



TRABAJO FIN DE GRADO  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
GRADO EN FARMACIA



---

# PROBIÓTICOS DE USO AMBIENTAL

---

Realizado por Nieves Borrallo Sánchez



Supervisado por Juan Parrado Rubio  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Revisión bibliográfica  
Junio 2020



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
TRABAJO FIN DE GRADO  
GRADO EN FARMACIA**

# ***PROBIÓTICOS DE USO AMBIENTAL***

Nieves Borrallo Sánchez

Curso 2019/2020

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Tutor: Juan Parrado Rubio

Revisión Bibliográfica

## RESUMEN

La agricultura es la actividad más importante de la historia del ser humano. Las plantas presentan una gran interacción con el microbioma del medio ambiente, generándose mutuamente beneficios, lo que ha derivado en el uso de los microorganismos como herramientas para el desarrollo de una agricultura sostenible. Así, se conocen como **probióticos de plantas** a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal o PGPM (Plant Growth Promoting Microorganisms) utilizados y formulados en nuevos productos para su aplicación agronómica, por parte de la industria biotecnológica.

Los probióticos entran en la categoría de bioestimulantes ambientales. El Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes (EBIC) los define como "sustancias y/o microorganismos que, aplicadas a plantas o a la rizosfera, estimulan los procesos naturales, mejorando/beneficiando la absorción de nutrientes, la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del cultivo". Los probióticos, además de aportar beneficios a la producción del cultivo, son una prometedora alternativa al uso de los fertilizantes minerales y pesticidas, para así alcanzar el equilibrio correcto de los ecosistemas.

Algunos de los más relevantes e innovadores probióticos ambientales desarrollados tanto a partir de bacterias (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Serratia* y *Azospirillum*), como de hongos (*Trichoderma* y hongos micorrícicos, *Gigaspora* o *Rhizophagus*) se van a describir a lo largo de este trabajo así como los distintos mecanismos que les confieren ser incluidos en la categoría de productos bioestimulantes y la cual contempla a los biofertilizantes, biocontroladores y/o biopesticidas, con objetivo de mostrar la importancia de esta rama de la biotecnología en el alcance de una agricultura sostenible.

**Palabras claves: probióticos, plantas, biofertilizantes, biocontrol, biopesticidas.**

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	7
METODOLOGÍA.....	7
RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	8
1. MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	8
1.1. PGP TRAITS.....	9
1.2. Formulación biotecnológica de probiótico.....	11
2. PROBIOTICOS BIOFERTILIZANTES.....	12
2.1.- Aporte de Nitrógeno: Fijación biológica del N <sub>2</sub> atmosférico.....	13
2.2.- Aporte de Fósforo: Solubilización/Mineralización del fósforo.....	15
2.3.- Aporte de Hierro: Producción de sideróforos.....	17
2.4.- Producción de fitohormonas.....	18
2.5.- Actividad ACC desaminasa.....	19
3. PROBIOTICOS BIOPESTICIDAS.....	20
3.1.- Producción de enzimas hidrolíticas.....	20
3.2.- Producción de HCN.....	21
3.3.- Producción de antibióticos, antifúngicos y otros tóxicos.....	21
4. PROBIOTICOS BIOCONTROLADORES.....	22
4.1.- Competición.....	22
4.2.- Resistencia sistémica inducida.....	23
5. EJEMPLOS DE PRINCIPALES PROBIÓTICOS.....	23
5.1.- Biofertilizantes fijadores de Nitrógeno.....	23
5.2.- Otros microorganismos.....	27
6. PERSPECTIVAS FUTURAS Y LIMITACIONES DEL USO DE PROBIÓTICOS EN LA AGRICULTURA .....	30
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	32

## INTRODUCCIÓN

Del área total del planeta, la parte acuática representa el 71% y la terrestre el 29%; de la parte terrestre solo se puede utilizar el 13% para la producción agrícola. Aun así, el 98% de los alimentos provienen del área agrícola y tan solo un 2% de la parte acuática. Para el 2050 la población mundial se calcula en cerca de 9 billones de personas, por lo que la producción de alimentos debería aumentar para entonces en un 70%.

Para aumentar la producción de cultivos existen tres estrategias principales de crecimiento: aumento de la tierra cultivada, incremento de la frecuencia de las cosechas y aumento de los rendimientos. Sin embargo, hay indicios de que podríamos estar llegando al límite de las posibilidades para las tres estrategias (Grageda-Cabrera et al., 2012).

Esta creciente necesidad de abastecimiento de productos agrícolas para la alimentación y transformación en bienes de consumo por parte de la sociedad moderna ha suscitado un inmenso desarrollo de actividades agrícolas en las últimas décadas (Carvajal y Mera, 2010). La aplicación de químicos como pesticidas y fertilizantes se ha convertido en una práctica muy común. Desafortunadamente, esto influye en la contaminación del agua y el suelo, y toda la cadena alimentaria sufre efectos adversos debidos a esta práctica, lo cual influye en la salud humana (Porto de Souza et al., 2017). Además, con la agricultura tradicional se está reduciendo la producción o incrementando los costes, o bien ambos. Los monocultivos, que se producen de forma reiterada en la misma tierra, dan lugar al agotamiento de la superficie de la tierra, de la vitalidad de la tierra, de la pureza del agua subterránea y de los microorganismos beneficiosos, haciendo vulnerables a las plantas a parásitos y patógenos (Singh et al., 2011).

En este contexto, los agricultores están llamados a producir más, con menos fertilizantes, menos plaguicidas y más prácticas sostenibles, lo que incluye la labranza mínima, la agricultura de precisión y el control biológico (Moreno-Velandia et al., 2018).

Además, se reconoce que la productividad del suelo depende de su buen mantenimiento y existe una especial atención al desarrollo de tecnologías biológicas para promover el uso sostenible de este recurso.

Es por todo esto por lo que comienza a plantearse la posibilidad de usar probióticos en la agricultura con el objetivo de mejorar la producción. Las plantas, al igual que los humanos se encuentran en simbiosis con ciertos microorganismos conocidos como probióticos. Estos microorganismos son una alternativa al uso de pesticidas y fertilizantes (Picard et al., 2008), por lo que se esquivarían los problemas mencionados anteriormente relacionados con su uso.

Los probióticos de plantas son productos englobados en la categoría de bioestimulantes ambientales, los cuales son definidos por el Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes (EBIC) como "*sustancias y/o microorganismos que, aplicadas a plantas o a la rizosfera, estimulan los procesos naturales, mejorando/beneficiando la absorción de nutrientes, la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del cultivo*". Los bioestimulantes consiguen estos beneficios con independencia de su contenido nutricional y, por lo tanto, se diferencian claramente de los fertilizantes.

A día de hoy, se conoce que los bioestimulantes ofrecen una herramienta para regular y/o modificar los procesos fisiológicos en plantas estimulando su crecimiento y rendimiento, reduciendo las limitaciones inducidas por diferentes estreses (Yakhin et al. 2017).

La industria biotecnología ambiental está en una fuerte expansión, se ve reflejado en los datos económicos de éstos en el mercado global, que mostraron un crecimiento de un 12,5 % entre 2013 y 2018, año en el que se estima que alcanzaron los 2.241 millones € (Calvo et al. 2014). Estudios más recientes sugieren que el índice de crecimiento entre 2016 y 2021 es del 10,4 %, año en que se alcanzarán los 2.900 millones €. Estos aumentos son la consecuencia de una mayor demanda de productividad de los cultivos, así como de la calidad y protección de los mismos frente a una gran cantidad de estreses ambientales (Fleming et al. 2019). Aunque el uso

global de los bioestimulantes es variable, Europa está en cabeza con una media anual de 6,2 millones de hectáreas tratadas con bioestimulantes (EBIC).

El uso de probióticos, uno de los bioestimulantes más utilizados, es respaldado por estudios científicos y organizaciones tales como la FAO. La utilización de esta bioherramienta puede dar una amplia gama de beneficios como mayor crecimiento de la planta, defensa, solubilización de minerales o fijación de nitrógeno atmosférico, entre otras (Lichtfouse, 2013).

El término de probióticos de uso ambiental se utiliza para referirse a un grupo de microorganismos beneficiosos para las plantas (Menéndez y García-Fraile, 2017) ya sea mejorando la salud del suelo, favoreciendo la absorción de nutrientes o favoreciendo la resistencia a estreses bióticos y abióticos.

La asociación entre el microorganismo probiótico y la planta se da principalmente en el suelo. La estrategia consiste en inocular o estimular el crecimiento de ciertos microorganismos que permitan obtener a la planta un beneficio concreto, como, por ejemplo, fijación de nitrógeno atmosférico. Estos microorganismos, normalmente, se encuentran de forma natural dentro de la raíz o en las inmediaciones, creando una serie de complejas interacciones en la rizosfera. La mayoría de estas interacciones entre el suelo, la planta y el microorganismo son aún desconocidas debido a que es un sistema abierto muy complejo (Hartmann et al., 2009).

Existe un interés creciente, tanto por la comunidad científica como por las empresas comerciales, en el desarrollo de probióticos y en la evaluación de sus efectos sobre las plantas y la rizosfera. Estos estudios se han desarrollado mediante diferentes enfoques metodológicos, incluyendo caracterización microbiana, estudios de rendimiento y crecimiento sobre plantas, y la aplicación de las llamadas estrategias ómicas, incluyendo transcriptómica, genómica, proteómica y metabolómica, que requieren de su integración para aportar legitimidad al campo de los bioestimulantes (Yakhin et al. 2017).

## **OBJETIVOS**

En este trabajo se ha considerado de gran relevancia por su importancia en la actualidad realizar una revisión bibliográfica sobre un nuevo tipo de productos biológicos de aplicación ambiental como alternativa a los fertilizantes y pesticidas químicos con los siguientes objetivos.

