

Actividad promotora del crecimiento vegetal de cepas de *Bacillus* spp. en frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Plant growth-promoting activity of *Bacillus* spp. strains in bean (*Phaseolus vulgaris*)

Angel Virgilio Cedeño-Moreira¹ ; Luis Humberto Vásquez-Cortez^{2,3} ; Ítalo Fernando Espinoza-Guerra¹ ; Camilo Alexander Mestanza-Uquillas¹ ; Joaquin Alfredo Plua-Montiel^{4*} ; Sanyí Lorena Rodríguez-Cevallos⁵ ; Luis Alberto Godoy-Montiel¹ ; Diego Mauricio Carrillo-Freire⁶ 

¹Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias y Biológicas, Laboratorio de Biología y Microbiología - Área de Fitopatología. Los Ríos, Ecuador; e-mail: acedenom@uteq.edu.ec; iespinoza@uteq.edu.ec; cmestanza@uteq.edu.ec; lgodoy@uteq.edu.ec

²Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Agroindustria. Los Ríos, Ecuador; e-mail: lvazquez@utb.edu.ec

³Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, ICAI-CONICET. Mendoza, Argentina.

⁴Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, sede Santo Domingo de los Tsáchilas. Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador; e-mail: japlua@espe.edu.ec

⁵Investigador independiente, Ecuador; e-mail: srodriguez4@uteq.edu.ec

⁶Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Facultad Ciencias de la Vida y Tecnologías. Manta, Ecuador; e-mail: diego.carrillo@uleam.edu.ec

*autor de correspondencia: japlua@espe.edu.ec

Cómo citar: Cedeño-Moreira, A.V.; Vásquez-Cortez, L.H.; Espinoza-Guerra, Í.F.; Mestanza-Uquillas, C.A.; Plua-Montiel, J.A.; Rodríguez-Cevallos, S.L.; Godoy-Montiel, L.A.; Carrillo-Freire, D.M. 2025. Actividad promotora del crecimiento vegetal de cepas de *Bacillus* spp. en frijol *Phaseolus vulgaris*. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 28(2):e2850. <http://doi.org/10.31910/rudca.v28.n2.2025.2850>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada en Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional

Recibido: abril 18 de 2025

Aceptado: septiembre 11 de 2025

Editado por: Helber Adrián Arévalo Maldonado

RESUMEN

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) representan una alternativa ecológica y eficiente frente al uso excesivo de fertilizantes químicos en la agricultura convencional. Dentro de este grupo funcional, las especies del género *Bacillus* se destacan por su versatilidad fisiológica, capacidad de esporulación y producción de metabolitos bioactivos. Dada esta relevancia, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad promotora del crecimiento de siete cepas nativas de *Bacillus* spp., aisladas de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris*, cultivado bajo condiciones controladas. Las cepas fueron aisladas mediante tratamiento térmico, caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y confirmadas taxonómicamente por secuenciación del gen 16S rRNA. Las especies identificadas incluyeron *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* y *Sporosarcina pasteurii*. Se evaluaron parámetros funcionales clave, como la producción de ácido indolacético (AIA), la cinética de crecimiento bacteriano y la influencia sobre variables morfológicas de la planta. Las cepas *B. pumilus* (AVCM54) y *S. pasteurii* (ACM044) mostraron una alta producción de AIA (>1,8 µg·mL⁻¹), lo que se correlacionó con un mayor desarrollo vegetativo de las plantas tratadas, evidenciado en la altura, el diámetro del tallo y la biomasa seca aérea y radicular. Estos resultados sugieren que las cepas seleccionadas poseen mecanismos bioestimulantes asociados a la síntesis de fitohormonas y la mejora de la eficiencia fisiológica de la planta. En conjunto, el estudio respalda el uso potencial de *Bacillus* spp. como bioinoculantes para la formulación de biofertilizantes aplicables en sistemas agrícolas sostenibles, especialmente en regiones tropicales, que enfrentan desafíos productivos y ambientales.

Palabras clave: Agricultura sostenible; Ácido indolacético; Bioinsumos; Bioinoculantes; Microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

ABSTRACT

Plant growth-promoting microorganisms (PGPM) represent an ecological and efficient alternative to the excessive use of chemical fertilizers in conventional agriculture. Within this functional group, species of the genus *Bacillus* stand out for their physiological versatility, sporulation capacity, and production of bioactive metabolites. Given this relevance, the objective of the present study was to evaluate the plant growth-promoting activity of seven native strains of *Bacillus* spp., isolated from the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*, cultivated under controlled conditions. The strains were isolated through heat treatment, characterized by biochemical assays, and taxonomically confirmed by sequencing of the 16S rRNA gene. The identified species included *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, and *Sporosarcina pasteurii*. Key functional parameters were evaluated, such as indole-3-acetic acid (IAA) production, bacterial growth kinetics, and the influence on morphological variables of the plant. The strains *Bacillus pumilus* (AVCM54) and *Sporosarcina pasteurii* (ACM044) exhibited high IAA production (>1.8 µg·mL⁻¹), correlating with greater vegetative development of treated plants, as evidenced by increases in plant height, stem diameter, and both shoot and root dry biomass. These findings suggest that the selected strains possess biostimulant mechanisms associated with phytohormone synthesis and improved physiological efficiency of the plant. Overall, this study supports the potential use of *Bacillus* spp. as bioinoculants for the formulation of biofertilizers applicable to sustainable agricultural systems, particularly in tropical regions facing productive and environmental challenges.

Keywords: Bioinoculants; Bioinputs; Indole-3-acetic acid; Plant growth-promoting microorganisms; Sustainable agriculture.

INTRODUCCIÓN

Phaseolus vulgaris L., comúnmente conocido como fréjol o frijol común, representa uno de los cultivos leguminosos más importantes, a nivel mundial, por su alto valor nutricional y relevancia socioeconómica en sistemas agrícolas de pequeña y mediana escala (Uebersax *et al.* 2022; Nchanji & Ageyo, 2021). Su contenido proteico, su capacidad de fijación biológica de nitrógeno y su versatilidad agronómica lo convierten en un componente clave de la seguridad alimentaria, especialmente, en regiones de América Latina y África (Dimopoulou *et al.* 2024); sin embargo, el rendimiento de este cultivo se ve frecuentemente limitado por factores bióticos y abióticos, como deficiencias nutricionales, estrés hídrico, salinidad y enfermedades del suelo (Basavaraja *et al.* 2024). Frente a estos desafíos, el desarrollo de estrategias sostenibles y eficientes para mejorar la productividad vegetal se vuelve prioritario.

En este contexto, el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM, por sus siglas en inglés) son una alternativa ecológica y económicamente viable frente al uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas químicos, ofreciendo soluciones sostenibles para mejorar la productividad agrícola (Hossain *et al.* 2023). En este contexto, las especies del género *Bacillus* se destacan por su capacidad de formar endosporas resistentes, su amplia distribución en distintos ecosistemas y su potencial multifuncional como biofertilizantes y como agentes de control biológico, lo que refuerza su valor estratégico en sistemas agrícolas sostenibles (Akinsemolu, *et al.* 2024). Las cepas de *Bacillus* spp. pueden promover el crecimiento de las plantas, a través de múltiples mecanismos, entre ellos, la solubilización de fosfatos, la síntesis de fitohormonas, como el ácido indolacético (AIA), la producción de sideróforos y la inducción de resistencia sistémica frente a patógenos (Poveda & González-Andrés, 2021; Khiangte & Lalfakzuala, 2021).

Numerosos estudios demuestran que la inoculación de *Bacillus* spp. en diferentes cultivos mejora significativamente parámetros agronómicos, como la tasa de germinación, el desarrollo radicular, la biomasa aérea y la eficiencia en la absorción de nutrientes (Sousa *et al.* 2021; Chandra *et al.* 2021); no obstante, aún persiste la necesidad de validar estos efectos en condiciones controladas que permitan aislar el impacto directo del microorganismo sobre la planta hospedera, evitando interferencias del entorno edáfico (Aijaz *et al.* 2024). Además, la respuesta de *P. vulgaris* a la inoculación con cepas específicas de *Bacillus* spp. aún requiere mayor caracterización, especialmente, en lo que respecta a la selección de cepas con alto potencial bioestimulante, adaptadas a las condiciones agroecológicas locales (Rocha *et al.* 2022).

