

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTE SEMISÓLIDO
APLICADO A CULTIVO DE PEPINO

Tesis

Que presenta CLAUDIA LETICIA BORJAS BANDA

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

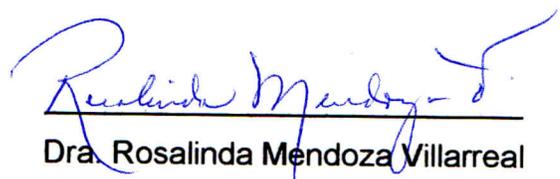
Saltillo, Coahuila

Junio 2017

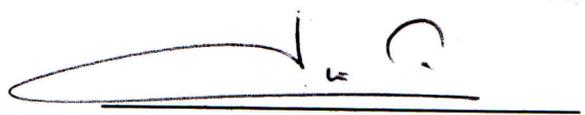
OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTE SEMISÓLIDO APLICADO A CULTIVO DE PEPINO

Tesis

Elaborada por CLAUDIA LETICIA BORJAS BANDA como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



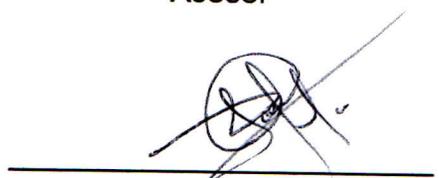
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor Principal



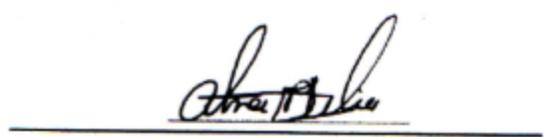
PhD Luis Alonso Valdez Aguilar
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente
Asesor



Dr. Valentín Robledo Torres
Asesor



Dra. Alma Delia Hernández Fuentes
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por forjar mi carrera Profesional y por con su visión y rubro, cambiar la forma en la que veo la vida.

Al CONACYT por aporta apoyos económicos económicas con las cual podemos cumplir metas profesionales, y por permitirnos investigar en proyectos que benefician a los Productores Mexicanos.

A la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal, por apoyarme en la realización del proyecto, principalmente en el inicio del mismo y cuando los resultados no eran tan eficaces como hubiéramos querido.

Al Dr. Luis Alonso Valdez Aguilar por los invaluable conocimientos compartidos sin recelo, útiles a lo largo de la realización de este proyecto.

Al Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente por apoyarme en la realización del protocolo y por aportarme material necesario a lo largo del mismo.

Al Dr. Valentín Robledo Torres por apoyarme con material, equipo y conocimientos estadísticos para el establecimiento y análisis de los resultados obtenidos.

A la Dra. Alma Delia Hernández Fuentes por abrirme las puertas del ICAp para la realización de mi movilidad en Tulancingo, Hidalgo.

A todos los laboratoristas que me apoyaron en la realización de este trabajo:

Ing. Martina Casillas De la Cruz, gracias por brindarnos tu apoyo y amistad sin interés alguno.

TLQ. Guadalupe Ovalle, gracias por colaborar en este proyecto cada que tus obligaciones te lo permitían.

DEDICATORIAS

A mi Madre por estar siempre conmigo y apoyarme en cada proyecto que inicié, sin importar si parece lógico. Gracias mami por enseñarme a ser consistente y trabajar por lo que quiero, a conducirme con respeto y honestidad en todo lo que hago y por enseñarme la importancia de la persistencia para lograr mis metas.

A mi Padre, agradezco tu apoyo en todas las etapas de mi vida y que a pesar de los errores que ambos pudimos haber cometido, siempre estaremos ahí para apoyarnos. Gracias por enseñarme a reír de la vida.

A mis hermanas que siempre están ahí para mí, sin importar lo lejos que pueda encontrarme. Gracias por hacerme no necesitar a nadie más.

A mis sobrinitos Sol y Leito que siempre me alegrarán la vida, sin importar que tan difícil sea la situación. ¡Gracias por siempre regalarme una sonrisa!

A ti amor, Tomás Morales, porque llegaste en el momento menos esperado, pero definitivamente en el indicado. Gracias por apoyarme en todo lo que ha estado a tu alcance (y en lo que no). Gracias por enseñarme a trabajar inteligentemente.

A todos los viejos y nuevos amigos que han permanecido ahí, a pesar de la falta de tiempo, la distancia y de las diferencias que las circunstancias nos provocan. Me hacen mejor persona.

Índice general

HOJA DE FIRMAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo general	2
Objetivos específicos	2
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Biofertilizantes	3
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	5
Fijación biológica de nitrógeno	7
Síntesis de hormonas vegetales	8
Control biológico	10
<i>Brevibacillus</i>	11
Antecedentes de uso de <i>Brevibacillus</i>	12
Cultivo del pepino	15
Importancia económica	16
Calidad funcional	18
Componentes químicos en pepino	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Agronómicas	24

Cuadro 1. Contraste que compara los tratamientos con Steiner al 100% con bacteria frente a los que no tienen bacteria.	25
Cuadro 2. Contraste de los tratamientos inoculados con bacteria a dosis Steiner de fertilización al 100 y 50%.	26
Cuadro 3. Contraste de tratamientos entre sustratos de sábila vs nopal en relación a variables agronómicas.	27
Cuadro 4. Contraste del testigo absoluto con fertilización al 100% de Steiner (dosis convencional) vs todos los tratamientos.	28
Cuadro 5. Contraste del testigo absoluto con fertilización Steiner al 100% vs los tratamientos con fertilización al 100% inoculados con bacteria.	29
Cuadro 6. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización Steiner 50% e inoculados con bacteria.	29
Cuadro 7. Contraste de tratamientos con bacteria vs sin bacteria con fertilización Steiner al 100%, sin considerar el testigo absoluto.	31
Cuadro 8. Contraste de tratamientos con bacteria vs sin bacteria combinada con fertilización Steiner al 50%, sin considerar el testigo absoluto.	32
Cuadro 9. Contraste de tratamientos inoculados con bacteria y fertilización 100% vs con bacteria al 50%, ambas de solución Steiner.	33
Cuadro 10. Contraste entre sustratos de nopal y sábila en variables nutracéuticas.....	34
Cuadro 11. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización al 100% inoculados con bacteria	35
Cuadro 12. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización Steiner 50% inoculados con bacteria.	35
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS.....	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contraste que compara los tratamientos con Steiner al 100% con bacteria frente a los que no tienen

bacteria.....	26
Cuadro 2. Contraste de tratamientos inoculados con bacteria y fertilización 100% frente a los que no fueron inoculados con bacteria al 50%, ambas de solución Steiner.....	27
Cuadro 3. Contraste entre sustratos nopal vs sábila en relación a variables agronómicas.....	28
Cuadro 4. Contraste de testigo absoluto con fertilización al 100% de Steiner (dosis convencional) frente al resto de tratamientos.....	28
Cuadro 5. Contraste del testigo absoluto con fertilización Steiner al 100% frente a aquellos tratamientos con fertilización al 100% inoculados con bacteria.....	29
Cuadro 6. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización Steiner al 50% e inoculados con bacteria.....	30
Cuadro 7. Contraste de tratamientos con bacteria vs sin bacteria con fertilización Steiner al 100%, sin considerar el testigo absoluto.....	31
Cuadro 8. Contraste de tratamientos con bacteria y sin bacteria combinados con fertilización Steiner al 50%, sin considerar el testigo absoluto.....	32
Cuadro 9. Contraste de tratamientos inoculados con bacteria y fertilización al 100% vs sin bacteria ambas de solución Steiner al 50%,	33
Cuadro 10. Contraste entre sustratos nopal y sábila en variables nutracéuticas.....	34
Cuadro 11. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización Steiner al 100% pero inoculados con bacteria.....	35
Cuadro 12. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización Steiner al 50% e inoculados con bacteria.....	36

RESUMEN
OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTE SEMISÓLIDO
APLICADO AL CULTIVO DE PEPINO

POR

CLAUDIA LETICIA BORJAS BANDA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL

Saltillo, Coahuila, Junio de 2017

En la UAAAN se extrajo una cepa de raíces de Nopal propagándola en medio NFB adicionándolo con antibióticos para resistencia. Mediante la técnica de PCR se obtuvo una secuencia de aminoácidos que se comparó con la base de datos *BLAST*®, determinando que es *Brevibacillus sp. G12*. Consecutivamente se elaboró un biofertilizante a base de extractos acuosos de sábila, nopal y goma de mezquite a diferentes concentraciones (0,0.1, 0.5 y 1.0 %) enriquecido con la cepa identificada (10^6 UFC ml^{-1}) evaluándose mensualmente. Los resultados muestran diferencia estadística al usar el nopal y sábila (0.1 y 1.0%) mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial, analizado en el programa SAS 9.4. Los tratamientos significativos se probaron en pepino Var. Tirano, en invernadero en un diseño de bloques completamente al azar con arreglo de parcelas divididas. Los tratamientos incluyeron dos sustratos un extracto de nopal y otro de sábila al 0.1 y al 1.0%, con y sin el *Brevibacillus* a concentración de 10^6 UFC ml^{-1} con solución nutritiva al 50% y otros 8 al 100%, además de dos testigos con solución Steiner al 50% y 100% para 18 tratamientos. Se realizaron tres mediciones a los 30, 60 y 90 días después del trasplante (ddt). Se evaluaron variables agronómicas y de calidad nutracéutica. Los resultados muestran que la fertilización química puede ser modificada al añadir dichos biofertilizantes.

Palabras clave

Brevibacillus, invernadero, pepino, extractos vegetales, nutracéuticos

ABSTRACT
OBTAINING AND EVALUATING A SEMISOLID BIOFERTILIZER IN
CUCUMBER

BY

CLAUDIA LETICIA BORJAS BANDA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL

Saltillo, Coahuila, Junio de 2017

At the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro a strain of *Brevibacillus* was isolated from Nopal roots. This strain was propagating in NFB medium added with antibiotics. Once isolated the DNA was analyzed by Gen 16s rna method and subsequently sent to Macrogen ® Laboratory when the amino acid sequence was performed by PCR technique which was compared in BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*) and classified as *Brevibacillus* Sp. G12.

Consecutively one semisolid biofertilizers was elaborated based on aqueous extracts of nopal, aloe vera and mesquite at different concentrations (0, 0.1, 0.5 y 1.0 %) and *Brevibacillus* strain added (10^6 UFC ml⁻¹). The data evaluated monthly show statistical difference when using nopal and aloe vera (0.1 y 1.0%) through a completely randomized design with factorial arrangement analyzed in SAS program 9.4 version. Extracts that produced significant difference were tested on cucumber Var. Tirano on a greenhouse. Agronomic (diameter of stem, height, total fresh and dry weight, number of fruits and yield) and nutraceutical parameters (total soluble solids, fruit hydrogen potential, titratable acidity, phenols, flavonoids and total antioxidants) were measured. The percentage of colonization of the root was also measured. The field design was completely randomized blocks with split plot arrangement, counting on 18 treatments analyzed in SAS 9.4. The treatments come from the combination of two nutrient solutions (Steiner modified) at 100% and 50%, plus the application of nopal and aloe substrates (0.1 and 1.0%) and added or not with *Brevibacillus* strain. Obtaining that the agronomic and nutraceutical variables showed significant difference compared to the control. Also the results indicate that the use of the biofertilizer (*Brevibacillus*) allows us to reduce the fertilization up to 50% of a modified solution of Steiner without affecting the development and yield of the crop.

