



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



UPCT

Escuela Técnica Superior de  
Ingeniería Agronómica



ETSIA

*Grado en Ingeniería Agroalimentaria  
y de Sistemas Biológicos*

Aislamiento e Identificación de Hongos y  
Bacterias de la Rizosfera de Plantas Aromáticas

**Autora:** Pedro Jorquera Garcilópez

**Dirección:** Matías López Serrano

**Codirección:**

Cartagena, diciembre de 2023



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica

**NORMATIVA DE  
TRABAJOS FIN DE ESTUDIOS  
EN LA ETSIA**

ANEXO I

---





## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo titulado “***Aislamiento e Identificación de Hongos y Bacterias de la Rizosfera de Plantas Aromáticas***” presentado por Pedro Jorquera Garcilópez para aspirar al Grado de Ingeniería Agronómica y de Sistemas Biológicos por la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena, y dirigido por el Dr. Matías López Serrano del Departamento de Ingeniería Agronómica,

Ha sido financiado por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la Fundación Séneca - Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia y del programa de la Unión Europea NextGenerationEU

Cartagena, diciembre de 2023

# INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	1
1. INTRODUCCION .....	2
1.1 La ancestral asociación de las plantas con microorganismos .....	2
1.2. Interacciones entre las plantas y los microorganismos .....	3
1.3. Importancia actual de los microorganismos en la agricultura .....	5
1.4. Métodos para el aislamiento e identificación de microorganismos de la rizosfera ..	7
1.5. Microorganismos en plantas aromáticas y medicinales.....	8
2. OBJETIVOS .....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
3.1. Material vegetal .....	11
3.2. Medios de cultivo de microorganismos.....	12
3.3. Cultivo de microorganismos asociados a raíces .....	12
3.4. Aislamiento de hongos y bacterias .....	14
3.5. Identificación de colonias puras de hongos y bacterias .....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Aislamiento de bacterias asociadas a raíces de plantas aromáticas .....	16
4.2. Aislamiento de hongos asociados a raíces de plantas aromáticas.....	18
4.3. Identificación de las bacterias aisladas .....	19
4.4. Identificación de los hongos aislados .....	21
4.5. Selección de los microorganismos para futuros ensayos en campo: creación de un banco de microorganismos asociados a raíces de plantas aromáticas .....	22
4.5.1. Bacterias identificadas .....	23
4.5.2. Hongos identificados .....	26
5. CONCLUSIONES .....	28
6. BIBLIOGRAFÍA .....	29

## RESUMEN

Se ha realizado el aislamiento y la identificación de hongos y bacterias asociadas a la rizosfera de 5 plantas aromáticas: *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Santolina chamaecyparissus*, *Salvia lavandulifolia* y *Helichrysum italicum*. Se han conseguido aislar y cultivar puras 23 bacterias, de las cuales 11 han sido identificadas a nivel de especie por la secuenciación del gen de ARNr 16S (y adicionalmente en algunos casos con el gen *gyrA*). 9 bacterias han sido identificadas por el momento sólo a nivel de género y 3 no han podido secuenciarse. Con respecto a los hongos, se han conseguido aislar 17 hongos en cultivos puros, de los cuales, se han identificado por la secuenciación de la región ITS (y adicionalmente el gen de  $\beta$ -tubulina para uno de ellos) 14 a nivel de especie, 1 a nivel de género y 2 no han podido secuenciarse. La mayoría de las bacterias están descritas como bacterias con actividades que pueden promover el crecimiento en plantas y otras pueden tener posibles aplicaciones biotecnológicas. En los hongos, hemos encontrado patógenos que podrían ser utilizados en estudios de fitopatología y también hemos encontrado 2 hongos de gran interés: *Talaromyces pinophilus* que se ha descrito como microparásito del extendido hongo *Botrytis cinerea* y es un buen candidato para su aplicación como agente de biocontrol; y *Clonostachys rosea* que presenta actividad antagonista frente a diversos hongos patógenos y ya se comercializa por diferentes empresas como agente de control biológico. El trabajo ha permitido disponer de un pequeño banco de hongos y bacterias de la rizosfera para evaluar en próximas investigaciones con plantas aromáticas en cultivo.

## ABSTRACT

The isolation and identification of fungi and bacteria associated with the rhizosphere of 5 aromatic plants has been carried out: *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Santolina chamaecyparissus*, *Salvia lavandulifolia* and *Helichrysum italicum*. 23 bacteria have been isolated and pure cultured, of which 11 have been identified at the species level by sequencing the 16S rRNA gene (and additionally in some cases with the *gyrA* gene). 9 bacteria have so far been identified only at the genus level and 3 have not been sequenced. With respect to fungi, 17 fungi have been isolated in pure cultures, of which 14 have been identified by sequencing the ITS region (and additionally the  $\beta$ -tubulin gene for one of them) at the species level. 1 at genus level and 2 could not be sequenced. Most bacteria are described as bacteria with activities that can promote growth in plants and others may have potential biotechnological applications. In fungi, we have found pathogens that could be used in phytopathology studies and we have also found 2 fungi of great interest: *Talaromyces pinophilus*, which has been described as a microparasite of the widespread fungus *Botrytis cinerea* and is a good candidate for its application as a biocontrol agent; and *Clonostachys rosea*, which presents antagonistic activity against various pathogenic fungi and is already marketed by different companies as a biological control agent. The work has made it possible to have a small bank of fungi and bacteria from the rhizosphere to evaluate in future research with aromatic plants in cultivation.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1 La ancestral asociación de las plantas con microorganismos**

El origen de la vida en la Tierra se sitúa en el medio acuático hace “aproximadamente” 4000 millones de años (dependiendo de las fuentes 4300-3700 millones de años). También existe un amplio margen de tiempo en el que diversos autores sitúan el origen de la fotosíntesis oxigénica, entre 3800 y 2400 millones de años, aunque estudios recientes basados en comparaciones de las secuencias génicas de los fotosistemas y cálculos de dataciones por relojes moleculares, se estima que pudo producirse hace 3400 millones de años (Cardona, 2018).

El siguiente evento significativo en la evolución de la vida en el planeta fue la colonización del medio terrestre por las plantas, que se produjo hace 500-450 millones de años. El paso de un medio acuático a un medio aéreo y la captación de nutrientes de las rocas originarias implicó drásticos cambios. Tanto para evitar la deshidratación como para la absorción de sustancias minerales inorgánicas, los organismos fotosintéticos de ese período no pudieron efectuarlo por sí solos, según apuntan los escasos fósiles encontrados; la simbiosis entre algas con hongos actualmente extintos, como Spongiophyton o el gigante Prototaxites, parece ser la clave de la colonización terrestre en los primeros ecosistemas (Selosse y Strullu-Derrien, 2015). La aparición de ciertos genes (protein-quinasas dependientes de calcio-calmodulina) en ciertas algas acuáticas, ancestros de las plantas terrestres, podrían haber permitido la simbiosis con ciertos hongos que les conferiría la posterior capacidad para la adaptación al medio terrestre (Delaux y cols., 2015). La evolución posterior durante millones de años entre los distintos grupos de plantas que iban surgiendo y los diversos microorganismos existentes en su entorno, conllevó la aparición de nuevos genes y nuevas rutas metabólicas marcadas por el establecimiento de simbiosis con organismos beneficiosos y la defensa frente a organismos patógenos, dando lugar a las complejas interacciones actuales que estamos empezando a comprender (Delaux y Schornack, 2021).

## **1.2. Interacciones entre las plantas y los microorganismos**

La interacción entre las plantas y los microorganismos durante millones de años ha dado lugar a complejas relaciones, que actualmente se observan tanto en ecosistemas naturales como agrícolas, con microorganismos beneficiosos, pero también con patógenos, especialmente bacterias y hongos (Dolatabadian, 2020). De esas interacciones en estos ecosistemas subterráneos surge el término rizosfera, para referirse a la zona donde se desarrollan las raíces de las plantas y conviven los diferentes tipos de microorganismos que interactúan con ellas y entre sí.