Considerando la creciente demanda de bioinsumos y alternativas sostenibles, este estudio tuvo como objetivo identificar las bacterias del género *Bacillus* asociadas a la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* y, posteriormente, evaluar la actividad promotora del crecimiento de cepas seleccionadas en *P. vulgaris* bajo condiciones de invernadero (Arslan & Bulut, 2023).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y preparación de muestras rizosféricas. Las muestras rizosféricas fueron recolectadas de plantas de *P. vulgaris* en etapa vegetativa, cultivadas en parcelas experimentales de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. Para cada muestra, se extrajeron las raíces con una porción de suelo adherido. Se seleccionaron tres plantas por parcela y el suelo rizosférico fue desprendido y transferido a bolsas estériles Whirl-Pak®. En laboratorio, las muestras fueron procesadas dentro de una cabina de bioseguridad clase II, Thermo Scientific™ 1300 Series A2, para minimizar la contaminación. Cada muestra rizosférica (10 g) fue homogeneizada en 90 mL de solución salina estéril al 0,85 % (NaCl), a 200 rpm durante 30 minutos, en una incubadora orbital (Orbital Incubator Shaker ZWY-240, LABWIT, Shanghai, China) (Alvarado Ibáñez *et al.* 2021).

Tratamiento térmico para el aislamiento de *Bacillus* spp. Para favorecer la selección de bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus*, la suspensión rizosférica se sometió a un tratamiento térmico de choque a 80 °C durante 10 minutos, en baño maría (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), con el propósito de eliminar la mayoría de las bacterias no esporuladas. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas decimales (10^{-1} a 10^{-6}) y se sembraron 100 µL por duplicado, mediante la técnica de extensión superficial en placas Petri, con agar nutritivo (NA), previamente esterilizado (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido).

Las placas fueron incubadas a 30 ± 1 °C durante 48 h, en una estufa bacteriológica (Memmert UNE 500). Las colonias con morfología compatible con *Bacillus* spp. (colonias opacas, secas o rugosas, de crecimiento rápido) fueron seleccionadas y purificadas por siembra en estrías sucesivas sobre medio NA (López & Alippi, 2007).

Caracterización morfológica y tinción de Gram. Las colonias purificadas fueron evaluadas por su morfología colonial (forma, borde, elevación, color, consistencia). Se realizó tinción de Gram, según el método estándar, observando la morfología celular con un microscopio óptico binocular Leica DM500 a 100× con inmersión en aceite (Madigan *et al.* 2021).

Pruebas fisiológicas y bioquímicas preliminares. Las cepas presuntamente identificadas como *Bacillus* spp. fueron sometidas a una batería de pruebas fisiológicas y bioquímicas, con el objetivo de confirmar su género, utilizando reactivos de alta pureza de la marca Merck® (Darmstadt, Alemania). La prueba de catalasa se realizó colocando una alícuota de 3 % de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre una colonia fresca, observando inmediatamente la liberación de burbujas de oxígeno, como indicativo de una reacción positiva, característica típica de *Bacillus* spp.

La prueba de producción de esporas se llevó a cabo mediante la tinción diferencial de Schaeffer-Fulton, en la que se utilizaron verde malaquita (colorante primario) y safranina (contratinción), permitiendo observar esporas como estructuras verdes oscuro

dentro de células rosadas bajo un microscopio Leica DM500 a 100×, confirmando la capacidad de esporulación de la cepa. La prueba de movilidad bacteriana fue determinada mediante inoculación en medio SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad), observando el patrón de difusión del crecimiento bacteriano desde la línea de punción vertical, tras 24 h de incubación, a 30 ± 1 °C; un crecimiento difuso indicaba movilidad positiva, común en *Bacillus subtilis* y otras especies. Adicionalmente, se realizó la prueba de hidrólisis de almidón, sembrando las cepas en medio agar nutritivo suplementado con almidón soluble al 1 %. Tras 48 h de incubación, las placas fueron reveladas con una solución de yodo lugol (I/KI), observándose halos de aclaramiento alrededor de las colonias, como evidencia de la actividad amilolítica, propiedad frecuente en *Bacillus amyloliquefaciens* y especies relacionadas. Estas pruebas permitieron una caracterización preliminar funcional de las cepas y su diferenciación de otros géneros morfológicamente similares no esporulados ni amilolíticos.

Identificación molecular de cepas mediante amplificación del Gen 16S rRNA. La identificación molecular de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* spp. se llevó a cabo mediante la amplificación parcial del gen 16S rRNA. Para ello, se extrajo ADN genómico a partir de cultivos bacterianos en fase logarítmica, utilizando el kit comercial ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del ADN extraído se evaluó mediante espectrofotometría, con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™), considerando aceptables aquellas muestras con una relación A260/A280 entre 1,8 y 2,0.

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYACCTTGTTACGACTT-3'), que amplifican aproximadamente 1500 pb del fragmento génico. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µL, utilizando DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific™), 1 µL de cada cebador (10 µM), 1 µL de ADN (~50 ng) y 9,5 µL de agua ultrapura libre de nucleasas (Invitrogen™). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 90 segundos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos (Weisburg *et al.* 1991).

Los productos amplificados fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (UltraPure™, Invitrogen™), preparado en tampón TAE 1× y teñido con GelRed™ (Biotium, EE. UU.). Se cargaron 5 µL del producto de PCR con 1 µL de buffer de carga y se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific™). Las corridas se realizaron a 100 V durante 45 minutos, en una cuba de electroforesis Cleaver Scientific Ltd. y los resultados fueron visualizados bajo luz ultravioleta, en un sistema de documentación DigiDoc-It®.

Las bandas correspondientes (~1500 pb) fueron purificadas con el GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific™) y enviadas a secuenciación Sanger bidireccional en la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el software BioEdit v7.2, y posteriormente comparadas con la base de datos del NCBI GenBank, mediante el algoritmo BLASTn. Se consideraron identificaciones confiables aquellas con valores de identidad iguales o superiores al 98 %. Esta estrategia permitió validar la asignación taxonómica preliminar de las cepas y confirmar su pertenencia al género *Bacillus* (Cappuccino & Welsh, 2020).

Cuantificación de ácido indolacético (AIA) por método colorimétrico. La capacidad de las cepas de *Bacillus* spp. para producir ácido indolacético (AIA) fue evaluada mediante el método colorimétrico con reactivo de Salkowski, para estimar la concentración de AIA sintetizado, a partir de la descarboxilación del L-triptófano exógeno, precursor natural de esta hormona en bacterias del suelo. Cada cepa fue inoculada en tubos Falcon® de 50 mL conteniendo 20 mL de caldo Luria-Bertani (LB), suplementado con 0,5 mg·mL⁻¹ de L-triptófano (Sigma-Aldrich). Los cultivos se realizaron a 30 ± 1 °C durante 72 h, bajo agitación constante a 150 rpm, en una incubadora orbital (ZWY-240, LABWIT, Shanghai, China). Al finalizar el periodo de incubación, los cultivos fueron centrifugados a $11.200 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C, en una centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R, Eppendorf, Hamburg, Germany) y el sobrenadante fue colectado para la reacción posterior.

Para la reacción colorimétrica, se mezclaron 1 mL del sobrenadante con 2 mL del reactivo de Salkowski, preparado con 1,5 mL de ácido perclórico (70 %) y 2,5 mM de FeCl₃ anhidro (Merck®, Alemania). Las muestras fueron incubadas en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. La intensidad del color rosado desarrollado fue medida a 530 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Las concentraciones de AIA fueron determinadas mediante una curva estándar construida con soluciones de AIA puro (Sigma-Aldrich), en un rango de 0 a 100 µg·mL⁻¹. Cada ensayo fue realizado por triplicado y los resultados se expresaron como µg·mL⁻¹ de AIA equivalente, producido por la cepa en las condiciones evaluadas. Esta técnica permitió cuantificar la actividad biosintética de auxinas de origen bacteriano, lo cual, es un parámetro clave para la selección de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) (Gordon & Weber, 1951; Patten & Glick, 2002).

Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriano. La cinética de crecimiento de las cepas se evaluó en medio de cultivo líquido bajo condiciones controladas, durante un periodo de 120 horas. Se utilizó caldo nutritivo (Nutrient Broth, Oxoid™, Thermo Fisher Scientific), como medio de crecimiento, preparado según las especificaciones del fabricante y esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Cada cepa fue previamente activada en placas de agar nutritivo durante 24 horas a 30 °C y posteriormente inoculada en

tubos con 5 mL de caldo nutritivo, para obtener un preinóculo. Después de 18 horas de incubación en agitación (150 rpm) a 30 ± 1 °C, en una incubadora orbital (ZWY-240, LABWIT, China), se ajustó la densidad óptica a $DO_{600nm} \approx 0,1$, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Esta suspensión se empleó como inóculo para matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo nutritivo estéril. El crecimiento bacteriano fue monitoreado a intervalos de 24, 48, 72, 96 y 120 horas. En cada punto de muestreo se tomaron 1 mL de cultivo, se realizaron diluciones seriadas decimales en solución salina estéril (NaCl 0,85%) y se sembraron 100 μ L de cada dilución por duplicado en placas de Petri con agar nutritivo, mediante la técnica de extensión superficial. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 24 h y se procedió al conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), para determinar la concentración bacteriana en cada punto de tiempo. Los resultados fueron expresados como Log_{10} de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se calcularon los promedios y errores estándar a partir de diez repeticiones independientes por cepa. Los datos obtenidos permitieron trazar las curvas de crecimiento, representando las fases lag, logarítmica, estacionaria y de declive celular (Madigan *et al.* 2021).

