

Rizosfera de tres cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. fuente de bacterias formadoras de endosporas con potencial biotecnológico

Yunel Pérez Hernández¹ <https://orcid.org/0000-0002-7245-5632>

Ana Julia Rondón Castillo¹ <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Leticia Fuentes Alfonso¹ <https://orcid.org/0000-0003-1741-2151>

María Caridad Nápoles García² <https://orcid.org/0000-0003-1413-1717>

Marlene María Martínez Mora¹ <https://orcid.org/0000-0003-4918-5424>

Yasmery Rubio Fontanills¹ <https://orcid.org/0000-0002-9396-4487>

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero, km 3/2. Matanzas. Matanzas. Cuba. CP 44740.

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera a Tapaste km 3 ½. San José de las Lajas. Mayabeque. Cuba. CP 32700.

*Autor para correspondencia e-mail: yunel.perez@umcc.cu; yunelph77@gmail.com

RESUMEN

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal constituyen una fuente promisoría de microorganismos, con capacidad para desarrollar nuevos bioplaguicidas que contribuyan al control de plagas, con una base agroecológica y sostenible. El presente trabajo tuvo como objetivo obtener aislados de bacilos formadores de endosporas con potencial biotecnológico a partir de la rizosfera de diferentes cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de tres tipos de suelo. Se realizaron colectas de suelo rizosférico de tres cultivares de frijol presentes en los municipios Colón y Unión de Reyes, de la provincia de Matanzas, Cuba. Las muestras de suelo se cultivaron en Caldo Nutriente y posteriormente se eliminaron las células vegetativas con calor. Se realizaron diluciones seriadas y las muestras se inocularon en medio de cultivo Agar Nutriente. Se seleccionaron colonias bacterianas con diferencias morfológicas y células bacterianas Gram positivas y productoras de endosporas. Las potencialidades antagónicas de los aislados se evaluaron a través de la producción de enzimas líticas como proteasas, lipasas, celulasas, amilasas, quitinasas y/o β -glucanasas y la síntesis de cianuro de hidrógeno. Se conformó una colección de 141 aislados de bacilos Gram positivos formadores de endosporas. El 8% fueron productores de cianuro de hidrógeno, el 57.7% de proteasas, el 19.3% de lipasas, el 56.5% de quitinasas y/o β -glucanasas, el 28.5% de celulasas y el 33.3% de α -amilasas. Estos aislados tienen potencial biotecnológico con aplicación en los sectores agropecuario e industrial.

Palabras clave: agroecología, amilasas, celulasas, HCN, proteasas

Rhizosphere of three cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. source of endospore-forming bacteria with biotechnological potential

ABSTRACT

Plant Growth Promoting Rhizobacteria constitute a promising source of microorganisms, with the capacity to develop new biopesticides that contribute to pest control, with an agroecological and sustainable basis. The objective of this work was to obtain isolates of endospore-forming bacilli with biotechnological potential from the rhizosphere of different cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from three types of soil. Rhizospheric soil collections were made from three bean cultivars present in the municipalities of Colón and Unión de Reyes, in the province of Matanzas, Cuba. The soil samples were grown in Nutrient Broth and the vegetative cells were subsequently removed with

heat. Serial dilutions were made and the samples were inoculated in Nutrient Agar culture medium. Bacterial colonies with morphological differences and Gram-positive and endospore-producing bacterial cells were selected. The antagonistic potentialities of the isolates were evaluated through the production of lytic enzymes such as proteases, lipases, cellulases, amylases, chitinases and / or β -glucanases and the synthesis of hydrogen cyanide. A collection of 141 isolates of endospore-forming Gram positive bacilli was made. The 8% of isolates were producers of hydrogen cyanide, 57.7% of proteases, 19.3% of lipases, 56.5% of chitinases and / or β -glucanases, 28.5% of cellulases and 33.3% of α -amylases. These isolates have biotechnological potential with application in the agricultural and industrial sectors.

Keywords: agroecology, amylases, cellulase, HCN, protease

INTRODUCCIÓN

La agricultura es el principal sector de crecimiento económico de los países en desarrollo (Nehra *et al.*, 2016). Las producciones agrícolas mundiales se sustentan, principalmente, con el uso de cantidades elevadas de insumos como fertilizantes químicos y plaguicidas. Sin embargo, estos productos tienen un impacto negativo en los agroecosistemas, y constituyen un riesgo para la salud del hombre y los animales (Vejan *et al.*, 2016). Debido a esta situación, los científicos buscan nuevas vías para disminuir el uso de productos agroquímicos, mediante su sustitución por otros menos agresivos al medioambiente y que contribuyan a obtener rendimientos que permitan satisfacer las demandas de la población.

Una de las estrategias para disminuir las poblaciones de organismos fitopatógenos, es el desarrollo de productos a base de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV), los cuales constituyen una alternativa agroecológica y sostenible a la aplicación de compuestos sintéticos (Mishra *et al.*, 2016; Méndez-Bravo *et al.*, 2018). Los mecanismos de acción antifúngica de las RPCV sobre las plantas están relacionados con un aumento de la resistencia sistémica inducida, la producción de antibióticos, sideróforos y diferentes enzimas líticas, las cuales hidrolizan componentes de la pared celular de los hongos fitopatógenos y afectan su crecimiento y desarrollo (Moreno *et al.*, 2018a; Thakur y Parikh, 2018).

En Cuba, la presencia de plagas fúngicas y bacterianas constituye una de las causas fundamentales de pérdidas económicas en numerosos cultivos importantes como el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Martínez *et*

al., 2014). Esta leguminosa, junto al arroz (*Oryza sativa* L.), constituyen la dieta básica de numerosos países latinoamericanos, y representa una fuente de proteína importante en países en vías de desarrollo, así como de otros elementos nutricionales como vitaminas, minerales y fibras (Moreno *et al.*, 2018b). Considerando que los microorganismos de la rizosfera de las plantas poseen potencial biotecnológico (Haldar y Sengupta, 2015) se podrían aislar RPCV con propiedades como antagonistas frente a organismos fitopatógenos y productoras de enzimas.