En términos amplios, las interacciones entre plantas y microbios se basan en un principio común de la biosfera que es el intercambio de nutrientes o, en definitiva, de energía. Dependiendo de cómo sea ese intercambio, se establecen las diferentes relaciones: beneficiosas para plantas y microbios (donde se establecen relaciones simbióticas), o perjudiciales para las plantas y beneficiosas para los microorganismos, que resultan ser parásitos o patógenos si llegan a producir la muerte o enfermedad de la planta (Spanu y Panstruga, 2017).

En el caso de las interacciones entre las raíces de las plantas y organismos beneficiosos, estos contribuyen aportando nutrientes minerales y nitrógeno fijado de la atmósfera, promueven el crecimiento por la producción de fitohormonas, mitigan procesos de diversos estreses e incluso presentan antagonismo con otros microorganismos patógenos (Dolatabadian, 2020). La planta suministra a estos organismos una fuente de carbono reducido en forma de carbohidratos u otros compuestos orgánicos excretados como exudados radiculares. Estos organismos suelen ser hongos micorrízicos y otros hongos no micorrízicos, rizobacterias fijadoras de nitrógeno y otras bacterias que favorecen el crecimiento vegetal denominadas PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

En los últimos años, el número de publicaciones sobre el estudio de las interacciones entre plantas y microorganismos es enorme, tanto por el interés científico como por el interés aplicado para su uso en una agricultura más sostenible. Existen numerosos estudios que intentan dilucidar los mecanismos moleculares implicados en el proceso de reconocimiento tanto de organismos

beneficiosos que permiten el establecimiento de relaciones simbióticas, como de organismos patógenos que desencadenan respuestas de defensa por las plantas, lo que, en ambos casos, implica una reprogramación de los procesos metabólicos de las células vegetales (Dolatabadian, 2020).

El estudio de las relaciones entre las plantas y los microorganismos que pueden habitar la rizosfera son muy complejos por las muchas variables que pueden estar implicadas.

Con respecto a la planta, las investigaciones realizadas apuntan al efecto que pueden tener diversos factores, como la especie vegetal, su edad o estado de desarrollo, el tipo de suelo, el pH y el estado nutricional. Dependiendo de estos factores, el microbiota que se establece en la rizosfera puede variar y modificarse por la planta en función de los cambios en los citados parámetros (El-Shatnawi y Makhadmeh, 2001; Marschner y cols, 2004).

Los factores ambientales parecen también ser determinantes tanto para los procesos de la planta como de los microorganismos de la rizosfera. Así, factores como la temperatura, la humedad, la luz con su efecto en los ritmos circadianos y el estado nutricional, especialmente los niveles de fosfato, nitrógeno y hierro afectan muy significativamente tanto al metabolismo de la planta como al de los microorganismos del entorno (Cheng y cols., 2019).

Aunque los procesos de “comunicación” a nivel molecular entre planta y microorganismos es todavía poco conocido, un factor clave para el establecimiento de diferentes comunidades microbianas en la rizosfera es la composición de los metabolitos presentes en los exudados de las raíces hacia el suelo. Estos exudados pueden contener muy diversos metabolitos, como aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, ácidos grasos, esteroides, vitaminas, flavonoides y otros compuestos fenólicos, terpenos y otros (Vives-Peris y cols., 2020). La planta puede modificar la composición de estos exudados en función de diferentes estados fisiológicos o por los diferentes tipos de estrés y establecer interacciones con microorganismos de la rizosfera que podrían variar en función de los cambios en los exudados. De la misma manera, la relación de los microorganismos con la planta también puede inducir determinados cambios en

las células vegetales que determinan la respuesta con variaciones en la composición de los exudados (Qu y cols., 2020).

En cualquier caso, dependiendo tanto de factores abióticos como bióticos la composición de los exudados puede modificarse por la planta y ser muy específica en cada caso y en cada especie, y determinará la especificidad de las relaciones planta-microorganismo, al igual que la presencia de unos organismos influirá en la presencia o ausencia de otros microorganismos.

### **1.3. Importancia actual de los microorganismos en la agricultura**

Es un hecho que el uso excesivo, que durante décadas, se ha hecho de la fertilización química y de plaguicidas sintéticos en la agricultura ha causado innumerables problemas a muchos niveles: contaminación de acuíferos, presencia de compuestos fitosanitarios en las cadenas tróficas, aumento de plagas y enfermedades en plantas, organismos patógenos más resistentes, pérdida de fertilidad de las tierras de cultivo, salinización de las mismas e incluso aumento de la desertificación en zonas sobreexplotadas. Entre los factores que más se ven afectados está la pérdida de biodiversidad y el desequilibrio de los ecosistemas naturales, entre los que se encuentra el suelo, que se habían establecido durante millones de años con la evolución.

La tendencia actual hacia una agricultura más sostenible, como la agricultura ecológica, y una versión más radical como la permacultura, están demostrando la posibilidad de regeneración de las tierras de cultivo y el establecimiento de nuevos equilibrios ecológicos en los sistemas agrícolas que incrementan, finalmente, la “salud” de la tierra y la productividad sostenible. En este sentido, el ecosistema que se establece en la rizosfera, entre las plantas y los diversos microorganismos, apunta a ser uno de los factores más cruciales para abordar el problema.

Por otro lado, también existen detractores de estas prácticas más respetuosas, argumentando, principalmente, la imposibilidad de producir alimentos suficientes para alimentar a la desmesuradamente creciente población humana. El reto para la ingeniería agrónoma es enorme, y de las investigaciones científicas y su

aplicación en el campo de la producción dependerá, en gran parte, el futuro de la producción de alimentos y otros bienes derivados de las plantas.

Como se comentó en el apartado anterior, las interacciones que se establecen en la rizosfera, entre las raíces de las plantas y los numerosos microorganismos que se desarrollan en su entorno, presenta una enorme complejidad por la gran variedad de factores, bióticos y abióticos, que pueden influir. A pesar del elevado número de investigaciones publicadas al respecto, con un crecimiento exponencial en la última década, todavía no se tiene un conocimiento profundo sobre los mecanismos que rigen el establecimiento de las relaciones planta-microorganismos y microorganismos-microorganismos dentro de la rizosfera. No obstante, existe un creciente número de organismos aislados del suelo que se están empezando a comercializar como insumos en agricultura, para su aplicación en el campo de la fertilización y en el campo de la protección frente a patógenos o frente a diferentes tipos de estrés. El mercado de estos productos está en plena expansión y son muchas las empresas interesadas en su producción.

Las estrategias actuales para la comercialización de productos microbiológicos para la agricultura se basan principalmente en cuatro propiedades que pueden conferir determinados microorganismos. La primera de ellas es el incremento en la capacidad nutricional de la planta gracias a la fijación atmosférica de  $N_2$  y la solubilización de nutrientes inmovilizados en el suelo, especialmente P, K y Fe. La segunda propiedad que se busca en estos microorganismos es la protección frente a otros organismos patógenos mediante la producción de compuestos repelentes, antibióticos, enzimas hidrolíticas, etc. La tercera propiedad es la protección frente al estrés abiótico, especialmente frente a la escasez de agua y a la salinidad de los suelos. Y la última propiedad que se busca es la de promover el crecimiento y desarrollo, generalmente por la capacidad para producir ciertas hormonas que estimulen el desarrollo de las plantas. Los microorganismos ensayados para ello incluyen bacterias promotoras del crecimiento, bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (libres o en simbiosis), bacterias movilizadoras de P, K, S y Fe, hongos productores de antibióticos y hongos micorrízicos capaces de introducirse en capas del suelo más profundas para la adquisición de nutrientes minerales y de agua. No obstante, también se apunta a la

importancia que debe tener la composición de los exudados radiculares para que la interacción de estos microorganismos suministrados tenga éxito. En este sentido, la investigación sobre estos compuestos para su comercialización todavía está en sus inicios. (Backer y cols., 2018; Santoyo y cols., 2021; Mohanram y Kumar, 2019; Pantigoso y cols., 2022).

#### **1.4. Métodos para el aislamiento e identificación de microorganismos de la rizosfera**

En los inicios de los estudios del microbioma presente en la rizosfera se empleaban técnicas de microbiología estándar basadas en el crecimiento sobre medios de cultivo más o menos selectivos, observaciones microscópicas y pruebas bioquímicas. Estos métodos presentaban muchas limitaciones por la imposibilidad de cultivar la mayoría de los microorganismos presentes en el suelo. Se estima que tan sólo el 10% de los microorganismos de la rizosfera pueden ser cultivados (Amann y Kuhl, 1998, Hirsch y cols., 2010).