1. Descripción de la naturaleza de los probióticos de uso ambiental,
2. Descripción de los diferentes mecanismos de acción debajo de la cual estará su potencial aplicación como biofertilizantes, biocontroladores y/o biopesticidas,
3. Descripción de principales probióticos
4. Marco legal y económico

## **METODOLOGÍA**

Para la realización del presente trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica en artículos científicos y revisiones sobre los probióticos de uso ambiental, sus mecanismos y sus aplicaciones. Para ello se han realizado búsquedas en distintas bases de datos como Google académico, SciELO y ScienceDirect.

Para obtener unos resultados más concretos, se utilizaron las palabras claves “biofertilizante, biocontrol, biopesticida, probióticos, suelo, plantas” tanto en inglés como en español, en las bases de datos nombradas anteriormente.

### **Criterios de inclusión**

- Artículos publicados en los últimos 20 años, eligiendo los más actuales siempre que sus evidencias no fueran de menor peso que en los más antiguos.
- Artículos en inglés o español.
- Artículos de acceso libre o accesibles a través de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla.

### **Criterios de exclusión**

- Artículos publicados hace más de 20 años.
- Artículos en un idioma diferente al inglés o español.
- Artículos a los que no se pudiera acceder al texto completo gratuitamente.



- Artículos o fuentes poco fiables o con contenido que pueda ser manipulado por cualquier usuario.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.**

Los probióticos de plantas son microorganismos promotores de crecimiento vegetal o PGPM (Plant Growth Promoting Microorganisms) que son formulados por parte de la industria biotecnológica para uso agronómico.

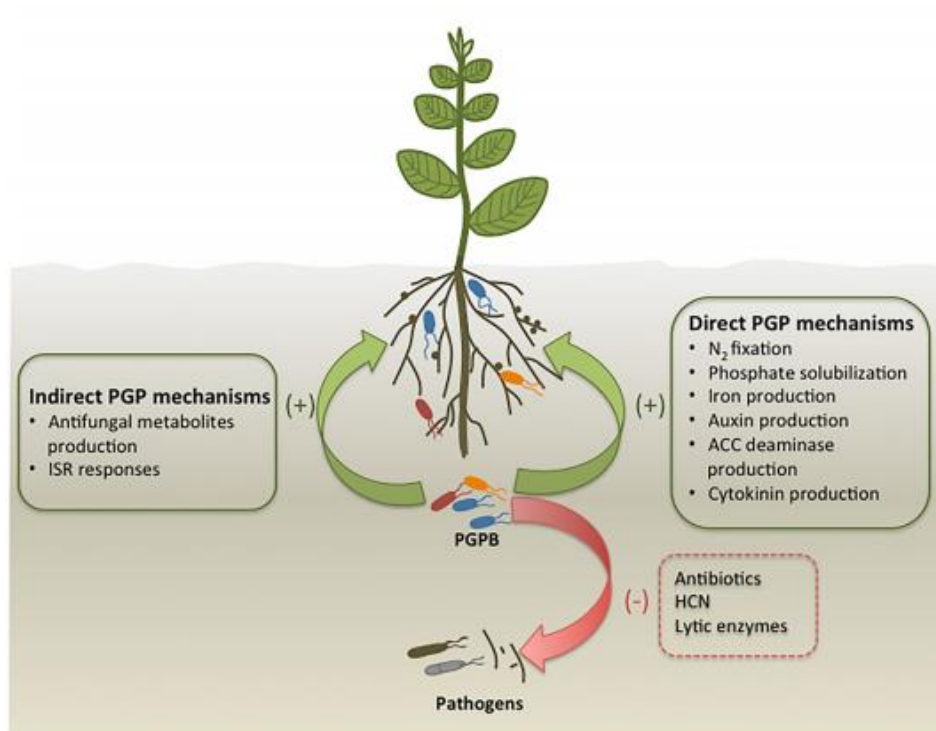
Los PGPM se definen como microorganismos ambientales ubicados en la rizosfera y que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas (Puente et al.,2011). La rizosfera es la porción de suelo que está fuertemente influenciada por las raíces de las plantas. Las plantas son capaces de excretar sustancias a través de la raíz y estas sustancias atraen a bacterias, que quieren utilizarlas como fuente de nutrientes para su crecimiento, dando inicio de esta forma a una relación de beneficio mutuo (Contreras et al., 2017).

Los PGPM son una herramienta muy útil en agricultura, tanto de forma directa como indirecta. De forma directa incrementan el crecimiento y la productividad vegetal facilitando la disponibilidad de recursos nutritivos para la planta o también pueden modular los niveles de hormonas vegetales o producirlos. De forma indirecta pueden disminuir o inhibir los efectos nocivos de diversos patógenos vegetales (Menéndez y García-Fraile, 2017) (Fig 1). A su vez, protegen a la planta del estrés abiótico, como pueden ser las temperaturas extremas, el pH, la salinidad, la sequía, los metales pesados o la contaminación debida a pesticidas (Woo y pepe, 2018).

Los microorganismos, aparte de promover el crecimiento de las plantas, deben cumplir además una serie de criterios para ser designados como PGPM:

1. Que no invadan los tejidos internos de la planta.
2. Que puedan colonizar la superficie de la raíz.
3. Que alcance una elevada concentración microbiana en la rizosfera, de manera que puedan realizar el efecto deseado.

4. Que no afecte al hombre ni a otros microorganismos benéficos ( Rodríguez, 2013)



**Figura 1.** Mecanismos de acción de los PGPM (Premachandra et al.,2016).

### 1.1. PGP TRAITS

Actualmente se conocen cientos de cepas microbianas que son candidatas para considerarse PGPM, pero no todas ellas tienen las características idóneas ello. Por esto mismo se han establecido una serie de características que deben tener los microorganismos para considerarse un PGP de interés, lo que se conoce como PGP traits.

Un PGP traits es una parte molecular de su genoma, que codifica la expresión de biomoléculas relacionadas directamente con una función de estimulación del crecimiento de las plantas.

Existe un consenso entre los investigadores en cuanto a los PGP traits más importantes, los cuales se pueden basar en la cuantificación de su transcriptoma, la expresión proteica o bien el metaboloma.

Los principales parámetros que se tienen en cuenta son los siguientes:

- Producción de ácido indol acético (IAA): es la auxina más importante y se cuantifica su producción por parte del microorganismo debido a que es una hormona que participa en la elongación y división celular de raíz y tallo. Además, hace menos rígida la pared celular para el crecimiento, por lo que el acceso a los nutrientes se consigue más fácilmente.
- Solubilización de fosfato: es de los nutrientes más limitantes en los suelos por lo que el aumento de su biodisponibilidad por parte de microorganismos puede ser muy importante para el crecimiento de la planta. Además, por este mecanismo se produce acidificación de la rizosfera, que puede ser beneficioso.
- Producción de amonio: el nitrógeno es el nutriente más limitante en los suelos, por lo que la producción de amonio, a partir de nitrógeno atmosférico principalmente, es fundamental.
- Niveles de ACC desaminasa: se trata de una enzima antiestrés muy importante, tanto en situaciones de estrés abiótico como biótico. Disminuye los niveles de etileno y, en consecuencia, aumenta la disponibilidad de amonio en la rizosfera (Esquivel-Cote et al., 2013).
- Producción de sideróforos: los microorganismos producen sideróforos que captan el hierro haciendo que este no esté disponible para patógenos como los hongos.

Además de estos parámetros que permiten cuantificar la capacidad de incrementar el crecimiento vegetal de forma directa, existen otros parámetros que pueden mejorar la producción y el crecimiento de manera indirecta.

Para el desarrollo de los probióticos es necesaria la identificación y el cultivo de microorganismos con posible potencial biotecnológico para su posterior estudio, este estudio es necesario para conocer su posible aplicación en la agricultura y el papel que ocuparía en el ecosistema. Existen dos métodos diferentes para determinar los candidatos a probióticos para un cultivo concreto: dependiente de cultivo e independiente de cultivo (Porto de Souza et al., 2017; Woo y Pepe, 2018).

Para identificar posibles probióticos con mecanismos **dependientes de cultivo** hay que partir de una muestra de material vegetal, de la que se aíslan las bacterias y hongos

asociados mediante sucesivos cultivos hasta obtener cultivos puros para identificar posteriormente el organismo mediante técnicas moleculares o fenotípicas. Las técnicas fenotípicas permiten describir características morfológicas, metabólicas y fisiológicas de los microorganismos, pero estas técnicas están en desuso debido a que son insuficientes y laboriosas, al contrario de las moleculares, como la PCR y la secuenciación, que han avanzado mucho y permiten identificar estos microorganismos fácilmente y sin coste excesivo.

En cuanto a la identificación mediante mecanismos **independientes de cultivo**, los microbios son detectados mediante la extracción y análisis de su material genético presente en muestras de suelo. Esta aproximación se basa en técnicas de secuenciación masiva, como la pirosecuenciación 454 o la secuenciación illumina, que permiten detectar la diversidad microbiana asociada a un cultivo vegetal. Además, si esto se combina con análisis meta-transcriptómicos se puede obtener información sobre los genes que podrían ser más importantes en la mejora de los cultivos.

Lo ideal sería combinar ambos métodos para obtener la máxima información sobre los beneficios que aporta cada microorganismo de forma aislada y en conjunto con el resto, para así determinar los microorganismos con más futuro como probióticos en la agricultura (Porto de Souza *et al.*, 2017).

## **1.2. Formulación biotecnológica de probióticos.**

Los probióticos utilizados ambientalmente, están compuestos por PGPMs, y una serie de excipientes químicos, que van a hacer factible su aplicación ambiental, es decir, que sean efectivos una vez inoculados en el cultivo.

Estas sustancias químicas utilizadas en la formulación se denominan "Carrier". Este término hace referencia al sustrato abiótico que se utiliza en el proceso de formulación de un probiótico, es decir, el probiótico es el producto final que contiene un carrier más un agente bacteriano o un consorcio de microorganismos (Bashan *et al.*, 2014).