Evaluación de parámetros morfofisiológicos en *P. vulgaris*.

La evaluación de los efectos de la inoculación bacteriana sobre el crecimiento inicial de *P. vulgaris* se realizó a los 20 días después de la siembra (dds), en condiciones de invernadero. Las semillas de frijol fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 minutos y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se sembraron en macetas plásticas de 1 kg de capacidad, 900 g de suelo esterilizado (autoclavado a 121 °C por 60 minutos durante dos días consecutivos). Se establecieron tratamientos con siete cepas bacterianas diferentes y un tratamiento testigo sin inoculación.

Cada cepa fue cultivada en caldo nutritivo a 30 ± 1 °C durante 24 h en agitación a 150 rpm. El inóculo se ajustó a una concentración de 10^8 $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($DO_{600nm} \approx 0,1$) utilizando un espectrofotómetro y se aplicó un volumen de 5 mL por planta al momento de la siembra. A los 20 dds, se seleccionaron ocho plantas por tratamiento para realizar la medición de variables morfofisiológicas. La altura de planta (cm) se midió desde la base del tallo hasta el ápice del brote principal, usando una regla metálica calibrada. El diámetro del tallo (cm) fue determinado a 1 cm de la base, utilizando un vernier digital (Mitutoyo 500-196-30 Japón). Posteriormente, las plantas fueron cosechadas, separando parte aérea y sistema radicular. Ambas fracciones se secaron en estufa a 65 °C por 48 h, en bandejas de aluminio y luego se pesaron en una balanza analítica ($\pm 0,1$ mg), para determinar el peso seco del follaje (g) y el peso seco de la raíz (g) (Arslan & Bulut, 2023).

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño completamente al azar. Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey utilizando el software Statgraphics.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación bioquímica

En la prueba de ureasa (URE), seis de las siete cepas mostraron una reacción positiva, lo que indica la capacidad de hidrolizar la urea a amoníaco y dióxido de carbono, mediante la acción de la enzima ureasa; la única cepa ureasa negativa fue KVAI032. En cuanto a la tinción de Gram (TGM), todas las cepas resultaron Gram positivas, lo que coincide con la morfología típica de *Bacillus*, que presenta una pared celular gruesa rica en peptidoglicano (Logan & De Vos, 2015). La actividad catalasa (CAT), evaluada mediante la liberación de burbujas en presencia de peróxido de hidrógeno, fue positiva en cinco cepas, mientras que ACM044 y AVCM083 no mostraron reacción de la catalasa (Tabla 1).

Todas las cepas mostraron resultados positivos en la producción de endosporas (PESP), característica fundamental del género *Bacillus*, confirmada mediante observación microscópica con la tinción de verde de malaquita. De igual manera, se observó movilidad (MVD) en todas las cepas analizadas, evidenciada por el crecimiento difuso en medio SIM, lo que indica la presencia de flagelos peritricos funcionales (Cappuccino & Welsh, 2020). Finalmente, en la prueba de hidrólisis de almidón (HALM), seis cepas demostraron la capacidad de producir amilasas extracelulares, generando halos de aclaramiento alrededor de las colonias tras la aplicación de lugol. La única cepa que no presentó hidrólisis del almidón fue ACM044 (*Sporosarcina pasteurii*) (Tabla 1).

Identificación molecular. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante el algoritmo BLASTn contra la base de datos del NCBI GenBank, alcanzando valores de cobertura de consulta del 100 %, en todas las cepas analizadas. Los resultados permitieron asignar taxonómicamente las cepas con niveles de identidad superiores al 99 %, confirmando su pertenencia a especies del género *Bacillus* y una del género *Sporosarcina*.

Las cepas AVCM54 y ACKV34 mostraron un 100 % de identidad con *Bacillus pumilus* (números de acceso EU784137.1 y EU780733.1, respectivamente), mientras que las cepas KVAI032, AVCM083 y LEMS16 fueron identificadas como *Bacillus subtilis*, con valores de identidad del 100, 99,8 y 100 %, respectivamente, y coincidencias con las cepas M10 (OQ568305.1), MSAR8 (MZ461958.1) y IIPRSHREP-6 (ON872223.1). Por otro lado, la cepa KVAM22 fue identificada como *Bacillus megaterium* con una identidad del 100 % frente a la cepa PHB 06 (MZ542333.1) (Altschul *et al.* 1990; Benson *et al.* 2013). Finalmente, la cepa ACM044 fue identificada como *Sporosarcina pasteurii*, con una coincidencia completa (100 %) con la cepa NCCB 48021 (NR_104923.1), reconocida por su alta actividad ureasa y potencial biotecnológico (Tabla 2).

Análisis de filogenia con base en el gen ARNr 16S. El análisis filogenético basado en las secuencias parciales del gen 16S rRNA permitió evaluar la relación evolutiva entre las cepas aisladas desde la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* y cepas de referencia, obtenidas de la base de datos GenBank.

Tabla 1. Caracterización fisiológica y bioquímica de cepas bacterianas aisladas desde la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* L.

| CEPA | URE | TGM | CAT | PESP | MVD | HALM |
|---------|-----|-----|-----|------|-----|------|
| AVCM54 | + | + | + | + | + | + |
| KVAI032 | - | + | + | + | + | + |
| ACKV34 | + | + | + | + | + | + |
| AVCM083 | - | + | + | + | + | + |
| LEMS16 | - | + | + | + | + | + |
| ACM044 | + | + | - | + | + | - |
| KVAM22 | - | + | + | + | + | + |

Actividad de ureasa (URE); reacción a la tinción de Gram (TGM), actividad catalasa (CAT), producción de endosporas (PESP), movilidad bacteriana (MVD); capacidad de hidrólisis de almidón (HALM). El símbolo "+" indica resultado positivo y "-" indica resultado negativo en la respectiva prueba.

Tabla 2. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas desde la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* mediante análisis del gen 16S rRNA.

| AISLADO | | Identidad (Base de datos NCBI / GenBank) | | | |
|---------|-------------------------------|--|---------------------------|---------------|------------------|
| Código | Nomenclatura | Cepa | Cobertura de consulta (%) | Identidad (%) | Numero de acceso |
| AVCM54 | <i>Bacillus pumilus</i> | UFPEDA 831 | 100 | 100 | EU 784137.1 |
| KVAI032 | <i>Bacillus subtilis</i> | M10 | 100 | 100 | OQ 568305.1 |
| ACKV34 | <i>Bacillus pumilus</i> | MD008 | 100 | 100 | EU 780733.1 |
| AVCM083 | <i>Bacillus subtilis</i> | MSAR8 | 100 | 99.8 | MZ 461958.1 |
| LEMS16 | <i>Bacillus subtilis</i> | IIPRSHEP-6 | 100 | 100 | ON 872223.1 |
| ACM044 | <i>Sporosarcina pasteurii</i> | NCCB 48021 | 100 | 100 | NR 104923.1 |
| KVAM22 | <i>Bacillus megaterium</i> | PHB 06 | 100 | 100 | MZ 542333.1 |

Se presenta la nomenclatura asignada, la especie identificada, el código de la cepa de referencia con la que se obtuvo mayor coincidencia, el porcentaje de cobertura de consulta y de identidad en comparación con la base de datos NCBI/GenBank, así como el número de acceso correspondiente.

Los resultados mostraron una clara separación de las cepas en clados consistentes con su identidad taxonómica. Las cepas AVCM083 y LEMS16 se agruparon con cepas de referencia de *Bacillus subtilis*, con un valor de soporte bootstrap del 100 %, lo cual, respalda su identificación molecular. Asimismo, las cepas AVCM54 y ACKV34 se agruparon estrechamente con *Bacillus pumilus*, compartiendo un soporte del 90 y 70 %, respectivamente, mientras que KVAI032 mostró relación con *Bacillus cereus*, aunque con un valor de bootstrap relativamente bajo (40 %) (Figura 1).

