede observarse que solo 2 de las cepas ensayadas son productoras de esta vitamina. Según el análisis estadístico ANOVA y test de múltiple comparación, se establecieron diferencias significativas entre ambas cepas. Se incluyó en el grupo B a la cepa *Pseudomonas stutzeri* (MES2) con el menor valor de producción, en torno a 0,016 ng/mL de extracto. Mientras que otra cepa diferente de la misma especie anterior, *Pseudomonas stutzeri* (TER3A), se incluyó en el grupo de homogeneidad C, con el máximo valor de producción, que estuvo en torno a 0,029 ng/mL de extracto.

Existen investigaciones llevadas a cabo por Murcia *et al.* (1997) que definen las producciones de biotina por parte de bacterias en un intervalo de 40 a 100 ng/10⁷ UFC de cultivo microbiano (lo que corresponde con aproximadamente 1 mL de un cultivo bacteriano estándar).

Figura 3-A y 3-B. Producción media de Biotina a partir de las cepas fúngicas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de Biotina



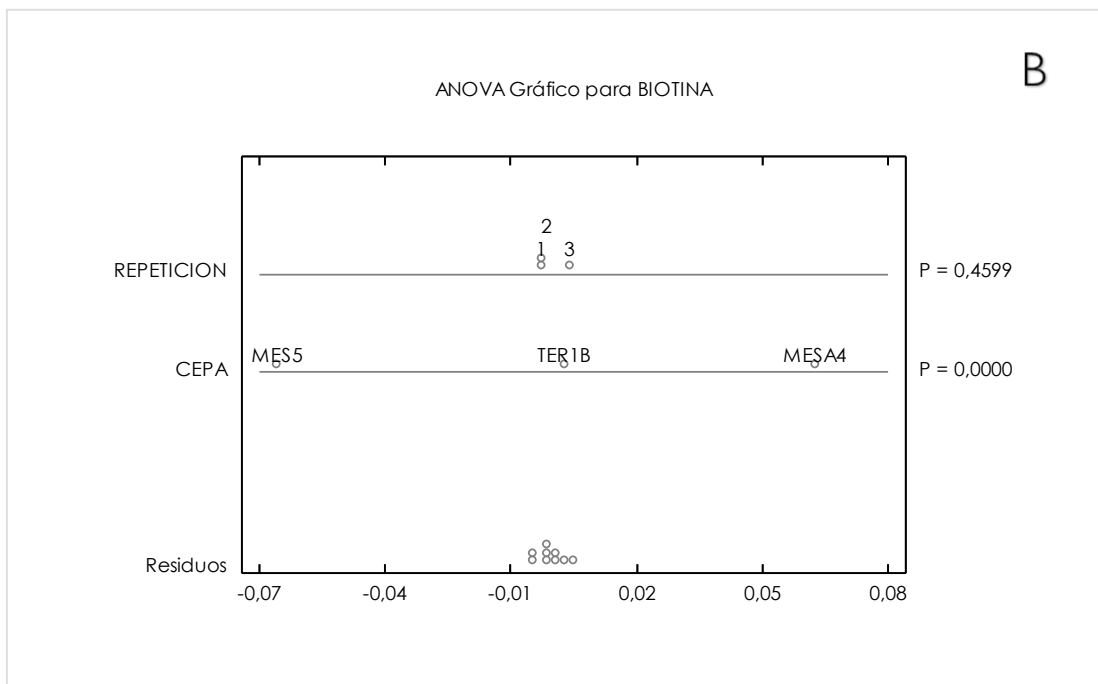
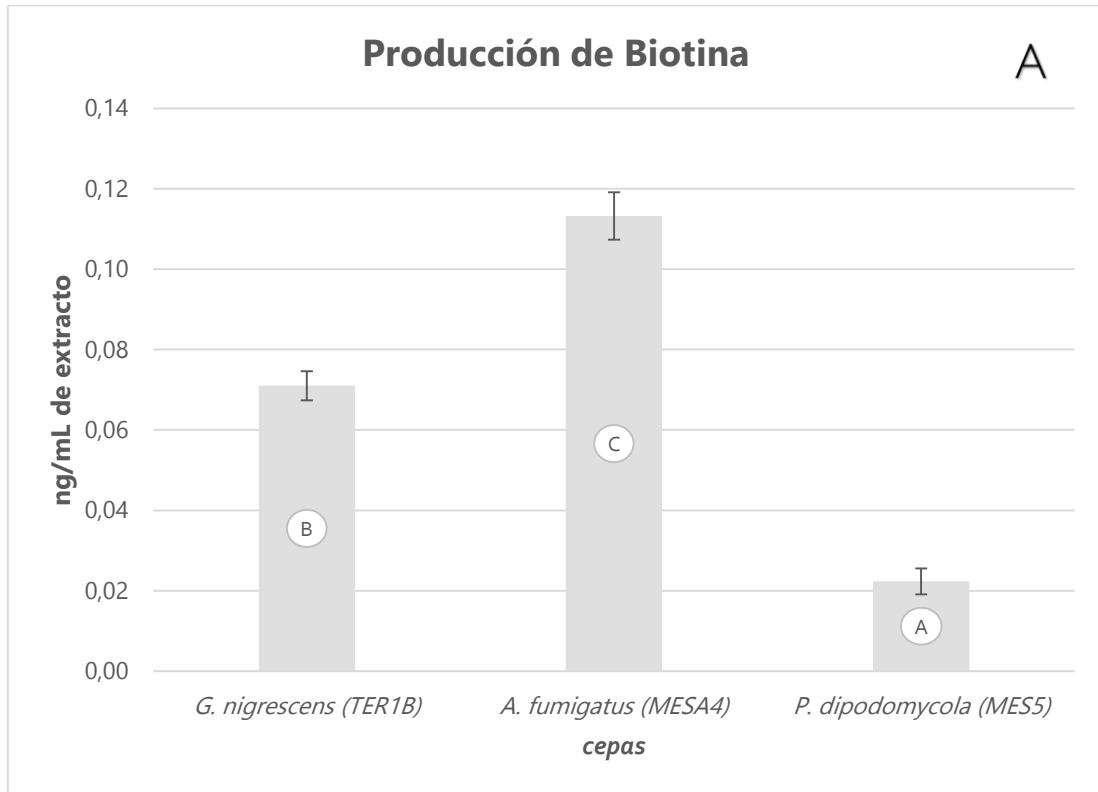
4. PRODUCCIÓN DE BIOTINA A PARTIR DE HONGOS

En cuanto a la producción de Biotina por parte de las cepas de hongos, podemos observar que las 3 cepas son productoras y que entre ellas hay diferencias de producción significativas (ver Figuras 4-A y 4-B). En este caso, la cepa que dio lugar a la menor producción de Biotina fue *Penicillium dipodomycola* (MES5), con valores en torno a 0,02 ng/mL de extracto. En el caso de la cepa *Gibellulopsis nigrescens* (TER1B) se triplicó dicha producción con valores de aproximadamente 0,71 ng/mL de extracto. Finalmente, la cepa que dio lugar a los mejores resultados de producción fue *A. fumigatus* (MESA4) con 0,11 ng/mL de extracto. Según el análisis estadístico realizado, sendas cepas fueron significativamente diferentes entre sí.