Entre las características principales que aporta la formulación son las siguientes:

- 1) Facilitar el crecimiento de los microorganismos PGPM.

- 2) Incrementar la viabilidad microbiana, en buenas condiciones fisiológicas durante un periodo de tiempo aceptable. Debe proteger a las células microbianas del estrés biótico y abiótico al que se van a enfrentar una vez sean aplicados en el suelo.
- 3) Proporcionar suficientes microorganismos en el momento de la inoculación para alcanzar el número umbral de bacterias que normalmente es necesario para obtener respuesta por parte de la planta, lo que quiere decir que el inoculante debe contener suficientes bacterias viables después del proceso de formulación (Bashan et al., 2014).

Además, los carriers también debe tener una serie de características para poder ser utilizados en la formulación de probióticos:

- Ser de bajo coste y que estén disponibles localmente.
- Ser miscibles.
- Permitir el intercambio gaseoso, especialmente oxígeno y tener un alto contenido en materia orgánica y capacidad de retención de agua que debe ser mayor al 50%.
- Ser fáciles de tratar (operaciones de mezclado y empaquetado).
- Que sean fácilmente esterilizables con autoclave o radiación gamma.
- Tener una buena adhesión a las semillas.
- Tener una buena capacidad de tamponamiento del PH.
- Ser no tóxicos para las plantas (Alori et al., 2017).

## **2. PROBIÓTICOS BIOFERTILIZANTES.**

A continuación, vamos a describir las principales funciones de los probióticos ambientales, una de las más importantes es la capacidad Biofertilizante.

Los probióticos con capacidad biofertilizante, aumentan la capacidad de la planta para captar nutrientes o, directamente, le suministran ellos los nutrientes, haciendo que se favorezca su crecimiento y, en consecuencia, aumente la productividad.

Los probióticos biofertilizantes podrían reemplazar a los fertilizantes minerales ya que los resultados que se obtendría serían los mismos o incluso mejores, y, además, tienen

un menor impacto medioambiental y económico (Alori y Babalola, 2018; Woo y Pepe, 2018).

Por otro lado, también se ha demostrado que los biofertilizantes benefician a la propia salud humana ya que mejora las propiedades nutritivas de los vegetales y frutos. Por ejemplo, se han visto incrementos en el contenido de pigmentos como los carotenoides o en los niveles de metabolitos secundarios como flavonoides (kaempferol), ácidos (ácido cafeico) y otros compuestos fenólicos con actividad antioxidante, lo que ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y oncológicas en aquellas personas que los consumen.

Algunos de los microorganismos que presentan capacidad como biofertilizantes son hongos micorrícicos como *Glomus fasciculatum*, hongos como *Trichoderma viride* y bacterias como *Bacillus coagulans* y *Pseudomonas fluorescens*, entre otros muchos (Alori y Babalola, 2018).

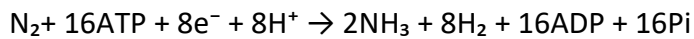
A continuación, se muestran en detalle los diferentes mecanismos que están detrás de la capacidad biofertilizante. Algunos probióticos biofertilizantes pueden ejercer su acción utilizando una mezcla de estos mecanismos.

### **2.1. Aporte de Nitrógeno: Fijación biológica del N<sub>2</sub> atmosférico.**

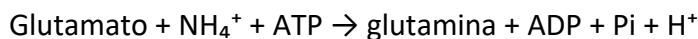
El nitrógeno es un elemento indispensable para la vida. Es el elemento más abundante en las plantas después del carbono, el oxígeno y el hidrogeno y a la vez el más limitante para su crecimiento. Forma parte de moléculas orgánicas como aminoácidos, nucleótidos, hormonas vegetales, pigmentos y moléculas defensivas, como alcaloides o glucósidos cianogénicos. Corresponde casi al 80% de los gases presentes en la atmósfera y permanece de forma casi inerte por poseer en su estructura un triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, lo que hace que no pueda ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos. Ante un déficit de nitrógeno, la planta desarrolla síntomas de deficiencia mineral, tales como la clorosis y la reducción de crecimiento, de ahí la intensidad en el uso de fertilizantes minerales ricos en nitrógeno (Alori y Babalola, 2018).

Para que las plantas puedan asimilar el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) debe ser convertido en una molécula disponible metabólicamente. Esta acción puede ser realizada por microorganismos, los cuales lo reducen y lo fijan en formas más asimilables para las plantas, como los iones amonio ( $NH_4^+$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ), o bien como aminoácidos (Restrepo-correa et al., 2017). Por su parte, las plantas le dan a cambio la fuente de carbono que estas requieren por los exudados radiculares.

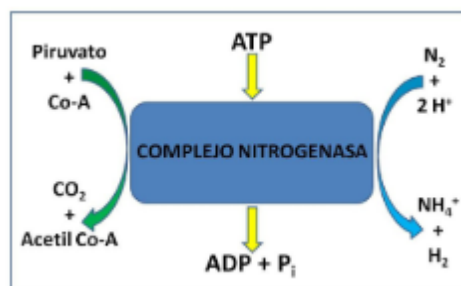
El proceso de reducción de  $N_2$  a amoníaco ( $NH_3^+$ ) está catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa (Figura 2) (Loredo-Osti et al., 2004) y requiere una alta cantidad de energía, que se obtiene a partir del ATP. La reacción se puede presentar de la siguiente forma:



Después el  $NH_3^+$  es convertido a  $NH_4^+$  en las condiciones ácidas de la rizosfera. Por último, este  $NH_4^+$  es utilizado por las plantas en un proceso llamado asimilación del amonio (Restrepo-correa et al., 2017) en el que este será incorporado a los aminoácidos, para luego dirigirse a otras moléculas nitrogenadas, las proteínas. La reacción quedaría de la siguiente manera:



Es importante que este proceso se produzca en ausencia de oxígeno ya que la enzima nitrogenasa es muy sensible y se inhibe por la presencia de este gas (López y Boronat, 2016).

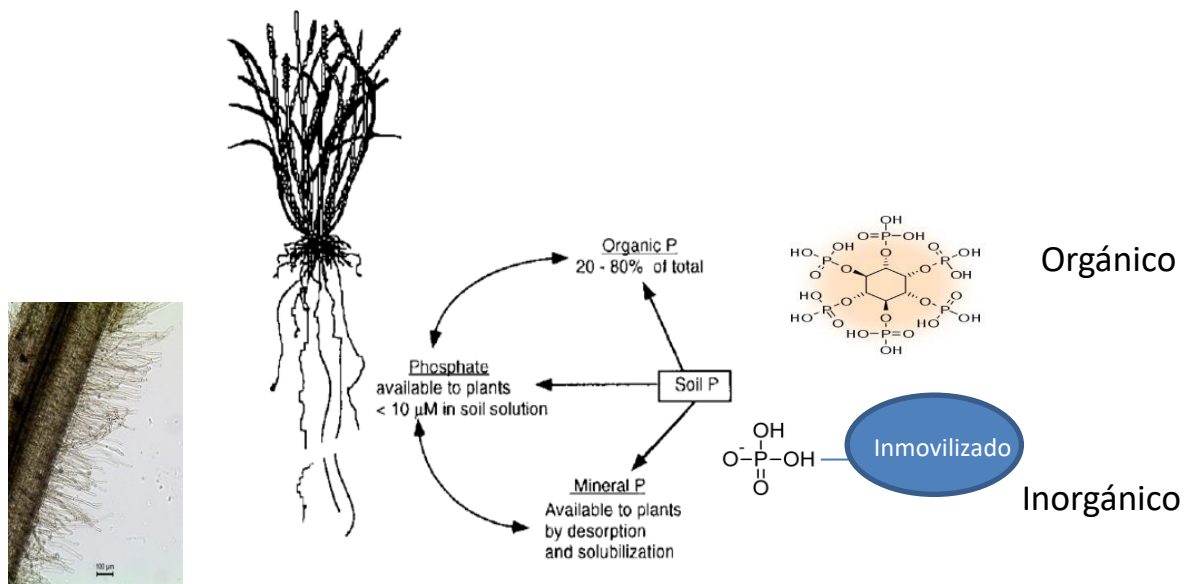


**Figura 2.** Reacciones bioquímicas básicas del complejo nitrogenasa. Los electrones se transfieren de la molécula del ácido pirúvico procedente del metabolismo al complejo nitrogenasa. La fijación de  $N_2$  atmosférico requiere energía suministrada por el ATP, produciéndose finalmente amonio e hidrógeno gaseoso (accesorio) (López y Boronat, 2016).

La fijación biológica del  $N_2$  pueden llevarla a cabo tanto bacterias de vida libre, como *Azoarcus* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* o *Azotobacter* sp., como bacterias simbióticas, tales como las del género *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Frankia* y *Nostoc*. Así, estas bacterias podrían reemplazar a los fertilizantes minerales, dado que proporcionan a las plantas cultivadas el nitrógeno necesario para su crecimiento y desarrollo (Warshan *et al.*, 2017; Alori y Babalola, 2018).