Key words

Brevibacillus, greenhouse, cucumber, vegetal extracts, nutraceuticals

INTRODUCCIÓN

Actualmente la fertilización tradicional utilizada, para obtener altos rendimientos y productividad de los cultivos se basa principalmente en la fertilización química complementaria, sin embargo en las últimas décadas, el rendimiento de los cultivos no se ha incrementado al ritmo del aumento de la fertilización química utilizada, mostrando por lo tanto, una baja eficiencia de asimilación de nutrientes y un aumento en cuanto a riesgos ambientales se refiere (Zhang *et al.*, 2010).

Como alternativa sustentable y aprovechando las capacidades que presentan algunos microorganismos como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, surge la formulación de biofertilizantes comerciales. Para formularlos, se utilizan microorganismos inocuos y se requiere de un cuidadoso manejo para no menguar su efectividad. En muchos países en desarrollo no hay industrias de inoculantes, lo cual hace aún más difícil su popularización. Además, en muchas áreas rurales hay una renuencia básica a usar bacterias y hongos como microorganismos benéficos, ya que en estas culturas, los microbios están asociados con enfermedades humanas y de los animales (Bashan, 2008).

En México, la producción actual de biofertilizantes se realiza por pequeñas empresas, instituciones de educación e investigación. A pesar de este desarrollo, la distribución y aplicación a gran escala ha tenido serias dificultades, principalmente por problemas de promoción, distribución y conservación del inoculo (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012).

En el caso de *Brevibacillus*, existen antecedentes de su uso para el control biológico de patógenos (Che *et al.* 2015; Ferreira *et al.* 2016; Joo *et al.* 2015; Pessanha *et al.* 2015), sin embargo a pesar de los estudios ya existentes, es importante evaluar su utilización y éxito como bacteria promotora de crecimiento y su capacidad de control biológico, resulta de importancia para su aplicación en hortalizas de alto impacto económico en el país, tal y como el pepino cultivado en invernadero.

La producción intensiva con la que se cultivan este tipo de hortalizas, han ocasionado problemas ambientales en su entorno, debido a la fertilización tradicional utilizada, enfocada en obtener altos rendimientos y productividad; sin embargo en décadas recientes, el rendimiento del cultivo no se ha incrementado proporcionalmente al aumento en el uso de los fertilizantes químicos, debido a la baja eficiencia de asimilación, a la fijación de los compuestos y la acumulación de sales minerales en los suelos (Zhang *et al.* 2010).

Debido a los costos altos del manejo y a la ineficiencia mostrada por los fertilizantes químicos tradicionales, es necesario desarrollar y aplicar prácticas agrícolas específicas, menos dañinas que muestren la expresión máxima del potencial productivo del cultivo de pepino (Sánchez *et al.*, 1998).

Objetivo general

Obtener y evaluar un biofertilizante semisólido (sustrato orgánico) adicionado con *Brevibacillus sp G12* en el cultivo de pepino.

Objetivos específicos

1. Determinar la eficiencia de la bacteria fijadora de N en la formulación semisólida realizada en el cultivo de pepino.
2. Determinar el contenido mineral de nitrógeno en la planta.
3. Evaluar el rendimiento agronómico y comercial del cultivo al utilizar el biofertilizante.
4. Evaluar las características fisicoquímicas y funcionales del fruto del pepino por efecto de la aplicación del biofertilizante

Hipótesis

Con el biofertilizante formulado se logrará el incremento en la disposición de N para la planta, lo que permitirá disminuir la dosis de fertilización química tradicional, sin afectar el rendimiento del cultivo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Biofertilizantes

El aumento de la población mundial y la demanda de fertilizantes y plaguicidas que esto implica, ha traído consigo cambios significativos en los sistemas agrícolas que conocemos actualmente, tratando de mantener la intensificación agrícola, haciendo uso de nuevas técnicas que ayudan a maximizar los rendimientos actuales (Lima *et al.* 2010).

En la agricultura moderna y sustentable, la aplicación de fertilizantes solubles y mejoradores del suelo ayudan a incrementar la producción de rendimiento de los alimentos y a su vez trata de considerar criterios económicos pertinentes para incrementar la fertilidad del suelo, minimizando a su vez el daño ambiental (Stamford *et al.* 2008).

Además de la fertilización química, los fertilizantes orgánicos, como las compostas y los biofertilizantes pueden ser utilizados para aumentar el uso de productos orgánicos en agrícolas especializadas. Entre estos dos últimos, los biofertilizantes, son los más atractivos, por el impacto positivo que representa para el ambiente y para los cultivos (Nunkaew *et al.* 2014).

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo y/o planta con el fin de sustituir, parcial o totalmente la fertilización sintética, así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos.

Sin embargo dentro de las más destacables desventajas de los portadores de los biofertilizantes se documenta su corta vida de anaquel y la pobre calidad, esto debido a la poca sobrevivencia que los organismos presentan bajo

condiciones adversas, como una alta tasa de contaminación, a su vez, un comportamiento impredecible e inconsistente en el rendimiento y posibles beneficios que se aportan a los cultivos. Por otro lado, el costo es un factor negativo ya que para su producción interviene un alto uso de energía e insumos, dentro del proceso de formulación muchas veces se incluye una mineralización, secado, molienda, tamizado y por último la corrección del pH de los portadores (Kumaresan y Reetha 2011; Sridhar *et al.*, 2004).

Además, existen otros problemas que limitan el uso generalizado de los biofertilizantes, destacando que el beneficio económico que se obtiene de un cultivo depende del tipo del mismo y de la extensión de tierra cultivada, si no se cuenta con algunos implementos como semillas y sistema de riego, el beneficio esperado será limitado. En muchos casos son necesarios estudios del suelo y en algunos casos es necesario aplicar tratamientos de remediación antes de aplicar un biofertilizante, la aplicación de fertilizantes químicos sigue siendo imprescindible, y por lo tanto su deficiencia puede afectar los rendimientos. Por otro lado, se carece de infraestructura adecuada, el precio de los productos es bajo, su posicionamiento es difícil y por último el apoyo a los pequeños productores de parte del gobierno es deficiente (Barragán-Ocaña y del-Valle-Rivera 2016).

Debido a los inconvenientes que la tecnología de los inoculantes presenta, es necesario desarrollar formulaciones alternativas que puedan soportar a la alta población microbiana que contendrá por un período de almacenaje mayor a los seis meses. Se habla de que las formulación no sólidas pueden jugar un rol importante y están volviéndose populares (Sridhar *et al.*, 2004).

El desarrollo de inoculantes producidos localmente es deseable, ya que estos están adaptados a condiciones locales. Para esto es importante usar portadores y métodos de preparación que estén ampliamente disponibles y que sean de fácil acceso. Un biofertilizante adecuado deberá cumplir con las características del siguiente criterio (1) debe estar disponible en forma granulada o de polvo (2) debe soportar el crecimiento de los microorganismos, su supervivencia y de fácil aplicación en el suelo (3) debe tener una estructura fuerte con capacidad

de absorción, adecuadas características de aireación y una excelente capacidad buffer de pH (4) no debe ser tóxico y ser amigable con el ambiente (5) debe ser fácil de esterilizar, producir y manejable en el suelo, y tener cualidades para su almacenamiento (6) no debe ser costoso (Ben Rebah *et al.*, 2002; Rivera-Cruz *et al.* 2008; Stephens y Rask 2000).

En los diferentes países latinoamericanos, existe una amplia gama de factores tanto favorables como desfavorables que influyen en la calidad, producción y distribución de los biofertilizantes. En ocasiones, las empresas no cuentan con almacenes apropiados a gran escala o la estructura necesaria para su transportación. En otros, la tecnología e infraestructura para su producción no está desarrollada (Elliott y Lynch, 1995).

Es evidente que se necesita un organismo regulatorio que ejerza un fuerte control de los inoculantes presentes en el mercado para evitar que el agricultor adquiera productos de baja calidad (Elliott y Lynch, 1995).

En México el mayor impacto de los biofertilizantes fue en las décadas comprendidas entre 1970 y 1980 con la fijación biológica de nitrógeno en soya y garbanzo, en donde se pudo sustituir la fertilización nitrogenada en Sinaloa que en ese tiempo fue el principal productor nacional de estas leguminosas (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012), la utilización de inoculantes comerciales a base de *Rhizobium* fue una práctica generalizada por los productores agrícolas y se recomendaba por centros de investigación gubernamentales. En los últimos años han aparecido un sinnúmero de preparaciones comerciales de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares, por su costo han sido utilizadas principalmente en hortalizas.

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

El papel de los microorganismos en el crecimiento vegetal, la administración de los nutrientes y el control biológico han sido ampliamente estudiados, y se encuentran bien sustentados. Estos microorganismos benéficos, colonizan la rizósfera y endorizósfera de las plantas y promueven el crecimiento vegetal

mediante diversos mecanismos de modo directo e indirecto. (Grover *et al.*, 2011).

En particular los microorganismos denominados como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), comprenden un grupo que es benéfico para las plantas teniendo la capacidad de colonizar la superficie de la raíz, la rizósfera y filósfera, así como tejidos internos de las plantas (Kloepper *et al.*, 1989).

Estas bacterias colonizan la rizósfera de muchas especies de plantas y muestran efectos benéficos, como incrementar el crecimiento vegetal y reducir la susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos patogénicos, bacterias virus y nemátodos (Kloepper *et al.*, 2004).

Muchos estudios se han enfocado en el uso de microorganismos para cambiar la zona de la rizósfera en el suelo, aumentando con esto la disponibilidad de macro y micronutrientes. Las BPCV regulan el crecimiento de la planta, al aumentar la síntesis de hormonas vegetales y la capacidad de asimilar los nutrientes minerales en el suelo, así como disminuir la susceptibilidad de la planta a enfermedades (Yang *et al.*, 2009).

Estos microorganismos promueven el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos, incluyendo entre otros la fijación atmosférica de nitrógeno, producción de auxinas, además de otras fitohormonas, solubilización de fósforo, producción de sideróforos y ACC (1-aminocycloporpano-1-ácido carboxílico) síntesis de aminasa (Glick, 2012).

Además de promover el crecimiento vegetal, estas bacterias promueven el desarrollo de las raíces, modificando la estructura de estas mediante la producción de fitohormonas como el ácido indoalacético (Mantelin y Touraine, 2003), incrementando la superficie de raíz y aumentando el número de raíces apicales. Esta estimulación en las raíces, puede significar una mayor defensa de las plantas contra diversos patógenos. Al tener mayor superficie de contacto y mayor cantidad de raíces, se aumentan los sitios de toma de nutrientes, este es uno de los mecanismos que las bacterias utilizan para incrementar la toma de nutrientes al estimular el desarrollo de la raíz (Kloepper *et al.*, 2007).