Por otra parte, las cepas KVAM22 y ACM044 se ubicaron en un clado separado junto con cepas de *Bacillus megaterium* y *Sporosarcina pasteurii*, respectivamente. La cepa ACM044 se agrupó firmemente (100 % bootstrap) con *S. pasteurii*, corroborando su identificación por BLAST. Cabe destacar que la inclusión de múltiples cepas de referencia por especie permitió evidenciar la robustez filogenética del análisis, mostrando altos niveles de similitud genética entre los aislados y sus contrapartes taxonómicas (Figura 1).

Producción de AIA. Se presentaron diferencias significativas en la producción de AIA entre las cepas evaluadas, donde las cepas AVCM54 y ACM044 registraron las mayores concentraciones. Estos resultados evidencian que ciertas cepas, en particular AVCM54 (*B. pumilus*) y ACM044 (*S. pasteurii*), poseen potencial bioestimulante, por su capacidad de síntesis de auxinas, lo cual, podría favorecer la elongación celular, el desarrollo radicular y la promoción general del crecimiento vegetal (Figura 2).

Crecimiento celular. En la figura 3a, correspondiente a las cepas ACM044 (*S. pasteurii*) y KVAM22 (*B. megaterium*), se observó un patrón de crecimiento típico con incremento progresivo desde las 24 hasta las 72 horas; posteriormente, ambas cepas presentaron una leve disminución a las 96 y 120 horas, lo que indica una transición hacia la fase estacionaria o inicio de declive celular.

En la figura 3b, se evidencia una cinética de crecimiento continua y sostenida de las cepas AVCM54 (*B. pumilus*) y ACKV34 (*B. pumilus*). Los valores máximos obtenidos para ambas cepas reflejan un comportamiento de alto rendimiento en condiciones de cultivo, posiblemente, asociado a una mayor tasa de replicación o adaptación al medio.

En la figura 3c se observa cómo las cepas KVAI032, AVCM083 y LEMS16 de *B. subtilis* presentaron un crecimiento activo hasta las 72 horas; sin embargo, a partir de las 96 horas se observó una estabilización o leve descenso en la concentración celular, en especial, para la cepa LEMS16, lo que sugiere una entrada más temprana en la fase estacionaria (Madigan *et al.* 2021).

En general, todas las cepas mostraron una fase logarítmica activa entre las 24 y 72 horas de cultivo, con diferencias en el tiempo de permanencia en fase exponencial y en el número máximo de células alcanzado, lo cual, puede estar relacionado con su capacidad metabólica, tasa de división y producción de metabolitos secundarios (Figura 3).

Efecto de las cepas bacterianas en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*. Los resultados mostraron diferencias entre tratamientos bacterianos y el testigo no inoculado, lo cual, evidencia el potencial bioestimulante de ciertas cepas. En cuanto a la altura de planta, los mayores valores se registraron en los tratamientos con las cepas AVCM083 y KVAI032, seguidas por AVCM54 y KVAM22. Estas alturas superaron al testigo, lo que indica un efecto positivo de las cepas

sobre la elongación del tallo en la fase vegetativa temprana (Figura 4a). Respecto al diámetro del tallo, el mayor valor se observó en la cepa AVCM083, seguida de KVAI032 y KVAM22, superando también al testigo. Un mayor diámetro del tallo puede estar relacionado con un fortalecimiento estructural inducido por la actividad hormonal bacteriana (Spaepen *et al.* 2007), particularmente, por la producción de auxinas, como el AIA (Fiusa Araújo *et al.* 2020) (Figura 4b).

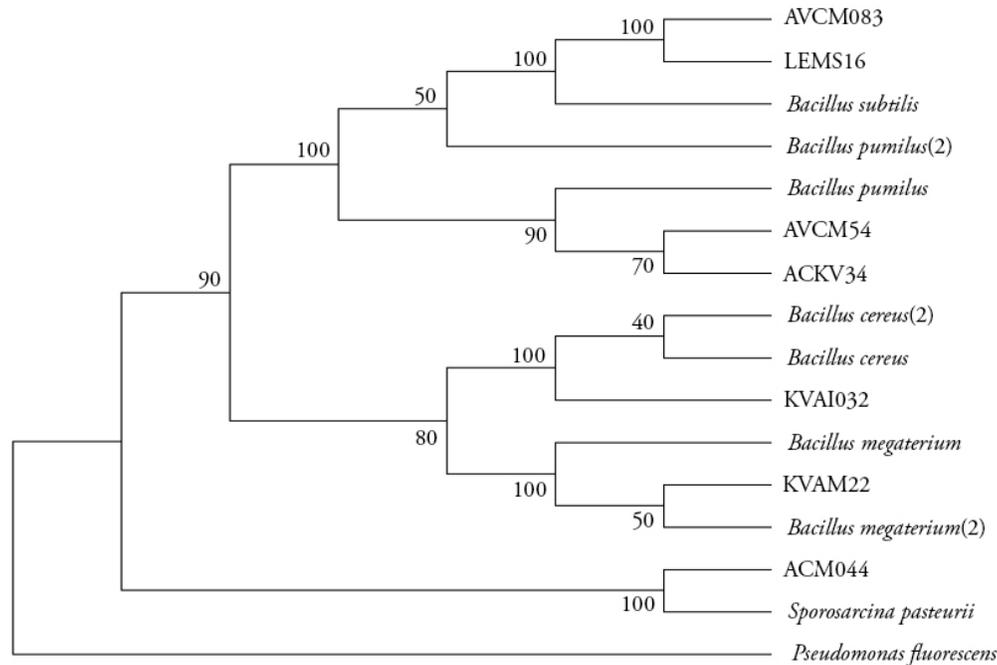


Figura 1. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen 16S rRNA de cepas bacterianas aisladas desde la rizosfera de *Phaseolus vulgaris*. El árbol construido mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) con 1.000 repeticiones de Bootstrap. Se muestran los valores de bootstrap en cada nodo.

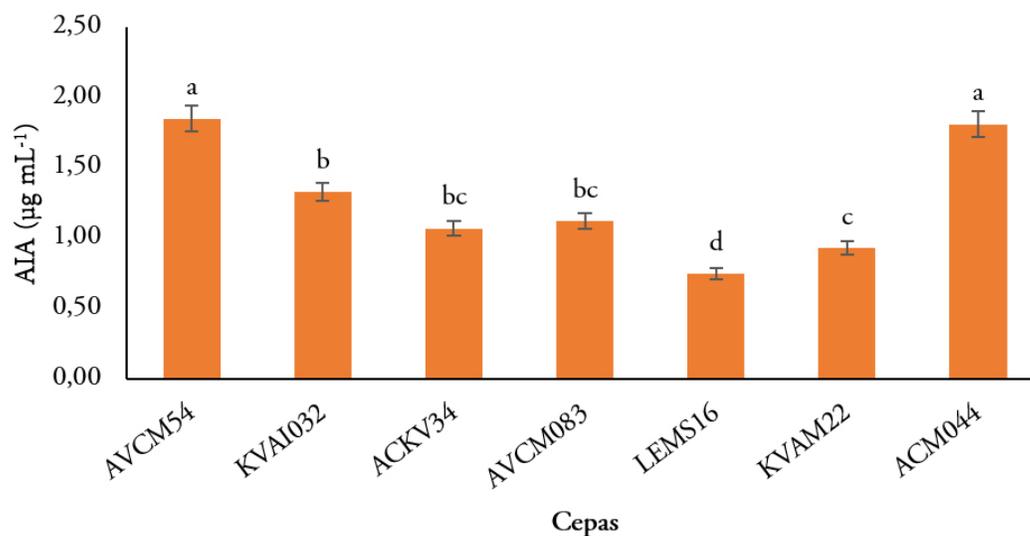


Figura 2. Producción de ácido indolacético (AIA). Los resultados se expresan en µg·mL⁻¹.