## 2.2. Solubilización/Mineralización del fósforo.

El fósforo es un elemento indispensable para la constitución celular y las reacciones bioquímicas en las plantas, pero las formas químicas que estas pueden utilizar son escasas a pesar del gran contenido de fósforo que hay en la mayoría de los suelos. Uno de los principales motivos de esta limitada disponibilidad se debe a la unión de los aniones fosfatos con otros elementos, con los que forma complejos poco solubles, como los fosfatos de hierro ( $FePO_4$ ), aluminio ( $AlPO_4$ ) o fosfatos de calcio [ $Ca_3(PO_4)_2$ ] (Hernández-Leal *et al.*, 2011)



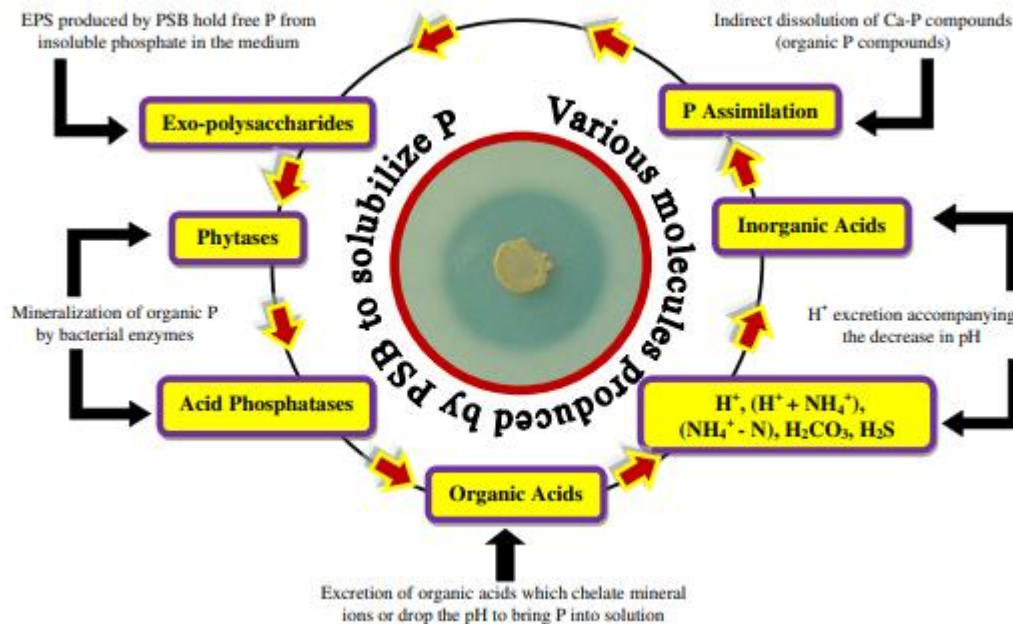
**Figura 3.** Adquisición de fósforo por las plantas.

Se ha demostrado que algunas bacterias del suelo son capaces de movilizar el fósforo que no es accesible para las plantas mediante procesos de solubilización y mineralización, permitiendo que las plantas lo absorban (Alori *et al.*, 2017; Alori y Babalola, 2018).



Los microorganismos que solubilizan el fósforo que forma parte de compuestos inorgánicos, lo hacen produciendo ácidos orgánicos (ácido málico, fumárico, butírico, glucurónico, ...), iones hidroxilo, protones, dióxido de carbono, agentes quelantes y enzimas. Estos ácidos orgánicos producen una bajada local del pH, modificando el equilibrio químico de las reacciones de secuestro del fósforo y secuestrando los cationes unidos al fosfato por lo que lo convierte en su forma soluble.

Por otro lado, los procesos de mineralización del fósforo tienen lugar mediante enzimas fosfatasas y fitasas que desfosforilan los fitatos, la forma orgánica de fósforo predominante en el suelo, para así liberar el fósforo de una manera disponible para la planta (Figura 3) (Alori et al., 2017).



**Figura 4.** Sustancias orgánicas e inorgánicas producidas por bacterias responsables de la solubilización/mineralización del fósforo de los suelos (Ahemad y Kibret, 2014).

Algunas bacterias que son capaces de solubilizar/mineralizar fósforo son *Azotobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, y *Rhizobium spp.*, entre muchas otras. De nuevo el uso de este tipo de bacterias tiene el potencial de reemplazar a los fertilizantes minerales (Alori et al, 2017; Alori y Babalola, 2018).

### 2.3. Aporte de Hierro: Producción de sideróforos.

El hierro (Fe) es fundamental para diversas funciones celulares como puede ser la síntesis de ADN. Este suele encontrarse en la naturaleza en la forma  $Fe^{3+}$  como parte de sales e hidróxidos que son de baja solubilidad, por lo que muchos se han centrado en buscar formas para la solubilización de hierro. En la actualidad, a nivel agrícola, la quelación del hierro suele hacerse mediante secuestrantes sintéticos como el EDTA y el EDDHA, pero sin embargo, estos suponen un peligro ambiental, pues liberan también otros metales pesados que se encuentran en el suelo o el agua, lo que representa un riesgo para la salud de los organismos vivos (Restrepo-correa et al., 2017). De este modo es necesario avanzar en la búsqueda de alternativas menos perjudiciales.

Los sideróforos son moléculas orgánicas de pequeño tamaño (0.5 – 1.0 kDa), solubles en solución acuosa a pH neutro y cuya función principal es la captura del ion férrico ( $Fe^{3+}$ ), en diferentes ambientes. Estos se clasifican en tres grupos: catecolatos, hidroximatos e hidroxicarboxilatos, según si el ligando que une hierro es catecol, ácido hidroxámico o ácido hidroxicarboxílico (Aguado-Santacruz et al., 2012; Saha et al., 2016; Alori y Babalola, 2018).

Estos compuestos son sintetizados por algunas plantas (fitosideróforos), sobre todo gramíneas, pero principalmente son los hongos y las bacterias, mayoritariamente Gram negativas, los que los secretan al medio como respuesta a un déficit de hierro para satisfacer sus necesidades nutricionales (Aguado-Santacruz et al., 2012; Alori y Babalola, 2018).

Los sideróforos actúan como quelantes específicos de  $Fe^{3+}$ , formándose un complejo  $Fe^{3+}$ -sideróforo, que ocasiona que este metal no se encuentre disponible para otros microorganismos que no sean capaces de reconocer dicho complejo (Aguado-Santacruz et al., 2012) y, además, los sideróforos secretados por hongos y bacterias pueden suministrar hierro a la planta favoreciendo su crecimiento y también su germinación.

Algunas de las bacterias que tienen capacidad de producir sideróforos pertenecen a los géneros *Chryseobacterium sp.* y *Pseudomonas sp.* (Alori y Babalola, 2018).

## 2.4. Producción de fitohormonas.

Las plantas son capaces de producir de forma endógena una serie de hormonas vegetales que regulan parámetros como el crecimiento, la división celular o la extensión de la raíz. Estas reciben el nombre de fitohormonas (Ramos et al.,2018) y pueden ser de 5 tipos diferentes: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. Algunos microorganismos pueden producir fitohormonas como parte de su metabolismo secundario y aparentemente, la producción de estas sustancias es una respuestas de los microorganismos a la producción de sustancias de la planta hacia la rizosfera (Loredo-Osti et al.,2004). Las dos más destacables son las auxinas y las giberelinas por lo que vamos a verlas un poco más en profundidad.

Auxinas: estas hormonas favorecen el desarrollo de las raíces laterales de la planta, lo que permite una mejora en la captación de los nutrientes del suelo (Luo et al., 2018). El ácido indol acético (AIA) es la auxina más estudiada. Su síntesis en las rizobacterias se realiza por diversas vías metabólicas en función de la bacteria implicada y se produce a partir del triptófano (Camelo et al., 2011), que está presente en los exudados de las raíces. Entre las principales rutas de biosíntesis están la del ácido indol-3-piruvico (IPA), la indol 3-acetonitrilo (IAN), la triptamina (TAM) y la del indol-3-acetamida (IAM) (Molina-romero et al.,2015).

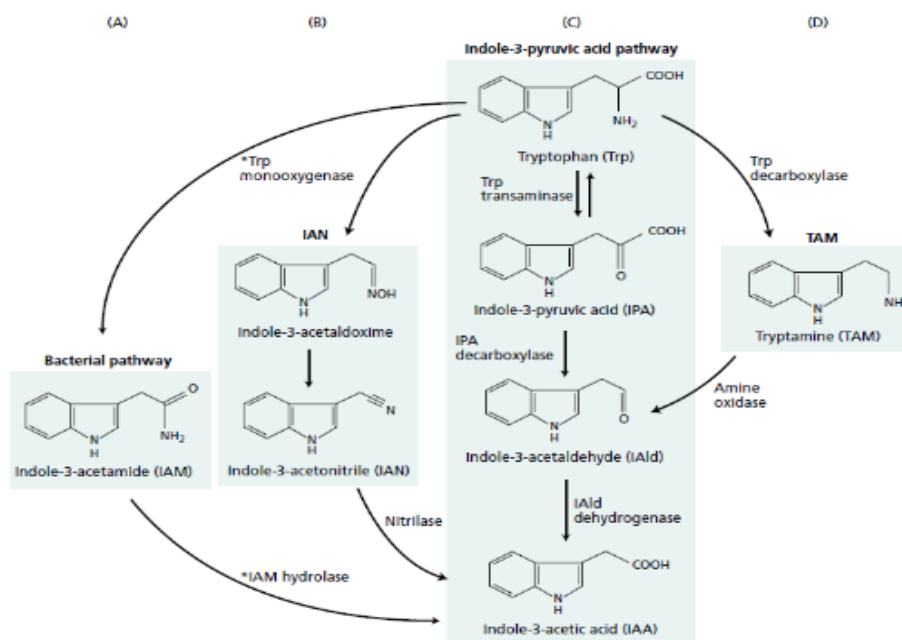


Figura 5. Rutas de síntesis de AIA en bacterias y plantas (Rodríguez, 2013).

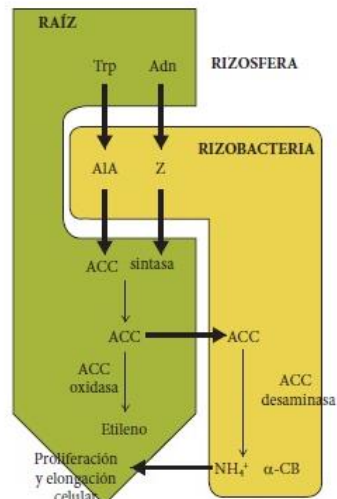
Giberelinas: son un grupo de moléculas complejas con grupos di-terpenos tetracarboxílicos (Molina-romero et al., 2015). Hay varios tipos diferentes, pero solo 4 de ellos pueden ser sintetizados por las PGPM (GA1, GA2, GA3 Y GA20). Estas hormonas son transportadas desde las raíces a las partes aéreas de la planta, donde los efectos que ejercen son notables y más aún cuando las bacterias tienen también la capacidad de producir auxinas, que estimulan el crecimiento radicular mejorando el suministro de nutrientes y facilitando el crecimiento en la parte aérea (Ramos et al., 2018) influyendo en procesos como la germinación, la floración y el desarrollo de los frutos (Alori y Babalola, 2018).