La asociación entre plantas y estas BPCV puede ser altamente benéfico, especialmente en suelos con condiciones de baja fertilidad (Carvalhais *et al.* 2013; Hungria *et al.* 2010). Las bacterias promotoras actúan beneficiando a las plantas mediante una serie de mecanismos que pueden trabajar de manera simultánea o trabajar desencadenados en un sistema de cascada, se considera que en partes o en cascada a un mecanismo que estimula a otro causando un mayor crecimiento, ejemplo de esto son las relaciones vistas entre la producción de fitohormonas, óxido nítrico, la actividad de las membranas y la proliferación de las raíces. Además la promoción del crecimiento puede ser también una combinación de mecanismos no relacionados que operan bajo alguna condición causada por el ambiente o por el manejo agronómico del cultivo, lo cual causa en la planta necesidades específicas (Bashan y De-Bashan, 2010).

Fijación biológica de nitrógeno

Como un constituyente de todas las biomoléculas el nitrógeno (N_2) es esencial para todos los organismos vivos, incluyendo las plantas. Existe un grupo de organismos capaces de reducir N_2 a NH_4 , desempeñando un papel fundamental en la biosfera, estos organismos son conocidos como diazotróficos (Kavadia *et al.* 2008).

La fijación biológica de nitrógeno es de hecho, una actividad única, dentro de la cual, una población específica de bacterias están involucradas, y que es controlada, y restringida por muchos factores biológicos y fisicoquímicos (Kavadia *et al.* 2008).

El crecimiento de estas bacterias depende de la abundancia de recursos energéticos en el medio de crecimiento. En los ecosistemas naturales la baja habilidad de asimilación de carbono es crítica para la supervivencia y crecimiento de microorganismos, especialmente para los fijadores de nitrógeno, es importante mencionar que la actividad de fijación de nitrógeno requiere de grandes cantidades de energía, hablamos de 20-30 moléculas de ATP por mol de N_2 reducido a NH_3 (Klucas, 1991).

Esta fijación es mediada por el complejo nitrogenasa, el cual se encuentra presente en los organismos fijadores antes mencionados, y que son capaces de catalizar la conversión del N_2 a NH_4 mediante la reacción general:

$N_2 + 10H^+ + 8e^- + nMgATP \rightarrow 2NH_4^+ + H_2 + nMgADP + nPi$ ($n \approx 16$), esta requiere grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP) y una reducción obligada de protones (Kavadia *et al.* 2008).

El primer producto de la reacción de fijación es NH_3 (amoníaco), el cual es rápidamente protonado, formándose NH_4^+ , lo cual es favorecido por el pK (9.25) de la reacción, de tal manera que amonio es la especie predominante a los pHs fisiológicos y la que toma parte en las reacciones de asimilación (Kavadia *et al.* 2008). La actividad de este complejo enzimático puede verse disminuida por la presencia de oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de éste, para mantener a esta enzima funcionando (Ureta y Nordlund, 2002), por tales motivos las bacterias aeróbicas utilizan dos mecanismos de protección de la nitrogenasa: la protección respiratoria, donde se produce una elevada tasa respiratoria a expensas de un alto consumo de carbono y energía, manteniendo así una concentración intracelular de oxígeno baja; y la protección conformacional, en la cual la nitrogenasa cambia su disposición a una forma reversible inactiva (Robson y Postgate, 1980).

Por otro lado está demostrado que el nitrato de amonio inhibe la actividad del complejo nitrogenasa (responsable de la reducción molecular de nitrógeno a amonio) hablando de la actividad transcripcional, así como en la actividad enzimática, lo que puede indicar que en condiciones de restricción del mismo, el complejo debería de funcionar adecuadamente (Steenhoudt y Vandereyden 2000).

Síntesis de hormonas vegetales

La síntesis de hormonas de crecimiento como ácido indolacético (IAA), ácido gibérelico (GA), citoquininas y etileno, aunado a la producción de sideróforos,

son las características que mejoran el crecimiento de los cultivos (Meena *et al.* 2015; Verma *et al.* 2014).

Las BPCV pueden inducir una amplia gama de efectos como la adquisición de producción de fósforo, prolina y ácido indolacético (IAA) que juega un rol importante en las respuestas que una bacteria muestra a condiciones de estrés (Dobra *et al.* 2010).

Además el IAA y sideróforos producidos por estas bacterias incrementan, ya sea directa o indirectamente la biomasa de los cultivos (Zahid *et al.* 2015).

Las plantas responden a los compuestos que son producidos por las bacterias mediante la activación del sistema de defensa adquirido, propio de su mecanismo de defensa, en la cual se emplea toda una cascada de defensa, dentro de la cual el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno son parte de la señalización de esta. Por lo tanto estas hormonas deben de ser parte de los efectos de estimulación para crecimiento de la planta. Sin embargo no se conoce totalmente el proceso en el cual intervienen estas hormonas y el rol que juegan en los cultivos al ser inoculados con bacterias benéficas (Métraux, 2001).

La producción de fitohormonas denominadas auxinas, citoquininas y giberelinas, son las más estudiadas, como parte del mecanismo de promoción de crecimiento por parte de las bacterias, específicamente las que trabajan de manera extracelular, siendo las auxinas las que más trabajos de investigación han generado (Garcia *et al.*, 2001).

Las auxinas están bien caracterizadas como una hormona sintetizada en las plantas, siendo el ácido 3 indolacético, el más conocido para estimular respuestas a corto y largo plazo en las plantas (Hagen, 1990). El ácido indolacético que es producido por la bacteria, puede mejorar los efectos benéficos otorgados por la promoción de síntesis de las auxinas y con esto afectar directamente el crecimiento de las raíces, mediante la estimulación de la división celular y con esto, la elongación de la planta. (kepczynska, 2008).

Control biológico

La protección de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal está bien documentado e involucra diversos procesos (Handelsman y Stabb, 1996).

En primer lugar la competencia entre microorganismos (benéficos y patógenos) puede limitar el crecimiento de los patógenos (Lemanceau *et al.* 1993).

Segundo, las interacciones directas entre el simbiote y el patógeno reducen la posterior virulencia, la producción de sustancias antimicrobiales, probablemente elegidas por competición de los recursos de la planta hospedera funciona, tal como se ha demostrado en cepas mutantes, que a su vez carecen de protección de toxinas y de efectos (Chin *et al.*, 2013).

Tercero, además de la competencia y la interacción directa, algunas cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, activan la respuesta de defensa inducido en las plantas (Pieterse *et al.*, 2007; Sturz *et al.*, 2000). Este es elicitado después del contacto con agentes de la rizósfera (Bakker *et al.* 2003; Ramamoorthy, 2001) e involucra la producción de elicitores o análogos de hormonas de las plantas, formando parte de la señalización en el sistema de resistencia, tal y cómo lo hace el ácido salicílico (Maurhofer *et al.*, 1998).

Para que el control biológico suceda, la rizobacteria necesita estar presente en la raíz en el lugar adecuado (bajo la punta de la raíz) y en el tiempo correcto (antes de que el patógeno haya causado un daño severo) y en la concentración correcta, lo cual dependerá de diferentes factores propios de la bacteria y de la planta hospedera (Emmert y Handelsman 1999).

La rizobacteria puede ayudar a la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios, los cuales pueden ayudar a la formación de antibióticos, el término idiofase (la fase peculiar) describe el periodo de crecimiento durante la cual el microorganismo produce metabolitos secundarios y se distingue de la trofofase (la fase nutricional) cuando los microorganismos dedican su metabolismo a la máxima síntesis de compuestos celulares y en crecer. La idiofase se caracteriza por un crecimiento lento y no exponencial, típicamente causado por la limitante de nutrientes y por una alta densidad celular (Liao *et al.*, 1995).

La importancia del uso del biocontrol en la agricultura es evitar las desventajas asociadas con los pesticidas sintéticos, incluyendo el desarrollo de resistencia en las poblaciones de una plaga. Una característica atractiva de las estrategias usadas en biocontrol, es que las poblaciones de patógenos resistentes a los antibióticos producidos en el mismo, crean una resistencia muy lenta. Debido a dos razones, primeramente, la mayoría de los agentes de biocontrol producen más de un antibiótico y la resistencia a múltiples antibióticos ocurre con muy poca frecuencia, por otro lado, la exposición total de la población de patógenos a los antibióticos es baja, debido a que en general las poblaciones de los agentes de biocontrol se encuentran localizadas en las raíces, por lo que las presiones de selección se minimizan (Handelsman y Stabb 1996).

Brevibacillus

El género *Bacillus* es un amplio y diverso grupo de bacterias Gram-positivo y Gram-negativo, capaces de formar endoesporas, ser aeróbicas, facultativas anaeróbicas y se pueden identificar por su forma de barra. Han sufrido diversas reclasificaciones a través de los avances en la biología molecular, presentando una filogenética muy heterogénea (Nazina *et al.*, 2001). Este género fue definido en 1920 como un género de bacterias Gram positiva de bacterias aeróbicas, formadoras de esporas, pero desde 1995 se descubrieron algunas estrictamente anaeróbicas y siete que no producen esporas (Logan *et al.*, 1995). *Brevibacillus*, también conocido como *Bacillus brevis* es una bacteria Gram positiva, que además puede formar esporas y que puede secretar altas cantidades de metabolitos secundarios que son importantes para controlar patógenos (Chen *et al.*, 2012).

Este género se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza e incluye bacterias termofílicas, psicofilas, ácidofilas, alcalofílicas y halófilas, que utilizan diversas fuentes de carbono para crecer, si son heterótrofas u otras fuentes si son autótrofas. Su hábitat se traslapa con *Bacillus* y se pueden encontrar en diversos ambientes que incluyen rocas, polvo, ambientes acuáticos, y en el interior de varios insectos y animales (Nicholson, 2002).

Varios géneros de *Brevibacillus* poseen importancia biológica. *B. laterosporus* con actividad larvicida, *B. agri*, *B. brevis*, y *B. laterosporus* se han asociado con infecciones humanas, y otro grupo de *B. brevis* se ha estudiado para el biocontrol de patógenos de plantas debido a su producción antimicrobial (Edwards y Seddon 2001).

Existen diversos métodos moleculares disponibles para la identificación exacta de cepas nativas, la técnica de secuenciación del gen 16s rADN es la primer herramienta para cumplir el propósito, este mecanismo es útil para la elaboración de biofertilizantes (Stanisich, 1996).

Antecedentes de uso de *Brevibacillus*

En este modelo de investigación, una sola inoculación con la cepa aislada más tolerante a la presencia de níquel del género *Brevibacillus brevis*, fue particularmente efectiva incrementando la biomasa de tallos y de raíces en el modelo biológico utilizado, al aplicar tres niveles diferentes de concentración o contaminación de Ni, en comparación con otras cepas nativas inoculadas en la planta control. Al coinocular las cepas anteriores con *G. mosseae* se presentó el peso seco y biomasa más altos (tallos y raíces), así como el mayor contenido de nitrógeno y fósforo, junto con el nivel más bajo de Ni en los tallos. Los resultados sugieren que la coinoculación con micorrizas beneficia en la asimilación de nutrientes y en la disminución de la toxicidad del Ni (Vivas *et al.* 2006).