Dentro de las RPCV, las bacterias formadoras de endosporas, entre las que se encuentra el género *Bacillus*, constituyen un grupo atractivo para el desarrollo de bioproductos de uso agrícolas en sustitución de los químicos. Sus características están bien documentadas y facilitan el desarrollo de formulaciones estables debido a que son resistentes a diversas condiciones ambientales (Thakur *et al.*, 2017; Sabaté *et al.*, 2018). Por otra parte, muchas de estas cepas son productoras de enzimas como celulasas, proteasas, amilasas y lipasas, y se utilizan como fuente de estos biocatalizadores que pueden tener aplicaciones en la producción de alimentos, bioetanol, papel, detergente y en la industria textil (Dida, 2018; Salvador *et al.*, 2019). Atendiendo a ello, contar con cepas que posean estas características aisladas de la rizosfera de especies cultivadas como el frijol común y adaptadas a los suelos de cultivo constituye una prioridad para las investigaciones. En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo obtener aislados de bacilos formadores de endosporas a partir de la rizosfera de diferentes cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de tres tipos de suelo con potencial biotecnológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de suelo rizosférico

Se colectó suelo rizosférico de tres cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. presentes en los municipios Colón y Unión de Reyes de la provincia de Matanzas, Cuba, en el mes de febrero de 2019. En Colón se muestrearon las cultivares Cuba Cueto 259-negro y Tomeguín 93, en la localidad de Río Piedra (Colón); mientras que en Unión de Reyes se tomaron muestras de Tomeguín 93 en Sabanilla y de Cul 156 y Tomeguín 93 en la localidad de Cabezas. El suelo en las áreas de colecta de Colón es de tipo Redzina Negra subtipo negro grisáceo, y en las áreas de colecta de Sabanilla y Cabezas de tipo Ferralítico Amarillento y Redzina roja, respectivamente (Hernández *et al.*, 2015). La temperatura promedio en Colón en el mes de colecta fue de 23.6 °C, con máximas promedio de 28 °C y mínimas de 19.2 °C; mientras que las precipitaciones tuvieron un acumulado de 8 mm, aproximadamente. En Unión de Reyes la temperatura promedio fue de 24.1 °C, con temperaturas máximas y mínimas promedio de 28.7 °C y 19.8 °C, respectivamente. Las precipitaciones acumuladas en el mes de febrero fueron de 7 mm.

Las plantas de frijol provinieron de semillas suministradas por la Empresa Provincial de Semillas de Jovellanos de la misma provincia. Se tomaron 11 muestras de suelo rizosférico en cada área de cultivo mediante un diseño de bandera inglesa. Cada muestra contenía aproximadamente 15 g de suelo rizosférico, la cual se introdujo en envases plásticos estériles de 50 ml de volumen con ayuda de una espátula también estéril. Cada muestra estuvo compuesta por suelo rizosférico proveniente de 15 a 20 plantas.

Aislamiento

Con el objetivo de incrementar la población de células bacterianas, se resuspendieron 10 g de cada muestra en 100 ml de medio de cultivo Caldo Nutriente en Erlenmeyers de 250 ml de volumen. Las suspensiones se mezclaron vigorosamente y se colocaron a 37 °C en una incubadora (Boxun®) con agitación (125 rpm) durante 72 h (Johnson y Bishop, 1996).

Los cultivos de suelo en Caldo nutriente se calentaron a 80 °C por 12 min en baño María

para eliminar las formas vegetativas y comenzar el aislamiento a partir de endosporas bacterianas (dos Santos *et al.*, 2018). Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-9}) en solución de NaCl al 0.9%. Se tomaron alícuotas de 100 µl de las últimas tres diluciones y se diseminaron sobre medio de cultivo Agar Nutriente (AN) en placas Petri (9 cm Ø) con ayuda de una espátula de Drigalski. Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se seleccionaron colonias bacterianas con diferentes morfologías, las cuales se purificaron por agotamiento por estrías en placas Petri con medio de cultivo AN, y se colocaron en iguales condiciones de temperatura y tiempo de incubación de 24 h. Posteriormente se observaron los caracteres morfológicos mediante la tinción de Gram y se seleccionaron los aislados con forma bacilar, Gram positivos y esporulados. Los aislados obtenidos se purificaron mediante la técnica de siembra por agotamiento y posteriormente se nombraron a partir del nombre del cultivar y la localización (Tabla 1).

Ensayos bioquímicos

Producción de cianuro de hidrógeno (HCN)

Los aislados se inocularon por agotamiento por estrías en placas Petri (9 cm de diámetro) sobre medio de cultivo AN que contenía 4.4 g l⁻¹ de glicina (Lorck, 1948). Se humedecieron papeles de filtro Whatman No. 1 con una solución compuesta por carbonato de sodio (2%) y ácido pícrico (0.5%) y se colocaron sobre la superficie interior de cada tapa. Las placas se sellaron con papel Parafilm® y se incubaron a 37 °C durante 4 días. El cambio de coloración en el papel de filtro de amarillo a amarillo claro, pardo oscuro y pardo rojizo, indicó el potencial cianogénico de los aislados como débil, moderado y fuerte, respectivamente. Se incubó una placa Petri sin inocular como control negativo.

Producción de enzimas hidrolíticas

β-1,3-glucanasa y/o quitinasa

Se determinó la capacidad de producir β-1,3-glucanasa y/o quitinasa por los aislados, en placas Petri con medio de cultivo compuesto por 4.0 g l⁻¹ de levadura panadera y 15 g l⁻¹ de agar (Gaye, 2016). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La producción de una o ambas enzimas se determinó por la presencia de una zona clara alrededor de las colonias.