La llegada de las técnicas moleculares ha revolucionado el estudio del microbioma del suelo. El aislamiento directo del suelo de ácidos nucleicos tras una lisis general ha permitido el análisis rápido de los organismos presentes en él. La técnica de PCR de regiones variables en el ADN codificante del ARNr 16S para procariontes y 18S para eucariotes, así como regiones ITS. El conocimiento creciente de secuencias genómicas de microorganismos permitió el uso de otras herramientas genómicas como los microarrays y la hibridación in situ con sondas fluorescentes para la detección de microorganismos concretos (Elsas y Boersma, 2010; Kirk y cols., 2004; Amann y cols., 2001). El increíble avance de las técnicas moleculares actualmente está permitiendo el análisis rápido del metagenoma aislado de un suelo con análisis de productos de PCR masivos a partir de primers universales, con PCRs cuantitativas de secuencias concretas y con las nuevas técnicas de secuenciación de alto rendimiento (High-throughput sequencing) capaces de leer múltiples secuencias de ADN simultáneamente junto con el desarrollo de aplicaciones bioinformáticas (Hirsch y cols., 2010).

### 1.5. Microorganismos en plantas aromáticas y medicinales

Dada la escasez de recursos hídricos actuales y, presumiblemente futuros dentro del marco del cambio climático que nos afecta, la viabilidad de ciertos cultivos muy extendidos en nuestro entorno, y con gran elevada demanda hídrica, podría verse comprometida. El sector de la producción de plantas aromáticas y medicinales es de gran interés en la región mediterránea y, especialmente en nuestra Región de Murcia por el incremento exponencial de la superficie cultivada en los últimos años. Este tipo de cultivos podría convertirse en una alternativa más viable económicamente dados los menores requerimientos hídricos, nutricionales y fitosanitarios que demanda.

En el presente trabajo, el objeto de estudio se centra en plantas aromáticas y medicinales y los microorganismos que habitan en sus rizosferas, con el fin de obtener recursos biológicos que contribuyan a un manejo sostenible y más eficiente de estos cultivos.

Se ha descrito la presencia de una gran variedad de bacterias que se asocian con las raíces de plantas aromáticas, muchas de ellas de forma endofítica, y que benefician de varias formas el desarrollo de estas plantas. Así se han aislado de plantas aromáticas bacterias de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Nocardia*, *Blackwater*, *Amycolatopsis*, *Planomyrobium*, *Actinoallomuru*, *Micrococcus*, *Panthea*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. También se ha reportado el efecto beneficioso que estos microorganismos tienen en el desarrollo de estas plantas a través de diferentes mecanismos que promueven el desarrollo a través de la síntesis de ácido Indolacético o ACC desaminasa, aumentan la resistencia frente a sequía o salinidad mediante la inducción de síntesis de melatonina o ácido salicílico, movilizan nutrientes minerales como P por producción de fosfatasas o hierro por excreción de compuestos quelantes, fijan nitrógeno atmosférico, o aumentan la resistencia a microorganismos patógenos mediante la producción de antibióticos, enzimas, o inducen los mecanismos de respuesta inducida sistémica por la emisión de compuestos volátiles. Adicionalmente se ha descrito también el aumento de metabolitos secundarios de diversa naturaleza en plantas asociadas a estas bacterias (Nguyen y cols., 2023).

La presencia de ciertos hongos, tanto micorrícicos como no micorrícicos, también se ha descrito en plantas aromáticas y se ha observado su influencia en el incremento de metabolitos secundarios (Shaikh y Mokat, 2018).

Se ha investigado el efecto que provocan diferentes microorganismos al inocularse en diversas plantas aromáticas y medicinales. En orégano, la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* y *Bradyrhizobium sp* incrementa la longitud y el peso de los tallos, el número de hojas y el peso seco de las raíces, incrementando considerablemente la producción de aceite esencial (Banchio y cols., 2008). La inoculación en *Artemisia annua* L. con el hongo micorrícico *Glomus mosseae* y la bacteria *Bacillus subtilis*, incrementan de forma sinérgica el contenido en artemisina (Awasthi y cols., 2011). En general, la biofertilización con diversos microorganismos como fijadores de nitrógeno, movilizadores de fósforo y hongos micorrícicos aumentan los rendimientos de los cultivos de plantas aromáticas y medicinales e incrementan la producción de aceites esenciales y otros metabolitos secundarios (Khalid, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

Abrir una nueva Línea de Investigación sobre Microbiología de la Rizosfera con aplicaciones agrícolas.

Aislar e identificar hongos y bacterias asociados a la rizosfera de Plantas Aromáticas para su futuro ensayo en cultivos de estas plantas.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Las muestras de raíces de plantas aromáticas de este estudio se recogieron al inicio de la primavera en una plantación cultivada en modo ecológico, en un período próximo a la finalización del cultivo, con riego deficitario y sin abonado desde final del ciclo anterior.

Las especies vegetales fueron *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Santolina chamaecyparissus*, *Salvia lavandulifolia* y *Helichrysum italicum*. Las muestras de raíces para su incubación fueron tomadas de la muestra de campo (Imagen 1) seleccionando partes no muy envejecidas, raíces secundarias, y mezcladas en una muestra única (Imagen 2). El material recogido en campo se introdujo en una bolsa de plástico hermética y se conservó a 4° C hasta su procesado.



**Imagen 1.** Muestra del sistema radicular tomada en campo. La imagen corresponde a *Melissa officinalis*.



**Imagen 2.** Muestras de raíces seleccionadas para la incubación previa. A la izquierda raíces de *Santolina chamaecyparissus* y a la derecha raíces de *Salvia officinalis*.

### **3.2. Medios de cultivo de microorganismos**

Todos los medios de cultivo ensayados se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos. Los medios sólidos con agar se distribuyeron en placas Petri que fueron selladas con Parafilm tras su solidificación y hasta su uso.

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes.

#### Agua de Peptona. (Incubación pre-siembra)

Polipeptona Bacteriológica (Microkit S.L.) 10 g/L

NaCl (Panreac) 5 g/L

pH 7,2 ajustado con NaOH

#### Medio Nutritivo 2 (M2) CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) (Bacterias)

Extracto de ternera (Sharlau) 1 g/L

Extracto de levadura (Sharlau) 2 g/L

Polipeptona Bacteriológica (Microkit S.L.) 5 g/L

NaCl (Panreac) 5 g/L

Agar bacteriológico (Cultimed), para medio sólido, 15 g/L

pH 7,2 ajustado con NaOH

#### Medio PDA (Sharlau) (Hongos)

Infusión de Patatas 4 g/L

D-(+)-Glucosa 20 g/l

Agar 15 g/L

### **3.3. Cultivo de microorganismos asociados a raíces**

#### Precultivo de las muestras

Las raíces seleccionadas, aproximadamente 1 g, fueron incubadas previamente en matraces Erlenmeyer de 50 ml, que contenían 10 ml de agua de peptona, en agitación orbital a 90 rpm y a temperatura ambiente durante 40 minutos (Imagen 3). Transcurrido el tiempo de incubación se introdujeron en la cabina de flujo laminar para la siembra en placa en medio sólido. Este proceso se repitió por

duplicado en dos días diferentes espaciados 2 semanas con las muestras conservadas a 4°C.



**Imagen 3.** Muestras de raíces incubadas en agua de peptona preparadas para la siembra en placa en medios sólidos

### Siembra de las muestras en medios de cultivo sólidos

Para la siembra de las muestras, se pipetearon 50 o 100 microlitros, del medio de incubación previa de las raíces, por cada placa del medio de cultivo seleccionado, esparciendo la muestra lo más homogéneamente posible con un asa de Digrafski. Las muestras se sembraron por quintuplicado tanto para bacterias como para hongos.

Para el cultivo de bacterias se empleó el medio M2 descrito por la CECT, ya que en él pueden crecer la mayoría de las bacterias asociadas a raíces descritas en la bibliografía.

Para el cultivo de hongos se empleó el medio PDA (Patata-dextrosa-agar) descrito como medio general para la mayoría de los hongos previsibles según la bibliografía.