La habilidad de *Brevibacillus brevis* para influir en el desarrollo de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en el cultivo del tomate, se ha investigado usando plantas cultivadas en cajas Petri en microclimas controlados y en invernadero utilizando macetas. El desarrollo de síntomas en plantas desarrolladas en ambas condiciones, se reducen en coinoculaciones de *F. oxysporum f.sp. lycopersici* con *B. brevis*, comparándolo con inoculaciones únicamente con el patógeno. Además la coinoculación presenta crecimientos significativos en las plantas, peso de la planta en microclima y mayor longitud de raíz en invernadero. Los resultados muestran

que *Brevibacillus brevis* es una opción ideal para el control de esta enfermedad en tomate (Chandel *et al.*, 2010).

Los microorganismos influyen en el destino de los metales en el medio ambiente, el hecho de que la contaminación por este vaya en aumento, ha hecho que la investigación para solucionarlo utilizando microorganismos haya aumentado en años recientes, llamándola bioremediación, en este trabajo se estudió el rol del arsénico, siendo transformado por el trabajo de bacterias e incorporándolo en el diseño de la bioremediación. Las muestras fueron tomadas en Namibia, con suelos desérticos, y conocido por estar contaminado con arsénico. De seis bacterias aisladas, una mostró tolerancia al arsénico, mostrando similitud molecular con *Brevibacillus brevis* según los resultados de la prueba del gen 16s rRNA (Banerjee *et al.* 2013).

La importancia de *Brevibacillus* se ha documentado científicamente en literatura publicada y comercialmente en productos diversos. Siendo uno de los grupos más conocidos de las bacterias Gram positivas. Su alta y rápida tasa de crecimiento, su buena transformación para eficientar la electroporación, disponibilidad de producir diversos vectores, la producción de una cantidad apreciable de proteasas extracelulares, y la continua expresión de proteínas heterólogas hacen a algunas cepas de este género, excelentes modelos de laboratorio. En referencia a sus aplicaciones biotecnológicas, en esta investigación se revisaron sus variadas aplicaciones tales como el ser una fuente de varias enzimas con un alto interés biotecnológico, aunado a su habilidad para degradar polietileno de baja densidad, además de ser útil en el biocontrol, y más recientemente descubierto como ser una herramienta útil para la sobre expresión (Panda *et al.* 2014).

En los cultivos de berenjena (*Solanum melongena L*) y de ají (*Capsicum annun L*) cuyas semillas crecieron en sustratos adicionados con humus de lombriz, residuos agrícolas y suelo, los cuales aportan nutrientes a las plantas pero carecen de fitohormonas, se suministraron mediante la adición de rizobacterias estimuladoras del crecimiento vegetal evaluando los efectos de un biopreparado de la rizobacteria *Brevibacillus borstelensis* B65 sobre la germinación y el

desarrollo de las plántulas de berenjena y de ají en fase de semillero. Los resultados mostraron los efectos de B65 sobre el aumento del porcentaje de germinación de la berenjena y del ají por encima de sus controles. Igualmente aceleró la emergencia de las plántulas, así como el aumento en la longitud de tallo y de las raíces y de la biomasa de tallos, hojas y raíces de chile (Ortega *et al.*, 2014)

En otro estudio se evaluó el efecto de la inoculación con la rizobacteria *Brevibacillus brevis* CBTC1 en el crecimiento y respuesta a la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) en genotipos de *Capsicum annum*, esta cepa, productora de ácido indolacético se aisló de suelos del estado de Yucatán, México, teniendo efectos significativos en el diámetro de tallo, altura de planta, biomasa, número de hojas y biomasa de raíz, por otro lado no modificó la concentración de N foliar ni la atracción de adultos de *B. tabaci* en los genotipos (Ruíz-Sánchez *et al.*, 2016).

Brevibacillus laterosporus es una bacteria entomopatogénica que muestra diversos grados de virulencia contra diversas plagas de insectos en la agricultura. A la inversa puede llegar a ser benéfico como parte de la flora intestinal de algunos otros insectos, incluyendo a las abejas. En este ensayo se utilizó *B. laterosporus*, el cual se identificó, a través del ensayo de PCR, específico para las especies, realizado en el cuerpo de diferentes insectos, incluyendo a *Apis mellifera* y *Bombus terrestris*. Una cepa purificada del interior de las abejas resultó ser patogénica contra la mosca *Musca* doméstica, así se sustenta que el desarrollo de interacciones mutualistas o patogénicas de esta bacteria, con diversas especies de insectos resulta un proceso evolutivo (Marche *et al.*, 2016).

Brevibacillus se ha aislado de ambientes naturales como lo suelos, donde parecen comportarse como saprofitos. El crecimiento mínimo de la bacteria ocurre entre una temperatura de 5-20 °C, la temperatura óptima para su crecimiento es de 40 °C. El crecimiento también dependerá del pH del ambiente y sucederá a un pH de 5.6, pasando un pH de 9.0 el crecimiento no ocurrirá.

Además esta bacteria es tolerante hasta un 2% de NaCl pero no crecerá más allá de un 3% (Vos *et al.*, 2015).

Cultivo del pepino

El origen del pepino se cree que es de India o del sureste de Asia, y aparentemente ha sido cultivado ahí desde hace 3000 años. Su cultivo se distribuyó posteriormente en Grecia, Italia y luego en China. El pepino fue introducido en Inglaterra en los 1300's y en América en 1539 (Decoteau, 2000). Bravo y Zambrano (2008) y Landauer (2010) dicen que se consideran como lugares de origen al centro Chino, que comprende la región montañosa de China Central y Occidental así como las tierras bajas adyacentes; al centro Indio, que comprende Assam y Birmania; y, al centro Indo Malayo, que comprende Indochina y las tierras bajas adyacentes.

Dentro de la familia de las cucurbitáceas, existen especies importantes para el hombre, dado que son fuente de alimento, fibra y algunos objetos domésticos, dentro de estas se encuentra el pepino (*Cucumis sativus*). Existen alrededor de 90 géneros y 750 especies de cucurbitáceas divididas entre el nuevo y el viejo continente. Siete géneros en ambos hemisferios. Actualmente son cultivados seis géneros y 12 especies (Barraza, 2008).

Cucumis sativus se encuentra dentro de las hortalizas más cultivadas de todo el mundo. Como muchas otras cucúrbitas, son usualmente monóicas, presentando órganos femeninos y masculinos en la misma planta. Las plantas comienzan a florecer prácticamente rápido, después de seis o siete semanas después de la siembra, además de que los frutos son cosechados cuando están inmaduros, cerca de siete o diez días pasada la antesis (Sebastian, 2010).

El pepino es una planta que crece, florece y fructifica con normalidad en días cortos (con menos de 12 horas de luz); aunque también soporta elevadas intensidades luminosas y a mayor cantidad de radiación solar, mayor es la producción. No existe una relación cuantitativa concreta entre la reducción de luz y reducción de producción, ya que esta relación depende de la intensidad de luz incidente y de la fase de cultivo (Wang *et al.* 2007).

El pepino, por ser una especie de origen tropical, exige temperaturas elevadas y una humedad relativa también alta. Sin embargo, el pepino se adapta a los climas cálidos y templados, y se cultiva desde las zonas costeras hasta los 1200 metros sobre el nivel del mar (Vélez, 2009). Según las etapas de desarrollo de la planta, la temperatura recomendable para la etapa de germinación deberá ser de 27 ° C en el día y 27 ° C en la noche; para la etapa de formación de la planta deberá ser de 21 ° C en el día y 19 ° C en la noche; y, para la etapa de desarrollo del fruto deberá ser de 19 ° C en el día y 16 ° C en la noche (Bazurto, 2009). En cuanto al pH, el cultivo se adapta a un rango de 6,5 – 7,8 (neutro), soportando incluso un pH hasta de 7,5 (Schnitman, 2007).

Importancia económica

La demanda de pepino en los Estados Unidos de Norteamérica ha tenido un crecimiento sin precedentes en los últimos años. La importación creció en 2006 441,900 toneladas hasta 594,102 toneladas en 2011; es decir, un incremento del 34.4% en solo cinco años (FAOSTAT, 2014). Según datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) México es el principal exportador a Estados Unidos en diversas frutas y hortalizas, en donde el pepino tiene un 83% de participación en el mercado (ASERCA, 2015).

En México es un cultivo importante por el consumo y recursos generados por su producción. Los estados de Sinaloa, Baja California, Michoacán y Morelos destacan como principales productores de esta hortaliza. En el año agrícola 2009 en Sinaloa fueron sembradas 2,791.68 ha de pepino de las cuales se obtuvieron 166,896.71 toneladas que generaron \$344,078,740.0 por su comercialización (SIAP, 2009). Junto con la sandía (*Citrullus vulgaris.*), melón (*Cucumis melo* L.) y jitomate (*S. lycopersicum*), son las especies de hortalizas de frutos más importantes que exporta México al mercado internacional. En el año 2013 el país ocupó el primer lugar en exportaciones de pepinos, con 368.383 t, cuyo valor fue de \$US 185 millones. Se utiliza tanto en estado fresco como industrial (pepinillos o “pickles”). También tiene amplio uso en cosmetología y salud, en la fabricación de jabones, cremas y productos que

aprovechan sus propiedades como emoliente, diurético, depurativo, laxante y calmante, así como sus efectos en tratamientos de aclaramiento de la piel y manchas, reducción de ojeras y nutrición del cuero cabelludo (Abu *et al.*, 2013). Hablando de la familia de las Cucurbitáceas, en la República Mexicana las principalmente cultivadas son la calabaza (*Cucúrbita spp.*), melón (*Cucumis melo L.*), pepino (*Cucumis sativus L.*) y sandía *Citrullus lanatus* (Thunb.) (Banco de México, 2013), entre otras. La actividad productiva del pepino es, sin duda, de las más importantes, es una hortaliza de alto potencial económico por ser un producto de exportación que se cultiva y consume en muchas regiones del mundo. El sistema de producción de pepino en invernadero normalmente se practica en el norte de Europa y América y México lo ha importado (Ortiz *et al.* 2009).

La producción de pepino en el noroeste de México ha sido un éxito, al obtenerse buenos rendimientos con una sola duración del ciclo, siendo esta de 108 días en invierno, lo que da oportunidad de realizar dos siembras al año prolongando así la ventana de producción (Hernández, 2006). Bajo condiciones de invernadero, la producción de pepino es de 2 a 9 veces más que en campo abierto, dependiendo del nivel tecnológico, el manejo y las condiciones climatológicas (Fumiaf, 2005), constituyendo asimismo una alternativa a la diversificación de cultivos en invernadero.

Según datos de MexBet, en México existen 245 empresas dedicadas a la exportación de hortalizas, las cuales se encuentran ubicadas principalmente en los estados de Sinaloa, Sonora, Jalisco, Guanajuato, Tamaulipas, Puebla, Nuevo León, Michoacán, Baja California, Morelos, Nayarit, Colima, Guerrero, donde se cultivan, principalmente, papa, chile, sandía, melón, calabaza, pepino, y cebolla. En general ha venido ocurriendo un aumento en la superficie cosechada de los cultivos de calabacita, chile verde, lechuga y pepino, dada la demanda que estos cultivos han tenido en el mercado de exportación. (Castellanos, 2004).