Las barras representan el promedio ± error estándar de tres repeticiones independientes. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

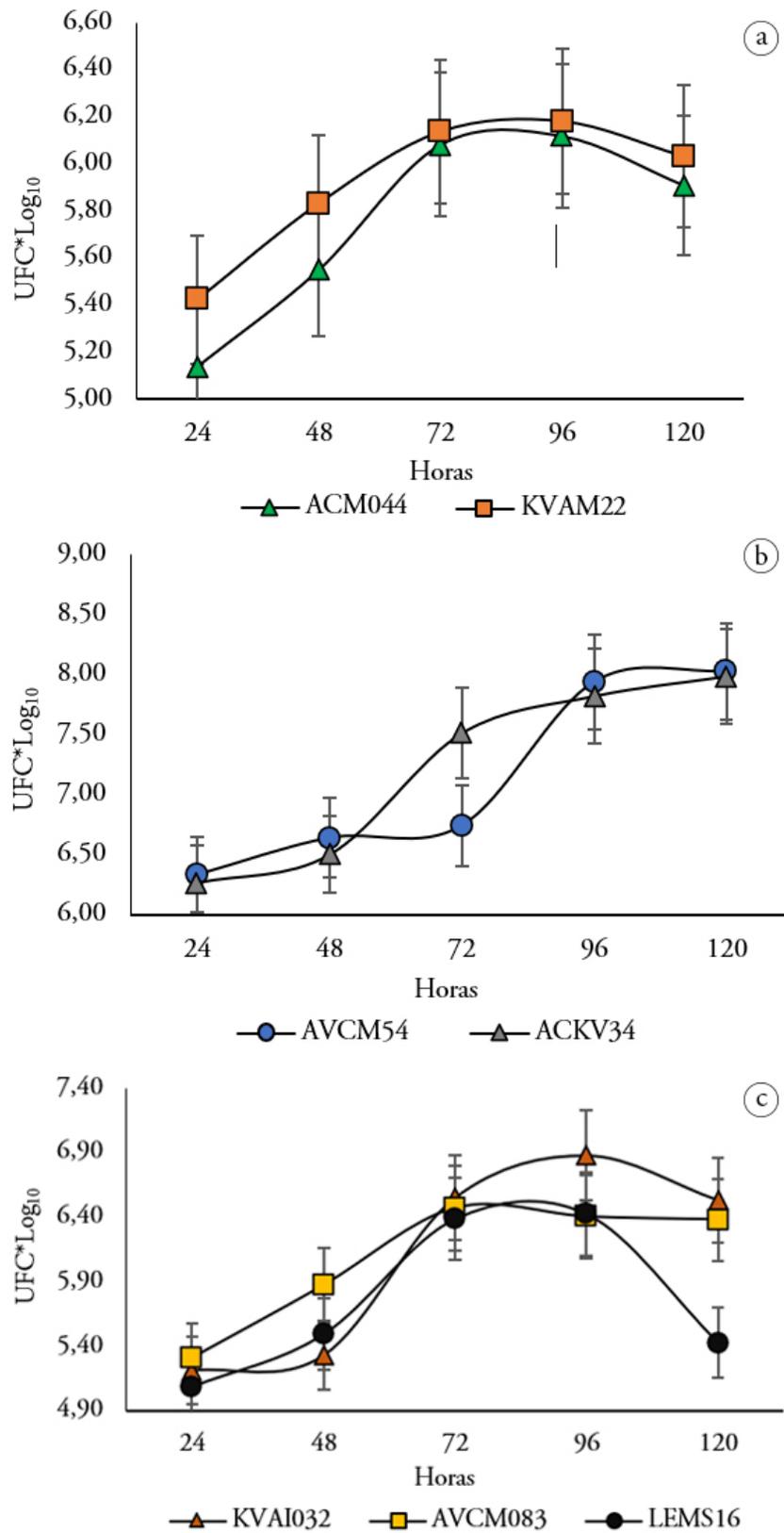


Figura 3. Cinética de crecimiento de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de *Phaseolus vulgaris*, evaluada durante 120 horas de incubación en medio líquido. Los valores corresponden a unidades formadoras de colonias (UFC.mL⁻¹) expresadas en escala logarítmica (Log₁₀). a) cepas ACM044 (*Sporosarcina pasteurii*) y KVAM22 (*Bacillus megaterium*); b) cepas AVCM54 y ACKV34 (*Bacillus pumilus*); c) Cepas KVAI032, AVCM083 y LEMS16 (*Bacillus subtilis*).

Los puntos representan el promedio de tres repeticiones independientes ± error estándar.

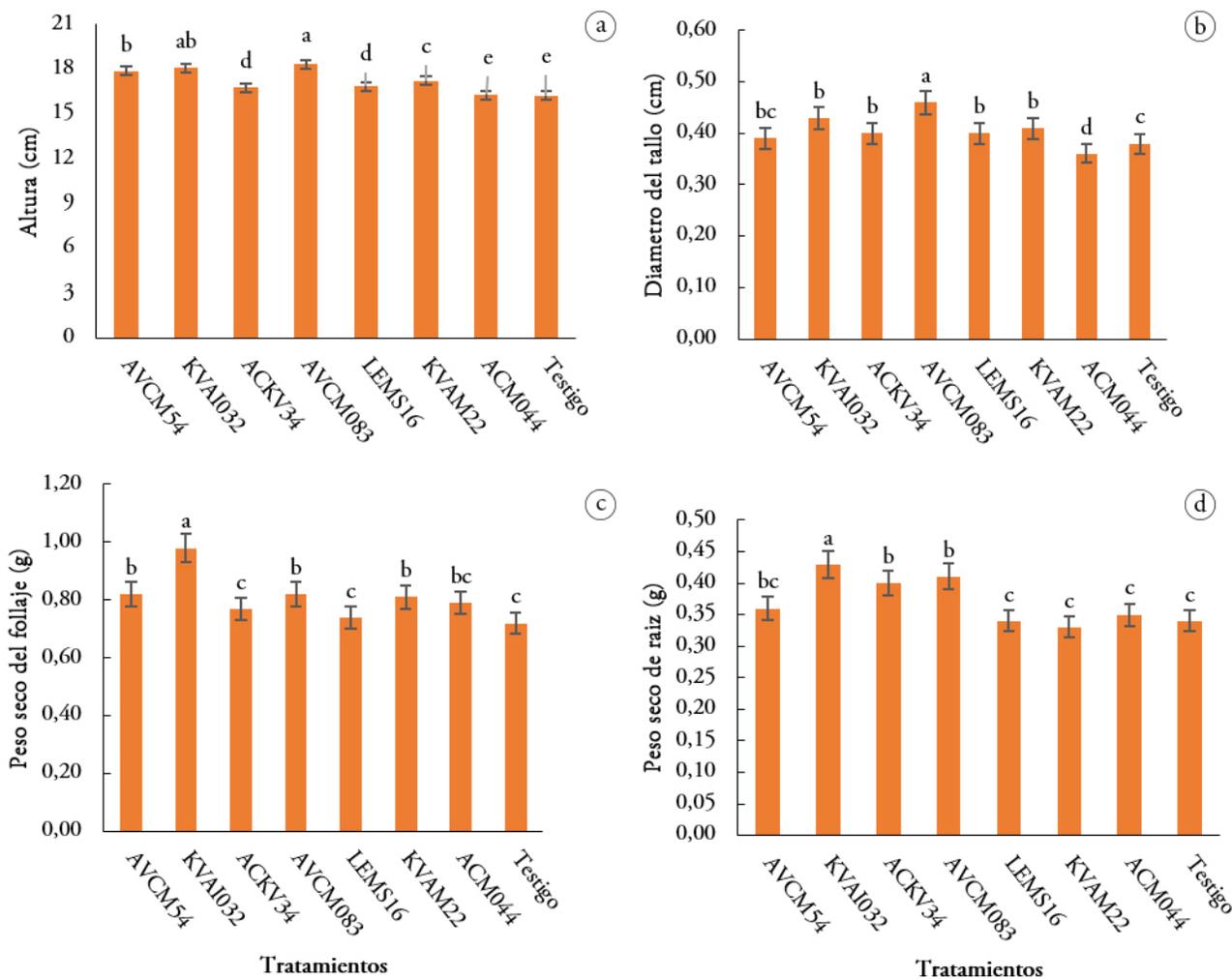


Figura 4. Efecto de la inoculación con cepas bacterianas sobre parámetros morfofisiológicos de *Phaseolus vulgaris* a los 20 días después de la siembra. a) altura de planta; b) diámetro del tallo; c) peso seco del follaje; d) peso seco de la raíz.

Las barras representan la media \pm error estándar de tres repeticiones independientes. Las letras sobre las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Estos resultados concuerdan con estudios previos que relacionan la producción de auxinas bacterianas con un fortalecimiento estructural inducido de la planta; por ejemplo, en el pepino se observó un incremento del 30-36 % del diámetro del tallo, gracias a la inoculación con cepas promotoras, como *Sinorhizobium meliloti* y *Acinetobacter radioresistens* (Zapata-Sifuentes *et al.* 2022). Asimismo, en rosas, el tratamiento con *Bacillus* spp. produjo un aumento de hasta 41 % en diámetro del tallo floral (Fiusa Araújo *et al.* 2020).