Las placas sembradas fueron incubadas a 30° C y el crecimiento fue seguido cada 24 horas hasta la aparición de las colonias microbianas.

### 3.4. Aislamiento de hongos y bacterias

Las bacterias fueron seleccionadas de las placas del medio M2 con un asa de cultivo a partir de colonias aisladas y resembradas nuevamente en placas individualmente. De igual manera se procedió con los hongos en medio PDA.

### 3.5. Identificación de colonias puras de hongos y bacterias

Inicialmente se procedió a la extracción de ADN de los microorganismos aislados para la posterior PCR con cebadores, o primers, de la región codificante para el ARNr 16S para bacterias y para hongos de regiones ITS (espaciador transcrito interno) localizadas entre los genes de ARNr 18S y 5.8S.

Por motivos de tiempo decidimos externalizar el servicio de amplificación y secuenciación a la empresa Genoma Laboratorio (Alhama de Murcia), para lo cual crecimos los microorganismos en medios líquidos y se les suministró una pequeña muestra de cada cultivo conservada en etanol.

Para la identificación inicial de **bacterias** a partir del producto de PCR del gen del ARNr 16S, se asignaron los taxones de acuerdo al análisis en la base de datos EZBioCloud. Se indicaron los taxones con valores de semejanza superiores al 98.70 %, siguiendo las recomendaciones facilitadas por la base de datos. En los casos en los que se obtuvieron varias especies con semejanzas distintas, pero superiores a este límite, se indicó el género identificado como resultado del análisis. No obstante, en los informes de resultados individuales para cada muestra, se indican todas las especies identificadas con valores superiores al 98.70 %, sugiriendo la exploración de otros genes para profundizar en su resolución taxonómica.

Las secuencias fueron igualmente analizadas en la base de datos GenBank (NCBI), mediante la herramienta BLASTN, con el objetivo de confirmar o comparar los resultados obtenidos por EZBioCloud. En los casos en los que se obtuvieron resultados ligeramente distintos, se eligió la información aportada por la base de datos EZBioCloud, por su mayor especificidad para la identificación de bacterias.

En los casos en los que se obtuvieron varios taxones con valores de semejanza superiores al 98.70 % en EZBioCloud, se escogió la especie que presentó consistencia con el análisis con BLASTN en la base de datos GenBank. En caso contrario, se especificó únicamente el género identificado.

Para la identificación inicial de **hongos** a partir del producto de PCR de la región génica ITS, Se asignaron los taxones de acuerdo con el análisis en la base de datos MycoBank, mediante el uso de la herramienta MycoID. Se escogió el primer taxón indicado en el alineamiento ofrecido por MycoID, por considerarse generalmente como el mejor resultado, siguiendo las recomendaciones facilitadas por la base de datos.

En caso de incluir distintos taxones en la misma celda, los valores de semejanza indicados en la tabla se refieren siempre a la primera especie obtenida por MycoID. El resto de las especies indicadas en la misma celda, presentaron semejanzas iguales o inferiores a la primera, pero siempre superiores al 99 %.

Las secuencias fueron igualmente analizadas en la base de datos GenBank, mediante la herramienta BLASTN, con el objetivo de confirmar o comparar los resultados obtenidos por MycoID. En los casos en los que se obtuvieron resultados ligeramente distintos, se eligió la información aportada por la base de datos MycoBank, por su mayor especificidad para la identificación de hongos.

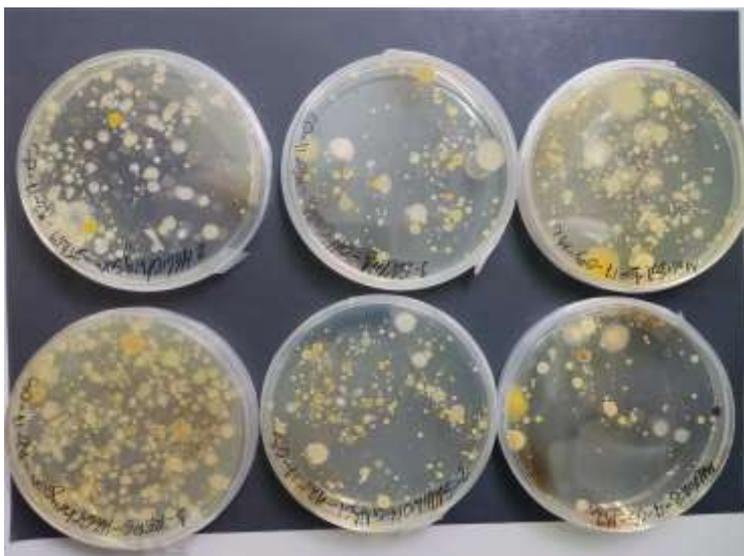
#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se comentó en la introducción, varios autores estiman que sólo el 10% de los microorganismos de la rizosfera detectados microscópicamente son susceptibles de ser cultivados, aunque también indican que muchos de ellos podrían estar moribundos o ser dependientes de otros microorganismos (Hirsch y cols., 2010).

Puesto que nuestro objetivo no es realizar un estudio exhaustivo de los microorganismos que habitan la rizosfera, sino aislar los que puedan resultarnos útiles para su aplicación en cultivos de plantas aromáticas, optamos por el método de selección descrito en el apartado anterior, considerando que los organismos que pudieran crecer están activos en la rizosfera y pueden ser representativos significativamente en la actividad del ecosistema. Escogimos un número significativo de colonias en cada caso, aunque el número total es elevado y su análisis masivo excedía el objetivo y el presupuesto de este trabajo.

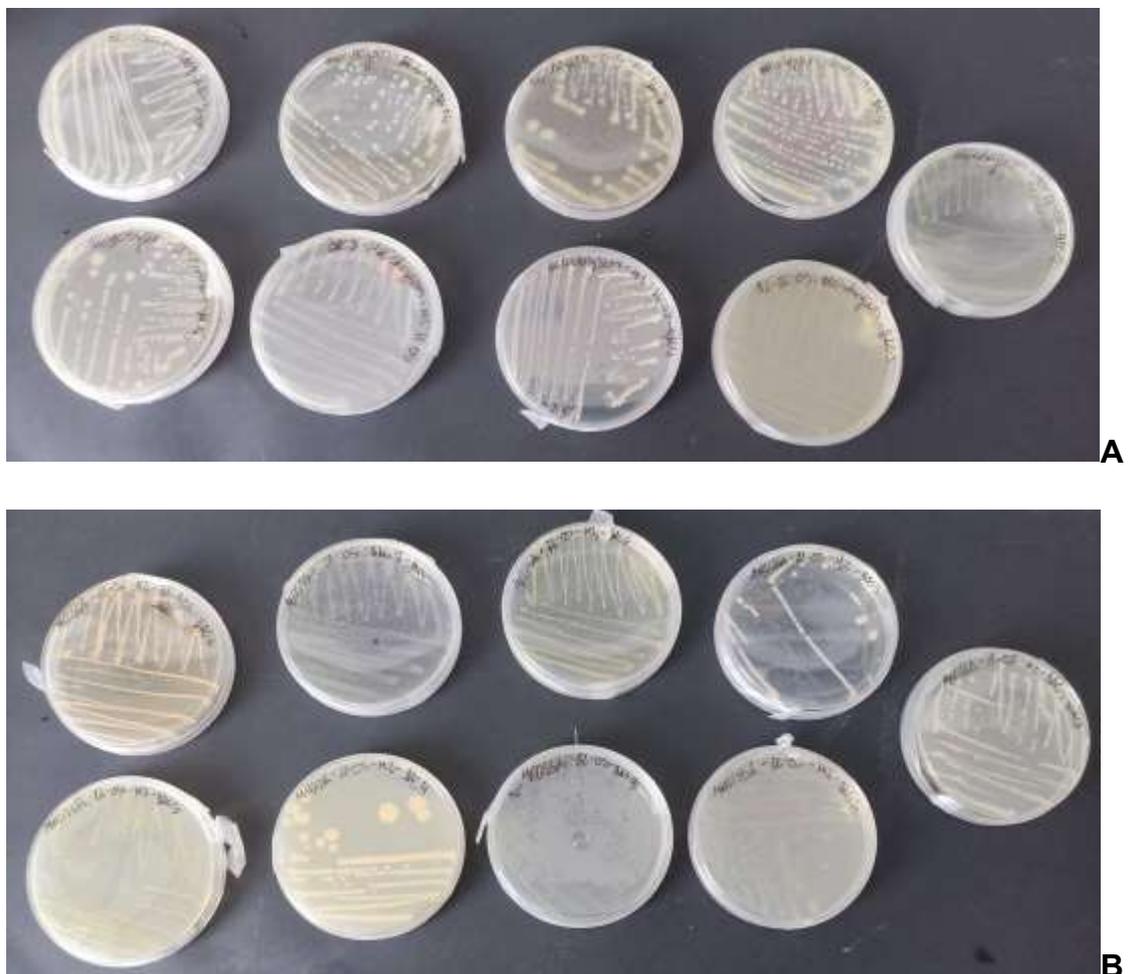
##### 4.1. Aislamiento de bacterias asociadas a raíces de plantas aromáticas

Una vez realizada la siembra en placas con medio M2 y transcurridos entre 2-4 días de cultivo, obtuvimos cultivos heterogéneos con colonias bien definidas para poder ser aisladas y cultivadas individualmente (Imagen 4).