Existen diversas fisiopatías en el cultivo de pepino como el rayado de fruto o piel de lagarto, aborto de frutos y amarilleo de frutos, los cuales ocasionan

pérdidas importantes de fruto y por lo tanto pérdidas económicas, estas fisiopatías se relacionan con una restricción de nutrientes a pesar de fertilizaciones químicas aparentemente adecuadas (González y Reyes, 2014).

Calidad funcional

Mientras que los alimentos se están utilizando para mejorar la salud, el conocimiento de la relación entre los componentes de la comida y la salud, ahora se usan para mejorar la calidad nutricional de los alimentos (Holdt y Kraan 2011).

Un gran número de fitoquímicos se han aprobado como promotores de la salud por la EFSA (Autoridad Europea de seguridad alimentaria), como los flavonoides, esteroides, polifenoles, fibras, gomas, pectinas, ácidos grasos, más otros grupos que se encuentran bajo estudio para ser catalogados como tales (Commission Regulation (EU) No 432/2012).

Los efectos benéficos de componentes de nuestra dieta han favorecido la búsqueda de materias primas no tradicionales, como fuente, para producir comida saludable y con propiedades organolépticas favorables. Entre ellos, los producidos localmente que tienen carácter residual o de temporada pueden ser interesantes, particularmente si existe alguna metodología flexible para la separación de los compuestos y si esta sirve para diferentes materiales. Los procesos hidrotérmicos son procesos amigables con el ambiente para fraccionar materiales lignocelulósicos, y pueden ser considerados como un proceso químico de extracción segura (Quitain *et al.* 2003).

La relación positiva entre la dieta y la salud ha incrementado la demanda del consumidor por tener más información para llevar una dieta diaria más saludable, incluyendo frutas y verduras, que posean características que ayuden a disminuir el proceso del envejecimiento y reducir el riesgo de padecer diversas enfermedades, principalmente aquellas cardiovasculares y cáncer, entre otras (Paredes-López *et al.*, 2010).

La actividad metabólica de los compuestos bioactivos en las hortalizas es manifestada como la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Szajdek y Borowska 2008).

Se considera que los compuestos responsables de los efectos de benéficos a la salud son fitoquímicos y las vitaminas C y E, los cuales presentan actividades antioxidante. Esta actividad es manifestada por su capacidad de eliminar las ROS, como el hidroxilo, radicales de peróxido y los radicales de otras formas de oxígeno, incluyendo el peróxido de hidrógeno y singlete oxígeno. Estos compuestos inhiben las actividades de las enzimas y forman complejos con metales que catalizan las reacciones de oxidación (Szajdek y Borowska, 2008).

Se suele representar a estos compuestos por la vitamina C y polifenoles como las antocianinas, ácidos fenólicos, flavanoles y flavonoles y taninos. Considerados como antioxidantes naturales debido a su alta concentración y amplia diversidad (Szajdek y Borowska, 2008).

Componentes químicos en pepino

Los Cucurbitacinas son el compuesto nutracéutico característico de la especie de las Cucurbitaceas, entre ellas el pepino. Perteneces a diferentes grupos químicos y se estudian actualmente para determinar su función en la planta y en la salud humana. A pesar de que se encuentra reportado el uso de pepino en la medicina naturista, existen pocos estudios reportando literatura científica acerca de sus componentes químicos y su actividad terapéutica (Aburjai y Natsheh 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en un invernadero de mediana tecnología con una cubierta de plástico calibre 4000, ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro con coordenadas 25°21'13" N 101°01'56" O, en la ciudad de Saltillo, México. Usando material vegetal de Pepino variedad Tirano del tipo

Americano. Para su siembra, se utilizaron charolas de poliestileno de 200 cavidades y su posterior siembra en contenedores de 5 L. de capacidad, contando con una mezcla de sustrato esterilizado a proporción de 70/30 de Peat Moss y perlita respectivamente.

Posteriormente se inoculó una cepa nativa bacteriana perteneciente al género *Brevibacillus* a los 30,60 y 90 días después del trasplante. La cepa fue añadida mediante la formación de un biofertilizante semisólido a base de extractos acuosos vegetales elaborados a base de nopal y sábila a dos diferentes concentraciones (0.1 y 1.0%).

Para su nutrición, al cultivo se le suministró, una solución nutritiva modificada de Steiner al 100 y al 50%. Los tratamientos incluyeron dos sustratos un extracto de nopal y otro de sábila al 0.1 y al 1.0%, con y sin el *Brevibacillus* a concentración de 10^6 UFC ml^{-1} con solución nutritiva al 50% y otros 8 al 100%, además de dos testigos con solución Steiner al 50% y 100% para sumar 18 tratamientos. El diseño experimental consistió en bloques completamente al azar con un arreglo de parcelas divididas analizados en SAS 9.4. Midiendo variables de interés agronómico: diámetro de tallo de planta, altura de planta, peso fresco total de planta, peso seco total de planta, número de frutos, porcentaje de nitrógeno de parte aérea, número de frutos y conteo de unidades formadoras de colonia en la raíz (UFC ml^{-1}). Y en tanto que las variables referentes a calidad poscosecha en fruto (pulpa y cáscara) fueron : pH, sólidos solubles totales (° Brix), color, fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante por dos métodos (DPPH y ABTS) analizadas en el fruto (pulpa y cáscara).

Variables agronómicas

1. Peso fresco

Se cortó la planta (sin raíz) y se pesó en una báscula modelo (CS-5000 OHAUS) con capacidad de 5 kg.

2. Peso seco

La planta fue colocada en bolsas de papel estraza y sometida a 48 horas de secado a una temperatura de 65° en una estufa de secado (Yamato DX-602), para posteriormente ser pesada en una balanza (CS-5000 OHAUS).

3. Altura de planta

Se utilizó un flexómetro para medir las plantas desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.

4. Diámetro de tallo

Con ayuda de un vernier digital (Truper 14388) se hicieron mediciones a aproximadamente 15 cm por encima de la base del tallo.

5. Rendimiento

Se pesó cada uno de los frutos cosechados en todos los cortes y se realizó un promedio final, para obtener los kg por planta totales de cada una de ellas en una balanza (CS-5000 OHAUS).

6. Número de frutos

Se contabilizaron los frutos de cada una de las plantas y se registraron para generar un promedio total de número de frutos por planta.

7. Porcentaje de nitrógeno

Mediante la técnica de Micro-Kjeldahl se cuantificó, en porcentaje el contenido de nitrógeno en la planta. Para lo cual, el material vegetal fue secado y molido, homogenizando hojas y tallos.

El procedimiento consistió en pesar 40 mg de muestra vegetal de pepino (previamente desengrasado) en un matraz micro kjeldahl, se agregaron 300-400 mg de catalizador CuSO_4 y K_2SO_4 en relación 1:7. Se agregaron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se realizó digestión en un equipo Labconco colocando un condensador de vapores de vidrio, conectado a una bomba de vacío para vapores ácidos. La digestión se llevó a cabo durante 1-2 horas, hasta que la muestra presentó un color verde esmeralda, dejando enfriar la muestra para finalmente retirarla del digestor. Para la destilación una vez que se enfrió la muestra y se observaba un líquido blanquecino, se colocó en un tubo de destilación, se agregó 5 mL de agua y 10 mL de NAOH al 60% (cuidadosamente). Para la captura del destilado, se colocó un matraz

Erlenmeyer con ácido bórico al 5% y dos gotas del indicador mixto y se colocó en un recipiente con hielo. Se destiló la muestra en el equipo Kjeldahl hasta obtener aproximadamente 75-100 ml de muestra (color verde). La mezcla del indicador se realizó con 50 ml de rojo de metilo al 0.2% y 25 ml de azul de metileno al 0.2%. El líquido recuperado se tituló utilizando HCl 0.01 N hasta el vire de color verde a rosa.

Variables poscosecha

Se homogenizaron los frutos, con base en el color (verde intenso), tamaño y que estuvieran libres de daños causados por plagas y enfermedades. Al mismo índice de maduración previo la determinación de estas, teniendo como parámetro las características convenientes desde el punto de vista comercial, característico de este tipo de pepinos.

1. Acidez titulable

Este determinó con base en la titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, utilizando solución de fenolftaleína como indicador. A 10 mL de jugo de pepino (pulpa y cáscara) se le añadieron 50 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, más tres gotas de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N hasta el vire de un color rosado que persistió de 15 a 30 segundos.

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V \times N \times \text{Meq}}{100} \times 100 \text{ g o ml de muestra}$$

V = volumen de NaOH consumidos

N = normalidad del NaOH

meq = peso miliequivalente del ácido predominante en la muestra (ácido cítrico).

2. Sólidos solubles totales (° Brix)

Con ayuda de un refractómetro digital (HANNA 96-801) se procedió a colocar una gota del jugo de pepino, obteniendo el porcentaje de sólidos solubles totales en °Brix.

3. Color

Utilizando un colorímetro digital CR-410 KMSA, se procedió a tomar tres lecturas de cada fruto, para posteriormente comparar resultados con la gráfica de colores.

4. Actividad antioxidante

1. DPPH

Se determinó por el método de (Brand-Williams *et al.*, 1995) con modificaciones, se maceraron 2 g de fruto fresco en 20 ml de metanol. El extracto metanólico se agitó en un vórtex por un minuto se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota de 300 μ l con 2.7 ml de DPPH al 6×10^5 mol L⁻¹. Se mantuvo la solución mezcla una hora en obscuridad, una vez transcurrido el tiempo mencionado se midió la absorbancia a 517 nm. Usando el DPPH como blanco. Calculando posteriormente el efecto detoxificador.

2. ABTS

Se determinó por el método de Ree *et al.*, (1999), se utilizó un extracto metanólico que contenía 2 g de fruto de pepino fresco y 20 ml de metanol, se maceró y se agitó por 1 minuto con ayuda de un vórtex, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos. Se homogenizó 7 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato de potasio para producir el catión ABTS^{*}, dejándolo incubar 16 horas en la obscuridad, después se mezclaron 10 ml de cada una de las soluciones preparadas. La solución ABTS^{*} se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 de longitud de onda a 734 nm, usando el metanol como blanco. Se tomaron 100 μ l del extracto y se mezcló con 3.9 de ABTS^{*} diluido (0.7), se dejó reposar en obscuridad por 6 minutos para posteriormente registrar la absorbancia. Se realizó una curva usando Trolox como estándar (Re *et al.*, 1999).

5. Fenoles

Se determinó por el método de (Kim *et al.*, 2006) con modificaciones. Se pesaron 2 g de pepino fresco y se añadieron 20 ml de metanol al 80%, la mezcla se dejó reposar por 12 horas a 4°C. Posteriormente se agitó a 12000 rpm por 5 minutos. Tomando una alícuota de 200 µl del sobrenadante mezclado con 150 µl del agente Folin Cicaltaeu 2N (Singleton y Ross, 1956), se añadieron 2 ml de Na₂CO₃ al 2%, dejándolo incubar por 25 minutos durante 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 735 nm, realizando la curva con ácido gálico.

