


Inoculante de segunda generación para incrementar el crecimiento y salud de plantas de jardín

Yolanda Elizabeth Morales-García^{1,2} , Dalia Juárez-Hernández², Ana Laura Hernández-Tenorio², Julieta Mariana Muñoz-Morales^{1,2} , Antonino Baez^{2*} , Jesús Muñoz-Rojas^{2**} .

¹ Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

² Grupo “Ecology and Survival of Microorganisms”, Laboratorio Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, BUAP.

Email autores corresponsales: *antonino.baez@correo.buap.mx; **joymerre@hotmail.com

Recibido: 10 noviembre 2020. **Aceptado:** 26 diciembre 2020

RESUMEN

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas han sido extensamente estudiadas y recientemente se han diseñado formulaciones multiespecies de segunda generación. Una de las formulaciones se denomina INOCREP y está compuesta por 6 especies bacterianas benéficas. INOCREP estimula el crecimiento de plantas mucho mejor que los mono-inoculantes y se ha explorado su función en diversas plantas de interés agrícola. Una formulación derivada de INOCREP que está diluida 10 veces respecto a la formulación original, se ha propuesto como una formulación para jardín; esta se ha explorado en diversas plantas bajo condición de maceta, permitiendo a las plantas un buen desarrollo. Existen tres formas para inocular las bacterias de la formulación multiespecies en jardines: a nivel de semilla, a nivel de plántula y a nivel de plantas desarrolladas. En este trabajo se muestra un panorama del estado del arte de la formulación INOCREP y su derivado de jardín.

Palabras clave: inoculantes bacterianos, INOCREP, inoculante multiespecies, fitoestimulación, jardines.

ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria have been extensively studied and the second generation of multispecies inoculants have recently been designed. INOCREP is a multispecies formulation

composed of six beneficial bacterial species. INOCREP stimulates plant growth much better than monoinoculants; its promoting traits have been studied in several plants of agricultural interest. A formulation derived from INOCREP that is diluted ten times respect to the original formulation has been proposed as a garden formulation. INOCREP-garden has been explored in various plants under pot conditions, enhancing plant development. There are three ways to inoculate the bacterial formulation in gardens: on the seeds, seedlings, and developed plants. This work provides an overview of the state of the art of the INOCREP formulation and its garden derivative.

Keywords: bacterial inoculants, INOCREP, multiespecies inoculant, phytostimulation, gardens.

INTRODUCCIÓN

La salud de las plantas depende, además de la nutrición, de una correcta interacción con las bacterias benéficas, esa interacción puede ocurrir a nivel de rizósfera, rizoplano, en la región epífita e incluso en la región endofítica [1–4]. Diversas bacterias han sido caracterizadas como benéficas para las plantas entre las que destacan bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* [5–7]. Algunas especies de los géneros mencionados, que han sido aisladas y ampliamente caracterizadas, se han usado para formular inoculantes que promueven el crecimiento de plantas [2,4]. La mayoría de las formulaciones son monoinoculantes (contienen un solo microorganismo) o Bi-inoculantes (2 microorganismos); estos últimos con el fin de aprovechar los mecanismos de acción de dos

microorganismos esperando su acción sinérgica [8–10]. Los mecanismos mediante los cuales las bacterias benéficas promueven el crecimiento de las plantas han sido mostrados en múltiples revisiones [1,2,4,11]. Estos incluyen a la producción de fitohormonas, la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de minerales esenciales como zinc y fósforo, la producción de ACC desaminasa, el antagonismo de patógenos, el desencadenamiento de una respuesta de defensa, entre otros (4). Con el fin de aprovechar estos mecanismos, se ha propuesto el desarrollo de inoculantes multiespecies que contengan bacterias compatibles y que puedan interactuar con las plantas para desencadenar una mayor estimulación del crecimiento [12,13].

Desarrollo de inoculantes multiespecies de segunda generación

Para acortar camino, las primeras formulaciones multiespecies de segunda generación se diseñaron con bacterias que ya se han estudiado en sus capacidades para promover el crecimiento de plantas, se conocen sus mecanismos moleculares para la fitoestimulación y son reconocidas como benéficas [13]. Sin embargo, con el tiempo se han ido incorporando bacterias promotoras del crecimiento de plantas que resultan interesantes por sus características de tolerancia a diferentes estreses y sus capacidades antagonistas de patógenos [14]. Para lograr el desarrollo de esta tecnología se tienen que realizar 8 estudios adicionales respecto a los monoinoculantes. Además la vida de anaquel de una formulación multiespecies debe ser estudiada y comparada con respecto a los monoinoculantes [15].