**Imagen 4.** Ejemplo de cultivo en Medio M2 de las muestras precultivadas en agua de peptona para la selección individual de colonias.

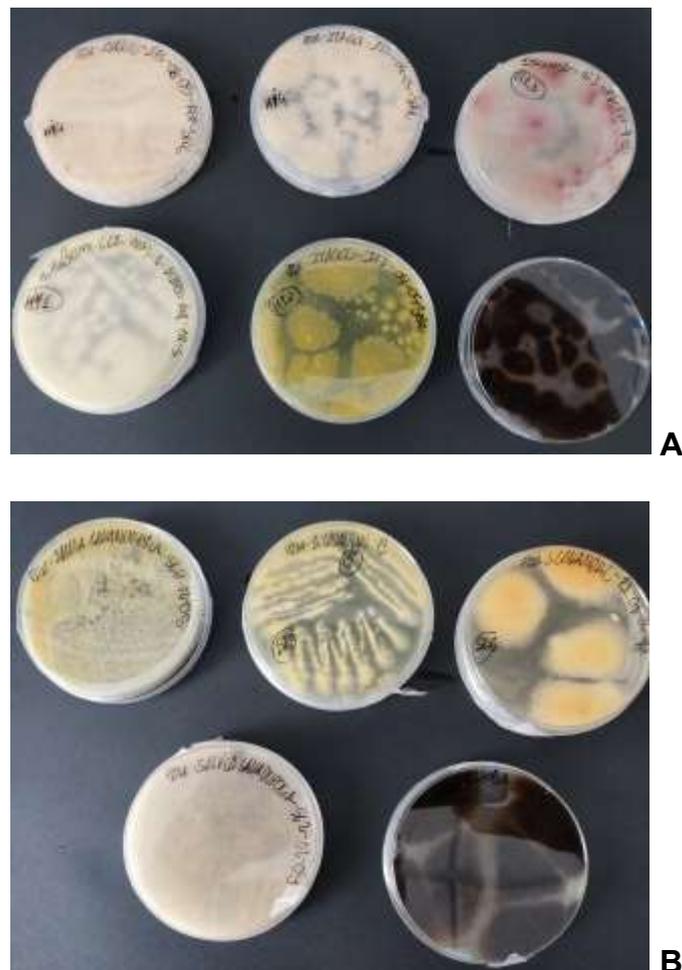
Las colonias aisladas individualmente fueron cultivadas varias veces hasta estar seguros de tener cultivos puros y homogéneos. Algunas de las muestras seleccionadas presentaron dificultad en su crecimiento y perdimos algunas de ellas. Finalmente conseguimos tener cultivos estables de 23 bacterias diferentes. No fue posible obtener bacterias puras de las muestras de *Santolina* por contaminación continua con hongos. Las bacterias obtenidas distribuidas por especie vegetal fueron 2 para *Salvia lavandulifolia* (B1 y B2), 5 para *Salvia officinalis* (B3-B7), 8 para *Helichrysum italicum* (B8-B15) y 8 para *Melissa officinalis* (B16-B23). En la Figura 5 se muestran algunos de los cultivos puros de las bacterias obtenidas.



**Figura 5.** Cultivos de bacterias seleccionadas puras de *Helichrysum italicum* (A, arriba) y *Melissa officinalis* (B, abajo).

#### 4.2. Aislamiento de hongos asociados a raíces de plantas aromáticas

Con los hongos cultivados en PDA procedentes de las raíces de las 5 plantas aromáticas del estudio, procedimos de la misma forma que con las bacterias, de modo que transcurridos entre 4-6 días aislamos colonias individualmente y fueron subcultivadas varias veces hasta estar seguros de tener cultivos puros y homogéneos. Finalmente conseguimos tener cultivos estables de 17 hongos puros. En este caso sí pudimos obtener muestras procedentes de Santolina. Los hongos obtenidos distribuidos por especie vegetal fueron 1 para *Salvia officinalis* (H1), 5 para *Salvia lavandulifolia* (H2-H6), 5 para *Santolina chamaecyparissus* (H7-H11), 3 para *Helichrysum italicum* (H12-H14) y 3 para *Melissa officinalis* (H15-H17)). En la Figura 6 se muestran algunos de los cultivos puros de los hongos obtenidos.



**Figura 6.** Cultivos de hongos seleccionados puros de *Helichrysum italicum* (A, arriba) y *Salvia lavandulifolia* (B, abajo).

### 4.3. Identificación de las bacterias aisladas

En la mayoría de las bacterias seleccionadas para su identificación con el fragmento corto del gen 16S, pudo llegarse a la identificación a nivel de Género, algunas a nivel de especie y 3 no pudieron identificarse por arrojar secuencias incongruentes. Con las bacterias no identificadas a nivel de especie se procedió a una nueva amplificación con el gen completo 16S o bien con el gen *gyrA* (que codifica la subunidad A de la DNA girasa) empleado para el género *Bacillus* y relacionados. Las bacterias que mostraron secuencias incongruentes deben ser cultivadas de nuevo y seleccionar colonias individuales para descartar posibles contaminaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, donde se especifica la planta de la que proceden las bacterias, la secuencia de referencia del GenBank del NCBI y el porcentaje de concordancia o semejanza con la misma.

**Tabla 1.** Resultados de la identificación de las bacterias aisladas.

Muestra / Procedencia	Taxón	Gen explorado	Semejanza (%)	Secuencia de referencia (NCBI)
B1 <i>Salvia lavandulifolia</i>	<i>Achromobacter sp.</i>	16S	99.07	HG324052
B2 <i>Salvia lavandulifolia</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S	98.19	CP000926
B3 <i>Salvia officinalis</i>	<i>Peribacillus sp.</i>	16S	98.64	LMBV01000055
B4 <i>Salvia officinalis</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	16S	99.80	X67222
B5 <i>Salvia officinalis</i>	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	16S	99.71	LDJK01000058
B6 <i>Salvia officinalis</i>	<i>Stenotrophomonas bentonitica</i> cepa BII-R7(T)	16S	100	LT622838
B7 <i>Salvia officinalis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	16S/ <i>gyrA</i>	99.90/ 98.97	MAOI01000012/ CP054568.1
B8 <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Priestia megaterium.</i>	16S/ <i>gyrA</i>	99.79	CP047699.1
B9 <i>Helichrysum italicum</i>	SECUENCIA INCONGRUENTE	16S		