6. Flavonoides

Se utilizó el método de Zhuang *et al.*, 1992 con modificaciones. Se pesaron 2 g de pepino fresco homogeneizado con metanol al 80%. El extracto se dejó reposar 12 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 300 µl de sobrenadante más 300 µl NaNO₂ al 5% y 300 µl de AlCl₃ al 10%, se dejó reaccionar por 6 minutos para posteriormente añadir 2 ml de NaOH 1N. Se midió la absorbancia a 510 nm. Realizando la curva con rutina como estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para poder comparar de una manera más precisa los resultados, ya que nos permitía formar grupos definidos con sustento teórico para comparar, se utilizó un análisis de contrastes ortogonales, en donde se hicieron comparaciones específicas deseadas entre los 18 tratamientos.

Agronómicas

Las variables agronómicas fueron: altura de la planta (AP), grosor de tallo (GT), peso fresco (PFP) y seco (PSP) de planta y contenido de nitrógeno total (NT) del tejido vegetal de follaje y al fruto: numero (NF) y rendimiento (R).

En el Cuadro 1 se muestran los resultados del contraste que compara la fertilización al 100% con inoculación de bacterias frente a aquellos con fertilización al 100% sin inoculación. En donde se observa con una fertilización Steiner al 100% pero además inoculados con bacteria *Brevibacillus* presentan un rendimiento significativamente superior de biomasa, respecto a aquellos que no fueron inoculados con la bacteria y que además no se les añadió ningún extracto vegetal, esto puede deberse a la capacidad de la cepa bacteriana para sintetizar hormonas, lo que pudo ayudar al crecimiento de las raíces y mejorar la asimilación de nutrientes por el cultivo, al tener más superficie de contacto (Adesemoye *et al.*, 2009). Por otro lado, los resultados obtenidos, son similares a los obtenidos en pepino donde los rendimientos más altos se obtuvieron al inocular rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, comparados con aquellos que no tuvieron inoculaciones (Isfahani y Besharati 2012).

En cuanto a la cantidad de nitrógeno contenido en la parte aérea de la planta (tallos y hojas) nuevamente los tratamientos inoculados con bacteria y fertilización al 100% concentraron los niveles en porcentaje de nitrógeno más altos, la cepa de *Brevibacillus* posee la capacidad de la denitrificación propia de algunas bacterias, la cual es un tipo de respiración anaeróbica en donde el nitrato se reduce a nitrógeno en cuatro pasos consecutivo, lo que pudo ayudar a que el nitrógeno se fijara en los tallos y hojas de las plantas inoculadas. Además se ha propuesto que las fitohormonas actúan para coordinar la adquisición de nitrógeno en las plantas (Kiba *et al.* 2011), por lo que nuevamente los mecanismos del biofertilizante pudieron estar involucrados.

Cuadro 1. Contraste que compara los tratamientos con Steiner al 100% con bacteria frente a los que no tienen bacteria.

Variable agronómica	100% Solución Steiner			
	Tratamiento	Con Bacteria	Sin Bacteria	Pr > F
Rendimiento (kg/planta)		3.68	3.49	0.002
Nitrógeno de tallo y hoja (%)		2.74	2.59	<.0001

En el Cuadro 2 se muestran los resultados pertenecientes al contraste 3 en donde se compararon los tratamientos con bacteria y Steiner al 100% frente a aquellos con Steiner al 50% y también inoculados con bacteria. Obteniendo que el peso fresco, peso seco, número de frutos, diámetro de tallo y % de nitrógeno son estadísticamente superiores en un 23.9, 52.05, 49,51, 4.30 y 7.03% respectivamente cuando se inocula bacteria, pero se mantiene una fertilización al 100%, esto al compararlos con los tratamientos inoculados con la cepa de *Brevibacillus* pero disminuyendo la dosis de fertilización al 50%, el disminuir la dosis de fertilización implica un estrés abiótico al cual la planta debe de responder para sobrevivir, se sabe que cualquier estrés puede ocasionar un impacto negativo directo o indirecto en el crecimiento de la planta y por lo tanto en su desarrollo (Glick *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007). A pesar de que los biofertilizantes han sido ampliamente utilizados, los resultados registrados por diversos estudios no muestran un alto grado de eficacia y la consistencia necesaria que se requiere para su comercialización a gran escala (Nadeem *et al.*, 2014), en relación a los resultados obtenidos en este estudio al inocular bacteria y usar 50% de fertilización.

Cuadro 2. Contraste de los tratamientos inoculados con bacteria a dosis Steiner de fertilización al 100 y 50%.

Variable agronómica	100%	50%	Pr > F
	CON Bacteria	CON Bacteria	
Peso fresco (g)	70.02	56.51	0.0029
Peso seco (g)	50.74	33.37	0.0005
Número de fruto (frutos por planta)	9.3	6.22	0.0003
Diámetro de tallo (mm)	10.66	10.2	0.0348

N (%)	2.74	2.56	0.0108
-------	------	------	--------

En el Cuadro 3 encontramos los resultados del contraste 4, comparando tratamientos con extracto vegetal a base de nopal frente a los que presentan extracto de sábila. Dentro del rendimiento, el número de frutos y el % de nitrógeno, mostraron que el extracto vegetal a base de sábila, es significativamente superior a aquellos tratamientos que contenían extracto vegetal a base de nopal, por lo que determinar el portador o cargador de un biofertilizante es una tarea importante, ya que dentro de las desventajas más comunes se encuentra la fácil contaminación y la corta vida de los microorganismos al inocularse para su aplicación (Kumaresan y Reetha 2011), se considera que estas pudieron ser la causa de la poca eficiencia del extracto de nopal en el cultivo de pepino. Por el contrario el éxito de los extractos a base de sábila se le otorga a la cantidad de azúcares y baja proteína que posee la sábila (Análisis bromatológicos realizados en la facultad de Ciencias Químicas). La cepa *Brevibacillus* requiere D-Fructosa, D-glucosa, glicerol, maltosa, manitol, ribosa, trehalosa, y algunos otros carbohidratos para su desarrollo, además de algunos aminoácidos y ácidos orgánicos que son usados como fuente de carbono y de energía (Vos *et al.*, 2015), debido a que la cepa requiere de diversos carbohidratos y de que el extracto de sábila tiene una alta concentración de los mismos, podemos basar su éxito en su contenido nutrimental.

Cuadro 3. Contraste de tratamientos entre sustratos de sábila vs nopal en relación a variables agronómicas.

Variable agronómica	Extracto vegetal		Pr > F
	Sábila	Nopal	
Rendimiento (kg/planta)	3.22	3.14	0.0053
Número de fruto (frutos por planta)	8	7.27	0.0067
N (%)	2.43	2.41	<.0001

El contraste 7 corresponde a la comparación del efecto del testigo absoluto con Steiner al 100% contra el resto de tratamientos. En el Cuadro 4 se observa que para las variables de peso fresco, peso seco, número de frutos y % de nitrógeno el TA100% fue superior que el resto de tratamientos, no siendo significativo en el resto de variables analizadas. Contrario a lo obtenido por (Islam *et al.*, 2015) quienes al inocular cepas bacterianas de *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Bacillus amyloliquefaciens* obtuvieron mejores resultados que con su control en cuanto a peso fresco y seco y mayor contenido de porcentaje de nitrógeno.

Cuadro 4. Contraste del testigo absoluto con fertilización al 100% de Steiner (dosis convencional) vs todos los tratamientos.

Variable agronómica	Testigo absoluto (100%)	Con y Sin bacteria (100 y 50%)	Pr > F
Peso fresco (g)	74.66	60.89	0.001
Peso seco (g)	54.58	40.15	0.002
Número de fruto (frutos por planta)	9.33	7.5	0.002
N (%)	2.83	2.57	0.077

En el Cuadro 5 se observan los resultados pertenecientes al contraste 8, en el cual se compararon los resultados obtenidos del tratamiento absoluto con Steiner al 100% frente a los que tuvieron la misma fertilización pero fueron inoculados con bacteria. Para todas las variables significativas el testigo se mostró superior estadísticamente. Al observar los datos podemos ver que las plantas tratadas con bacteria se encontraron cerca de alcanzar al testigo absoluto sin lograrlo. Debido a que los microorganismos benéficos, si bien trabajan en simbiosis, son independientes a la planta, y su metabolismo pudo estar encaminado a otro fin. Por otro lado la cepa necesita condiciones específicas que son complicadas de otorgar, sin alterar el manejo del cultivo;

muchas de las cepas de *Brevibacillus* no crecerán cerca de los 20°C o más allá de los 50°C. Su crecimiento tampoco ocurre a un pH de 5.5 y por encima de los 9.0 (Vos *et al.*, 2015), las condiciones ideales pudieron no cumplirse en el cultivo por lo cual la cepa no pudo llegar a la concentración adecuada para satisfacer los requerimientos y superar al testigo absoluto.

Cuadro 5. Contraste del testigo absoluto con fertilización Steiner al 100% vs los tratamientos con fertilización al 100% inoculados con bacteria.

Variable agronómica	TA (100%)	CB (100%)	Pr > F
Peso fresco (g)	74.66	70.02	0.0001
Peso seco (g)	54.58	51.2	0.0002
Número de fruto (frutos por planta)	9.33	9.3	0.0003
Diámetro de tallo (mm)	11.87	10.66	0.0328
N (%)	2.83	2.74	0.0411

En el Cuadro 6, aquí se describen los resultados de comparar el TA 100% frente a aquellos tratamientos con Steiner al 50% e inoculados con bacteria. En este caso para la variable de peso fresco el testigo absoluto con fertilización completa, se muestra muy superior a los tratamientos que fueron tratados con una severa restricción de nutrientes. Si bien esta rizobacteria se encuentra reportada como promotora del crecimiento vegetal al sintetizar hormonas de crecimiento, además de que algunas cepas se han reportado como sintetizadoras de ácido indolacético (Vivas *et al.*, 2005) no fue capaz de sobrellevar la restricción del resto de nutrientes, ocasionando una planta raquílica.

Cuadro 6. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización Steiner 50% e inoculados con bacteria.

Variable agronómica	TA (100%)	CB (50%)	Pr > F
Peso fresco (g)	74.66	56.51	0.0311

Poscosecha y propiedades fisicoquímicas y funcionales

En el Cuadro 7 se encuentran los resultados correspondientes al contraste 1 para las variables poscosecha, obteniendo que en cuanto al contenido de sólidos solubles totales (°Brix) y pH, resultan superiores los tratamientos con una solución nutritiva de Steiner al 100% e inoculados con *Brevibacillus*, frente aquellos con la misma fertilización pero que no fueron inoculados con *Brevibacillus*. Al inocularlas con *Brevibacillus* obtenemos un valor de 5.25° Brix un 57% más de sólidos solubles totales comparado con los reportados en el 2015 (Moreno-Velázquez) en donde al fertilizar pepinos con una solución similar a la utilizada en este trabajo se obtienen cifras de 3.33, sin embargo,. En cuanto al pH y con un valor promedio de 5.1 también se obtienen valores más altos frente a aquellos no inoculados, en un estudio realizado en el cultivo de fresa, se obtuvo que al inocular *Bacillus subtilis* sin importar su fertilización Steiner al 100 o al 50%, se obtenía el pH más alto en los tratamientos inoculados con *Bacillus subtilis* (Magaña, 2016). Por el contrario el contenido de flavonoides y porcentaje de acidez titulable es estadísticamente superior cuando los tratamientos con dicha fertilización no son tratados con bacteria. Acorde con Moreno Velázquez (2015) el contenido de acidez titulable expresada en ácido cítrico es 69% inferior, con una fertilización al 100% pero sin utilizar ningún tipo de inoculación. Finalmente el hecho de inocular microorganismos puede ser determinante para obtener el contenido más alto de flavonoides, de acuerdo a lo obtenido por (Chen *et al.*, 2013) quién al inocular hongos micorrícicos y además añadir estrés abiótico (baja temperatura) logra obtener la mayor cantidad de flavonoides, en este caso el estrés abiótico podría ser el causado por la baja dosis de fertilización.