Con relación al peso seco del follaje, las plantas inoculadas con la cepa KVAI032 destacaron con el valor más alto, seguidas por las cepas AVCM54, AVCM083 y ACM044, en comparación con el testigo, que alcanzó un peso de 0,72 g. Estos resultados sugieren un aumento en la biomasa aérea inducida por ciertas cepas, probablemente, asociado a una mayor eficiencia fotosintética o disponibilidad de nutrientes promovida por las bacterias (Vessey, 2003; Hungria *et al.* 2010) (Figura 4c).

En cuanto al peso seco de la raíz, los valores más altos se observaron en los tratamientos con las cepas KVAI032, AVCM083 y ACKV34,

mientras que el testigo y otras cepas presentaron valores inferiores. Esto indica que algunas cepas podrían haber estimulado el desarrollo del sistema radicular, lo que resulta beneficioso para la absorción de agua y nutrientes (Figura 4d).

Con relación al frijol, diversas investigaciones demostraron que el uso de cepas del género *Bacillus* puede mejorar significativamente la germinación, el crecimiento inicial de plántulas y la tolerancia a estrés biótico y abiótico. Estos microorganismos actúan como promotores de crecimiento vegetal (PGPR), influyendo en la disponibilidad de nutrientes, la producción de fitohormonas y la inducción de resistencia sistémica; por ejemplo, Arslan & Bulut (2023) observaron que la aplicación de *Bacillus* spp. en semillas de frijol incrementó la tasa de germinación y favoreció un desarrollo más vigoroso de las plántulas, lo que respalda el potencial biotecnológico de este género bacteriano en el cultivo de leguminosas. La inoculación de plantas con cepas del género *Bacillus* desencadena una serie de interacciones bioquímicas y fisiológicas complejas, que resultan en la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal.

La inoculación de frijol con cepas del género *Bacillus* es estudiada, debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal, mediante mecanismos directos e indirectos. Diversos trabajos demuestran que estas bacterias producen fitohormonas, como ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas, que estimulan la elongación celular, el desarrollo radicular y el engrosamiento del tallo (Santoyo *et al.* 2017). Además, algunas especies de *Bacillus* incrementan la disponibilidad de nutrientes esenciales, como nitrógeno, fósforo y hierro, a través de la fijación biológica, solubilización de fosfatos y producción de sideróforos, lo que se traduce en una mejora del rendimiento y la biomasa en frijol (Gouda *et al.* 2018).

De manera complementaria, la inoculación con *Bacillus* confiere ventajas en la tolerancia a estrés biótico y abiótico; por ejemplo, Kumar *et al.* (2012), indican que cepas de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* activan las respuestas sistémicas de defensa (ISR), aumentando la resistencia frente a patógenos comunes en el cultivo de frijol, como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. Este efecto protector se asocia a la producción de metabolitos antimicrobianos, lipopeptídicos y enzimas hidrolíticas, que limitan el crecimiento de fitopatógenos y favorecen un microbioma rizosférico saludable.

La formación de endosporas es una estrategia evolutiva clave en bacterias del género *Bacillus*, activada por señales ambientales de escasez nutricional o deshidratación (Lamba *et al.* 2022). El proceso es regulado por un complejo sistema de cascadas genéticas que involucran factores de transcripción tipo sigma (σ^F , σ^E , σ^G y σ^K) y genes estructurales, como *spoOA*, los cuales, coordinan la división asimétrica, la síntesis de cortex y la deshidratación de la espora (Yang *et al.* 2021; Islam *et al.* 2022). Esta capacidad permite que las bacterias sobrevivan en forma latente por largos periodos, manteniendo su viabilidad en ambientes edáficamente adversos y asegurando su reactivación, cuando las condiciones vuelven a ser favorables (Hsieh *et al.* 2023).

El éxito del género *Bacillus* como PGPR en frijol se sustenta en su capacidad para formar endosporas resistentes, lo que asegura su persistencia en condiciones ambientales adversas y garantiza un efecto prolongado en el cultivo (Maheshwari *et al.* 2015). En este sentido, su aplicación en sistemas agrícolas sostenibles representa una estrategia biotecnológica prometedora para reducir la dependencia de fertilizantes y plaguicidas químicos, incrementando, al mismo tiempo, la productividad y la resiliencia del frijol en diversos entornos agroecológicos.

Este efecto multicausal se debe a la expresión de rutas metabólicas altamente especializadas, que permiten a estas bacterias modular el entorno rizosférico, alterar la fisiología vegetal y establecer asociaciones funcionales duraderas. El éxito de *Bacillus*, como microorganismo promotor del crecimiento vegetal (PGPR), se sustenta en la combinación de múltiples mecanismos sinérgicos, altamente conservados, a nivel genómico, pero con expresión diferencial según la especie, la cepa y el contexto ambiental (Lastochkina *et al.* 2021).

Entre los mecanismos directos destaca la producción de fitohormonas bacterianas, especialmente, ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas. Estas moléculas actúan como señales interdominio

capaces de integrarse a las rutas de señalización endógenas de la planta, promoviendo la expansión celular, la división en meristemas y la elongación de las raíces (Spaepen & Vanderleyden, 2011). El AIA, por ejemplo, induce la expresión de genes relacionados con el transporte de auxinas (*PIN*, *AUX*) y estimula la formación de raíces laterales, aumentando la superficie de absorción de agua y nutrientes. Además, ciertas cepas de *Bacillus* también producen ácido abscísico y compuestos que interfieren con el balance hormonal de estrés, mejorando la plasticidad fenotípica de la planta frente a condiciones adversas (Khan *et al.* 2020).

Otro mecanismo directo de relevancia es la solubilización de nutrientes esenciales, como fósforo, potasio y zinc, mediante la secreción de ácidos orgánicos (cítrico, glucónico, láctico) y enzimas fosfatasas; las bacterias *Bacillus* transforman formas insolubles de fosfato en especies disponibles para la planta, como $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-} (Mażylytė *et al.* 2022; Pan & Cai, 2023). Esta capacidad está mediada por genes como *gcd* (glucosa deshidrogenasa) y *ppx* (polifosfato exohidrolasa), cuya expresión está inducida por señales de deficiencia de fósforo y pH (Suleman *et al.* 2018; Pan & Cai 2023). Este proceso no solo mejora la nutrición mineral vegetal, sino que, también, puede modificar el pH microambiental del rizoplano, favoreciendo la disponibilidad de otros micronutrientes.

La recurrente presencia de bacterias del género *Bacillus* en la rizosfera se explica desde una perspectiva ecológica y funcional, como el resultado de una coevolución entre microorganismos edáficos y plantas superiores (Magotra *et al.* 2024). La rizosfera, definida como el microambiente inmediato a la raíz, constituye un nicho dinámico, caracterizado por la alta disponibilidad de compuestos orgánicos liberados a través de exudados, mucílagos y células descamadas (Maitra *et al.* 2024). Este entorno favorece el establecimiento de bacterias con capacidades metabólicas diversificadas, motilidad activa y tolerancia a fluctuaciones ambientales, atributos que caracterizan estructuralmente a los miembros del género *Bacillus* (Guerrero M., 2023).

La dominancia de *Bacillus* spp. en la rizosfera está sustentada por su capacidad de formar endosporas, una estrategia de resistencia que les confiere ventaja competitiva bajo condiciones de estrés edáfico, como desecación, salinidad, temperaturas extremas o competencia microbiana (Petrović *et al.* 2023; Xia *et al.* 2024). Este ciclo de alternancia entre estados vegetativos y esporulados permite a *Bacillus* no solo colonizar eficientemente los nichos radiculares durante las fases activas de la planta, sino, también, persistir en el suelo durante los períodos de latencia vegetal, asegurando su reactivación tras la germinación de nuevas raíces (Mawarda *et al.* 2022). Esta plasticidad fenotípica les otorga un papel estratégico como colonizadores pioneros de la rizosfera (Lin *et al.* 2021).

Adicionalmente, *Bacillus* spp. sintetiza sideróforos de alta afinidad, como bacillibactina, que secuestran hierro férrico (Fe^{3+}) del suelo y lo hacen biodisponible, tanto para la bacteria como para la planta, especialmente, en condiciones de deficiencia férrica. Esta acción no solo contribuye a la nutrición vegetal, sino que también inhibe el crecimiento de patógenos al privarlos de hierro, actuando como mecanismo de competencia interespecífica (Miethke & Marahiel, 2007).

A pesar del potencial demostrado de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) para mejorar la productividad agrícola de forma sostenible, su implementación, a gran escala, en países en vías de desarrollo, enfrenta múltiples limitaciones, que trascienden lo estrictamente científico. Estas barreras, en su mayoría estructurales y sistémicas, comprometen la adopción efectiva de tecnologías basadas en inoculantes microbianos, como *Bacillus* spp., en sistemas agrícolas tradicionales o de bajos insumos (Bashan *et al.* 2014).