**Tabla 1.** Continuación

Muestra / Procedencia	Taxón	Gen explorado	Semejanza (%)	Secuencia de referencia (NCBI)
<b>B10</b> <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Bacillus haynesii</i>	16S	99.38	MRBL01000076
<b>B11</b> <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Bacillus sp</i>	16S	99.51	MRBL01000076
<b>B12</b> <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Microbacterium barkeri</i>	16S	99.80	X77446
<b>B13</b> <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Peribacillus frigiditolerans</i>	16S/gyrA	99.17	CP110132.1
<b>B14</b> <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Peribacillus frigiditolerans</i>	16S/gyrA	99.17	CP110132.1
<b>B15</b> <i>Helichrysum italicum</i>	SECUENCIA INCONGRUENTE	16S		
<b>B16</b> <i>Melissa officinalis</i>	<i>Ensifer adhaerens</i>	16S	100	JNAE01000171
<b>B17</b> <i>Melissa officinalis</i>	SECUENCIA INCONGRUENTE	16S		
<b>B18</b> <i>Melissa officinalis</i>	<i>Ensifer sp.</i>	16S	99.60	JNAE01000171
<b>B19</b> <i>Melissa officinalis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	16S	99.80	ASJC01000029
<b>B20</b> <i>Melissa officinalis</i>	<i>Microbacterium oleivorans</i>	16S	99.59	LT223597.1
<b>B21</b> <i>Melissa officinalis</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	16S	99.01	BBXP01000056
<b>B22</b> <i>Melissa officinalis</i>	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	16S	99.63	BCRF01000095
<b>B23</b> <i>Melissa officinalis</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	16S	99.69	MK480726

En la Tabla 1 se resaltan en azul las bacterias que podemos considerar identificadas a nivel de especie con una confianza suficiente (11 de las 23 seleccionadas inicialmente) y con las que ya podremos trabajar. El resto de bacterias deben ser identificadas explorando otros genes. Estos trabajos se

realizarán más adelante ya que algunas de ellas pueden resultar muy valiosas para nuestros fines.

#### 4.4. Identificación de los hongos aislados

La mayoría de los hongos seleccionados pudieron ser identificados a nivel de especie con la secuenciación de la región ITS. Para dos hongos, H1 y H10, hubo que recurrir a estudiar otras regiones, el factor de elongación EF-1 $\alpha$  para el hongo H1 y una región del gen de la  $\beta$ -tubulina para el hongo H10. El hongo H2 no se volvió a investigar por presentar idéntico aspecto en el cultivo que H1. Los hongos H3 y H6 dieron resultados incongruentes en la secuenciación y deben volver a cultivarse a partir de colonias individuales para descartar posibles contaminaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, donde se especifica la planta de la que proceden los hongos, la secuencia de referencia del Mycobank (excepto para H1 y H10 que hubo que recurrir a GenBank al secuenciarse otros genes) y el porcentaje de concordancia o semejanza con la misma.

**Tabla 2.** Resultados de la identificación de los hongos aislados.

Muestra / Procedencia	Taxón	Región explorada	Semejanza (%)	Secuencia de referencia (MycoBank)
H1 <i>Salvia officinalis</i>	<i>Cladosporium vicinum</i>	EF-1 $\alpha$	99,59	HM148300.1 (GenBank)
H2 <i>Salvia lavandulifolia</i>	<i>Cladosporium tenuissimum</i> <i>/cladosporioide/vicinum</i>	ITS	100	CNRMA16.635/CBS 112388
H3 <i>Salvia lavandulifolia</i>	RESULTADOS INCONGRUENTES	ITS		
H4 <i>Salvia lavandulifolia</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITS	100	JW 288013 MZ890525
H5 <i>Salvia lavandulifolia</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i>	ITS	100	FMR 13982
H6 <i>Salvia lavandulifolia</i>	RESULTADOS INCONGRUENTES	ITS		
H7 <i>S. chamaecyparissus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITS	100	JW 288013 MZ890525

**Tabla 2.** Continuación.

Muestra / Procedencia	Taxón	Gen explorado	Semejanza (%)	Secuencia de referencia (MycoBank)
H8 <i>S. chamaecyparissus</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i>	ITS	100	FMR 13982
H9 <i>S. chamaecyparissus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITS	100	UOA/HCPF 14172
H10 <i>S. chamaecyparissus</i>	<i>Penicillium flavigenum</i>	$\beta$ -tubulina	99,79	OU641467.1 (GenBank)
H11 <i>S. chamaecyparissus</i>	<i>Penicillium vinaceum</i>	ITS	100	SH0884485.09FU EU833227
H12 <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	ITS	100	UOA/HCPF 8934
H13 <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITS	100	UOA/HCPF AB82
H14 <i>Helichrysum italicum</i>	<i>Fusarium annulatum</i>	ITS	100	LC13675 MW016496
H15 <i>Melissa officinalis</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>	ITS	100	UOA/HCPF 8806
H16 <i>Melissa officinalis</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i>	ITS	100	FMR 13982
H17 <i>Melissa officinalis</i>	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	100	MIRRI0144403

De los 17 hongos seleccionados inicialmente, disponemos de 14 identificados con un gran margen de confianza y podremos trabajar con ellos en próximas investigaciones.

#### **4.5. Selección de los microorganismos para futuros ensayos en campo: creación de un banco de microorganismos asociados a raíces de plantas aromáticas**

Los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación de hongos y bacterias, que crecen en el entorno de las raíces de las plantas aromáticas seleccionadas, son un inicio prometedor para abordar estudios posteriores de su efecto sobre el cultivo de estas.

#### **4.5.1. Bacterias identificadas**

Con respecto a las bacterias identificadas, se dispone de las siguientes especies:

##### Obtenidas de *Salvia officinalis*:

*Sinorhizobium meliloti*

*Stenotrophomonas chelatiphaga*

*Stenotrophomonas bentonitica* cepa BII-R7(T)

##### Obtenidas de *Helichrysum italicum*:

*Priestia megaterium*

*Bacillus haynesii*

*Microbacterium barkeri*

*Peribacillus frigoritolerans*

##### Obtenidas de *Melissa officinalis*:

*Ensifer adhaerens*

*Microbacterium oleivorans*

*Microbacterium hydrocarbonoxydans*

Las bacterias identificadas sólo a nivel de Género se seguirán investigando por el interés que pueden tener para su aplicación. Estas son las siguientes:

##### Bacterias por identificar

*Achromobacter* sp.

*Pseudomonas* sp.

*Peribacillus* sp.

3 *Bacillus* sp.

*Ensifer* sp.

*Rhodococcus* sp.

*Microbacterium* sp.

Como se describe a continuación, se ha descrito que algunas de estas bacterias están relacionadas directamente con efectos beneficiosos para las plantas, otras

pueden ser potencialmente explotables con fines biotecnológicos por las actividades que presentan.

### ***Sinorhizobium meliloti***

Es una bacteria que establece simbiosis con leguminosas formando nódulos y contribuye a la fijación de nitrógeno atmosférico incluso en condiciones de salinidad de los suelos (Roumiantseva y Muntyan, 2015). Existen muchas publicaciones sobre la simbiosis de esta y otras rizobacterias con leguminosas, pero no se ha encontrado bibliografía de su interacción con otro tipo de plantas, incluidas las aromáticas y medicinales. Está descrito el crecimiento de estas y otras bacterias en forma de biofilm en torno a las raíces, que contribuiría a su supervivencia en condiciones de diferentes estreses y que podría ser un factor para tener en cuenta a la hora de establecer la simbiosis (Rinaudi y Giordano, 2010).

### ***Stenotrophomonas chelatiphaga***

Está descrita su implicación en la promoción del crecimiento de plantas, estimula el crecimiento de las raíces por producción de auxinas y confiere resistencia a estrés hídrico y salino por producción de enzimas y osmoprotectores (Ulrich y cols., 2021). También se ha descrito su producción de sideróforos de Fe y Zn, y el aumento de estos elementos y el incremento de P en las plantas a las que se asocia (Ghavami y cols., 2017; Ghavami y cols., 2016). Como posible aplicación biotecnológica en descontaminación, también se ha descrito la capacidad de algunas cepas para la degradación de hidrocarburos y aceites (Goncharova y cols., 2021).

### ***Stenotrophomonas bentonitica cepa BII-R7***

No se ha encontrado bibliografía que implique esta bacteria en el crecimiento de las plantas, pero sí se han descrito ciertas propiedades que la convierte en un buen candidato para aplicaciones biotecnológicas en el campo de la descontaminación. Así, por la formación de biofilms en la superficie de bentonitas (donde se ha encontrado) y su capacidad para inmovilizar lantánidos y actínidos trivalentes radiactivos, como Europio y Curio (Ruiz-Fresneda y cols., 2020). También, concretamente la cepa identificada, se ha descrito por su capacidad de

reducir Selenio (IV), contaminante de la y móvil en el suelo, a nanopartículas de Se (0) mucho menos tóxico (Pinel-Cabello y cols., 2021).