Algunos trabajos previamente realizados por Arcos (2010), muestran datos de producción de Biotina en torno a 12 ng/mL de extracto a partir de cepas fúngicas aisladas de compost, como es el caso de la cepa *Paecilomyces variotii* RSU 312. Sin embargo, en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo, los datos de producción de Biotina indicados por Arcos (2010) para bacterias y actinomicetos, no superaron en ocasiones 1 ng/mL.

Según los datos indicados, la producción de Biotina por parte de las cepas analizadas no destacó con respecto a lo que se describe en otras investigaciones, lo cual no significa que su aplicación *in vivo* no resulte satisfactoria a través de mecanismos diferentes, o bien mediante la producción de cualquier otro tipo de sustancias promotoras del crecimiento.

Figura 4-A y 4-B. A. Producción media de Biotina a partir de las cepas fúngicas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de Biotina.

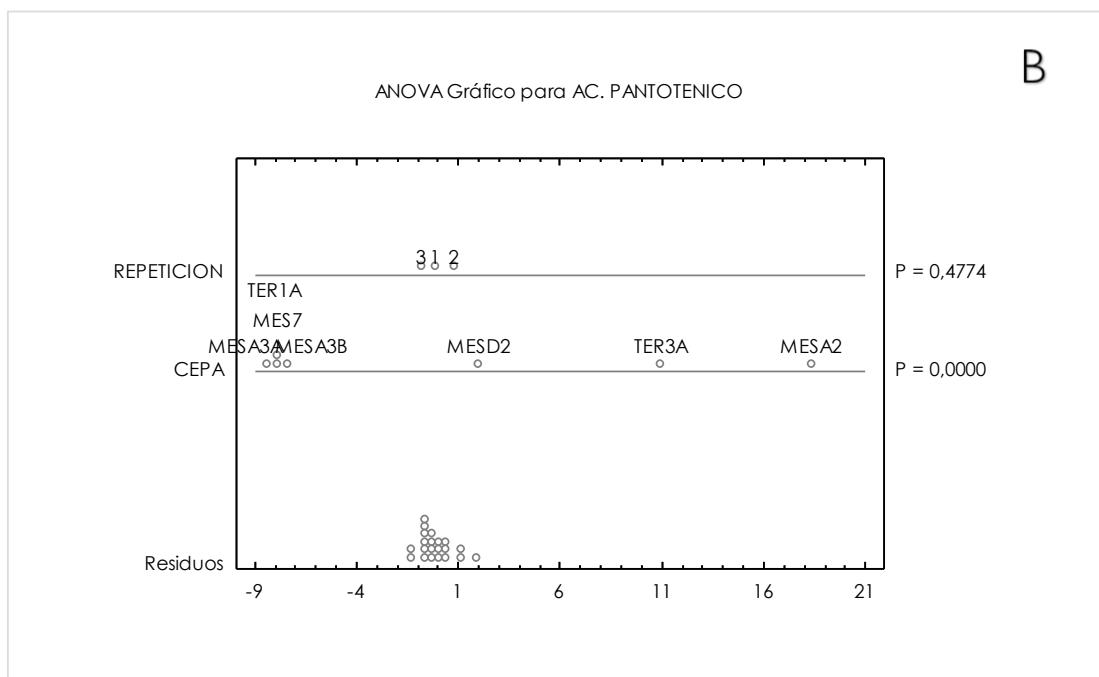
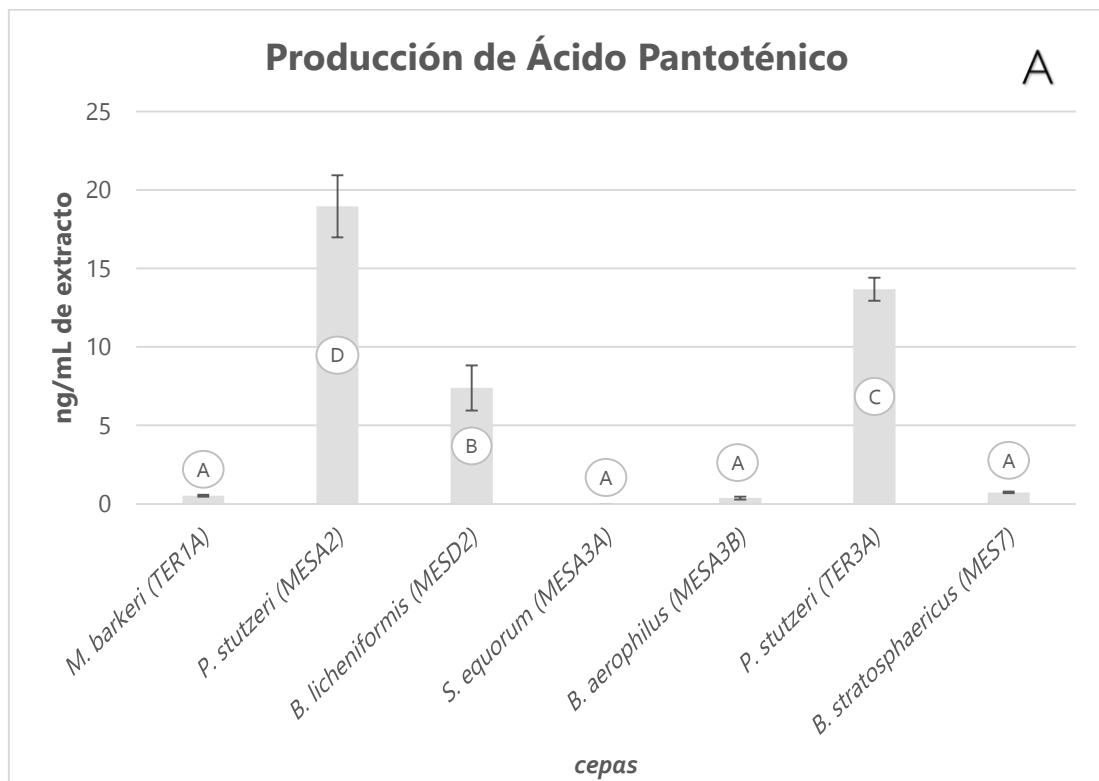


5. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PANTOTÉNICO A PARTIR DE BACTERIAS

En la Figura 5-A, se muestran los resultados derivados de los ensayos de producción de Ácido Pantoténico por parte de las cepas bacterianas. Según los datos analizados, se establecieron 4 grupos de homogeneidad a partir del test de mínima diferencia significativa. Dentro del grupo A se incluyeron aquellas cepas que mostraron los menores valores de producción de Ácido Pantoténico, el cual en el caso concreto de la cepa *Staphylococcus equorum* (MESA3A) fue prácticamente nulo. Las otras cepas incluidas en el grupo A fueron *Microbacterium barkeri* (TER1A), *Bacillus aerophilus* (MESA3B) y *Bacillus stratosphaericus* (MES7).

Se establecieron, por otro lado, diferencias significativas entre el resto de cepas bacterianas ensayadas, de modo que se obtuvieron valores de producción de Ácido Pantoténico en torno a 7, 13 y 19 ng/mL de extracto, en el caso de las cepas *B. licheniformis* (MESD), *P. stutzeri* (TER3A) y *P. stutzeri* (MESA2), respectivamente. Los datos de producción descritos en el caso de otras bacterias como *Azotobacter vinelandii* y *A. chroococcum*, consideradas como agentes promotores del crecimiento vegetal (Murcia *et al.*, 1997), revelan datos de producción muy variables, que oscilan, según el medio de cultivo, entre 22-70 ng/10⁷ CFU y 0,2 ng/10⁷ CFU, respectivamente (lo que podría corresponder aproximadamente a 1 mL de un cultivo bacteriano estándar). Se observa pues, que los datos de producción de pantoténico en el caso de las cepas ensayadas en este trabajo, si bien está por debajo de los máximos alcanzados por algunas bacterias estudiadas, no dejan de ser prometedores.

Figura 5-A y 5-B. Producción media de Ácido Pantoténico a partir de las cepas bacterianas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de Ácido Pantoténico.

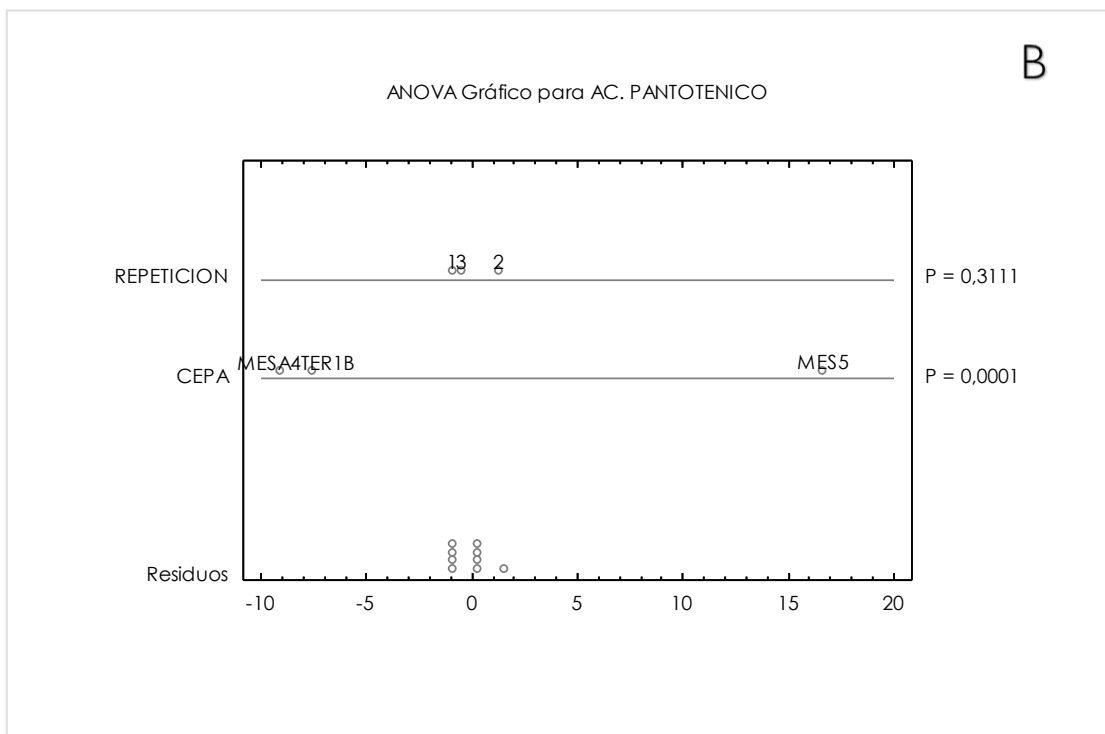
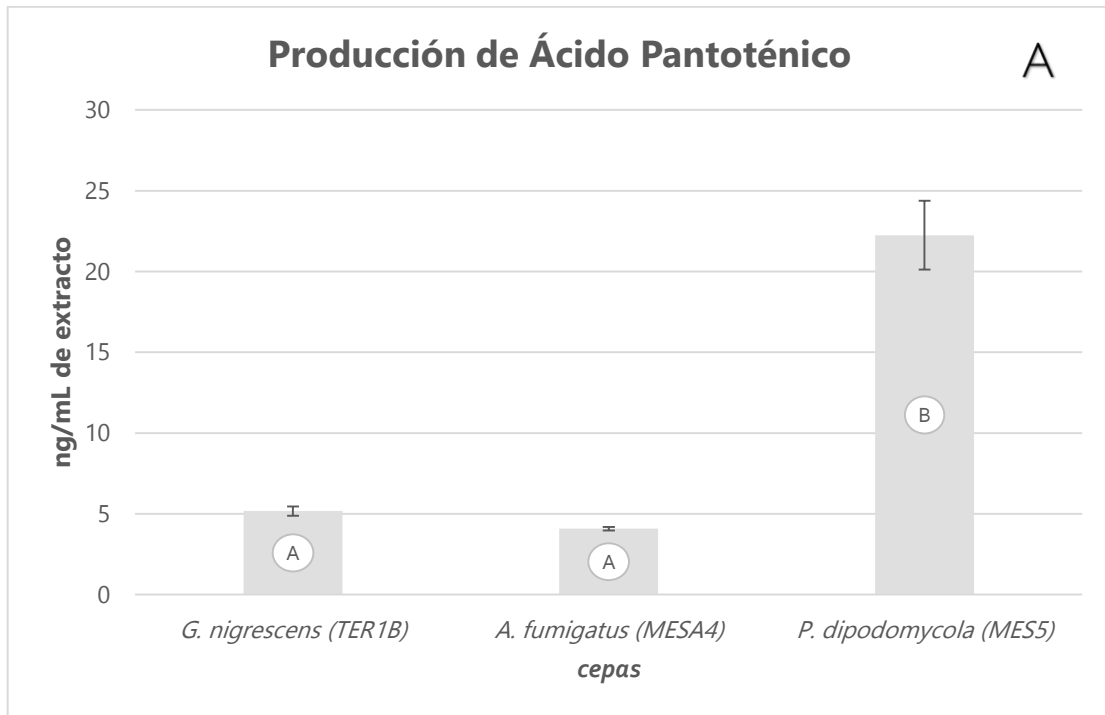


6. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PANTOTÉNICO A PARTIR DE HONGOS

Con respecto a la producción de Ácido Pantoténico a partir de las 3 cepas de hongos seleccionadas, se detectaron niveles de detección entre 4 y 5 ng/mL de extracto en el caso de las cepas *Gibellulopsis nigrescens* (TER1B) y *Aspergillus fumigatus* (MESA4), mientras que la cepa *Penicillium dicodomycola* (MES5) mostró una producción casi 5 veces superior (Figura 6-A y 6-B)

En este caso, al comparar la producción de Ácido Pantoténico por parte de las cepas de bacterias y las de hongos, no se encontraron grandes diferencias en cuanto a nivel de producción. Si se obvia el grupo microbiano, la cepa más interesante desde el punto de vista de la producción de esta vitamina fue el hongo *Penicillium dipodomycola* (MES5).

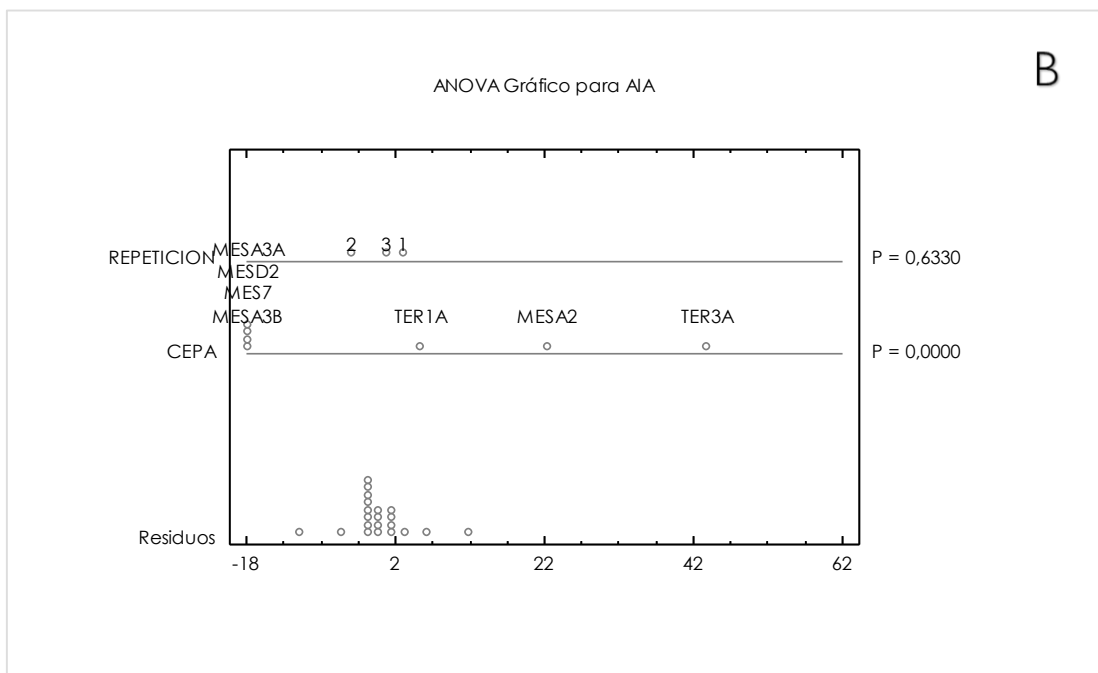
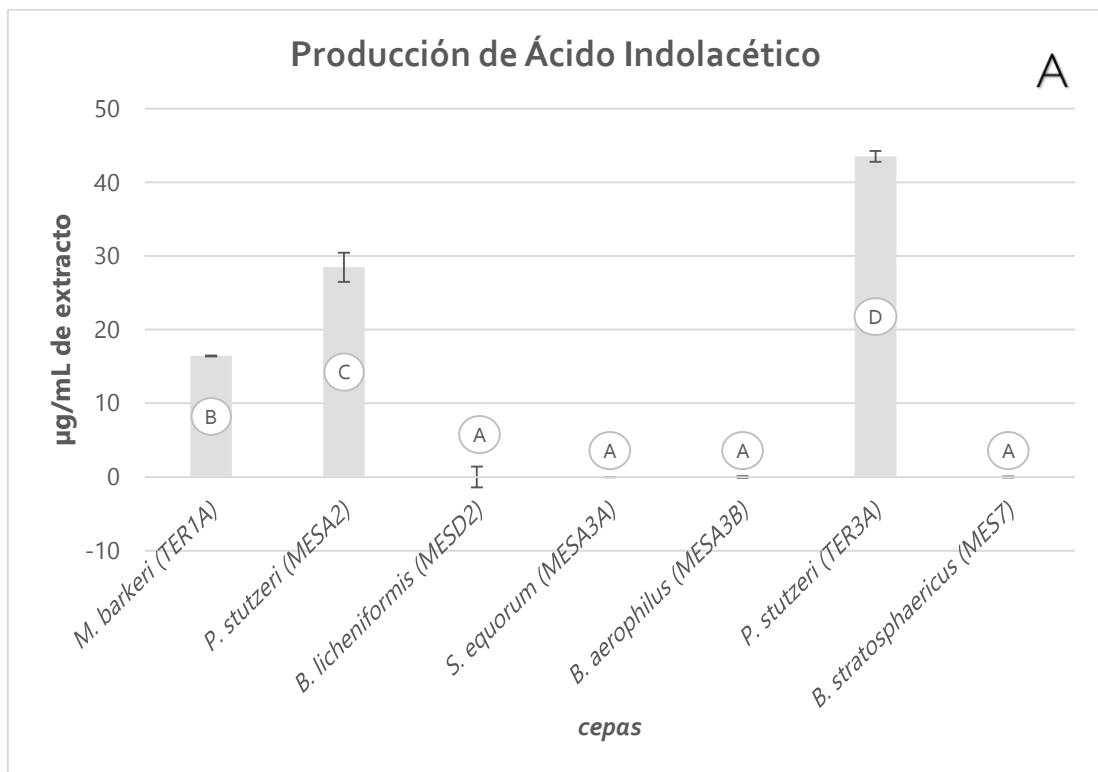
Figura 6-A y 6-B. Producción media de Ácido Pantoténico a partir de las cepas fúngicas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de Ácido Pantoténico.



7. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO A PARTIR DE BACTERIAS

La producción media de Ácido Indolacético (AIA) en medios adicionados con triptófano, a partir de las cepas bacterianas seleccionadas, se muestra en las Figuras 7-A y 7-B. En dichas figuras se observa que 4 de las cepas analizadas no produjeron cantidades detectables de AIA, mientras que en las otras 3 los valores de producción fueron significativamente diferentes. La cepa que mostró los valores más bajos de producción (a excepción de aquellos consideradas como no productoras) fue *Microbacterium barkeri* (TER1A) con valores en torno a 16,4 µg/mL, seguida de *Pseudomonas stutzeri* (MESA2) con 28,4 µg/mL. Por último, la cepa *P. stutzeri* (TER3A), dio lugar a los datos mayores de producción de AIA, llegando a alcanzar valores por encima de 40 µg/mL de extracto.

Figura 7-A y 7-B. A. Producción media de Ácido Indolacético a partir de las cepas bacterianas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de AIA



Si se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con otros datos encontrados en bibliografía relativos a la producción de Ácido Indolacético en bacterias, se observan ciertas similitudes. Por ejemplo, en los estudios de Matsukawa *et al.* (2007) se alcanzaron producciones de AIA en las cepas *Streptomyces purpurascens* NBRC 13077, *S. coelicolor* A3, *S. olivaceus* NBRC 12805 y *S. kasugaensis* NBRC 13851 en torno a 28,4, 21,8, 14,2 y 51,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Otros artículos de investigación se hace referencia a producciones de AIA semejantes a las anteriores, como es el caso de Torres-Rubio *et al.* (2000). Dichos autores estudiaron la producción de Ácido Indolacético a partir de 40 cepas bacterianas (15 cepas pertenecientes al grupo de las Enterobacterias, 19 cepas *Azotobacter spp.*, y 6 cepas de *Pseudomonas spp.*). Los datos de producción para las cepas de *Azotobacter chroococcum* oscilaron en torno a 32,2 y 16,1 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a *Azotobacter vinelandii* se obtuvieron valores de producción entre 20 y 30 mg/L , un intervalo de entre 14 y 28 $\mu\text{g/mL}$ a partir de varias cepas de *Pseudomonas putida*, 21,2 $\mu\text{g/mL}$ en *Pseudomonas aeruginosa* y 15,2 $\mu\text{g/mL}$ en *Klebsiella pneumoniae*. Teniendo en cuenta tales datos, y comparándolos con los obtenidos en este trabajo, cabe destacar la capacidad de la cepa *P. stutzeri* (TER3A), para producir AIA *in vitro* y en consecuencia su potencial para actuar como un agente promotor del crecimiento vegetal.