Tabla 1. Nomenclatura de los aislados y descripción de la cultivar y sitio de colecta.

Nomenclatura de los aislados	Cultivar de frijol	Sitio de colecta	Localización
CN 1,2...n	Cuba Cueto 259-negro T-1567	Río Piedra, Colón	Latitud: 22.840800, Longitud: -81.676077
TCol 1,2...n	Tomeguín 93	Río Piedra, Colón	Latitud: 22.842907, Longitud: -81.663286
TS 1,2...n	Tomeguín 93	Sabanilla, Unión de Reyes	Latitud: 22.701064, Longitud: -80.866073
TCab 1,2...n	Tomeguín 93	Cabezas, Unión de Reyes	Latitud: 22.694812, Longitud: -80.876006
Cul 1,2...n	Cul 156	Cabezas, Unión de Reyes	Latitud: 22.844198, Longitud: -81.543115

Proteasas

El ensayo de producción de proteasas se realizó en medio de cultivo semisólido con leche descremada (Chaiharn *et al.*, 2008). Los aislados se colocaron con la ayuda de un asa de siembra sobre placas Petri (9 cm Ø) con medio de cultivo compuesto por 15 g l⁻¹ de leche descremada, 0.5 g l⁻¹ de extracto de levadura y 15 g l⁻¹ de agar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La presencia de un halo claro alrededor de las colonias indicó la producción de proteasas. Se midieron los diámetros del halo y de la colonia con una regla milimetrada, para el cálculo del índice de potencia mediante la fórmula siguiente: IP (%) = (Z - C)/C * 100, donde Z: diámetro del halo claro alrededor de la colonia (mm), C: diámetro de la colonia bacteriana (mm).

Lipasas

La producción de lipasas se determinó mediante el método de Kim y Hoppe (1986). Los aislados se inocularon en placas Petri con medio de cultivo compuesto por peptona (10 g l⁻¹), cloruro de calcio (0.1 g l⁻¹), cloruro de sodio (5 g l⁻¹), agar (15 g l⁻¹) y 10 ml de Tween 80 (sorbitol monooleato; m/v). Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h. La presencia de una zona de deposición opaca alrededor de la colonia indicó la producción de lipasas. Se determinó el índice de potencia de las colonias con actividad lipídica de manera similar al ensayo de producción de proteasas.

Amilasas

La producción de amilasas se determinó de acuerdo con el método de Karnwal (2011). Los aislados se sembraron en medio mínimo

de sales que contenía almidón soluble (1.0%) y agar 15 g l⁻¹. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y la producción de enzimas se observó mediante tinción del medio de cultivo con 20 ml de disolución iodada (2% de yodo y 0.2% de yoduro de potasio). La zona sin coloración alrededor de la colonia indicó la producción de enzimas amilasas.

Celulasas

Los aislados se sembraron en placas Petri con medio mínimo de sales con sal sódica de carboximetilcelulosa (1%) y agar 15 g l⁻¹. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. El medio de cultivo se tiñó con 20 ml de una disolución de rojo Congo 0.5% durante 20 minutos y posteriormente se lavó el medio de cultivo con una disolución de cloruro de sodio (1 mol l⁻¹) (Carder, 1986). Se determinó el índice de potencia mediante la medición de la zona clara alrededor de la colonia como se describió previamente.

Análisis estadístico

Los datos se procesaron con el programa estadístico SPSS versión 18.0 sobre Windows. Se determinó el ajuste de los datos a una distribución normal mediante la prueba de Bartlett y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Kormogorov-Smirnov (Sigarroa, 1985). Se realizó un análisis de varianza simple para determinar diferencias entre los índices de potencia de los aislados estudiados. Para la comparación entre las medias se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (Duncan, 1955) (p<0.05). Las medias y los errores estándar de cada aislado, en los diferentes ensayos, se calcularon a partir de tres réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un total de 437 aislados a partir de la rizosfera de las plantas de frijol de diferentes cultivares muestreados, de los cuales 141 (32.27%) correspondieron a bacilos Gram positivos con capacidad para producir endosporas (Tabla 2). Este resultado puede estar asociado con la presencia de otras bacterias Gram positivas resistentes a temperatura elevadas, como formas cocoides (Oslo y Nottingham, 1980) o a las condiciones de cultivo que limitaron la formación de estas estructuras.

Producción de cianuro de hidrógeno

La producción de cianuro de hidrógeno constituye uno de los indicadores importantes, que se evalúan en la búsqueda de aislados bacterianos con actividad antagónica de organismos fitopatógenos. Los sitios de colecta con mayor número de aislados productores de cianuro de hidrógeno correspondieron a los de la localidad de Cabezas, con los cultivares Tomeguín 93 (13.33%) y Cul 156 (12.12%) de la misma localidad (Figura 1) donde el suelo es de tipo Redzina roja. Entre los aislados analizados no se observaron productores de HCN en los obtenidos a partir de la rizosfera del mismo cv. Tomeguín 93 en la localidad de Sabanilla que tiene suelo de tipo Ferralítico Amarillento. Dicho resultado sugiere profundizar en la influencia del tipo de suelo en la composición de aislados de la rizosfera de este cultivar y sus propiedades.