### **Priestia megaterium**

Anteriormente denominada *Bacillus megaterium*. Se han descrito varias propiedades de interés para esta bacteria halotolerante. Según su análisis genético, poseen la capacidad de producir osmolitos como prolina y betaína, transportar potasio y producir fitohormonas y poliaminas para promover el crecimiento vegetal (Naumovich y cols., 2022). Tiene también la capacidad de solubilizar y moviliza K (Wu y cols., 2023) y producir ácido indolacético, desnitrificar, solubilizar P y tiene actividad ureasa (Jo y cols., 2023), promover el crecimiento y acumular Selenio (Lin y cols., 2022) y algunas cepas presentan capacidad antipatogénica (Cui y cols., 2023). Sus aplicaciones también pueden ser biotecnológicas por su capacidad para producir vitamina B-12 y polímeros como polihidroxibutirato (PHB) que puede ser utilizado para la producción de plásticos no procedentes de petróleo (Biedendieck y cols., 2021) y producir resveratrol in vitro (Zhang y cols., 2023).

### **Bacillus haynesii**

Aunque abundan las publicaciones sobre las múltiples aplicaciones agrícolas que pueden tener varias especies del género *Bacillus*, pocas son las que se encuentran sobre *B. haynesii*. Se ha descrito que favorece el crecimiento de plantas en colaboración sinérgica con *B. safensis*, frente a distintos tipos de estrés abiótico como pH, temperatura, sal y sequía. Ambas especies producen ácido giberélico, ácido indolacético, ACC desaminasa, exopolisacáridos, proteasas, quitinasa, amilasa, celulasa, y solubiliza minerales como P, Zn y K, también *B. haynesii* puede fijar nitrógeno (Patel y cols., 2023). También se ha descrito su capacidad de solubilizar fósforo por la producción de fosfatasa ácidas (Abdelgalil y cols., 2022). Existe un número mayor de publicaciones por sus diversas posibles aplicaciones biotecnológicas como síntesis de nanopartículas de ZnO para nanotecnologías, bioproducción de levan (un biopolímero con múltiples aplicaciones en distintos sectores), descontaminación de Cr (VI), producción de taninas para descontaminación de los residuos de la industria del curtido, etc.

### **Microbacterium barkeri**

Se ha descrito el efecto como agente de biocontrol frente a diferentes patógenos (Liu y cols., 2012). También se ha descrito alguna aplicación biotecnológica como la capacidad de degradar alcohol polivinílico presente en las aguas residuales de la industria textil (Chung y cols., 2016).

### **Peribacillus frigorigerans**

Se ha descrito su actividad nematocida frente a *Bursaphelenchus xylophilus* (Montecillo y Bae, 2022).

### **Ensifer adhaerens**

Es una bacteria capaz de modificar genéticamente a las plantas y se ha investigado como alternativa diferente a *Agrobacterium* (Zuniga-Soto y cols., 2015). También se ha descrito como bacteria promotora del crecimiento por su capacidad para producir fitohormonas, fijar N<sub>2</sub> y desaminar la ACC (Katiyar y cols., 2021), también para solubilizar K, Fe Si y Al de las rocas (Wang y cols., 2016). También hay numerosas publicaciones sobre otras actividades y posibles aplicaciones como la degradación de neonicotinoides, acumulación de metales pesados, producir vitamina B12, oxidación de arsénico y reductor de cromo, y otras.

### **Microbacterium oleivorans y Microbacterium hydrocarbonoxydans**

Se ha descrito la capacidad de estas dos especies para degradar aceites por lo que se apunta a su posible aplicación en descontaminación (Schippers y cols., 2005).

#### **4.5.2. Hongos identificados**

Con respecto a los hongos identificados, algunos están bien descritos como hongos fitopatógenos, como *Cladosporium vicinum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium annulatum*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus tubingensis*, y quedan almacenados en la colección para posibles ensayos en fitopatología.

### **Penicillium flavigenum y Penicillium vinaceum**

Hay amplia bibliografía sobre la capacidad de producir antibióticos. Su uso en plantas será ensayado para analizar el efecto sobre otros microorganismos.

### **Talaromyces pinophilus**

Se ha descrito como microparásito del extendido hongo Botrytis cinérea y es un buen candidato para su aplicación como agente de biocontrol (Abdel-Rahim y Abo-Elyousr, 2018). Por la síntesis de biomoléculas derivadas del esqualeno se está estudiando su aplicación en medicina por su capacidad antifúngica (incluida la capacidad anticandidiasis), bactericida e incluso anticancerígena (Bhat y cols., 2023).

### **Clonostachys rosea**

Existen numerosas publicaciones sobre su actividad antagonista frente a diversos hongos patógenos y ya se comercializa por diferentes empresas como agente de control biológico.

## **5. CONCLUSIONES**

1. Se ha conseguido establecer una metodología básica para crear una línea de investigación de microbiología de la rizosfera.

2. Se han conseguido identificar a nivel de especie 11 de las 23 bacterias aisladas de la rizosfera de plantas aromáticas.

3. Se han conseguido identificar 14 de los 17 hongos aislados de la rizosfera de plantas aromáticas.

4. Se dispone de un pequeño banco de hongos y bacterias para el inicio del estudio de su efecto en plantas aromáticas cultivadas

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelgalil SA, Kaddah MMY, Duab MEA y Abo-Zaid GA. 2022. A sustainable and effective bioprocessing approach for improvement of acid phosphatase production and rock phosphate solubilization by *Bacillus haynesii* strain ACP1. *Scientific Report* 12 (1), 8926. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11448-6>
- Abdel-Rahim IR y Abo-Elyousr KAM. 2018. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. *Microbiological Research* 212–213: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.004>
- Amann R y Kuhl M. In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Current Opinion in Microbiology* 1: 352-358. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80041-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80041-6)
- Amann R, Fuchs BM y Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 231–236. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00204-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00204-4)
- Awasthi A, Bharti N, Nair P, Singh R, Shukla AK, Gupta MM, Darokar MP y Kalra A. Synergistic effect of *Glomus mosseae* and nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain Daz26 on artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology* 49: 125–130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.06.005>
- Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci R, Sowmyalakshmi Subramanian S y Donald L. Smith DL. 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9, Article 1473. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Banchio E, Bogino PC, Zygadlo J y Giordano W. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 766–771. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2008.08.006>
- Bhat MP, Rudrappa M, Hugar A, Gunagambhire PV, Kumar RS, Nayaka S, Almansour AI y Perumal K. 2023. In-vitro investigation on the biological activities of squalene derived from the soil fungus *Talaromyces pinophilus*. *Heliyon* 9, e21461. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21461>
- Biedendieck R, Knuuti T, Moore SJ y Jahn D. 2021. The "beauty in the beast"-the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (14-15): 5719-5737. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11424-6>
- Cardona T. 2018. Early Archean origin of heterodimeric Photosystem I. *Heliyon* 4 e00548. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00548>
- Cheng YT, Zhang L y He SY. 2019. Plant-Microbe Interactions Facing Environmental Challenge *Cell Host & Microbe* 26, 183-192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.009>
- Chung J, Kim S, Choi K y Kim JO. 2016. Degradation of polyvinyl alcohol in textile waste water by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508. *Environmental Technology* 37 (4) SI: 452-458. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1054257>
- Cui ZL, Hu LN, Zeng LL, Meng WQ, Guo D y Sun L. 2023. Isolation and characterization of *Priestia megaterium* KD7 for the biological control of pear fire blight. *Frontiers in microbiology* 14, 1099664. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1099664>
- Delaux P-M y Schornack S. 2021. Plant evolution driven by symbiotic and pathogenic interactions. *Science* 371(6531), pp.eaba6605. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aba6605> o <https://hal.science/hal-03327916>.
- Delaux P-M, Radhakrishnan GV, Jayaraman D, Cheema J, Malbreil M, Volkening JD, Sekimoto H, Nishiyama T, Melkonian M, Pokorny L, Rothfels CJ, Sederoff HW, Stevenson DW, Surek B, Zhang Y, Sussman MR, Dunand C, Morris RJ, Roux C, Wong GK-S, Oldroyd