## **2.5. Actividad ACC desaminasa.**

Determinados microorganismos pueden producir el enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) desaminasa, que actúa sobre el ACC, precursor inmediato del etileno, y lo transforma en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio (Alori y Babalola, 2018).

El etileno, una de las hormonas vegetales mencionadas anteriormente, está muy relacionado con la senescencia de la planta y en situaciones de estrés, juega un papel fundamental para la supervivencia de esta, ya que se encarga de activar los mecanismos de señalización o actúa siendo el efector final de la respuesta (Alcántara et al., 2019). Sin embargo, esto puede ser contraproducente ya que cantidades muy elevadas de etileno provocan la supresión de la elongación de las raíces inhibiendo el desarrollo de la planta (Cetin et al., 2011).

Cuando se produce una situación de estrés, el etileno producido por la planta regula su homeostasis lo que da lugar a una reducción en el crecimiento de los brotes y las raíces de la planta. Los microorganismos son capaces de producir la ACC desaminasa, que degrada la ACC para suministrar nitrógeno y energía. Además, al degradarse la ACC, se produce menos cantidad de etileno, lo que alivia el estrés de la planta y promueve su crecimiento (Vurukonda et al., 2016) (Figura 6).



**Figura 6.** Modelo del mecanismo de la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante el cual las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal disminuyen los niveles de etileno en plantas (Esquivel-Cote et al., 2013).

### 3. PROBIÓTICOS BIOPESTICIDAS.

El uso de biopesticidas como alternativa a los pesticidas químicos es algo cada vez más extendido para el control de plagas y enfermedades en los cultivos, debido a los efectos negativos que estos tienen sobre los seres humanos y el medio ambiente (Fernández y Juncosa, 2002). Los mecanismos por los cuales actúan estos biopesticidas se basan en la producción y secreción de distintas sustancias, como enzimas hidrolíticas o metabolitos secundarios tóxicos (Alori y Babalola, 2018).

#### 3.1. Producción de enzimas hidrolíticas.

Algunos probióticos son capaces de hacer frente a determinadas infecciones fúngicas gracias a que son capaces de producir y secretar enzimas hidrolíticas como las quitinasas, proteasas, lipasas y 1,3-glucanasas. Estas, conjuntamente, pueden atacar la pared celular de los hongos patogénicos y alterar la permeabilidad de su membrana (Alori y Babalola, 2018; Menéndez y Paço, 2020).

Es cierto que hay que tener en cuenta que, estas enzimas se secretan al medio en bajas cantidades, y, además, son susceptibles a la desnaturalización y a la degradación por procesos químicos, físicos y biológicos (Menéndez y Paço, 2020).

Las enzimas hidrolíticas pueden ser secretadas por microorganismos como los hongos *Trichoderma* spp. (Alori y Babalola, 2018).

### **3.2. Producción de HCN.**

El cianuro de hidrógeno (HCN), es un metabolito secundario producido por algunas rizobacterias, que evita el crecimiento de las malas hierbas y además tiene poder antifúngico. Este tiene la capacidad de inhibir metaloproteínas esenciales para la vida de estos organismos, como por ejemplo la enzima citocromo C oxidasa, que forma parte de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria (Alori y Babalola, 2018).

### **3.3. Producción de antibióticos, antifúngicos y otros tóxicos.**

La producción de antibióticos, antifúngicos y otros metabolitos tóxicos es el mecanismo más conocido e importante utilizado por los probióticos para limitar la invasión de patógenos en las plantas. (Moreno et al., 2018).

Existe una gran cantidad de microorganismos capaces de producir estos metabolitos, como por ejemplo las bacterias del género *Pseudomonas*, capaces de producir ácido pseudomónico (inhibe la síntesis de proteínas bacterianas), ácido fenazina-1-carboxílico (es antifúngico, aumenta el nivel de especies reactivas de oxígeno), 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG, activo frente a un gran número de organismos, como los nematodos, a los que afecta en la eclosión de los huevos) y muchos otros más metabolitos como la karacilina, la zwittermicina, etc. Las bacterias del género *Bacillus* también pueden producir antibióticos, tales como la subtilina (actúa sobre la pared de los hongos), la bacilisina (inhibe la síntesis de peptidoglucanos en bacterias), la clorotetaina, la iturina, etc. Por último, algunos hongos también pueden producir estos metabolitos, como por ejemplo *Trichoderma harzianum*, que produce metabolitos volátiles que impiden la podredumbre de la raíz provocada por hongos patógenos, o algunos hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que son efectivos frente al hongo patógeno *Phytophthora infestans* (Alori y Babalola, 2018).

Muchos de estos fitopatógenos pueden desarrollar resistencia a algunas de estas sustancias, por lo que es muy interesante que los microorganismos que actúan como biopesticidas tengan la capacidad de sintetizar distintas sustancias tóxicas. Además, es importante también realizar ensayos previos, ya que se ha demostrado que algunos probióticos pueden ser muy efectivos frente algunos fitopatógenos, pero no frente a otros (Alori y babalola, 2018).

#### **4. PROBIÓTICOS BIOCONTROLADORES.**

Los probióticos biocontroladores son difíciles de definir, ya que comparten propiedades biofertilizantes y biopesticidas. La literatura los define como microorganismos que protegen a la planta de forma inespecífica de los efectos deletéreos de los patógenos y de los estreses abióticos, permitiendo su crecimiento de forma indirecta (Menéndez y Paço, 2020).

Los microorganismos pueden ejercer su función de biocontrol mediante mecanismos como la competición o la resistencia sistémica inducida.

##### **4.1. Competición.**

Algunos microorganismos como la bacteria *Pseudomonas fluorescens* pueden limitar la proliferación de fitopatógenos en la rizosfera mediante la competición por los nutrientes. En este caso, en *P. fluorescens*, esto se debe a su propia motilidad, que está determinada por varios genes, y la generación de mutantes hipermoviles hace que la bacteria sea más competitiva, incrementando su habilidad de colonizar la rizosfera sin causar daños a la planta (Barahona et al., 2011).

El lugar específico de colonización en la raíz también es muy relevante en el biocontrol de fitopatógenos, ya que si el probiótico ocupa el mismo lugar en la raíz que el fitopatógeno la efectividad de la competición será mayor. *Collimonas fungivorans* es un ejemplo de bacteria que controla el crecimiento de determinados hongos patógenos de esta manera (Kamilova et al., 2007).

Sin embargo, la competición por sí sola no es suficiente para controlar la proliferación

de patógenos, sino que se requieren otras propiedades biopesticidas (Alori y Babalola, 2018).

#### **4.2. Resistencia sistémica inducida.**

Algunos microorganismos son capaces desencadenar el desarrollo de mecanismos no específicos de resistencia a patógenos en las plantas. Esto se conoce como Resistencia Sistémica Inducida (ISR) e implica la activación por parte de los probióticos de mecanismos de resistencia a fitopatógenos e insectos dependientes de hormonas vegetales, concretamente de jasmonatos y etileno (Alori y Babalola, 2018).

### **5. EJEMPLOS DE PRINCIPALES PROBIÓTICOS**

#### **5.1. Biofertilizantes fijadores de Nitrógeno**

Como se ha visto anteriormente, los cultivos demandan altas cantidades de nitrógeno para su crecimiento y desarrollo, lo que ha hecho necesario el uso de fertilizantes minerales para mantener el rendimiento. En consecuencia, se han generado graves problemas ambientales, como son el deterioro de los suelos y la eutrofización. Una solución al problema que supone el uso intensivo de abonos sintéticos reside en los organismos fijadores de nitrógeno atmosférico,  $N_2$ , que pueden transformar el nitrógeno molecular en formas de nitrógeno asimilables por la planta (Singh *et al.*, 2016).

Las bacterias fijadoras de  $N_2$  pueden estar presentes como organismos de vida libre en la rizosfera o estableciendo simbiosis con la planta. Entre las bacterias simbióticas fijadoras de  $N_2$  más estudiadas, se encuentran *Rhizobium* sp. o *Azospirillum* sp., que han demostrado incrementar el crecimiento vegetal y el rendimiento de determinados cultivos del orden *Fabales*, como por ejemplo *Vicia sativa*, *Vigna radiate*, *Vigna mungo* o *Pisum sativum*, entre otros (Igiehon y Babalola, 2018).

El uso de las bacterias fijadoras de  $N_2$  en la agricultura, tanto simbióticas como de vida libre, es común hoy en día dado que existen biofertilizantes comerciales que contienen algunas de las bacterias que se han mencionado, como por ejemplo Vitasoil®



(Symborg, contiene *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp.).

### ***Rhizobium* sp.**

Se trata de un habitante común en los suelos agrícolas, pero frecuentemente su población es insuficiente para alcanzar una relación benéfica con la planta o no son capaces de fijar cantidades suficientes de N<sub>2</sub>, por lo que es necesario inocularla la semilla para asegurar la FBN (Lázaro et al., 2017).