Los porcentajes bajos (0-13%) de aislados productores de HCN, obtenidos en la presente

investigación, coinciden con los resultados referidos por El-Sayed *et al.* (2014) quienes observaron 34 aislados con esta característica (6.45%) entre 531 analizados. De manera similar, Thakur *et al.* (2017) informaron aproximadamente 11%, mientras que Thakur y Parikh (2018) refirieron 12% de aislados productores de HCN a partir de la rizosfera de *Arachys hypogea* L. En otros géneros bacterianos como *Pseudomonas*, es posible obtener porcentajes elevados (88%) de aislados con la maquinaria bioquímica para la síntesis de cianuro de hidrógeno; sin embargo, estudios con aislados del *Bacillus*, evidencian valores inferiores en relación con esta propiedad (Saharan y Nehra, 2011). La ausencia de aislados productores de este metabolito secundario, a partir de la rizosfera de plantas de la cultivar Tomeguín 93, en la localidad de Sabanilla, puede estar relacionado con la diversidad baja de microorganismos presentes en el área de cultivo, con la capacidad genética de producir este compuesto. Sin embargo, un muestreo más amplio en la zona podría elevar la probabilidad de encontrar aislados con esta propiedad.

El aislado TCol54 mostró la producción más elevada de HCN (Tabla 3). TCab23 y Cul53 produjeron niveles moderados de este metabolito y el resto de los aislados seleccionados como positivos evidenciaron actividades bajas.

La producción alta y moderada de cianuro de hidrógeno por TCol54 y Cul53, respectivamente, evidencia las potencialidades de estos aislados como

Tabla 2. Aislados de bacilos esporulados Gram positivos obtenidos a partir de la rizosfera de plantas de cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L.

Aislados	Total	Bacilos esporulados	(%)
CN	95	28	29.47
TCol	72	27	37.50
TS	149	38	25.50
TCab	53	15	28.30
Cul	68	33	48.53
Total	437	141	32.27

Leyenda: CN (cv. Cuba Cueto 259-negro, municipio Colón), TCol (cv. Tomeguín 93, municipio Colón), TS (cv. Tomeguín 93, localidad Sabanilla, Unión de Reyes), Tcab (cv. Tomeguín 93, Cul (cv. Cul 156, localidad Cabezas, Unión de Reyes)

agentes biocontroladores, ya que este compuesto se ha propuesto como un metabolito secundario volátil que actúa indirectamente en el control de organismos fitopatógenos (Laville *et al.*, 1998). En otros trabajos, se le atribuye la propiedad de formar quelatos con metales y elevar su disponibilidad para las plantas, lo que potencia su crecimiento y desarrollo (Rijavec y Lapanje, 2016). Por lo tanto, el uso de aislados bacterianos productores de HCN en

suelos deficientes de nutrientes, podría contribuir a la biofertilización de los cultivos y al desarrollo de una agricultura más agroecológica.

Producción de enzimas líticas

Los porcentajes más elevados de aislados productores de proteasas (81.6%) se obtuvieron en el cultivar Tomeguín 93 de la localidad Sabanilla. Por otra parte, los

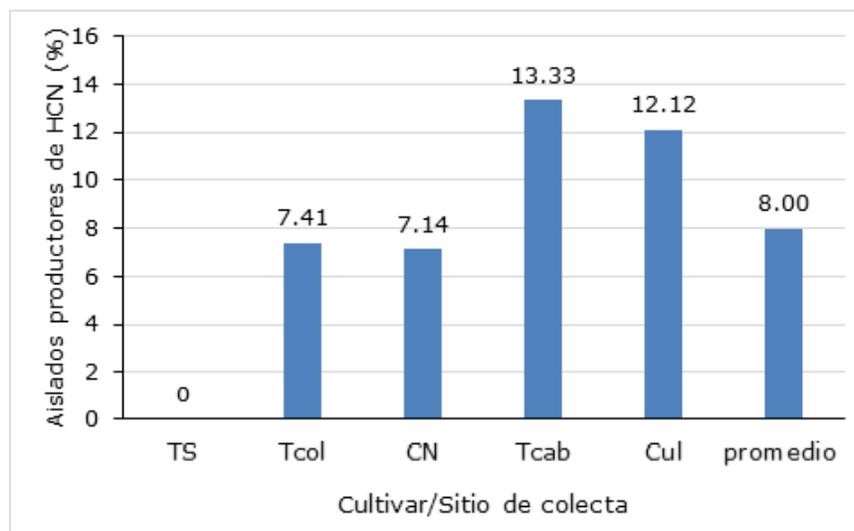


Figura 1. Porcentaje de aislados productores de cianuro de hidrógeno con respecto al total según el cultivar de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y la localidad. Leyenda: +++: alta, ++: moderada, +: baja. CN (cv. Cuba Cueto 259-negro, municipio Colón), TCol (cv. Tomeguín 93, municipio Colón), TS (cv. Tomeguín 93, localidad Sabanilla, Unión de Reyes), Tcab (cv. Tomeguín 93), Cul (cv. Cul 156, localidad Cabezas, Unión de Reyes).

Tabla 3. Aislados bacterianos formadores de endosporas procedentes de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L. productores de HCN.

Aislados	Actividad
TCol54	+++
TCab23	++
Cul53	+
TCol34	+
TCab1	+
Cul6	+
Cul7	+
Cul22	+
CN84	+
CN92	+

Leyenda: +++: alta, ++: moderada, +: baja. CN (cv. Cuba Cueto 259-negro, municipio Colón), TCol (cv. Tomeguín 93, municipio Colón), TS (cv. Tomeguín 93, localidad Sabanilla, Unión de Reyes), Tcab (cv. Tomeguín 93, Cul (cv. Cul 156, localidad Cabezas, Unión de Reyes)

cultivares Tomeguín 93 y Cul 156, de la localidad de Cabezas, mostraron los valores más altos de aislados productores de las enzimas β -1,3 glucanasas y/o quitinasas, con 80.0 y 84.8%, respectivamente; mientras que en celulasas (55.5%) y amilasas (51.5%) se observaron en el cultivar Cul156 de la localidad de Cabezas (Tabla 4). La producción de enzimas como β -1,3 glucanasas, quitinasas, proteasas, lipasas, celulasas y amilasas por las RPCV, se emplea como una prueba común para seleccionar cepas con características biocontroladoras (Chaiharn *et al.*, 2008; Geetha *et al.*, 2014; Alia *et al.*, 2020).