1) Las bacterias de las formulaciones multiespecies deben ser compatibles entre ellas (no antagonizarse). Para ello, se estudia su capacidad de antagonismo bajo diferentes condiciones y tipos de ensayo [12,16,17]. Por lo general los ensayos de antagonismo que se realizan son la prueba de inhibición simultánea y ensayos en agar en doble capa [18]. Se elaboran tablas donde se muestran los resultados de antagonismo y se seleccionan aquellas bacterias que no se antagonizaron en

las distintas condiciones exploradas [13,16].

2) Se desarrollan experimentos de tolerancia a diferentes formas de estrés, por ejemplo: desecación, salinidad, congelación, entre otros [19–21]. Se seleccionan, las más tolerantes a los diversos estreses. Una metodología que contribuye a la búsqueda exhaustiva de bacterias altamente tolerantes es la cuantificación por el método goteo por sellado en placa masivo (GSPM) [22]. Este método permite la cuantificación masiva de microorganismos, antes y después del estrés, en poco tiempo y es muy accesible para realizarse en laboratorios de bajos recursos. Un tema en particular que es de gran interés es la tolerancia a la desecación, debido a que las bacterias con esta capacidad son candidatas para ser utilizadas como inoculantes de plantas para la agricultura y/o la biorremediación de suelos contaminados en zonas áridas o semidesérticas [19,23].

3) Las bacterias seleccionadas en el paso 1 y 2, se usan para elaborar consorcios de bacterias que contengan miembros promotores del crecimiento de plantas, de mecanismos conocidos, no patógenas, compatibles y tolerantes a desecación. Una vez que se han logrado estas características en las formulaciones, no significa que serán exitosas para promover el crecimiento de plantas, por lo que se deberá explorar su capacidad de

interacción con la planta y de promover el crecimiento cuando están en consorcio. No obstante, primero se deben diseñar medios de selección, para entender que ocurre durante la cointeracción.

4) Se diseñan medios de selección para cada cepa del consorcio, por ejemplo, en un consorcio que contiene 6 bacterias compatibles, se requieren 6 medios de selección. Cada uno permite el crecimiento de una de las 6 especies bacterianas y discrimina el crecimiento de las otras 5 [12]. Este es uno de los pasos más críticos, porque se tienen que explorar las capacidades de las diferentes bacterias para poder conseguir las condiciones deseadas y frecuentemente hay bacterias que usan las mismas fuentes de carbono o toleran los mismos compuestos. Entre las condiciones que se exploran es el uso de fuentes de carbono, nitrógeno, capacidad de tolerar compuestos tóxicos, capacidad de resistencia a los antibióticos, tolerancia a metales pesados, entre otras características [13,16,17].

5) Se estudian metodologías para una identificación molecular rápida (ej. Restricción del gen 16S DNAr ó la amplificación de bandas específicas de genes de cada bacteria [13,16]. Esto es importante para realizar pruebas confirmatorias de que lo que capturan los medios de selección realmente corresponden a las especies bacterianas que deben ser

cuantificadas, especialmente cuando se hacen los estudios a nivel de interacción en plantas.

6) Se explora la capacidad de las bacterias del consorcio para interaccionar con plantas y se estudia la diferencia entre la cointeracción de consorcios versus cepas solas [12,13,16]. En particular, se estudia la capacidad de las cepas para adherirse a semillas o plántulas, así como la capacidad de las bacterias para colonizar la rizósfera o si fuera el caso el interior de los tejidos de las plantas. Estos estudios se realizan en plantas inoculadas con las bacterias solas y en consorcio.

7) Se explora la capacidad de promoción de crecimiento de las bacterias de los consorcios bajo condiciones de laboratorio e invernadero y se compara contra la inoculación de cepas individuales [13,16]. Esta es la prueba de fuego, pues no todos los inoculantes multiespecies son capaces de promover el crecimiento de las plantas, a pesar de que las cepas individuales si lo consiguen. Es posible que la expresión de genes cambie cuando las bacterias están en consorcio [24] y es un tema que deberá ser estudiado en un futuro cercano.