### ***Azotobacter* sp.**

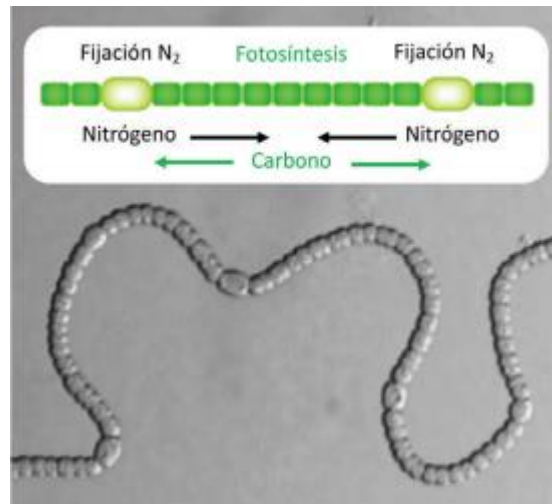
Los microorganismos pertenecientes a este género son bacterias asociativas de vida libre. Estos, además de ser capaces de producir la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, pueden secretar fitohormonas y vitaminas (Rodríguez et al., 2016), solubilizar fosfato y movilizar hierro.

Las bacterias del género *Azotobacter* no solo se limitan a favorecer el crecimiento vegetal, sino que también actúan como agentes biocontroladores y biopesticidas, ya que excretan metabolitos antifungicidas y tienen actividad ACC desaminasa, además de producir enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la catalasa. Estas bacterias han resultado ser beneficiosas para una gran variedad de cultivos de importancia económica a nivel mundial, como por ejemplo el tomate (*Solanum lycopersicum*), el trigo (*Triticum aestivum*) y el sorgo (*Sorghum bicolor*) (Woo and Pepe, 2018).

### **Cianobacterias**

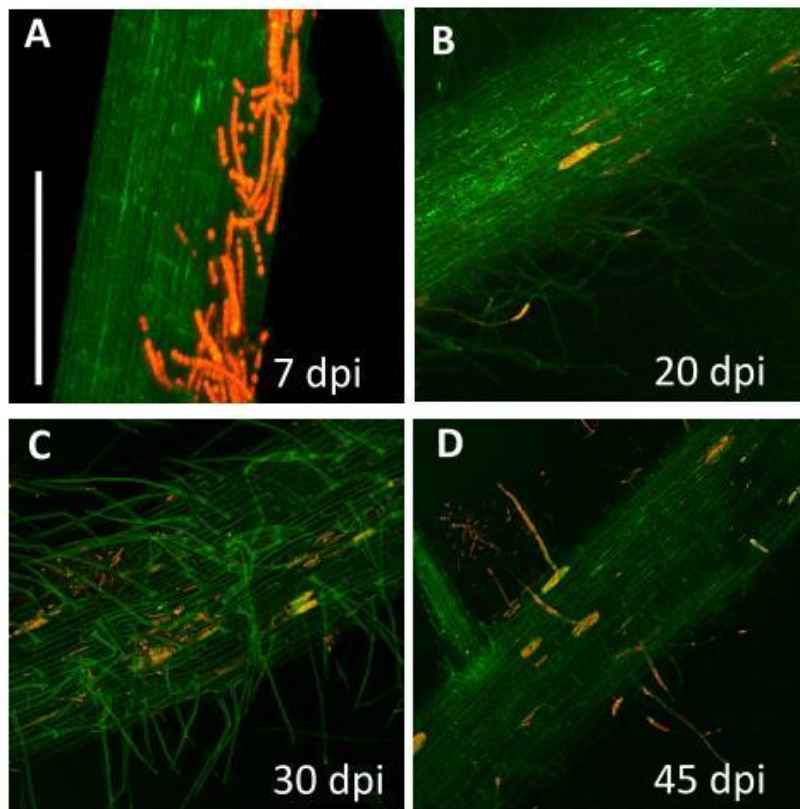
Además de las bacterias que se acaban de nombrar, existe un grupo de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> con un alto potencial biotecnológico, sobre las que cada vez se hacen más estudios: las cianobacterias. Las cianobacterias son bacterias Gram-negativas muy ubicuas que tienen un gran impacto en los contenidos de carbono y nitrógeno en el suelo como consecuencia de su capacidad de fijar CO<sub>2</sub> mediante el proceso fotosintético, así como de fijar N<sub>2</sub>. Como el complejo de la nitrogenasa, encargado de

la fijación de  $N_2$ , se inhibe en presencia de oxígeno, en una gran proporción de cianobacterias dicho proceso ocurre en células diferenciadas, los heterocistos, que se asocian con células vegetativas a las que aportan el nitrógeno asimilado. Por su parte, las células vegetativas proporcionan a los heterocistos los productos de la fotosíntesis, ya que los heterocistos no pueden llevarla a cabo porque se produce oxígeno (Figura 7) (Singh *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2020).

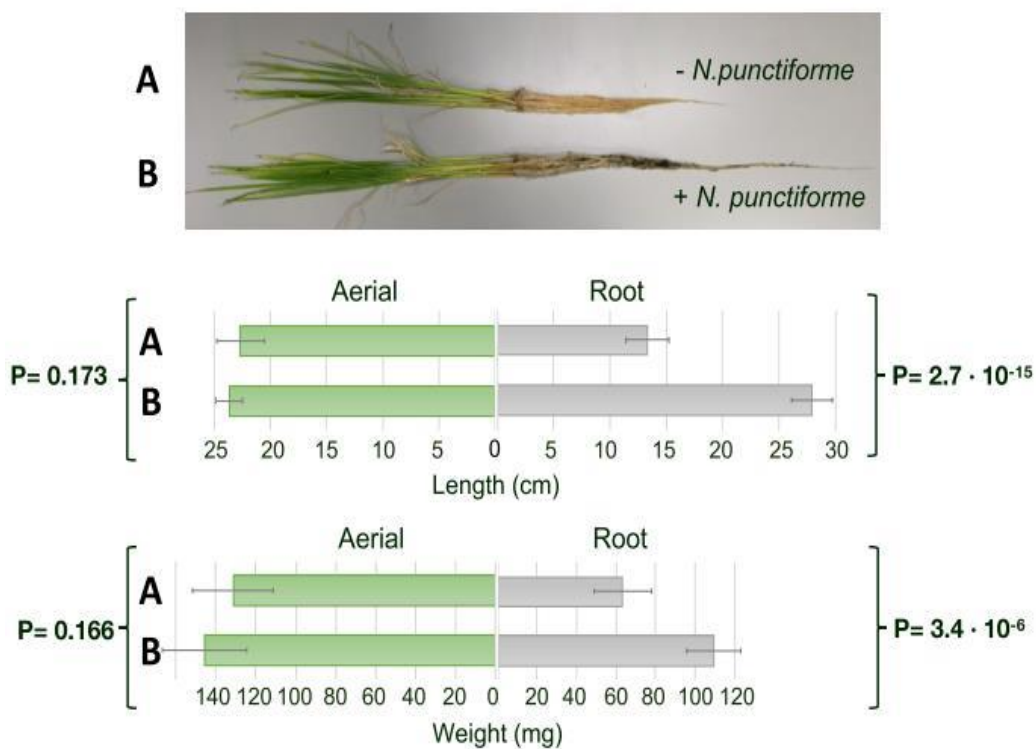


**Figura 7.** Cianobacteria filamentosas formadoras de heterocistos y relaciones funcionales entre heterocistos y células vegetativas (Muro, 2019).

Se ha visto también que muchos de estos microorganismos, además de fijar  $N_2$ , producen vitaminas y fitohormonas, incrementando la biodisponibilidad de compuestos nitrogenados que pueden ser absorbidos por las raíces (Singh *et al.*, 2016). En una reciente investigación, se estudió el efecto de la inoculación de la cianobacteria simbiótica *Nostoc punctiforme* en arroz (*Oryza sativa* L.). En este estudio se evidenció la capacidad de *Nostoc punctiforme* de establecer una simbiosis endófitas a largo plazo con la planta de arroz (Figura 8). Al evaluar el crecimiento de las plantas en presencia de *Nostoc*, se observó que la longitud y el peso fresco de las raíces aumentó significativamente con respecto al control, sin inóculo (Figura 9). En los tejidos de raíz colonizados por la cianobacteria, se detectaron heterocistos maduros y funcionalmente activos en ausencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo, lo que indica que el uso de estos microorganismos como biofertilizantes, en un futuro, es muy prometedor (Álvarez *et al.*, 2020).



**Figura 8.** Colonización de las raíces de arroz (*Oryza sativa* L.) por la cianobacteria *Nostoc punctiforme*. dpi: días post- inoculación (Álvarez *et al.*, 2020).



**Figura 9.** Efecto de la inoculación de *Nostoc punctiforme* en las plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) (Álvarez *et al.*, 2020).

## 5.2. Otros microorganismos

### ***Azospirillum sp.***

Es el género de PGPM más ampliamente estudiado. Ha sido objeto de estudio desde la década del setenta y su inoculación en plantas favorece un aumento significativo del sistema radical, induce resistencia a agentes patógenos, provee elementos como el nitrógeno, inhibe la proliferación de plantas parásitas y produce hormonas que estimulan el crecimiento vegetal. Han sido aisladas de la filosfera (superficie de la planta que se encuentra expuesta al aire), de las raíces de pastos, de cereales y de diversas familias y suelos (tropicales, subtropicales, templados y árticos). Además, es capaz de adaptarse a los cambios en la disponibilidad de nutrientes e interacciona con los microorganismos nativos que compiten por estos nutrientes. La presencia de varias vías metabólicas alternativas permite a *Azospirillum* consumir una amplia variedad de ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos que se encuentren en el medio donde se desarrolle (Hernández et al., 2015).

### ***Pseudomonas sp.***

Las bacterias que pertenecen a este género están muy extendidas en los suelos agrícolas y son capaces de mejorar el rendimiento de los cultivos por mecanismos directos e indirectos. Son capaces de solubilizar el fósforo de suelo y aumentar su disponibilidad para las plantas. Algunas cepas son capaces de producir sideróforos que aumentan la solubilidad del hierro en la rizosfera y en otras se ha visto que tienen una alta capacidad de producir ácido indol acético (Sivasakthi et al., 2014). Son muchas las especies de *Pseudomonas* en las que se han descubierto estas propiedades, tales como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. monteilii*, *P. rhodesiae*, *P. chlororaphis* y *P. taiwanensis*, entre muchas otras (Panpatte et al., 2016; Jishma et al., 2017).