Los resultados de este trabajo estuvieron en correspondencia con estudios previos de bioprospección realizados en la rizosfera de diferentes especies de plantas, donde se evidenciaron las potencialidades de los bacilos como microorganismos productores de enzimas hidrolíticas como lipasas (Geetha *et al.*, 2014), proteasas (Thakur *et al.*, 2017) y quitinasas (Dar *et al.*, 2018). De manera similar, otros autores aislaron bacilos productores de amilasas y/o celulasas de *Capparis spinosa* L., *Glinus lotoides* L. y *Tribulus terrestris* L. (El-Sayed *et al.*, 2014), *Zingiber officinale* Rosc. (Dinesha *et al.*, 2015), arroz, *Triticum aestivum* L. (Modi *et al.*, 2017; Przemieniecki *et al.*, 2018) y *Phaseolus vulgaris* (Mokrani *et al.*, 2018). Además, existen referencias de cepas de *Bacillus* productoras de estas enzimas, aisladas a partir de otras fuentes como estiércol vacuno (Ramachandran *et al.*, 2016) y compost (De Marco *et al.*, 2017).

Por otra parte, las diferencias en la composición de aislados por cultivar y sitio de colecta, así como su actividad de producción de enzimas podrían estar influenciados, además de por sus características genéticas, por el tipo y composición del suelo sometido a manejo agroecológico histórico de las áreas de cultivo. Por ejemplo, el uso intensivo de productos agroquímicos contaminantes, puede disminuir la diversidad de microorganismos presentes en un momento dado y por tanto, la probabilidad de encontrar una cantidad mayor de microorganismos con determinadas características genéticas. En el caso de los aislados productores de proteasas, celulasas y amilasas, es posible que un suelo rico en materia orgánica, asociado a un manejo agroecológico, puede sostener poblaciones diversas de microorganismos que produzcan estas enzimas, las cuales hidrolizan las proteínas, la celulosa y el almidón presentes en la materia orgánica. Los monómeros derivados de la hidrólisis de estas biomoléculas son utilizados por los microorganismos como fuente de nitrógeno y energía (Mishra *et al.*, 2016; De Marco *et al.*, 2017; Dida, 2018).

Entre los aislados seleccionados como mayores productores de enzimas β -1,3-glucanasas y/o quitinasas estuvieron: Cul22, TCab2, TCol72, TS34, TS147, TS104; mientras que TS96, TS149, CN15, TS142, TCol40, TCol21 mostraron las producciones más elevadas de proteasas y TCol35, TS124, TS104 de enzimas lipasas (Tabla 5).

Tabla 4. Porcentaje de aislados productores de β -1,3 glucanasas y/o quitinasas, proteasas y lipasas según el cultivar de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el sitio de colecta.

Enzimas	Aislados con actividad lítica (%)					Promedio
	CN	TCol	TS	TCab	Cul	
Proteasas	35.7	44.4	81.6	60.0	66.7	57.7
Lipasas	14.3	11.1	18.4	20.0	6.1	13.9
β -1,3 glucanasas y/o quitinasas	28.6	44.4	44.7	80.0	84.8	56.5
Celulasas	17.9	18.5	23.7	26.7	55.5	28.5
Amilasas	32.1	25.9	10.5	46.7	51.5	33.3

Leyenda: CN (cv. Cuba Cueto 259-negro, municipio Colón), TCol (cv. Tomeguín 93, municipio Colón), TS (cv. Tomeguín 93, localidad Sabanilla, Unión de Reyes), Tcab (cv. Tomeguín 93, Cul (cv. Cul 156, localidad Cabezas, Unión de Reyes)

Tabla 5. Producción de enzimas β -1,3-glucanasas y/o quitinasas, proteasas y lipasas por aislados bacterianos formadores de endosporas aislados de *Phaseolus vulgaris* L.

Aislados	Actividad Glu.-Qui.	Aislados	Actividad proteolítica (IP %) \pm EE	Aislados	Actividad lipídica (IP %) \pm EE
Cul22	+++	TS96	201.11 a \pm 10.59	TCol35	312.22 a \pm 6.18
TCab2	+++	TS149	200.61 a \pm 11.02	TS124	257.14 b \pm 8.24
TCol72	+++	CN15	175.24 ab \pm 18.09	TS104	149.12 c \pm 8.75
TS34	+++	TS142	172.22 abc \pm 18.00	TCab17	132.54 c \pm 10.3
TS147	+++	TCol40	171.21 abcd \pm 14.92	CN85	125.56 cd \pm 2.14
TS74	+++	TCol21	151.10 bcde \pm 2.7	CN94	101.11 de \pm 18.2
TS104	+++	TS84	133.84 bcde \pm 20.79	TS119	93.04 e \pm 7.32
Cul31	++	TCol54	131.85 bcde \pm 11.85	TCol 39	63.18 f \pm 4.55
Cul6	++	TS123	129.12 cde \pm 10.74	TS149	59.89 fg \pm 9.44
Cul7	++	CN78	127.78 de \pm 11.56	TS123	59.68 fg \pm 4.13
Cul50	++	TS124	125.56 de \pm 17.88	TS33	34.52 g \pm 3.82
Cul32	++	TS114	125.56 de \pm 17.80		
Cul36	++	CN92	125.15 de \pm 3.57		
Cul16	++	TS70	120.00 e \pm 20.00		
Cul53	++	TCol62	116.67 e \pm 8.81		
Cul26	++	TS115	115.49 e \pm 12.70		
Cul35	++	TS47	115.21 e \pm 19.40		
Cul63	++	TS110	113.85 e \pm 16.60		
Cul19	++	TCol53	107.89 e \pm 9.13		
Cul20	++	TCol22	103.89 e \pm 8.41		