8) Se explora la capacidad de los consorcios para promover el crecimiento de plantas en diferentes escenarios reales [12]. Esta última fase, es la más difícil, en cuanto a presupuesto se refiere, debido a que se requiere una mayor cantidad de insumos y también se

requiere de agricultores dispuestos a explorar los nuevos productos para el desarrollo de sus cultivos. No obstante, esto ha sido superado por una tercia de formulaciones multiespecies [12,13,16,17], dos de las cuales incluso se han patentado (MX2013007978A y MX2015014278A) [12,17].

En resumen esas nuevas formulaciones multiespecies contienen bacterias compatibles entre ellas y con las plantas, son altamente tolerantes a condiciones adversas, poseen mecanismos diversos de promoción de crecimiento y se ha comprobado su capacidad para promover el crecimiento de las plantas bajo distintas condiciones [16,17,25]. A estas formulaciones se les ha designado el nombre de inoculantes bacterianos de segunda generación [6,13].

Los inoculantes de segunda generación surgen como una respuesta para incrementar de forma más contundente el rendimiento de los cultivos agrícolas [16,26]. Sin embargo, pueden ser excelentes para mitigar el cambio climático [27], debido a que evitan el uso excesivo de fertilizantes químicos [28]. El cambio climático se ha intensificado en los últimos días debido a las actividades humanas [29] y es urgente cambiar las prácticas agrícolas para evitar más daños al entorno. Los inoculantes microbianos de segunda generación promueven el crecimiento de las plantas de forma eco-

sustentable y no dañan al medio ambiente [13,24].

INOCREP un inoculante de segunda generación muy prometedor

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla es pionera en el desarrollo de inoculantes de segunda generación y las patentes MX2013007978A y MX2015014278A [12,17] son ejemplos de formulaciones multiespecies que pronto estarán disponibles para su uso en el mercado mexicano. Se ha realizado el escalamiento de uno de los inoculantes de segunda generación y se cuenta con el registro de la marca (INOCREP) [30,31]. Esta formulación está conformada por *Azospirillum brasilense* Sp7, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, *Paraburkholderia unamae* MTI-641 (anteriormente *Burkholderia unamae* MTI-641), *Sphingomonas* sp. OF-178, *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *Pseudomonas putida* KT2440. La cantidad total de bacterias que contiene la formulación está en el rango de 10^9 UFC/mL. Todas las cepas de la formulación INOCREP poseen características promotoras del crecimiento de plantas [13] y sus mecanismos de promoción de crecimiento vegetal han sido reportados (Tabla 1). Por ejemplo, *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI 5 promueven el crecimiento de plantas a

través de la producción de fitohormonas como el ácido indol acético [32,33], *P. unamae* MTI-641 produce ACC desaminasa [34,35] y 4 de las especies bacterianas están implicadas en la fijación biológica del nitrógeno (Tabla 1). Además, algunas de las bacterias también poseen otras características relevantes como por ejemplo la capacidad de llevar a cabo la bioremediación de compuestos xenobióticos, entre las que destacamos a *P. putida* KT24340,

Sphingomonas sp. OF-178 y *P. unamae* MTI-641 (Tabla 1). Todas tienen la capacidad de producir sustancias inhibitorias, por lo que tienen un potencial para llevar a cabo el biocontrol de fitopatógenos y algunas bacterias como *P. putida* KT2440 han sido reportadas con la capacidad de desencadenar la respuesta sistémica inducida en plantas; protegiéndolas del ataque de patógenos (Tabla 1).

Tabla 1. Características relevantes de las cepas que conforman la formulación INOCREP.

Cepa bacteriana	FBN	Producción de fitohormonas	Producción de sustancias inhibitorias	Inductor de respuesta sistémica en plantas	ACC desaminasa	Solubilización de fosfatos	Bioremediación
<i>A. brasilense</i> Sp7	+ [36]	+ [32]	+ [37,38]	+ [39]	ND	+ [16]	+ [40]
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	+ [41]	ND	ND	ND	ND	+ (resultados no publicados)	ND
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5	+ [33]	+ [33]	+ [42-44]	+ [45]	ND	+ [16]	- [46]
<i>P. unamae</i> MTI-641	+ [34]	ND	+ [34]	ND	+ [35]	+ [47]	+ [47]
<i>P. putida</i> KT2440	- [48]	+ [49,50]	+ [16,50]	+ [51,52]	- [50]	+ [16,50]	+ [53,54]
<i>Sphingomonas</i> sp. OF-178	ND	ND	+ [16]	ND	ND	+ [16]	+ [55]

FBN significa Fijación Biológica del Nitrógeno, ND significa no determinado.