- GED y Ané J-M. 2015. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *PNAS* 112, 43: 13390–13395. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>
- Dolatabadian A. 2021. Plant–Microbe Interaction. *Biology*, 10, 15. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/biology10010015>
- El-Shatnawi MKJ y Makhadmeh IM. 2001. Ecophysiology of the Plant-Rhizosphere System. *Journal of Agronomy & Crop Science* 187, 1Ð9. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-037X.2001.00498.x>
- Ghavami, N, Alikhani, HA, Pourbabaee, AA y Besharati, H. 2016. Study the Effects of Siderophore-Producing Bacteria on Zinc and Phosphorous Nutrition of Canola and Maize Plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 47 (12): 1517-1527. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1194991>
- Ghavami, N, Alikhani, HA, Pourbabaee, AA y Besharati, H. 2017. Effects of two new siderophore-producing rhizobacteria on growth and iron content. *Journal of Plant Nutrition* 40(5): 736-746. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1262409>
- Goncharova, A, Karpenyuk, T, Kalbayeva, A, Mukasheva, T y Bektileuova, N. 2021. Screening and Characterization of Emulsifying Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Coastal Waters of the Caspian Sea. *Nase More* 68 (2): 74-82. DOI: <https://doi.org/10.17818/NM/2021/2.2>
- Hirsch PR, Mauchline TH y Clark IM. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 878-887. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.019>
- Jo H, Lim K, Ibal JC, Kim MC, Kim HB, Baek C, Heo YM, Lee H, Kang S, Lee DG y Shin JH. 2023. Growth Increase in the Herbaceous Plant *Centella asiatica* by the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria *Priestia megaterium*. *Plants-Basel* 12(13), 2398. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12132398>
- Katiyar P, Dubey RC y Maheshwari DK. 2021. ACC deaminase-producing *Ensifer adhaerens* KS23 enhances proximate nutrient of *Pisum sativum* L. cultivated in high altitude. *Archives of Microbiology* 203 (5): 2689-2698. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02250-5>
- Khalid KA. 2012. Biological fertilization and its effect on medicinal and aromatic plants. *Nusantara Biosciences* 4, No. 3: 124-133. DOI: <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n040307>
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H y Trevors JT. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169– 188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.006>
- Lin XR, Chen HB, Li YX, Zhou ZH, Li JB, Wang YQ, Zhang H, Zhang Y Han YH y Wang SS. 2022. *Priestia* sp. LWS1 Is a Selenium-Resistant Plant Growth-Promoting Bacterium That Can Enhance Plant Growth and Selenium Accumulation in *Oryza sativa* L. *Agronomy-Basel* 12 (6), 1301. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12061301>
- Liu J, Zhou Q, Ibrahim M, Liu H, Jin GL, Zhu B y Xie GL. 2012. Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Microbacterium barkeri* Strain 2011-R4. *Journal of Bacteriology* 194 (23): 6666-6667. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01468-12>
- Marschner P, Crowley D y Yang CH. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261: 199–208. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035569.80747.c5>
- Mohanram S y Kumar P. 2019. Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of plant-microbe interactions. *Annals of Microbiology* (2019) 69:307–320. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01448-9>
- Montecillo JAV y Bae H. 2022. In silico analysis of koranimine, a cyclic imine compound from *Peribacillus frigoritolerans* reveals potential nematocidal activity. *Scientific Report* 12 (1), 18883. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20461-8>

- Naumovich NI, Akhremchuk AE, Valentovich LN, Aleschenkova ZM, Ananyeva IN y Safronova GV. 2022. Molecular characterization of halotolerant strain *Priestia megaterium* BIM B-1314D. *Doklady Natsionalnoi Akademii Nauk Belarusi* 66 (1): 55-64. DOI: <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-55-64>
- Nguyen T-D, Nguyen T-T, Pham M-N, Duong H-N, Pham T-T, Nguyen T-P, Nguyen P-T, Nguyen T-U T, Nguyen H-H, Nguyen H-T. 2023. Relationships between endophytic bacteria and medicinal plants on bioactive compounds production. *Rhizosphere* 27, 100720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100720>
- Pantigoso HA, Newberger D y Vivanco JM. 2022. The rhizosphere microbiome: Plant–microbial interactions for resource acquisition. *Journal of Applied Microbiology* 133: 2864–2876. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15686>
- Patel M, Vurukonda SSKP y Patel, A. 2023. Multi-trait Halotolerant Plant Growth-promoting Bacteria Mitigate Induced Salt Stress and Enhance Growth of *Amaranthus Viridis*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 23 (2): 1860-1883. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01143-4>
- Pietro D. Spanu PD y Panstruga R. 2017. Editorial: Biotrophic Plant-Microbe Interactions. *Frontiers in Plant Science* 8, Article 192. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00192>
- Pinel-Cabello M, Chapon V, Ruiz-Fresneda MA, Alpha-Bazin B, Berthomieu C, Armengaud J y Merroun ML. 2021. Delineation of cellular stages and identification of key proteins for reduction and biotransformation of Se(IV) by *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7. *Journal of Hazardous Materials* 418, 126150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126150>
- Qu Q, Zhang Z, Peijnenburg WJGM, Liu W, Lu T, Hu B, Chen J, Chen J, Lin Z, y Qian H. 2020. Rhizosphere Microbiome Assembly and Its Impact on Plant Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 5024–5038. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00073>
- Rinaudi LV y Giordano, W. 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters* 304 (1): 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01840.x>
- Roumiantseva, ML y Muntyan, VS. 2015. Root nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*: Tolerance to salinity and bacterial genetic determinants. *Microbiology* 84 (3): 303-318. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261715030170>
- Ruiz-Fresneda MA, Lopez-Fernandez M, Martinez-Moreno MF, Cherkouk A, Ju-Nam Y, Ojeda JJ, Moll H y Merroun ML. 2020. Molecular Binding of Eu(III)/Ce(III) by *Stenotrophomonas bentonitica* and Its Impact on the Safety of Future Geodisposal of Radioactive Waste. *Environmental Science & Technology* 54 (23): 15180-15190. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02418>
- Santoyo G, Urtis-Flores CA, Loeza-Lara PD, Orozco-Mosqueda MC y Glick BR. Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology* 10, 475. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
- Schippers A, Bosecker K, Spröer C y and Schumann P. 2005. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. And *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 655–660. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63305-0>
- Selosse M-C y Strullu-Derrien C. 2015. Origins of the terrestrial flora: A symbiosis with fungi? *BIO Web of Conferences* 4, 00009. DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20150400009>
- Shaikh NH y Mokhat DN. 2018. Role of Rhizosphere Fungi Associated With Commercially Explored Medicinal and Aromatic Plants: A Review. *Current Agriculture Research Journal* Vol. 06, No.(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.6.1.09>
- Ulrich, K, Kube, M, Becker, R, Schneck, V y Ulrich, A. 2021. Genomic Analysis of the Endophytic *Stenotrophomonas* Strain 169 Reveals Features Related to Plant-Growth Promotion and

- Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology* 12, 687463. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687463>
- Van Elsas JD y F.G.H. Boersma FGH. 2010. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology* 47, 77-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.010>
- Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A y Pérez-Clemente RM. 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports* 39:3–17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Wang YL, Chen W, He LY, Wang Q y Sheng XF. 2016. Draft Genome Sequence of *Ensifer adhaerens* M78, a Mineral-Weathering Bacterium Isolated from Soil. *Genome Announcements* 4 (5), e00969-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.00969-16>
- Wu XY, Zhao ZJ, Zhao ZR, Zhang YJ, Li MC y Yu QL. 2023. Analysis of the Potassium-Solubilizing *Priestia megaterium* Strain NK851 and Its Potassium Feldspar-Binding Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (18), 14226. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241814226>
- Zhang XH, Zhang D, Ding Y, Li ZL, Wang CC y Ye SH. 2023. Biosynthesis of resveratrol by an endophytic *Priestia megaterium* PH3 via the phenylpropane pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology* 107: 7581–7599. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12768-x>
- Zuniga-Soto E, Mullins E y Dedicova B. 2015. Ensifer-mediated transformation: an efficient non-Agrobacterium protocol for the genetic modification of rice. *Springerplus* 4, 600. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1369-9>