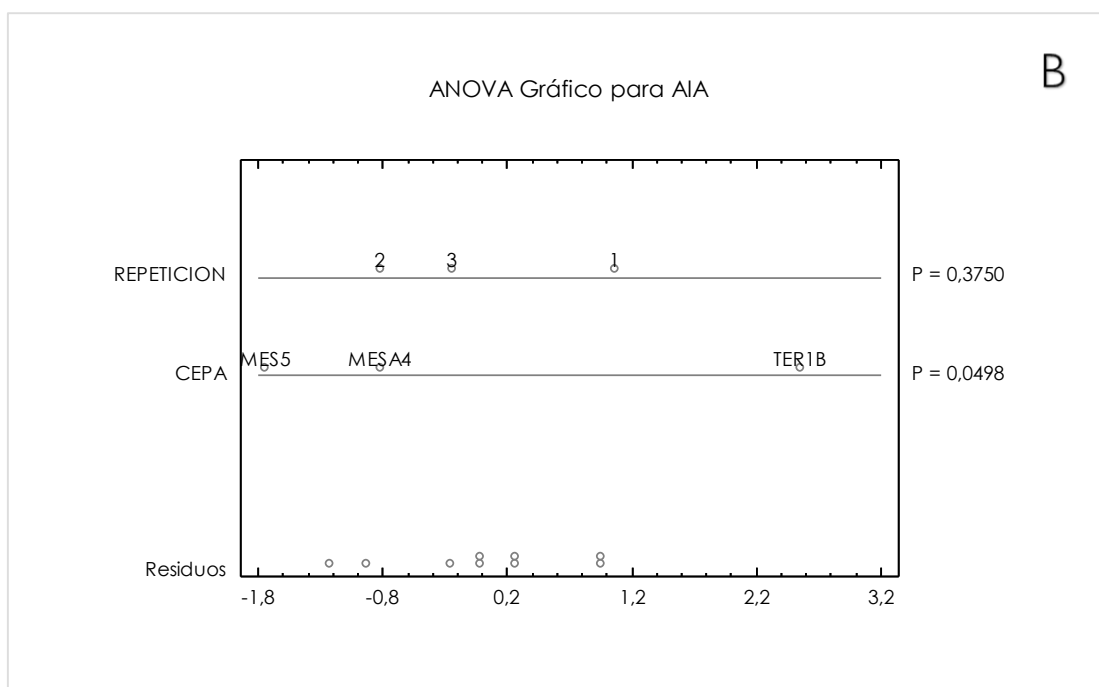
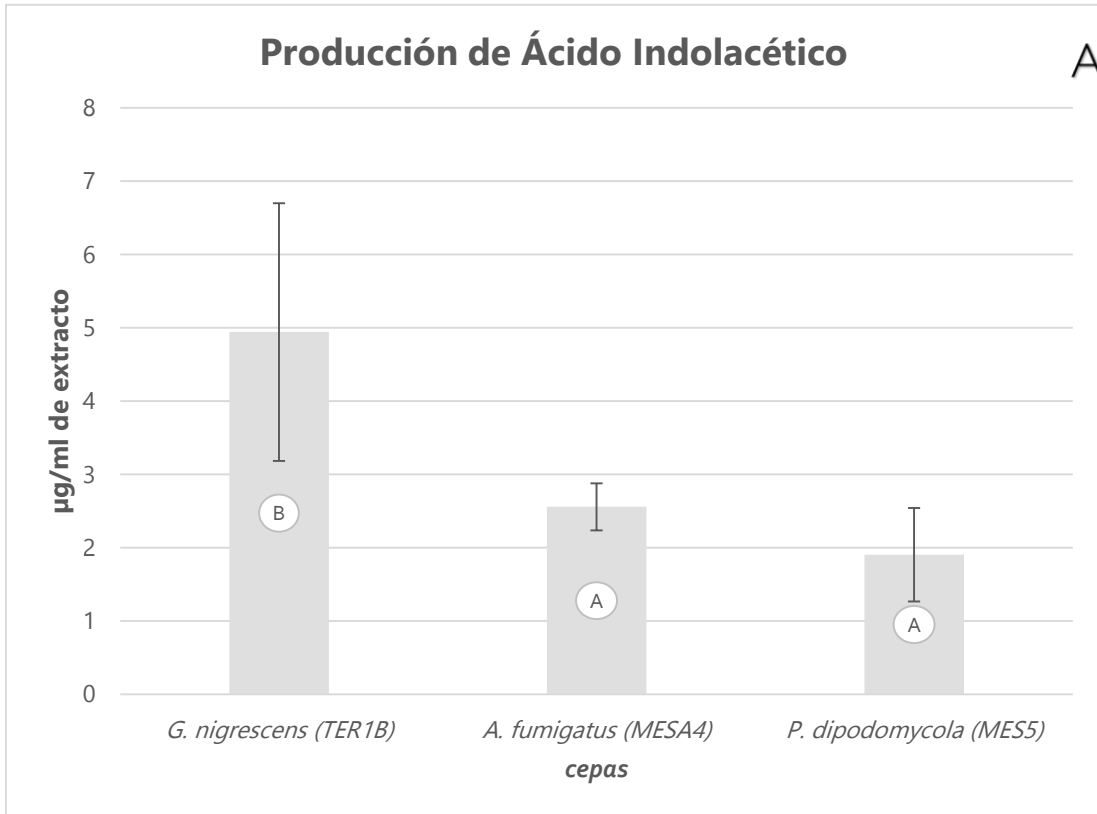
Un importante aspecto a tener en cuenta se indica en Aguilar-Piedras *et al.* (2008). Dichos autores detectaron importantes diferencias de producción de AIA en *Azotobacter brasilense*, en función de los medios de cultivo utilizados para tal finalidad. En un medio libre de nitrógeno la concentración de AIA registrada por *A. brasilense* fue de 2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que cuando se adicionó en un medio con una fuente de nitrógeno combinado y triptófano extra (como precursor de AIA), la producción de AIA aumentó hasta 24 $\mu\text{g/mL}$. Por tanto, la producción microbiana de AIA depende no solo de la especie y cepa productora, sino también de las condiciones de cultivo, la concentración de triptófano, el pH, la oxigenación y la fase de crecimiento (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008).

8. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO A PARTIR DE HONGOS

Las 3 cepas de hongos ensayadas produjeron niveles detectables de Ácido Indolacético, como puede observarse en las Figuras 8-A y 8-B. Los niveles de producción oscilaron en un intervalo medio de 2 a 5 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose estadísticamente 2 grupos de homogeneidad diferentes. Las cepas *Aspergillus fumigatus* (MESA4) y *Penicillium dipodomycola* (MES5) produjeron valores de AIA en torno a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ y 1,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que *Gibellulopsis nigrescens* (TER1B) duplicó dicha producción, hasta alcanzar valores medios de 4,9 $\mu\text{g/mL}$.

Al contrario que lo observado en el caso de las vitaminas Niacina y Biotina, donde los valores de producción fueron muy superiores en el caso de los hongos, hay que destacar que la producción de AIA fue notablemente superior en el grupo de las bacterias.

Figura 8-A y 8-B. A. Producción media de Ácido Indolacético a partir de las cepas fúngicas analizadas. Letras diferentes muestran grupos de homogeneidad distintos según el test de mínima diferencia significativa al 95 % de nivel de confianza. B. Análisis estadístico (ANOVA multifactorial) en el que se muestra la influencia del Factor Cepa en la producción de AIA



9. CARACTERIZACIÓN FINAL DE LAS CEPAS SELECCIONADAS CON RESPECTO A SU CAPACIDAD PARA PRODUCIR VITAMINAS Y FITOHORMONAS

En la Tabla 2 se muestra la caracterización de las cepas seleccionadas con respecto a la capacidad para producir Niacina, Biotina, Ácido Pantoténico y Ácido Indolacético. Dicha tabla muestra de forma cualitativa, la capacidad nula (-), baja (+), media (++) y alta (+++) para producir dichas sustancias.