Aunque la formulación INOCREP fue inicialmente diseñada para maíz [12], a nivel de laboratorio e invernadero se ha explorado en otro tipo de plantas, como el jitomate, el frijol, el crisantemo y la papa, todo ha quedado documentado en tesis de posgrado y licenciatura y aún no ha llegado a fase de publicación [15,56-59].

A nivel de campo, con el apoyo de un proyecto FINNOVA (CONACYT), se exploró la funcionalidad de esta formulación en diferentes tipos de cultivos de interés agrícola en distintas

regiones de la República Mexicana con resultados exitosos, entre los que podemos destacar al maíz, jitomate, el frijol, cebada, trigo y hiervas aromáticas (resultados en fase de análisis de datos). Cada vez son más los usuarios que exploran esta tecnología por sus características amigables con el medio ambiente y la potenciación del rendimiento de los cultivos, por lo que resulta una formulación muy prometedora para su uso a nivel de campo (Figura suplementaria 1).

La formulación INOCREP se ha explorado en

cultivos de maíz de diferentes variedades y regiones geográficas con resultados muy alentadores [13]. Por ejemplo, en el periodo de 2019, este producto se aplicó en maíz, en varias regiones del estado de Puebla, con el fin de evaluar los rendimientos tras el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Estos ensayos se realizaron con la ayuda del Comité Estatal de Sanidad del Estado de Puebla (CESAVEP), en conjunto con la Dirección de Innovación y Transferencia del Conocimiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (DITCo-BUAP). Se observaron resultados positivos en la mayoría de los campos inoculados con variación en los rendimientos posiblemente debido a las condiciones ambientales y de suelo propias de cada región (Figura suplementaria 2).

El tiempo de vida de anaquel de la formulación INOCREP ha sido estudiada y se sabe que la formulación líquida es estable hasta por dos años bajo temperaturas de refrigeración [15]. Sin embargo, se siguen estudiando las condiciones para obtener una formulación en polvo para que el transporte sea más factible [60].

Inoculantes de segunda generación en plantas que crecen en macetas

Recientemente se ha observado que los inoculantes de segunda generación también se

pueden utilizar para lograr una agricultura urbana exitosa especialmente en macetas. Se ha explorado su uso en techos de casas, jardines de tamaño diverso, patios o incluso en una oficina con el uso de focos led. Algunos ejemplos de plantas inoculadas con inoculantes de segunda generación bajo condiciones de maceta se muestran en la figura 1, sin embargo, otras plantas también han sido inoculadas con la formulación INOCREP, observando sus beneficios (figura suplementaria 3) [61].

En 2019 se impartieron en la región de San Andrés Cholula, Puebla, México y con apoyo de ese municipio, una serie de cursos para mostrar a la población interesada, a como incorporar las bacterias de la formulación multiespecies INOCREP en sus plantas (Figura 2). Para ello se desarrolló una formulación multiespecies especial para jardín, muy económica, que se caracterizó por estar en una dilución 1:10 respecto de la formulación INOCREP original. Los jardines urbanos no requieren una dosis tan concentrada como la que se requiere para ser usada en el campo, debido a que la extensión a inocular es mucho menor. Así, la formulación de jardín viene en una presentación líquida conteniendo 250 mL de una suspensión bacteriana (1×10^8 UFC/mL) (Figura 3). La formulación de jardín se puede resuspender hasta en 25 L de agua, esta nueva suspensión está lista para llevar a cabo la

inoculación.



Figura 1. Ejemplos de plantas inoculadas con la formulación INOCREP para jardín, creciendo en macetas. A) Frambuesa en maceta. B) Suculentas creciendo en condiciones de oficina alimentadas con agua, materia orgánica y un foco led. C) Árbol de pera coexistiendo con cilantro en maceta. D) Árbol de *Leucaena leucocephala* coexistiendo con plantas de mala madre (*Chlorophytum comosum*). E) Flor de muerto (*Cempazuchitl silvestre*).