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0.05$). Leyenda: IP: índice de potencia, EE: error estándar. CN (cv. Cuba Cueto 259-negro, municipio Colón), TCol (cv. Tomeguín 93, municipio Colón), TS (cv. Tomeguín 93, localidad Sabanilla, Unión de Reyes), Tcab (cv. Tomeguín 93, Cul (cv. Cul 156, localidad Cabezas, Unión de Reyes), Glu. - Qui.: Actividad glucanolítica y/o quitinolítica

La actividad β -1,3-glucanolítica y/o quitinolítica, proteolítica y lipídica mostrada por varios de los aislados analizados, indicaron un uso potencial de éstos como agentes biocontroladores de hongos fitopatógenos. Esto se debe a la capacidad que tienen estas enzimas de inhibir el crecimiento de las hifas de los hongos, ya que pueden provocar la lisis celular o modificar las paredes celulares de estos organismos, compuestas fundamentalmente por quitina, β -1,4-N-acetilglucosamina, cadenas de β -glucano y proteínas (Haldar y Sengupta, 2015; Alia *et al.*, 2020). Por ejemplo, un estudio sobre el complejo enzimático micolítico de *Bacillus subtilis* 739, evidenció que las enzimas quitinasa, β -1,3-glucanasa y proteasa, tienen la mayor contribución a la lisis de los micelios de varias especies de hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Fusarium*

culmorum (WG Sm) Sacc. y *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (Aktuganov *et al.*, 2007). Además, la activación de las quitinasas y β -1,3-glucanasas pueden provocar la Resistencia Sistémica Inducida en las plantas, con lo cual se incrementan las defensas frente a hongos fitopatógenos diversos (Yedidia *et al.*, 1999). De manera similar, la acción conjunta de lipasas, proteasas, quitinasas y glucanasas, pueden inhibir el desarrollo de diferentes microorganismos patógenos como *Botrytis cinerea* Pers., *Sclerotium rolfsii* (Sacc.), *Fusarium oxysporum* f. sp. *appi*, *Phytophthora* spp. (Mont.) de Bary, *R. solani*, *Pythium ultimum* Trow, y *Monographella nivalis* (Schaffnit) E. Müll (Glick, 2012; Przemieniecki *et al.*, 2018).

Los aislados bacterianos mayores productores de celulasas mostraron índices de potencia en un intervalo aproximado entre 201 a 255%

(Tabla 6). Las RPCV con la capacidad de producir celulasas y amilasas tienen un valor elevado en la dinámica de los agroecosistemas, ya que degradan los residuos orgánicos de almidón y celulosa del suelo en azúcares simples y liberan al medioambiente minerales que pueden ser utilizados por estas bacterias en sus procesos metabólicos. Además, los productos de la hidrólisis enzimática incrementan la diversidad de microorganismos beneficiosos alrededor de la rizosfera, con funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mishra *et al.*, 2016). Por otra parte, los aislados productores de celulasas tienen importancia para acelerar el proceso de compostaje de la materia orgánica, con el objetivo de obtener abono orgánico (De Marco *et al.*, 2017).

Se ha comprobado que aislados de bacilos esporulados, pertenecientes al género *Bacillus*,

productores de celulasas (Vijay y Nivedita, 2017; Alia *et al.*, 2020) y amilasas (Shebba *et al.*, 2017; Tsegaye *et al.*, 2019), además de constituir agentes potenciales para el control de hongos fitopatógenos, representan una fuente para la obtención de estas enzimas, que poseen distintas aplicaciones en industrias y procesos tecnológicos, como la producción de bioetanol, detergente, papel, alimento animal en conjunto con hemicelulasas y pectinasas; así como en la industria alimenticia para la clarificación de vinos y la elaboración de jugos y cervezas (Menendez *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2016a; Singh *et al.*, 2016b; Saini *et al.*, 2017). En tal sentido, los aislados obtenidos en este estudio podrían tener potencial para posteriores usos tales como los descritos. Sin embargo, es importante desarrollar otros estudios de termoestabilidad y resistencia al cultivo en diferentes pH, para identificar los aislados

Tabla 6. Aislados bacterianos de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L. de tres cultivares con las mayores actividades celulolíticas y amilolíticas.

Aislados	Actividad celulolítica (IP %) ± EE	Aislados	Actividad amilolítica
TCab 10	255.76 a ± 12.24	CN59	+++
TCol 36	225.28 ab ± 14.43	TCab10	+++
TCab 19	219.84 ab ± 16.96	TCab19	+++
Cul 36	216.67 ab ± 1.51	Cul30	+++
Cul 62	213.33 abc ± 11.61	Cul54	+++
Cul 33	208.33 abc ± 13.01	Cul63	+++
TS 112	201.67 bcd ± 2.57	Cul62	+++
Cul 7	197.44 bcde ± 4.07	Cul6	+++
CN 78	193.33 bcde ± 4.06	Cul16	++
TCol 69	163.76 cdef ± 12.27	CN64	++
Cul 35	155.33 defg ± 2.00	CN69	++
Cul 53	153.33 defg ± 6.80	CN92	++
CN 59	152.58 defgh ± 9.56	CN13	++
TCol 39	148.52 defgh ± 16.89	CN78	++
Cul 31	147.22 efgh ± 11.00	TCab18	++
TCab 1	144.25 efgh ± 24.00	Cul59	++
Cul 16	120.59 fgh ± 4.41	Cul61	++
CN 65	106.94 gh ± 8.63	Cul1	++
Cul 1	104.17 gh ± 2.77	Cul2	++
CN 64	99.33 h ± 5.30	TCab20	++