Tabla 2. Caracterización cualitativa de las cepas seleccionadas en función de su potencial para producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

NOMBRE CIENTÍFICO	TIPO	CÓDIGO	IG ¹	SP ²	N ³	B ⁴	AP ⁵	AIA ⁶
<i>Methanosarcina barkeri</i>	B	TER1A	132	-	++	-	+	++
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B	MESA2	121	-	++	+	+++	+++
<i>Bacillus licheniformis</i>	B	MESD2	120	+	++	-	++	-
<i>Staphylococcus equorum</i>	B	MESA3A	122	-	+	-	-	-
<i>Bacillus aerophilus</i>	B	MESA3B	123	+	++	-	+	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	B	TER3A	128	-	++	+	+++	+++
<i>Bacillus stratosphaericus</i>	B	MES7	124	-	+	-	+	-
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	H	TER1B	151	-	++	++	++	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	H	MESA4	142	-	+++	++	++	+
<i>Penicillium dipodomycola</i>	H	MES5	135	-	+++	+	+++	+

¹IG: Índice de Germinación (%)

²SP: Solubilizadores de fosfato (caracterización cualitativa)

³N: Niacina

⁴B: Biotina

⁵AP: Ácido Pantoténico

⁶AIA: Ácido Indolacético

Tal y como se indica en dicha Tabla y, en función de un criterio puramente subjetivo, las 3 cepas de hongos seleccionadas en función de sus Índices de Germinación analizados en ensayos previos destacaron como productores de Niacina, Biotina y Ácido Pantoténico. De entre el grupo de las bacterias, las dos cepas de *P. stutzeri* mostraron capacidad tanto para producir vitaminas como Ácido Indolacético, por lo que éstas junto con los 3 hongos, fueron los mejores candidatos para ser aplicados como estimuladores potenciales del crecimiento vegetal.

V. CONCLUSIONES

- Se ha comprobado la capacidad de determinadas cepas microbianas procedentes de compost de origen vegetal, para actuar como potenciales agentes fitoestimulantes y promotores del crecimiento vegetal, lo cual podría estar directamente relacionado con el carácter biofertilizante del propio compost.
- La selección de cepas microbianas procedentes de compost en base a su capacidad para estimular la germinación y elongación radicular (Índice de Germinación), puede considerarse un criterio de partida a la hora de investigar la capacidad de dichas cepas para producir sustancias implicadas en la promoción del crecimiento vegetal.
- Las cepas fúngicas seleccionadas, *Gibellulopsis nigrescens* TER1B, *Aspergillus fumigatus* MESA4 y *Penicillium dipodomycola* MES5, destacaron como agentes potencialmente productores de las vitaminas Niacina, Biotina y Ácido Pantoténico, y en menor medida de Ácido Indolacético.
- De entre el grupo de las bacterias seleccionadas, las dos cepas de *Pseudomonas stutzeri* (MESA2 y TER3A), fueron las mejores candidatas como estimuladoras del crecimiento vegetal, ya que no sólo mostraron capacidad para producir Niacina, Biotina y Ácido Pantoténico, sino también para producir altas cantidades de Ácido Indolacético.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Piedras, J., Xiqui-Vásquez, M., García-García, S. & Baca, B. (2008) Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50, pp. 29-37.
- Alban, C., Job, D. & Douce, R. (2000) Biotin metabolism in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, pp. 17-47.
- Antoun, H. & Prevost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 1-38). Netherlands.: Z. A. Siddiqui.
- Arcos, M. (2010). Búsqueda de agentes microbianos bioprotectores a partir de distintos tipos de compost. Proyecto Final de Carrera. Almería: Universidad de Almería.
- Bashan, Y. & de-Bashan, L. (2005) Bacteria/plant growth-promotion. En: Hillel D (ed) *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, pp. 103–115.
- Bashan, Y. & Holguin, G. (2005). Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, pp. 1225-1228.
- Beauchamp, C. (1993). Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents, *Phytoprotection*, 71, pp. 19-27.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez, J., & Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de biología*, 27, pp. 137-142.
- Dahm, H., Rózycki, H., Strzelczyk, E. & Li, C. (1993). Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. *Zbl Mikrobiology*, 148, pp. 195–203
- Dakshinamurti, K. & Chauhan, J. (1989). Biotin. *Vitamins and Hormones*, 45, pp. 337-384.
- Davies, P. (1995). *Plant hormones*. Hingham, Mass.: Kluwer Academic.
- De-Bashan, L. & Bashan, Y. (2008) Joint immobilization of plant growthpromoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying

plant-bacterium interactions. *Applied of Environmental Microbiology*, 74, pp. 6797-6802.

De-Bashan, L., Antoun, H. & Bashan, Y. (2005). Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), pp. 197-203.

Dewan, M. & Sivasithamparam, K. (1989) Efficacy of treatment with a sterile red fungus for control of take-all in wheat, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 17, pp. 333-336.

Entcheva, P., Phillips, D. & Streit, W. (2002). Functional Analysis of *Sinorhizobium meliloti* Genes Involved in Biotin Synthesis and Transport. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), pp. 2843-2848.

Frappier, F. & Marquet, A. (1981). On the biosynthesis of biotin in *Achromobacter* IVSW a reinvestigation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 103(4), pp. 1288-1293.

Gonzalez-Lopez, J., Salmeron, V., Moreno, J. & Ramos-Cormenzana, A. (1983). Amino acids and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. *Soil Biology and Biochemistry*, 15(6), pp. 711-713.

Gordon, S. & Weber, R. (1951). Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology*, 26 (1), pp. 192-195.

Gravel, V., Antoun, H. & Tweddell, R. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomona putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole-3-acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39, pp. 1968-1977.

Gray, W. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*, 2(9), pp. 311.

Guillén-Navarro, K., Encarnación, S. & Dunn, M. (2005). Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 246(2), pp. 159-165.

- Heinz, E., Phillips, D. & Streit, W. (1999). BioS, a Biotin-Induced, Stationary-Phase, and Possible LysR-Type Regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(9), pp. 803-812.
- Hofmann, K., Heinz, E., Charles, T., Hoppert, M., Liebl, W. & Streit, W. (2000). *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 bioS and bdhA gene transcriptions are both affected by biotin available in defined medium. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), pp. 41-44.
- Hyakumachi, M. (1994). Plant growth-promoting fungi from turfgrass rhizosphere with potential for disease suppression. *Soil Microorganisms*, 44, pp. 53–68.
- Jacobsen, C. (1997). Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4-D contaminated soil, *Plant Soil*, 189, pp. 139–144.
- Kapulnik, Y. (1996). Plant growth promoting rhizosphere bacteria, En: *Plant Roots The Hidden Half*, Waisel, Y., Eshel, A. & Kafkafi, U., eds., Marcel Dekker, N.Y., pp. 769-781.
- Kirkland, J. (2007). Niacin. En: *Handbook of vitamins*, Zempleni, J., Rucker, R., McCormick, D. & Suttie, J., eds., Taylor & Francis Group, New York, pp. 192–232.
- Kloepper, J. W. (1993). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: *Soil Microbial Ecology*, F.B. Jr., Metting, ed., Marcel Dekker inc., N.Y., pp. 255-273.
- Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes En: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Vol 2. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France, pp. 879- 882.
- Knowles, J. (1989). The Mechanism of Biotin-Dependent Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), pp. 195-221.
- Lazarovits, G., & Nowak, J. (1997). Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment, *HortScience*, 32, pp. 188-192.

- Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J. & Kennedy, C. (2004). Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis Is Deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* Strains with Mutations in Cytochrome c Biogenesis Genes. *Journal of Bacteriology*, 186(16), pp. 5384-5391.
- Li, J., Brader, G., Helenius, E., Kariola, T. & Palva, E. (2012). Biotin deficiency causes spontaneous cell death & activation of defense signaling. *The Plant Journal*, 70(2), pp. 315-326.
- Lucy, M., Reed, E. & R. Glick, B. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), pp. 1-25.
- Marek, M. & Skorupska, A. (2001). Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 & the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biology and Fertility of Soils*, 33(2), pp. 146-151.
- Martinez-Toledo, M., Rodelas, B., Salmeron, V., Pozo, C. & González-López, J. (1996). Production of pantothenic acid and thiamine by *Azotobacter vinelandii* in a chemically defined medium and a dialysed soil medium. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1-2), pp. 131-135.
- Maruyama, J., Yamaoka, S., Matsuo, I., Tsutsumi, N. & Kitamoto, K. (2012). A newly discovered function of peroxisomes: involvement in biotin biosynthesis. *Plant Signaling Behavior*, 7, pp. 1-5.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M. & Takenaka, S. (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and Environments*, 26(2), pp. 128-134.
- Matsukawa, E., Boulygina, E., Kuznetsov, B., Tourova, T., Kravchenko, I. & Gal'chenko, V. (2001). A system of oligonucleotide primers for the amplification of nifH genes of different taxonomic groups of prokaryotes. *Microbiology*, 70, pp. 73-78.
- McBurney, C., Bollen W. & Williams R. (1935). Pantothenic acid and the nodule bacteria-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 21, 301-304.

- Murcia, R., Rodelas, B., Salmerón, V., Martínez-Toledo, M.V. & González-López, J. (1997). Effect of the herbicide simazine on vitamin production by *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Applied Soil Ecology*, 6, pp. 187-193.
- Nautiyal, C. (2006). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), pp. 265-270.
- Nehl, D. B., Allen, S. J., & Brown, J. F. (1996). Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, 5, pp. 1-20.
- Noctor, G. (2006). NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), pp. 1603-1620.
- Patten, C. and Glick, B. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), pp. 207-220.
- Peña, H. & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *INCI*, 32, pp. 560-565.
- Pinton, R., Varanini, Z., & Nannipieri, P. (2001). The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. En *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. N.Y.: Marcel Dekker, Inc. pp. 1-17.
- Primerano, D. & Burns, R. (1983). Role of acetohydroxy acid isomeroeductase in biosynthesis of pantothenic acid in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 153, pp. 259-269.
- Probanza, A., Lucas, J., Acero, N. & Gutierrez Mañero, F. (1996). The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) growth. *Plant and Soil*, 182(1), pp. 59-66.
- Revillas, J., Rodelas, B., Pozo, C., Martínez-Toledo, M. and González-López, J. (2000). Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic

compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), pp. 486-493.

Rodelas, B., Salmerón, V., Martínez-Toledo, M. & González-López, J. (1993). Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media. *Plant and Soil*, 153(1), pp. 97-101.

Sakurai, N., Imai, Y., Masuda, M., Komatsubara, S. & Tosa, T. (1993). Molecular breeding of a biotin-hyperproducing *Serratia marcescens* strain. *Applied of Environmental Microbiology*, 59, pp. 3225-3232.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5(5), pp. 301-307.

Schlöter, M., Dilly, O. & Munch, J. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, pp. 255-262.

Seoáñez, M., Chacón, A.J., Gutiérrez, A. & Angulo, I. (1999b). *Contaminación del suelo: Estudios, tratamientos y gestión*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Sierra, S., Rodelas, B., Martínez-Toledo, M., Pozo, C. & González-López, J. (1999). Production of B-group vitamins by two *Rhizobium* strains in chemically defined media. *J. Appl. Microbiol.*, 86, pp. 851–858.

Somers, E., Vanderleyden, J. & Srinivasan, M., (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet, *Critical Reviews of Microbiology*, 30, pp. 205-240.

Streit, W. & Entcheva, P. (2003). Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Applied of Microbiological Biotechnology*, 61, pp. 21–31.

Sturz, A. V., & Christie, B. R. (2003). Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil Tillage Residues*, 72, pp. 107-123.

Sullivan, J., Brown, S., Yocum, R. & Ronson, C. (2001). The bio operon on the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium* sp. strain R7A includes a novel gene in pimeloyl-CoA synthesis. *Microbiology*, 147, pp. 1315–1322.

- Swaminathan, M. (1991). Sustainable agricultural systems and food security. *Outlook Agricultural*, 20, pp. 243-249.
- Tang, W. (1994) Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. En *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*. Ryder, M.H., Stephens, P.M. y Bowen, G.D. (Eds), CSIRO, Adelaide, pp. 267-273.
- Torres-Rubio, M., Valencia-Plata, S, Bernal-Castillo, J. & Martínez-Nieto, P. (2000). Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. And Pseudomonas sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, pp. 171-176.
- Vargas-García, M.C. & Suárez-Estrella, F. (2008). Efecto de la aplicación del compost sobre las propiedades biológicas del suelo. En: Moreno, J. y Moral, R. *Compostaje*. Mundi-Prensa. Madrid.
- Werner, D. (2001). Organic signals between plants and microorganisms. En *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. N.Y.: Marcel Dekker, Inc., pp. 197-222.
- Werner, D. (2004). Signalling in the rhizobia-legumes symbiosis, En *Plant surface Microbiology*. Varma, A., Abbott, L., Werner, D., Hampp, R., eds Springer, N.Y. pp. 99-119.
- White, W., Gunyuzlu, P. & Toyn, J. (2001). Saccharomyces cerevisiae Capable of de Novo Pantothenic Acid Biosynthesis Involving a Novel Pathway of β -Alanine Production from Spermine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), pp. 10794-10800.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. & De Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle*, 22, pp. 54-57.