Las bacterias *Pseudomonas sp.* están adaptadas a vivir en la rizosfera de las plantas y son probióticos muy relevantes debido a que crecen rápido, por lo que se puede producir grandes cantidades de biomasa en poco tiempo; se adaptan a los estreses ambientales fácilmente, compiten con microorganismos patógenos y producen muchos metabolitos activos que permiten el control de enfermedades y el crecimiento

de la planta durante distintas etapas de su desarrollo, tales como antibióticos, sideróforos, fitohormonas y compuestos volátiles (Panichiketal et al., 2019).

La recopilación de información y la puesta a punto de estas bacterias está permitiendo la generación de formulados comerciales que contienen *Pseudomonas*, los cuales se venden como biofertilizantes y biocontroladores, como por ejemplo Phosbac PS® (Kimatec Agro).

El hecho de que las propiedades beneficiosas de las bacterias *Pseudomonas* spp. estén bien definidas ha permitido ir un paso más allá, aplicando los amplios conocimientos que se tienen de las *Pseudomonas* a la nanotecnología (Panichiketal et al., 2019).

### ***Bacillus* sp.**

El género *Bacillus* destaca por su gran diversidad, las bacterias de este género han mostrado ser de los probióticos más relevantes que se pueden usar para optimizar el rendimiento de los cultivos por su resistencia ante condiciones ambientales adversas y por la producción de una amplia gama de compuestos con actividad fungicida o fungistática (Rodríguez et al., 2016).

Estas bacterias Gram positivas proporcionan nutrientes minerales a las raíces de las plantas a las que están asociadas, principalmente mediante la solubilización del fósforo y la producción de amonio a partir de la digestión de aminoácidos. Sin embargo, en los últimos años se ha destacado el papel que desempeñan estas bacterias frente a situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico (Porto de Souza et al., 2017; Alori y Babalola, 2018).

El papel de las bacterias *Bacillus* en la protección de la planta frente a patógenos se debe principalmente a la secreción de metabolitos, especialmente la iturina, la surfactina o la fengicina, todos ellos lipopéptidos. Estos lipopéptidos están implicados en la formación de biofilm y en la quimiotaxis de la bacteria hacia las zonas más ricas en nutrientes, lo que afecta indirectamente al desarrollo del patógeno por competencia (Alori y Babalola, 2018; Köhl et al., 2019). Algunas bacterias *Bacillus* también son capaces de secretar compuestos volátiles que impiden la infección de la

planta por parte de patógenos, así como la producción de toxinas, como en el caso de *Bacillus thuringiensis*, uno de los primeros probióticos usados (Timmusk et al., 2017; Alori y Babalola, 2018).

En cuanto a las propiedades que pueden aportar las bacterias *Bacillus* en la protección de las plantas frente a estrés abiótico, es necesario establecer que estas bacterias son muy interesantes en este ámbito porque pueden formar esporas que resisten condiciones medioambientales extremas, como el calor, la sequía, la inundación o valores de pH muy altos o muy bajos. Estas esporas pueden permanecer estables durante más de dos años. Además, su aplicación como inóculos es bastante sencilla y pueden resistir a los fertilizantes y pesticidas empleados regularmente en los cultivos (Akhtar et al., 2020). Cabe recordar que se han encontrado las bacterias de este género en muestras de ambientes desérticos, de ahí el posible papel de estas bacterias de hacer que las plantas sobrevivan frente a distintos tipos de estrés abiótico (Fuentes et al., 2020).

Según la literatura, la resistencia a sequía inducida por este tipo de bacterias se atribuye a distintos mecanismos, tales como la producción y secreción de exopolisacáridos (EPS), que retienen y participan en la formación de biofilm bacteriano, que, a su vez, interviene en la prevención de la desecación de la raíz; la producción de hormonas vegetales como citoquininas o auxinas y la actividad de la ACC deaminasa, que evita la producción de etileno mediante la metabolización de su precursor ACC. Además, en este estudio se destaca el papel de *Bacillus* en la inducción de la actividad catalasa, que es una enzima antioxidante, por lo que esta inducción podría suponer otro mecanismo de prevención de la muerte de la planta ante situaciones de estrés hídrico mediante el control de las especies reactivas del oxígeno. Si bien, se piensa que lo que verdaderamente hace que las plantas inoculadas con estas bacterias sobrevivan en situación de sequía es una combinación de todos los mecanismos mencionados (Akhtar et al., 2020).

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS Y LIMITACIONES DEL USO DE PROBIÓTICOS EN LA AGRICULTURA.

Recientemente se han desarrollado técnicas moleculares de alta eficiencia, como el sistema CRISPR-Cas9, que ha permitido generar mutantes de los microorganismos que han demostrado ser beneficiosos para cultivos con el fin de determinar el mecanismo que les aporta ese potencial. Además, el uso de estas técnicas ha derivado hacia la obtención de microorganismos probióticos de plantas modificados genéticamente, con intención de incrementar los beneficios que aportan o incluso para incorporar nuevas propiedades que no poseían previamente. Este campo es muy prometedor y está en pleno desarrollo (Lebeer et al., 2018).

También se está investigando la aplicación de la nanotecnología en combinación con los probióticos para potenciar al máximo sus beneficios. Las nanopartículas por sí solas pueden tener un efecto positivo o negativo en los cultivos, pero aún no se ha determinado la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas y el impacto en el desarrollo de una planta específica. Algunas de las nanopartículas que han tenido éxito en la agricultura son las nanopartículas de oro (AuNPs) en los cultivos de pepino (*Cucumis sativus*) y lechuga (*Lactuca sativa*), en los que se observó un mayor índice de germinación, las nanopartículas de aluminio (AlNPs) en los cultivos de rábano (*Raphanus sativus*), en los que mejoró el desarrollo radicular o las nanopartículas de óxido de cesio, CeO<sub>2</sub>, en cultivos de maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*) y alfalfa (*Medicago sativa*), en los que se mejoró el desarrollo de la parte aérea (Mishra et al., 2014). Entre las distintas nanopartículas, destacan las nanopartículas de oro, AuNPs, que, en combinación con *Pseudomonas monteilii* ha mostrado un efecto muy positivo en el crecimiento de algunas plantas, como *Vigna unguiculata*, incluso más que el inóculo de la planta únicamente con la bacteria. Si bien, es evidente que este campo de investigación está aún en etapas muy tempranas y que se requieren más estudios que integren la nanotecnología con la biotecnología medioambiental para obtener un rendimiento alto, tanto de los probióticos como de los cultivos (Panichikkal et al., 2019).

A pesar de los avances que se han obtenido en la investigación y desarrollo de los

microorganismos como probióticos para el desarrollo de una agricultura sostenible en los últimos años, existen limitaciones que aún no se han resuelto. La investigación sobre los beneficios que pueden aportar bacterias y hongos a los cultivos incrementa cada vez más año a año, pero desgraciadamente nunca es suficiente, ya que las relaciones planta-microbio son muy selectivas. Además, la extrapolación de los estudios de laboratorio al campo es relativamente escasos. Por otro lado, una de las limitaciones más importantes es que, en líneas generales, los probióticos no se producen a gran escala como lo hacen los pesticidas sintéticos o los fertilizantes minerales, por lo que para que la funcionalidad de los microorganismos sea la óptima en los cultivos, se debe poner esfuerzo en generar inóculos, ya sea en forma líquida o sólida, en grandes cantidades de manera económica y eficiente. También hay que tener en cuenta que el inóculo debe mantener su viabilidad desde que se produce hasta que se aplica al cultivo. Por ello, lo ideal es desarrollar probióticos que se puedan conservar a temperatura ambiente, lo que disminuiría los costes asociados. A esto, se suma que el uso de probióticos puede llegar a generar un impacto medioambiental severo. Por ejemplo, un microorganismo autóctono no patógeno se puede ver afectado por los metabolitos que secretan los probióticos para combatir microbios patógenos, o bien se puede producir el desplazamiento de algunas especies de microorganismos indígenas, lo que es bastante propenso a ocurrir con el uso de microorganismos modificados genéticamente. Como consecuencia final, el equilibrio del ecosistema se vería alterado (Alori y Babalola, 2018).

El acuerdo entre científicos, políticos y agricultores es necesario para la superación de estas limitaciones y el avance en el desarrollo de los probióticos para cumplir sus principales objetivos: satisfacer las necesidades alimentarias, tanto en países pobres como en países desarrollados en los que la población está en aumento; limitar los usos de fertilizantes minerales y pesticidas y solucionar los problemas ocasionados en el medioambiente con anterioridad. En definitiva, el uso de probióticos para el desarrollo de una agricultura sostenible es una estrategia que merece la pena explorar, ya que aporta beneficios a toda la humanidad, así como al planeta que habitamos (Menéndez y García-Fraile, 2017).



## CONCLUSIONES

El uso de probióticos en la agricultura es de una gran actualidad e importancia. Suponen una mejora agrícola tanto a nivel de absorción de nutrientes y de la estructura del suelo como de resistencia a estrés biótico y abiótico.

El uso de microorganismos probióticos de plantas que sustituyan, en la medida de lo posible, el uso de pesticidas y fertilizantes minerales es una estrategia prometedora para alcanzar una agricultura sostenible.

Los probióticos pueden actuar de formas muy variadas y sobre organismos diferentes, por lo que la investigación en este ámbito es fundamental. Los probióticos pueden actuar como agentes biofertilizantes, biocontroladores y/o biopesticidas, dando lugar, en todos los casos, al desarrollo vegetal y, en ocasiones, a la restauración del medioambiente.