Una de las principales restricciones es la falta de infraestructura técnica y biotecnológica necesaria para el aislamiento, caracterización, producción, formulación y conservación de cepas microbianas eficientes. La producción de bioinoculantes requiere condiciones controladas de fermentación, estandarización de procesos y cumplimiento de normas de calidad microbiológica y genética, aspectos que, a menudo, se encuentran ausentes o son escasamente desarrollados en instituciones públicas o privadas, de países de renta baja. Esta debilidad en la capacidad tecnológica restringe el desarrollo local de bioinsumos adaptados a condiciones agroecológicas específicas y favorece la dependencia de productos importados, generalmente, formulados para suelos y cultivos diferentes (Herrmann *et al.* 2013).

Por otra parte, Wang *et al.* (2025) mencionan que el uso de PGPM permite la utilización de urea como fuente de nitrógeno asimilable, a través de su hidrólisis en amoníaco y dióxido de carbono, lo que también provoca un aumento localizado del pH. Desde el punto de vista ecológico, esta actividad confiere a las bacterias una ventaja competitiva en suelos agrícolas donde se aplican fertilizantes nitrogenados ureicos (Gupta *et al.* 2023).

Como conclusión, en el presente trabajo, se lograron aislar e identificar diversas cepas nativas rizoféricas, entre ellas, *Bacillus pumilus* (AVCM54) y *Sporosarcina pasteurii* (ACM044), además de otras pertenecientes al género *Bacillus*, con potencial actividad promotora del crecimiento vegetal.

Entre las cepas evaluadas, AVCM54 (*Bacillus pumilus*) y ACM044 (*Sporosarcina pasteurii*) destacaron por su elevada capacidad de síntesis de ácido indolacético (AIA). Esta característica hormonal se correlacionó directamente con un mayor desarrollo de raíces laterales y con la plasticidad fenotípica de la planta frente a condiciones de cultivo.

Las cepas seleccionadas mostraron un crecimiento vigoroso en medios de cultivo y una alta capacidad de esporulación, lo cual, representa una ventaja tecnológica para su escalamiento en la formulación de bioinoculantes. Además, evidenciaron tolerancia a condiciones de estrés nutricional, lo que refuerza su adaptabilidad a entornos agroecológicos de bajos insumos.

De acuerdo con los ensayos en invernadero, la inoculación con las cepas AVCM54 (*B. pumilus*) y ACM044 (*S. pasteurii*) promovió incrementos significativos en la altura de planta, diámetro del tallo y biomasa seca aérea y radicular. Estos resultados evidencian su potencial como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) y respaldan su selección para el desarrollo de bioinsumos destinados a sistemas agrícolas tropicales.

Como recomendación, futuras investigaciones se deberían enfocar en la validación de estas cepas bajo condiciones edafoclimáticas diversas, su escalamiento en formulaciones de biofertilizantes comerciales y la evaluación de su desempeño en interacción con otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR), considerando enfoques consorciados que potencien los efectos bioestimulantes

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por el apoyo incondicional para poder ejecutar la presente investigación. **Financiación:** La financiación fue realizada por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y por los autores. **Contribución de autores:** Angel Virgilio Cedeño Moreira: conceptualización, metodología, investigación, administración del proyecto, supervisión, validación, redacción, borrador original; Luis Humberto Vásquez Cortez: supervisión, validación, redacción – revisión y edición, administración del proyecto, metodología; Ítalo Fernando Espinoza Guerra: supervisión, validación, redacción – revisión y edición, administración del proyecto, metodología; Camilo Alexander Mestanza-Uquillas: supervisión, validación, redacción – revisión y edición, administración del proyecto, metodología; Jhoan Alfredo Plua Montiel: redacción – borrador original, validación, revisión crítica del manuscrito; Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos: recolección de datos, análisis formal, apoyo en investigación; Luis Alberto Godoy Montiel: software, metodología, visualización, recolección de datos, análisis formal; Diego Mauricio Carrillo Freire: redacción – revisión y edición, supervisión.

REFERENCIAS

- AIJAZ, N.; ZAHEER, M.S.; HAMEED, A.; ASLAM, H.M.U.; ALAM, M.W.; RIAZ, H.; BARASARATHI, J.; AGHAYEVA, S.; BIBI, R.; RIAZ, M.W.; ALI, H.H.; MANOHARADAS, S.; MANZOOR, M.A.; REHMAN, S. 2024. Improving salinity tolerance in wheat plants via inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus subtilis* for enhanced biomass, growth, and physiological process. *Acta Physiologiae Plantarum*. 46(11):103. <https://doi.org/10.1007/s11738-024-03727-8>
- AKINSEMOLU, A.A.; ONYEAKA, H.; ODION, S.; ADEBANJO, I. 2024. Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*. 64(6):e2300614. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300614>
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ALVARADO IBÁÑEZ, J.C.; MOSTACERO LEÓN, J.; GUTIÉRREZ ARAUJO, M. 2021. Potencial biofertilizante de rizobacterias asociadas a cultivos amazónicos de importancia económica. *REBIOL*. 41(2):156-166.
- ARSLAN, M.; BULUT, S. 2023. The effects of *Bacillus* ssp. on germination and seedling growth of common bean (*Phaseolus*

- vulgaris*). Current Trends in Natural Sciences. 12(23):160-166. <https://doi.org/10.47068/ctns.2023.v12i23.017>
- BASAVARAJA, T.; TRIPATHI, A.; GURUMURTHY, S.; MAHADEVAIAH, C.; LAMICHANEY, A.; CHANDORA, R.; DEVINDRAPPA. 2024. Genomic-assisted breeding strategies for biotic stress in common bean: Progress and prospects. En: Parihar, A.K.; Bohra, A.; Lamichaney, A.; Mishra, R.; Varshney, R.K. (eds). Genomics-aided breeding strategies for biotic stress in grain legumes. Springer Nature Singapore. p.231-275. https://doi.org/10.1007/978-981-97-3917-2_8
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ, J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant and Soil. 378:1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCHMIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. 2013. GenBank. Nucleic Acids Research. 41(D1):D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- CAPPUCCINO, J.G.; WELSH, C. 2020. Microbiology: A laboratory manual. 12 edición. Pearson. 561p.
- CHANDRA, P.; KHOBRA, R.; SUNDHA, P.; SHARMA, R.K.; JASROTIA, P.; CHANDRA, A.; SINGH, D.P.; SINGH, G.P. 2021. Plant growth promoting *Bacillus*-based bio formulations improve wheat rhizosphere biological activity, nutrient uptake, and growth of the plant. Acta Physiologiae Plantarum. 43:139. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03310-5>
- DIMOPOULOU, M.; VARELTZIS, P.; GORTZI, O. 2024. A systematic review of the twelve most popular bean varieties, highlighting their potential as functional foods based on the health benefits derived from their nutritional profiles, focused on non-communicable diseases. Applied Sciences. 14(22):10215. <https://doi.org/10.3390/app142210215>
- FIUSAARAÚJO, F.F.; BRANDÃO, R.M.; MEIRELES BARGUIL, B.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; PASQUAL, M.; LARA SILVA REZENDE, R.A.; ALVES PEREIRA, M.M.; TEIXEIRA BUTTRÓS, V.H.; DÓRIA, J. 2020. Plant growth-promoting bacteria improve growth and modify essential oil in rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Black Prince. Frontiers in Sustainable Food Systems. 4:606827. Frontiers Media. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.606827>
- GORDON, S.A.; WEBER, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiology. 26(1):192-195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- GOUDA, S.; KERRY, R.G.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H.S.; PATRA, J.K. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiological Research. 206:131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- GUERRERO, M.G.G. 2023. Sporulation, structure assembly, and germination in the soil bacterium *Bacillus thuringiensis*: Survival and success in the environment and the insect host. Microbiology Research. 14(2):466-491. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14020035>
- GUPTA, S.; YILDIRIM, S.; ANDRIKOPOULOS, B.; WILLE, U.; ROESSNER, U. 2023. Deciphering the interactions in the root–soil nexus caused by urease and nitrification inhibitors: A review. Agronomy. 13(6):1603. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061603>
- HERRMANN, X.; YBARRA, A.; SCHWARTZ, M. 2013. Limitaciones tecnológicas y dependencia de bioinsumos importados en condiciones agroecológicas específicas. Revista Internacional de Agroecología y Sustentabilidad. 7(2):45-58.
- HOSSAIN, M.A.; HOSSAIN, M.S.; AKTER, M. 2023. Challenges faced by plant growth-promoting bacteria in field-level applications and suggestions to overcome the barriers. Physiological and Molecular Plant Pathology. 126:102029. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102029>
- HSIEH, H.Y.; STEWART, G.C. 2023. Does environmental replication contribute to *Bacillus anthracis* spore persistence and infectivity in soil? Research in Microbiology. 174(5):104052. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104052>
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* increases yields of common bean and maize in Brazil. Plant and Soil. 331(1-2):413-425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>
- ISLAM, T.; RABBEE, M.F.; CHOI, J.; BAEK, K.H. 2022. Biosynthesis, molecular regulation, and application of *bacilysin* produced by *Bacillus* species. Metabolites. 12(5):397. <https://doi.org/10.3390/metabo12050397>
- KHAN, M.A.; BANO, A.; KHAN, A.L. 2020. Phytohormones producing plant growth-promoting rhizobacteria: Mechanisms and their potential in sustainable agriculture. Plant Growth Regulation. 91(3):453-470.
- KHIANGTE, L.; LALFAKZUALA, R. 2021. Effects of heavy metals on phosphatase enzyme activity and indole-3-acetic acid (IAA) production of phosphate solubilizing