Cuadro 7. Contraste de tratamientos con bacteria vs sin bacteria con fertilización Steiner al 100%, sin considerar el testigo absoluto.

Variable poscosecha	100% Solución Steiner		
	Con Bacteria	Sin Bacteria	Pr > F
SST (° Brix)	5.25	3.5	0.0216
pH	5.10	4.7	0.0002
Ac. Titulable (%)	0.24	0.19	<.0001
Flavonoides [mg Rutina/g PF]	0.76	0.61	<.0001

Dónde; SST= Sólidos solubles totales

En el Cuadro 8., en donde el contenido de sólidos solubles totales, pH, acidez titulable, fenoles, y cantidad de antioxidantes mediante la técnica DPPH, son estadísticamente superiores, cuando se inocula bacteria, esto frente a aquellos tratamientos también con Steiner al 50% pero que no fueron inoculados con *Brevibacillus*. Por el contrario el contenido de flavonoides, así como, el peso de diámetro ecuatorial y la longitud de fruto son significativamente mayores cuando se fertiliza con Steiner al 50% pero no se inocula *Brevibacillus*. El total de variables correspondientes al contenido bioquímico son mejores cuando se inocula la cepa bacteriana de *Brevibacillus*, esto puede deberse a que las bacterias son capaces de generar una amplia variedad de metabolitos secundarios que pueden tener una influencia positiva (Sturz y Christie 2003).

Cuadro 8. Contraste de tratamientos con bacteria vs sin bacteria combinada con fertilización Steiner al 50%, sin considerar el testigo absoluto.

Variable poscosecha	50% Solución Steiner		
	Con Bacteria	Sin Bacteria	Pr > F
Brix (°)	4.5	3.93	0.0216
pH	5.06	4.25	0.0105
Ac. Titulable (%)	0.23	0.16	0.0071
Fenoles [µg EAG/g PF]	0.13	0.11	0.0008
Flavonoides [mg Rutina/g PF]	0.74	0.76	<.0001
DPPH	12.61	12.59	<.0001
Peso de fruto (g)	431.96	433.87	<.0001
DE (mm)	51.43	52.79	<.0001
Longitud (cm)	23.11	24.05	<.0001

Los tratamientos inoculados con bacteria y con fertilización Steiner al 100% , en cuanto a las variables de grados brix, acidez titulable, peso, diámetro ecuatorial y longitud de fruto resultaron significativamente mayores al compararlos con aquellos tratamientos también inoculados, pero con una solución nutritiva de Steiner al 50%, tal y como se muestran en el Cuadro 9. Las bacterias poseen una virtud de adaptación fisiológica y versatilidad metabólica, las bacterias en las zonas de raíces de las plantas son un agente clave del cambio del suelo en los agroecosistemas, con efectos positivos, en cuanto a tolerancia de altos contenidos de sales, aumento en los rendimientos de los cultivos y mejoras en la calidad del suelo, respecto a la disponibilidad de nutrientes; sin embargo, esta regulación está mediada por el *quórum sensing* de las bacterias, las

cuales, se deben adaptar para alcanzar una alta proliferación y, de esta manera, se estimulan, se activan y se mantienen en la zona radicular, por medio de la liberación selectiva de los exudados y lixiviados, por parte de las plantas y otros microorganismos (Brown, 2010), debido a la alta restricción de los nutrientes esto pudo llevar a la poca o nula eficiencia de la cepa bacteriana, por otro lado, al trabajar con microorganismos vivos siempre se deberá tener en cuenta que diversos factores serán fundamentales para lograr su óptimo desarrollo.

Cuadro 9. Contraste de tratamientos inoculados con bacteria y fertilización 100% vs con bacteria al 50%, ambas de solución Steiner.

Variable agronómica	Solución Steiner		Pr > F
	100%	50%	
Sólidos solubles totales (°Brix)	7.5	4.5	0.0039
Ac. Titulable (%)	0.23	0.19	0.0311
Peso de fruto (g)	523.35	431.96	<.0001
Diámetro ecuatorial (mm)	54.35	51.45	<.0001
Longitud (cm)	25.94	23.11	<.0001

En el Cuadro 10 se presentan los resultados de la comparación del uso del extracto de sábila frente al de nopal, resultando que para el contenido de grados Brix, el pH y el porcentaje de acidez titulable, el extracto de sábila fue estadísticamente superior. El extracto vegetal de sábila, se perfila, como la mejor opción para ser un portador del inoculante, debido a la consistencia de su pulpa la sábila ayuda a fijar la bacteria con la raíz del cultivo de pepino, llegando

a calificar como un buen portador del inoculante, esto debido a que se necesita, que la bacteria este bien fijada a las células de la raíz, si no sucede esto, las sustancias promotoras del crecimiento que pueda excretar la bacteria se va hacia la rizósfera y puede ser consumido por otros microorganismos, además antes de que sean asimilados por la planta, al no estar bien adheridas a la raíz, el agua puede lavar la bacteria lejos de la rizósfera y morirán en un suelo o sustrato carente de nutrientes y finalmente los sitios potencialmente buenos para la asociación benéfica y que no son ocupados por la cepa de *Brevibacillus*, pueden ser utilizados por otros microbios patógenos o no benéficos al cultivo (Ro *et al.*, 2000). Aunado a esto la sábila contiene diversas vitaminas como la A, C y E, ácido fólico y colina, minerales como calcio, cromo, cobre, selenio, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc, un tipo de polisacáridos en el mucilago conocidos como mucopolisacáridos y además contiene las enzimas auxinas y giberelinas, los cuales pudieron servir como sustrato alimenticio a la cepa de *Brevibacillus* logrando ser el mejor extracto y portador con potencial para ser un biofertilizante (Ro *et al.* 2000; Shelton 1991).

Cuadro 10. Contraste entre sustratos de nopal y sábila en variables nutracéuticas

Variables de calidad	Extracto vegetal		Pr > f
	Sábila	Nopal	
Sólidos solubles totales (°Brix)	4.38	4.33	0.004
pH	4.87	4.68	0.014
Ac. Titulable (%)	0.21	0.19	0.031

Se observa en el Cuadro 11 que al comparar el testigo absoluto con fertilización completa (Steiner al 100%) comparado con los tratamientos con la misma fertilización, pero además inoculados con la cepa *Brevibacillus* la cantidad de grados Brix es superior y altamente significativa en aquellos tratamientos

inoculados con la bacteria. Se menciona, por ejemplo, que es posible mejorar el grado de dulzura (grados Brix) de algunos frutos como melón, utilizando bacterias solubilizadoras de fosfatos (Kao, 2007)

Cuadro 11. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización al 100% inoculados con bacteria.

Variable agronómica	Testigo absoluto (100%)	Tratamientos con bacteria (100%)	Pr > F
SST(°Brix)	2.67	5.25	<.0001

SST= Sólidos solubles totales

Al comparar el testigo absoluto con Steiner al 100% y los tratamientos con fertilización reducida (Steiner 50%) podemos observar que las variables de grados Brix, pH, antioxidantes (ABTS) y diámetro ecuatorial es superior estadísticamente en los tratamientos que fueron inoculados y a los cuales se les redujo su fertilización un 50%. Por el contrario la longitud y peso de fruto fueron significativamente superiores cuando la fertilización fue completa (Steiner 100%) y no se tuvo inoculación alguna, tal y como lo muestra el Cuadro 12. Aunque existen muchos reportes de que los hongos micorrízicos y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal influyen en el valor nutrimental de los alimentos, solo algunos estudios han investigado los efectos que pueden tener en los nutrientes relevantes para los humanos en la parte comestible de los cultivos de plantas y que les permiten a los frutos desarrollarse de manera eficaz. (Giovannetti *et al.*, 2013).

Cuadro 12. Contraste del testigo absoluto vs tratamientos con fertilización Steiner 50% inoculados con bacteria.

Calidad de fruto	TA (100%)	Con Bacteria (50%)	Pr > F
Sólidos solubles totales (°Brix)	2.67	4.50	<.0001
Potencial Hidrogeno	4.53	5.09	0.0214

*Antioxidantes	0.66	0.83	0.0362
Peso fresco (g)	453.60	431.96	0.0047
Diámetro ecuatorial (mm)	50.48	51.45	0.0006
Longitud (cm)	24.27	23.11	0.0059

TA= Testigo absoluto *Técnica ABTS

CONCLUSIONES

El biofertilizante formulado a base de extractos acuosos de sábila y de nopal logró aumentar la fijación de nitrógeno total en los tratamientos con *Brevibacillus* y el rendimiento en los frutos con fertilización Steiner al 100%.

Por otro lado se obtuvieron resultados superiores en rendimiento, número de fruto y porcentaje total de nitrógeno en planta y en calidad nutracéutica en el porcentaje de SST, pH y acidez titulable en aquellos frutos donde el extracto vegetal utilizado fue la sábila.

En relación al contenido de sólidos solubles totales (°Brix), pH y acidez titulable en fruto se incrementó al utilizar plantas inoculadas con *Brevibacillus* sin importar el nivel de fertilización al que se sometiera la planta. Sin embargo, los flavonoides y el contenido de antioxidantes medidos con la técnica ABTS no se afectaron al inocular con la bacteria por lo que es necesario realizar otros estudios con diferentes niveles de fertilización y concentración de bacteria para verificar el beneficio de la inoculación con *Brevibacillus*.

REFERENCIAS

Abu-Romman, S., Suwwan, M., & Ezz, A. L. (2013). The influence of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Advances in Environmental Biology*. 339-344.

- Aburjai, T., & Natsheh, F. M. (2003). Plants used in cosmetics. *Phytotherapy research*, 17(9), 987-1000.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., & Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial ecology*, 58(4), 921-929.
- Bakker, P. A. H. M., Ran, L. X., Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25(1), 5-9.
- Banerjee, S., Majumdar, J., Samal, A. C., Bhattachariya, P., & Santra, S. C. (2013). Biotransformation and bioaccumulation of arsenic by *Brevibacillus brevis* isolated from arsenic contaminated region of West Bengal. *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol*, 3, 1-10.
- Barragán-Ocaña, A., & del Carmen del-Valle-Rivera, M. (2016). Rural development and environmental protection through the use of biofertilizers in agriculture: An alternative for underdeveloped countries?. *Technology in Society*, 46, 90-99.
- Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2010). Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy*, 108, 77-136.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brown, D. (2010). A mathematical model of the Gac/Rsm quorum sensing network in *Pseudomonas fluorescens*. *Biosystems*, 101(3), 200-212.
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Fan, B., Fedoseyenko, D., Kierul, K., Becker, A., & Borriss, R. (2013). Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. *PLoS One*, 8(7), e68555.
- Chandel, S., Allan, E. J., & Woodward, S. (2010). Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. *Journal of phytopathology*, 158(7-8), 470-478.
- Che, J., Liu, B., Ruan, C., Tang, J., & Huang, D. (2015). Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. *Crop Protection*, 67, 178-183.