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0.05$). IP: índice de potencia, EE: error estándar. Actividad: +++ = alta, ++ = moderada, + = baja. Leyenda: CN (cv. Cuba Cueto 259-negro, municipio Colón), TCol (cv. Tomeguín 93, municipio Colón), TS (cv. Tomeguín 93, localidad Sabanilla, Unión de Reyes), Tcab (cv. Tomeguín 93, Cul (cv. Cul 156, localidad Cabezas, Unión de Reyes)

de mayor actividad y tolerancia a temperaturas elevadas y a cambios de pH en el medio de cultivo. Por otra parte, estos aislados, tienen ventajas importantes como la de un crecimiento rápido que podría permitir ciclos de fermentación cortos, la capacidad de secretar las enzimas analizadas al medio extracelular y ser manipulados de manera segura (Pandey *et al.*, 2000).

A partir de los resultados se logró conformar una colección de bacilos formadores de endosporas obtenidos de la rizosfera de tres cultivares de frijol y tres sitios de colecta, con 141 aislados entre los cuales el 8% fueron productores de cianuro de hidrógeno, productores de enzimas hidrolíticas como proteasas (57.7%), lipasas (19.3%), quitinasas y/o β -glucanasas (56.5%), celulasas (28.5%) y α -amilasas (33.3%).

CONCLUSIONES

La rizosfera de los cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Cul 156, Cuba Cueto 259-negro y Tomeguín 93 cultivados en diferentes suelos contiene bacilos formadores de endosporas con potencial biotecnológico productores de cianuro de hidrógeno y enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, quitinasas y/o β -glucanasas, celulasas y α -amilasas). Constituyen candidatos potenciales para el desarrollo de productos bioplaguicidas agroecológicos, para el control de organismos patógenos en el cultivo del frijol. Además, las cepas productoras de proteasas, celulasas y amilasas, pudieran ser fuentes para la obtención de enzimas con diferentes fines industriales.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad de Matanzas bajo el proyecto 'Ciencias Básicas'. Los financistas contribuyeron con recursos financieros para la divulgación de los resultados y la compra de insumos; sin embargo, no tuvieron participación en ninguna de las etapas de la investigación, como el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización y Análisis formal YPH y AJR, Investigación YPH, MMM y YRF, Metodología AJR, LFA y MNG, Recursos AJR y LFA, Supervisión ARC, MNG, Escritura: primera redacción de YPH, Escritura: revisión y edición de MNG y AJR.

REFERENCIAS

Aktuganov GE, Galimzyanova NF, Melent'ev AI, Kuzmina LY (2007) Extracellular hydrolases of strain *Bacillus* sp. 739 and their involvement in the lysis of micromycete cell walls. *Microbiology Mikrobiologiya* 76: 413-420

Alia S, Hameeda S, Shahida M, Iqbal M, Lazarovitse G, Imrana A (2020) Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiological Research* 232: 1-17; doi: 10.1016/j.micres.2019.126389

Carder JH (1986) Detection and quantitation of cellulase by Congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. *Analytical Biochemistry* 153(1): 75-79

Chaiharn M, Chunhaleuchanon S, Kozo A, Lumyong S (2008) Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *MITL Science Technology Journal* 8(1): 18-23

Dar GH, Sofi S, Padder SA, Kabli AA (2018) Molecular characterization of rhizobacteria isolated from walnut (*Juglans regia*) rhizosphere in Western Himalayas and assessment of their plant growth promoting activities. *Biodiversitas* 19(2): 712-719

De Marco ÉG, Heck K, Martos ET, Van Der Sand ST (2017) Purification and characterization of a thermostable alkaline cellulase produced by *Bacillus licheniformis* 380 isolated from compost. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 89(3): 2359-2370; doi: 10.1590/0001-3765201720170408

Dida G (2018) Isolation and characterization of starch degrading rhizobacteria from soil of Jimma University Main Campus, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research* 12(32): 788-795; doi: 10.5897/AJMR2018.8873

Dinesha R, Anandaraj M, Kumar A, Bini YK, Subila KP, Aravind R (2015) Isolation,

- characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research* 173: 34-43; doi: 10.1016/j.micres.2015.01.014
- dos Santos K, Soares-da-Silva J, da Silva MC, Tadeid WP, Polanczyke RA, Soares VC (2018) Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Revista Brasileira de Entomologia* 62: 5-12
- Duncan B (1955) Multiple ranges and multiple F. Test. *Biometrics* 11: 1-42
- El-Sayed WS, Akhka A, El-Naggar MY, Elbadry M (2014) *In vitro* antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Frontiers Microbio* 5: 1-11; doi: 10.3389/fmicb.2014.00651
- Gaye R (2016) Plant growth-promoting bacteria from Western Australian soils. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias, Universidad de Murdoch, Murdoch, Australia
- Geetha K, Rajithasri AB, Bhadraiah B (2014) Isolation of Plant growth promoting rhizobacteria from rhizosphere soils of green gram, biochemical characterization and screening for antifungal activity against pathogenic fungi. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* 3(9): 47-54
- Glick R (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 1-15; doi: 10.6064/2012/963401
- Haldar S, Sengupta S (2015) Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere: insight and biotechnological potential. *Open Microbiol J* 9: 1-7
- Hernández A, Pérez J, Bosh D, Castro N (2015) Clasificación de los suelos de Cuba. Ediciones INCA, Mayabeque
- Johnson C, Bishop AH (1996) A technique for the effective enrichment and isolation of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* 142: 173-177
- Karnwal A (2011) Screening and optimization of extracellular amylase production from plant growth promoting rhizobacteria. *Annals Food Science and Technology* 12(2): 135-141
- Kim SJ, Hoppe HG (1986) Microbial extracellular enzyme detection on agar plates by means of fluorogenic methyl umbelliferyl-substrates. *Actes de Colloques* 3: 175-183
- Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Del fago G, Keel C, Haas D (1998) Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology* 180: 3187-3196
- Lorck H (1948) Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiology* 1(2): 142-146
- Martínez E, Cantillo T, García D (2014) Hongos asociados a semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas en Cuba. *Biotecnología Vegetal* 14(2): 99-105
- Méndez-Bravo A, Cortazar-Murillo EM, Guevara-Avendaño E, Ceballos-Luna O, Rodríguez-Haas B, Kiel-Martínez AL, Hernández-Cristóbal O, Guerrero-Analco JA, Reverchon F (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLoS ONE* 13(3): e0194665; doi: 10.1371/journal.pone.0194665
- Menendez E, Garcia-Fraile P, Rivas R (2015) Biotechnological applications of bacterial cellulases. *Bioengineering* 2(3): 163-182
- Mishra J, Prakash J, Arora N (2016) Role of beneficial soil microbes in sustainable agriculture and environment management. *Climate change Environ Sus* 4(2): 137-14
- Modi K, Patel P, Parmar K (2017) Isolation, Screening and Characterization of PGPR from Rhizosphere of Rice. *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 5(3): 264-270; doi: 10.18782/2320-7051.2887
- Moreno A, García V, Reyes JL, Vásquez J, Cano P (2018a) Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de