- bacteria. *Geomicrobiology Journal*. 38(6):494-503. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1894271>
- KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. 2012. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. En: Maheshwari, D.K. *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems*. Springer. p.37-59. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2
- LAMBA, S.; MUNDANDA MUTHAPPA, D.; FANNING, S.; SCANNELL, A. G. M. 2022. Sporulation and biofilms as survival mechanisms of *Bacillus* species in low-moisture food production environments. *Foodborne Pathogens and Disease*. 19(7):448-462. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0006>
- LASTOCHKINA, O.; ALINIAEIFARD, S.; GARSHINA, D.; GARIPOVA, S.; PUSENKOVA, L.; ALLAGULOVA, C.; FEDOROVA, K.; BAYMIEV, A.; KORYAKOV, I.; SOBHANI, M. 2021. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages. *Journal of Plant Physiology*. 263:153462. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153462>
- LIN, Y.; ALSTRUP, M.; PANG, J.K.Y.; MARÓTI, G.; ER-RAFIK, M.; TOURASSE, N.; ØKSTAD, O.A.; KOVÁCS, Á.T. 2021. Adaptation of *Bacillus thuringiensis* to plant colonization affects differentiation and toxicity. *mSystems*. 6(5):e0086421. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00864-21>
- LOGAN, N.A.; DE VOS, P. 2015. *Bacillus*. En: Whitman, W.B. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley. p.1-163. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- LÓPEZ, A.C.; ALIPPI, A.M. 2007. Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. *International Journal of Food Microbiology*. 117(2):175-184. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.007>
- MADIGAN, M.T.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; SATTLEY, W.M. STAHL, D.A. 2021. *Brock Biology of Microorganisms*. 16 edición. Pearson Education. 994p.
- MAGOTRA, S.; NEGI, N.P.; KUMAR, H. 2024. Co-shaping and co-evolution of microbial biodiversity: Study for identification of potential plant growth promoting microbes. En: Kaur, S.; Dwibedi, V.; Sahu, P.K. *Metabolomics, Proteomics and Gene Editing Approaches in Biofertilizer Industry*. Springer Nature Singapore. p.261-281. https://doi.org/10.1007/978-981-97-2910-4_14
- MAHESHWARI, D.K.; DHEEMAN, S.; AGARWAL, M. 2015. Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture. En: Maheshwari, D.K. *Bacteria in agrobiolgy: Crop productivity*. Springer. p.159-182. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45795-5_7
- MAITRA, P.; HRYNKIEWICZ, K.; SZUBA, A.; JAGODZIŃSKI, A.M.; AL-RASHID, J.; MANDAL, D.; MUCHA, J. 2024. Metabolic niches in the rhizosphere microbiome: dependence on soil horizons, root traits and climate variables in forest ecosystems. *Frontiers in Plant Science*. 15:1344205. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1344205>
- MAWARDA, P.C.; MALLON, C.A.; LE ROUX, X.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. 2022. Interactions between bacterial inoculants and native soil bacterial community: The case of spore-forming *Bacillus* spp. *FEMS Microbiology Ecology*. 98(12):fiac127. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac127>
- MAŽYLYTĖ, R.; KAZIŪNIENĖ, J.; OROLA, L.; VALKOVSKA, V.; LASTAUSKIENĖ, E.; GEGECKAS, A. 2022. Phosphate solubilizing microorganism *Bacillus* sp. MVY-004 and its significance for biomineral fertilizers' development in agrobiotechnology. *Biology*. 11(2):254. <http://dx.doi.org/10.3390/biology11020254>
- MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71(3):413-451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- NCHANJI, E.B.; AGEYO, O.C. 2021. Do common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) promote good health in humans? A systematic review and meta-analysis of clinical and randomized controlled trials. *Nutrients*. 13(11):3701. <https://doi.org/10.3390/nu13113701>
- PAN, L.; CAI, B. 2023. Phosphate-solubilizing bacteria: Advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. *Microorganisms*. 11(12):2904. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8):3795-3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- PETROVIĆ, M.; JANAKIEV, T.; GRBIĆ, M.L.; UNKOVIĆ, N.; STEVIĆ, T.; VUKIĆEVIĆ, S.; DIMKIĆ, I. 2023. Insights into endophytic and rhizospheric bacteria of five sugar beet hybrids in terms of their diversity, plant-growth promoting, and biocontrol properties. *Microbial Ecology*. 87:19. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02329-0>
- POVEDA, J.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. 2021. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105(23):8629-8645. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>
- ROCHA, R.; LOPES, T.; FIDALGO, C.; ALVES, A.; CARDOSO, P.; FIGUEIRA, E. 2022. Bacteria associated with the roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

- at different development stages: Diversity and plant growth promotion. *Microorganisms*. 11(1):57. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010057>
- SANTOYO, G.; HERNÁNDEZ-PACHECO, C.; HERNÁNDEZ-SALMERÓN, J.; HERNÁNDEZ-LEÓN, R. 2017. The role of abiotic factors modulating the plant–microbe–soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 15(1):e03R01. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2017151-9990>
- SOUSA, S.M.; DE OLIVEIRA, C.A.; ANDRADE, D.L.; DE CARVALHO, C.G.; RIBEIRO, V.P.; PASTINA, M.M.; MARRIEL, I.E.; DE PAULA LANA, U.G.; GOMES, E.A. 2021. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. *Journal of Plant Growth Regulation*. 40(2):867-877. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3(4):a001438. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31(4):425-448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- SULEMAN, M.; YASMIN, S.; RASUL, M.; YAHYA, M.; ATTA, B.M.; MIRZA M.S. 2018. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PLoS One*. 13:e0204408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204408>
- UEBERSAX, M.A.; CICHY, K.A.; GOMEZ, F.E.; PORCH, T. G.; HEITHOLT, J.; OSORNO, J.M.; KAMFWA, K.; SNAPP, S.S.; BALES, S. 2022. Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security-A review. *Legume Science*. 5(1):e155. <https://doi.org/10.1002/leg3.155>
- VESSEY, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255(2):571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- WANG, J.; FU, P.; HE, X.; LIU, Y.; ZUO, Y.; WEI, Z.; WANG, Y.; YANG, Y.; LI, C.; SHEN, X.; ZHU, L. 2025. Fur-regulated urease contributes to the environmental adaptation of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology Spectrum*. 13(4):e0275624. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02756-24>
- WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2):697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- XIA, X.; WEI, Q.; WU, H.; CHEN, X.; XIAO, C.; YE, Y.; LIU, C.; YU, H.; GUO, Y.; SUN, W.; LIU, W. 2024. *Bacillus* species are core microbiota of resistant maize cultivars that induce host metabolic defense against corn stalk rot. *Microbiome*. 12:156. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01887-w>
- YANG, H.; QU, J.; ZOU, W.; SHEN, W.; CHEN, X. 2021. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105(18):6607-6626. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11533-2>
- ZAPATA-SIFUENTES, C.; HERNANDEZ-MONTIEL, L.G.; SAENZ-MATA, J.; FORTIS-HERNANDEZ, M.; BLANCO-CONTRERAS, E.; BLANCO-CONTRERAS, E.; CHIQUITO-CONTRERAS, R.G.; PRECIADO-RANGEL, P. 2022. Plant growth-promoting rhizobacteria improve growth and fruit quality of cucumber under greenhouse conditions. *Plants*. 11(12):1612. <https://doi.org/10.3390/plants11121612>