- Chen, S., Jin, W., Liu, A., Zhang, S., Liu, D., Wang, F., & He, C. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase growth and secondary metabolism in cucumber subjected to low temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 160, 222-229.
- Chen, W., Wang, Y., Li, D., Li, L., Xiao, Q., & Zhou, Q. (2012). Draft genome sequence of *Brevibacillus brevis* strain X23, a biocontrol agent against bacterial wilt. *Journal of bacteriology*, 194(23), 6634-6635.
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 117-153.
- Dobra, J., Motyka, V., Dobrev, P., Malbeck, J., Prasil, I. T., Haisel, D., & Vankova, R. (2010). Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. *Journal of plant physiology*, 167(16), 1360-1370.
- Edwards, S. G., & Seddon, B. (2001). Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of applied Microbiology*, 91(4), 652-659.
- Emmert J., E, and B Handelsman. (1999). "Biocontrol of Plant Disease: A Gram-Positive Perspective." *FEMS Microbiology Letters* 171: 1–9.
- Ferreira, V., Barcellos, I. D. S., Carramaschi, I. N., Santos-Mallet, J. R., Queiroz, M. M., & Zahner, V. (2016). Larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Musca domestica* (Linnaeus, 1758)(Diptera: Muscidae), treated with *Brevibacillus laterosporus* (Laubach) spore suspensions. *Journal of invertebrate pathology*, 137, 54-57.
- Garcia de Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of microbiology*, 47(5), 404-411.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 329-339.
- GONZÁLEZ, D. B. Z., & REYES, I. A. F. ALTOS DEL ESTADO DE MÉXICO. (2014). Folleto técnico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Grageda-Cabrera O. A., Díaz-franco A., and Peña-cabriales José. 2012. "Impacto de Los Biofertilizantes En La Agricultura * Impact of Biofertilizers

in Agriculture Resumen." 3: 1261–74.

- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1231-1240.
- Hagen, G. (1990). The control of gene expression by auxin, Plant Hormones and their role in plant growth and development. The Netherland: Davies, P.J.
- Handelsman, J., & Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The plant cell*, 8(10), 1855.
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.
- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., & Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331(1-2), 413-425.
- Isfahani, F. M., & Besharati, H. (2012). Effect of biofertilizers on yield and yield components of cucumber. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2(2), 83-92.
- Islam, S., Akanda, A. M., Prova, A., Islam, M. T., & Hossain, M. M. (2015). Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Joo, H. J., Kim, H. Y., Kim, L. H., Lee, S., Ryu, J. G., & Lee, T. (2015). A *Brevibacillus* sp. antagonistic to mycotoxigenic *Fusarium* spp. *Biological Control*, 87, 64-70.
- Kao, S. S. (2007). *Current Status of Bio-pesticides Development, Farmers' Acceptance and Utilization, and Future Perspective in Taiwan*. Food and fertilizer technology center (FFTC).
- Kavadia, A., Vayenas, D. V., Pavlou, S., & Aggelis, G. (2008). Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey–one-predator system. *ecological modelling*, 218(3), 323-338.
- Kepczynska, A. K. (2008). The use of rhizobacteria to stimulate plants growth. *Biotechnology*, 102-114.

- Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of experimental botany*, 62(4), 1399-1409.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., & Rajapakse, N. C. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2327-2332.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablutowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
- Kloepper, J. W., Gutierrez-Estrada, A., & McInroy, J. A. (2007). Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian journal of microbiology*, 53(2), 159-167.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.
- Klucas, R. (1991). Associative nitrogen fixation in plants. In: Dilworth, M.J., Glenn, A.R. (Eds.), *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, 1-5.
- Kumaresan, G., & Reetha, D. (2011). Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. *Journal of Phytology*, 3(10).
- Lemanceau, P., Bakker, P. A., De Kogel, W. J., Alabouvette, C., & Schippers, B. (1993). Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Applied and Environmental microbiology*, 59(1), 74-82.
- Liao, X., Vining, L. C., & Doull, J. L. (1995). Physiological control of trophophase–idiophase separation in streptomycete cultures producing secondary metabolites. *Canadian journal of microbiology*, 41(4-5), 309-315.
- Lima, F. S., Stamford, N. P., Sousa, C. S., Junior, M. L., Malheiros, S. M. M., & Van Straaten, P. (2010). Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1769-1775.
- Logan, N. A., Hoffmaster, A. R., Shadomy, S. V., & Stauffer, K. E. (2011). *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition (pp. 381-402). American Society of Microbiology.

- Marche, M. G., Mura, M. E., & Ruiu, L. (2016). *Brevibacillus laterosporus* inside the insect body: Beneficial resident or pathogenic outsider?. *Journal of invertebrate pathology*, 137, 58-61.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., & Défago, G. (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88(7), 678-684.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., & Bajpai, V. K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340-347.
- Métraux, J P. (2001). "Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Current State of Knowledge." *European Journal of Plant Pathology* 107: 13–18.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology advances*, 32(2), 429-448.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic *Thermophilic bacilli*: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.
- Nicholson, W. L. 2002. "Roles of *Bacillus* Endospores in the Environment." *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(3): 410–16.
- Nunkaew, T., Kantachote, D., Kanzaki, H., Nitoda, T., & Ritchie, R. J. (2014). Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA)-containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(1), 4-4.
- Panda, A. K., Bisht, S. S., DeMondal, S., Kumar, N. S., Gurusubramanian, G., & Panigrahi, A. K. (2014). *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 623-639.

- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life: A review. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 299-308.
- Pessanha, R. R., Carramaschi, I. N., dos Santos Mallet, J. R., Queiroz, M. M., & Zahner, V. (2015). Evaluation of larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830)(Diptera: Calliphoridae), treated with *Brevibacillus laterosporus*. *Journal of invertebrate pathology*, 128, 44-46.
- Pieterse, C. M., van Pelt, J. A., Verhagen, B. W., Ton, J., van Wees, A. C. M., Léon-Kloosterziel, K. M., & Van Loon, L. C. (2003). Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis*, 35(1-3), 39-54.
- Quitain, A. T., Sato, N., Daimon, H., & Fujie, K. (2003). Qualitative investigation on hydrothermal treatment of hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) bark for production of useful chemicals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(27), 7926-7929.
- Ramamoorthy, V. (2001). "Induction of Systemic Resistance by Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Crop Plants against Pests and Diseases." *Crop Protection* 20(1): 1-11.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219400000569>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rebah, F. B., Tyagi, R. D., & Prevost, D. (2002). Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresource technology*, 83(2), 145-151.
- Rivera-Cruz, M del C., Narcía, A. T., Ballona, G. C., Kohler, J., Caravaca, F., & Roldan, A. (2008). Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(12), 3092-3095.
- Ro, J. Y., Lee, B. C., Kim, J. Y., Chung, Y. J., Chung, M. H., Lee, S. K., ... & Park, Y. I. (2000). Inhibitory mechanism of aloe single component (alprogen) on mediator release in guinea pig lung mast cells activated with specific antigen-antibody reactions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(1), 114-121.

- Robson, R. L., & Postgate, J. R. (1980). Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 183-207.
- Sánchez Del C F, J Ortiz C, Ma C Mendoza C, V A González H, J Bustamante O (1998) Parámetros fisiológicos y agronómicos de jitomate en dos sistemas nuevos de producción. *Rev. Fitotec. Mex.* 21:1-13.
- Shelton, Ronald M. (1991). "Aloe Vera: Its Chemical and Therapeutic Properties." *International Journal of Dermatology* 30(10): 679–83.
- Sridhar, V, Brahma Prakash G.P., and Hegde S. V. (2004). "Development of a Liquid Inoculant Using Osmoprotectants for Phosphate Solubilizing Bacterium (*Bacillus Megaterium*)." 17(2): 251–57.
- Stanisich, G. V. (1996). *VA, Microbiology*, 3–16.
- Stamford, N. P., R. A. Lima, M. A. Lira, and C. R S Santos. (2008). "Effectiveness of Phosphate and Potash Rocks with *Acidithiobacillus* on Sugarcane Yield and Their Effects on Soil Chemical Attributes." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(10): 2061–66.
- Steenhoudt, O., and J. Vandereyden. (2000). "Azospirillum, Free-Living Nitrogen Fixing Bacterium Closely Associated with Grasses: Genetic, Biochemical and Ecological Aspects." *FEMS Microbiology Reviews* 24(4): 487–506.
- Stephens, J. H G, and H. M. Rask. (2000). "Inoculant Production and Formulation." *Field Crops Research* 65(2–3): 249–58.
- Sturz, A. V., and B. R. Christie. 2003. "Beneficial Microbial Allelopathies in the Root Zone: The Management of Soil Quality and Plant Disease with Rhizobacteria." *Soil and Tillage Research* 72(2): 107–23.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, 19(1), 1-30.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147-156.
- Ureta, A., & Nordlund, S. (2002). Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *Journal of bacteriology*, 184(20), 5805-5809.
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., & Jaiswal, D. K. (2014). Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum L.*) in India. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 33-37.

- Vivas, A., Biro, B., Németh, T., Barea, J. M., & Azcón, R. (2006). Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2694-2704.
- Vivas, A., J. M. Barea, and R. Azcón. (2005). "Interactive Effect of *Brevibacillus Brevis* and *Glomus Mosseae*, Both Isolated from Cd Contaminated Soil, on Plant Growth, Physiological Mycorrhizal Fungal Characteristics and Soil Enzymatic Activities in Cd Polluted Soil." *Environmental Pollution* 134(2): 257–66.
- Vos, Paul De, K L Ledeganckstraat, and B- Ghent. 2015. "*Brevibacillus.*" : 1–22.
- W, Zumft, and Zumft W. (1997). "Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification." *Microbiol Mol Biol Rev* 61(4): 533–616. <http://mmbbr.asm.org/cgi/reprint/61/4/533?view=long&pmid=9409151>.
- Weber, O. B., Baldani, V. L. D., Teixeira, K. D. S., Kirchhof, G., Baldani, J. I., & Dobereiner, J. (1999). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*, 210(1), 103-113.
- Yang, J., Kloepper J. W., and Choong M. R. (2009). "Rhizosphere Bacteria Help Plants Tolerate Abiotic Stress." *Trends in Plant Science* 14(1): 1–4.
- Zahid, M., Kaleem M. A., Hameed S., and Rahim N. (2015). "Isolation and Identification of Indigenous Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Himalayan Region of Kashmir and Their Effect on Improving Growth and Nutrient Contents of Maize (*Zea Mays* L.)." *Frontiers in Microbiology* 6(MAR): 1–11.
- Zapata, P. J., Botella M. A., Pretel M. A., and Serrano M. (2007). "Responses of Ethylene Biosynthesis to Saline Stress in Seedlings of Eight Plant Species." *Plant Growth Regulation* 53(2): 97–106.
- Zhang F, Shen J, Zhang J, Zuo Y, Li L, Chen X (2010) Rhizosphere processes and management for improving nutrient use efficiency and crop productivity: implications for China, 1st ed. *Adv Agron*107:1–32. doi:10.1016/S0065-2113(10)07001-X.