Por último, incidir en una necesidad de una mayor investigación a un mayor estudio de las posibles relaciones entre la microbiota indígena y la cepa inoculada, búsqueda de nuevos probióticos, mediante técnicas moleculares y la investigación en tecnologías de formulación y producción industrial van a permitir el uso masivo de estas tecnologías.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz R. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev Fitotec Mex.* 2012; 35(1): 9-21.
- Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J King Saud Univ Sci.* 2014; 26: 1-20.
- Akhtar SS, Amby DB, Hegelund JN, Fimognari L, Grobkinsky DK, Westergaard JC et al. *Bacillus licheniformis* FMCH001 Increases Water Use Efficiency via Growth Stimulation in Both Normal and Drought Conditions. *Front Plant Sci.* 2020; 11(Apr): 1-12.

- Alcántara JS, Acero J, Alcántara JD, Sánchez RM. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*. 2019; 17(32): 109-129.
- Alori ET, Babalola OO. Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa. *Front Microbiol*. 2018; 9(sep): 1-12.
- Alori ET, Dare MO, Babalola OO. Microbial inoculants for soil quality and plant health. *Sust Agric Rev*. 2017; 281-307.
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agricultura. *Front Microbiol*. 2017; 8(jun): 1-8.
- Álvarez C, Navarro JA, Molina-Heredia FP, Mariscal V. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the symbiotic strain *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *Mol Plant Microbe In*. 2020.
- Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Zea-Bonilla T, Perez-Jimenez RM, Martín M et al. *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(15): 5412-5419.
- Bashan Y, De-Bashan LE, Prabhu SR, Hernández JP. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*. 2014; 378: 1-33.
- Calvo P, Nelson L, Kloepper JW. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*. 2014; 383: 3-41.
- Camelo R, Vera SP, Bonilla RR. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Cienc Tecnol Agropecuaria*. 2011; 12(2): 159-166.
- Carvajal JS, Mera AC. Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + limpia*. 2010; 5(2): 77-96.
- Cetin CS, Karaca A, Kizilkaya R, Turgay OC. Role of plant growth promoting bacteria and fungi in heavy metal detoxification. En: Sheramati I, Varma A (eds.). *Detoxification of heavy metals*. Berlin: Springer; 2011. p. 366-388.
- Contreras RA, Gómez BA, Veloz RA. Efecto de las bacterias de suelo de bosque benéficas para plantas. *Jóvenes en la ciencia*. 2017; 3(2): 943-947.

- Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R, Huante P. Agrobiotechnological importance of the ACC deaminase in rhizobacteria, a review. *Rev Fitotec Mex.* 2013; 36(3): 251-258.
- European Biostimulants Industry Council. Biostimulants Definition Agreed [en línea]. [Consultado en Abril 2020]. Disponible en: <http://www.biostimulants.eu/2011/10/biostimulants-definition-agreed/>
- Fernández C y Juncosa R. Biopesticidas ¿la agricultura del futuro? *Phytoma.* 2002; 141: 14-19.
- Fuentes A, Herrera H, Charles TC, Arriagada C. Fungal and bacterial microbiome associated with the rhizosphere of native plants from the atacama desert. *Microorganisms.* 2020; 8(2): 1-14.
- Grageda-Cabrera OA, Diaz-Franco A, Peña-Cabriaes JJ, Vera-Nuñez JA. Impacto de los fertilizantes en la agricultura. *Rev Mex Cienc Agríc.* 2012; 3(6): 1261-1274.
- Hartmann A, Schmid M, Van Tuinen D, Berg G. Plant-driven selection of microbes. *Plant soil.* 2009; 321(1-2): 235-257.
- Hernández M, Terry C, Almogoea M. Uso de *Azospirillum* en la agricultura. *Agroecosistemas.* 2015; 3(1): 401-413.
- Hernández-Leal TI, Carrión G, Heredia G. Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia.* 2011; 45: 881-892.
- Igiehon NO, Babalola OO. Rhizosphere microbiome modulators: Contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *Int J Environ Res Public Health.* 2018; 15(4).
- Jishma P, Hussain N, Chellappan R, Rajendran R, Mathew J, Radhakrishnan EK. Strain-specific variation in plant growth promoting volatile organic compounds production by five different *Pseudomonas* spp. as confirmed by response of *Vigna radiata* seedlings. *J Appl Microbiol.* 2017; 123(1): 204-216.
- Kamilova F, Leveau JHJ, Lugtenberg B. *Collimonas* fungivorans, an unpredicted in vitro but efficient in vivo biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environ Microbiol.* 2007; 9(6): 1597-1603.

- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Front Plant Sci.* 2019; 10(july): 1-19.
- Lázaro Y, Santana Y, Miranda E. Efecto de la inoculación de *Rhizobium* sobre el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* (frijol) en condiciones semicontroladas. *Avances.* 2017; 19(1): 66-74.
- Lebeer S, Bron PA, Marco ML, Van pijkeren JP, O'Connell M, Hill C et al. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr Opin Biotechnol.* 2018; 49: 217-223.
- Lichtfouse E. Sustainable agriculture reviews. Vol 12. Springer; 2013.
- López JP, Boronat R. Aspectos básicos de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias. Estudio en el laboratorio de educación secundaria. *Rev Eureka Ensen Divulg Cienc.* 2016; 13(1): 203-209.
- Loredó-Osti C, López-Reyes L, Espinosa-Victoria D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra latinoamericana.* 2004; 22(2): 225-239.
- Luo J, Zhou JJ, Zhang JZ. Aux/IAA gene family in plants: Molecular structure, regulation and function. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(1): 1-17.
- Menéndez E, García-Fraile P. Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world. *AIMS Microbiol.* 2017; 3(3): 502-524.
- Menéndez E, Paço A. Is the application of plant probiotic bacterial consortia always beneficial for plants? Exploring synergies between rhizobial and non-rhizobial bacteria and their effects on agro-economically valuable crops. *Life.* 2020; 10(3): 1-18.
- Mishra j, Singh R, Kumar A. Plant Growth Promoting Microbes: Diverse Roles in Agriculture and Environmental Sustainability. En: Kumar V et al., editores. *Probiotics and Plant Health.* Singapore: Springer; 2017. p.71-111.
- Molina-Romero D, Bustillos-Cristales MR, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Santiago-Saenz Y, Castañeda-Lucio M et Al. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas.* 2015; 17(2): 24-34.

- Moreno A, García V, Reyes JL, Vázquez J, Cano P. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sostenible. *Rev Colomb Biotecnol.* 2018; 20(1): 68-83.
- Moreno-Velandia CA, Cotes AM, Beltrán-Acosta C, Bettiol W, Elad Y. Control biológico de fitopatógenos del suelo. *Agentes de control biológico.* V.1. p.144-220.
- Muro AM. RNAs reguladores de cianobacterias. *SEM@FORO.* 2019; 68(Dic): 27-28.
- Panichikkal J, Thomas R, John JC, Radhakrishnan EK. Biogenic Gold Nanoparticle Supplementation to Plant Beneficial *Pseudomonas monteilii* was Found to Enhance its Plant Probiotic Effect. *Curr Microbiol.* 2019; 76(4): 503-509.
- Panpatte DG, Jhala YK, Shelat HN, Vyas RV. Nanoparticles: The next generation technology for sustainable agriculture. En: Singh DP, editor. *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity.* India: Springer; 2016. p.289-300.
- Picard C, Baruffa E, Bosco M. Enrichment and diversity of plant-probiotic microorganisms in the rhizosphere of hybrid maize during four growth cycles. *Soil biol biochem.* 2008; 40(1): 106-115.
- Porto de Souza L, Blandon LM, Rodrigues C, Cândido M, Vinicius de Melo G, De Oliveira J et al. Potential applications of plant probiotic microorganisms in agricultura and forestry. *AIMS Microbiol.* 2017; 3(3): 629-648.
- Premachandra D, Hudek L, Brau L. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. *Biotechnol Biomater.* 2016; 6(3): 1-8.
- Puente M, García J, Rubio E, Peticari A. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. *Miscelánea.* 2011; 116: 89-92.
- Ramos E, Bonilla B, Aguilar M. Interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *CITECSA.* 2018; 10(15): 23-31.
- Restrepo-Correa SP, Pineda-Meneses EC, Rios-Osorio LA. Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria.* 2017; 18(2): 335-351.

- Rodríguez CA. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (*solanum lycopersicum*) variedad santa clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (*ricinus communis*). Rev Tec Agro. 2013; 24(II): 23-31.
- Rodríguez J, Ríos Y, Baró Y. Efectivity of strains Azotobacter sp. and Bacillus sp. for a control the fungi species associated with vegetable. Cultivos tropicales. 2016; 37: 13-19.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Kumar B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environ Sci Pollut Res. 2016; 23(5): 3984-3999.
- Singh JS, Chandra V, Singh DP. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. Agric Ecosyst Environ. 2011; 140: 339-353.
- Singh JS, Kumar A, Rai AN, Singh DP. Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. Front Microbiol. 2016; 7(apr): 1-19.
- Sivasakthi S, Usharani G, Saranraj P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) – *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. Afr J Agric Res. 2014; 9(16): 1265-1277.
- Timmusk S, Behers L, Muthoni J, Muraya A, Aronsson AC. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. Front Plant Sci. 2017; 8(Feb): 1-10.
- Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plants promoting rhizobacteria. Microbiol Res. 2016; 184: 13-24.
- Warshan D, Espinoza JL, Stuart RK, Richter RA, Kim SY, Shapiro N et al. Feathermoss and epiphytic Nostoc cooperate differently: Expanding the spectrum of plant-cyanobacteria symbiosis. ISME Journal. 2017; 11(12): 2821-2833.
- Woo SL, Pepe O. Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. Front Plant Sci. 2018; 9 (1801): 1-6.

- Yakhin OI, Lubyaynov AA, Yakhin IA, Brown PH. Biostimulants in plant science: A global perspective. *Front Plant Sci.* 2017; 26(Jan): 2049.