- biofertilización para la agricultura sustentable. Revista Colombiana de Biotecnología 20(1): 68-83
- Moreno XA, Lobelle L, González J (2018b) Efecto de los bioestimulantes Biobras 16 y Quitomax sobre el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Delicias-364' en la agricultura suburbana de Aguada de Pasajeros. Revista científica Agroecosistemas 6(2): 151-160
- Mokrani S, Belabid L, Bedjaoui B, Nabti E (2018) Growth stimulation of *Phaseolus vulgaris* L plantules by strain *Bacillus amyloliquefaciens* H1a producer of beneficial agricultural enzymes. JOJ Horticulture 2(2): 1-7
- Nehra V, Saharan BS, Choudhary M (2016) Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. Springerplus 5(1): 948; doi: 10.1186/s40064-016-2584-8
- Oslo JC, Nottingham PM (1980) Temperature. En: Silliker JH (ed). Microbial Ecology of Foods, Volumen 1: Factors affecting life and death of microorganisms, pp. 1-38. Academic press, London
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R (2000) Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem 31: 135-152
- Przemieniecki SW, Kurowski TP, Damszel M, Krawczyk K, Karwowska A (2018) Effectiveness of the *Bacillus* sp. SP-A9 strain as a biological control agent for spring wheat (*Triticum aestivum* L.). J Agr Sci Tech 20: 609-619
- Ramachandran V, Jaganathan R, Swathirajan CR (2016) Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* strains isolated from cow dung, soil compost and soil rhizosphere microflora. EC Bacteriology and Virology Research 1(1): 31-35
- Rijavec T, Lapanje A (2016) Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens but rather regulating availability of phosphate. Front Microbiol 7: 1-14
- Sabaté DC, Pérez C, Petroselli G, Erra-Balsells R, Audisio MC (2018) Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. Microbiological Research 211: 21-30
- Saini R, Singh H, Dahiya A (2017) Amylases: Characteristics and industrial applications. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 6(4): 1865-1871
- Saharan BS, Nehra V (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research 21: 1-30
- Salvador CA, Rojas M, Mesa L, Londoño-Larrea P, Villavicencio J, González E (2019) Obtention of cellulases in Ecuador to reduce enzyme costs in sugar cane bagasse hydrolysis. Revista Centro Azúcar 46(1): 18-28
- Shebba J, Dhamotharan R, Baskar K (2017) Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their antifungal effect on *Rhizoctonia solani* (J.G. Kühn 1858). Adv Plants Agric Res 7(5): 369-375; doi: 10.15406/apar.2017.07.00269
- Sigarroa A (1985) Biometría y Diseño Experimental. Pueblo y Educación, La Habana, Cuba
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Kumar P (2016a) Microbial Cellulases in Industrial Applications. Annals of Applied Bio-Sciences 3(4): 24-29
- Singh R, Mittal A, Kumar M, Kumar P (2016b) Amylases: A Note on Current Applications. International Research Journal of Biological Sciences 5(11): 27-32
- Thakur A, Parikh SC (2018) Screening of Groundnut Plant Associated Rhizobacteria for Multiple Plant Beneficial Plant Growth Promoting Traits. J Plant Pathol Microbiol 9: 457; doi: 10.4172/2157-7471.1000457
- Thakur D, Kaur M, Mishra A (2017) Isolation and screening of plant growth promoting *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. and their effect on growth, rhizospheric population and phosphorous concentration of *Aloe vera*. Journal of Medicinal Plants Studies 5(1): 187-192
- Tsegaye Z, Yimam M, Bekele D, Chaniyalew S, Assefa F (2019) Characterization and

Identification of native plant growth-promoting bacteria colonizing tef (*Eragrostis Tef*) rhizosphere during the flowering stage for a production of bio inoculants. *Biomed J Sci & Tech Res* 22(2): 16444- 16456; doi: 10.26717/BJSTR.2019.22.003710

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq-Boyce A (2016) Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability- A Review. *Molecules* 21(5): 1-17; doi: 10.3390/molecules

Vijay K, Nivedita S (2017) Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Growth Promoters for Wheat: A Review. *Agri Res & Tech* (4): 1-7; doi: 10.19080/ARTOAJ.2017.12.555857

Yedidia I, Benhamou N, Chet I (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1061-1070

Recibido: 16-07-2020

Aceptado: 08-10-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.