Figura 2. Recorridos de los cursos que se dieron en el municipio de San Andrés, Cholula, Puebla.

Las plantas inoculadas con esta formulación pueden crecer en cualquier sitio de una casa, aprovechando los espacios mínimos que

podieran estar disponibles. La inoculación de las bacterias se puede realizar en varias formas y tres son las que destacan para el desarrollo de plantas de un hogar: inoculación de semillas, inoculación de plántulas e inoculación de plantas ya desarrolladas [62,63].



Figura 3. Formulación multiespecies para jardín.

Inoculación de semillas

Esta se realiza colocando las semillas requeridas en un contenedor pequeño (frasco o vaso). Se cubren con inoculante de jardín sin diluir y se dejan en inmersión durante una hora (Figura 4). Posteriormente las semillas se sacan y están listas para el sembrado. La suspensión sobrante puede usarse para seguir inoculando semillas o bien para adicionarlo a algunas plantas del jardín.



Figura 4. Inoculación de semillas de aguacate.

Inoculación de plántulas (germinados de distintas plantas)

En este caso se recomienda diluir la formulación en el volumen que se requiera para inocular el total de plántulas, el punto máximo de dilución es hasta 25 L. En caso de ser pocos germinados se recomienda usar la formulación de jardín sin dilución. Para esto se coloca un contenedor (ejemplo un vaso), se coloca un poco de inoculante de jardín y posteriormente se colocan las plántulas de tal forma que quedan sumergidas (especialmente la raíz) (Figura 5). Después de una hora, las plántulas se siembran en suelo o el soporte que se use para el

crecimiento de las plantas. Cabe mencionar que el manejo de las plántulas debe hacerse con cuidado para mantener su integridad.



Figura 5. Inoculación de plántulas de melón.

Inoculación de plantas en desarrollo y plantas adultas

Las plantas jóvenes o incluso adultas también se pueden inocular, para aprovechar dos características importantes de las bacterias presentes en los inoculantes de segunda generación: 1) la protección de las plantas ante un evento de estrés por desencadenamiento de una respuesta inducida por rizobacterias [51,64] y 2) el antagonismo de las bacterias benéficas contra patógenos [14,18]. En función de la cantidad de plantas, se diluye la formulación, recordar máximo en 25 L de agua, si se requiere mayor volumen, es mejor usar dos dosis de jardín. La suspensión obtenida se coloca en un atomizador y se asperja en toda la región aérea, para el caso de árboles es suficiente con atomizar la base del tronco (Figura 6).



Figura 6. Inoculación de un árbol de aguacate. Fotografía propia que fue solicitada por la gaceta de la BUAP [61].

Existen otras formas de inoculación, pero esas no serán abordadas en este escrito. En los distintos foros donde se realizó la impartición de cursos la gente fue muy participativa y el reto siguiente será llevar esta tecnología a las ciudades para el desarrollo de plantas en jardines urbanos e incluso en condiciones de oficina o casas que no tienen la fortuna de contar con luz solar; para este caso la experiencia nos muestra que los focos led son suficientes para mantener el crecimiento activo de una planta en condiciones de bajo consumo de energía.

Es importante destacar que después de la inoculación de semillas, el número de bacterias sobrante es variable dependiendo del tipo de semillas que fue inoculado y la suspensión final es una mezcla de bacterias de la formulación INOCREP con otras bacterias provenientes de la las semillas (observaciones no publicadas). Sin embargo, la suspensión sobrante puede ser usada para inocular a otras plantas, para

aprovechar la formulación en su totalidad y sin consecuencias adversas para las plantas que reciben el sobrante.

CONCLUSIÓN

Las formulaciones multiespecies de segunda generación promueven el crecimiento de plantas y aún existe poca difusión de estos productos. Sin embargo, representan una excelente alternativa para el desarrollo de plantas a nivel de macetas para jardines. Estas formulaciones pueden potenciar el desarrollo de las plantas en un estado saludable en espacios pequeños que puedan ser aprovechados. Existen tres formas principales para inocular las formulaciones multiespecies de segunda generación: inoculación en semillas, inoculación en plántulas e inoculación aérea en plantas ya desarrolladas. Estos productos ya se están comercializando en México para el desarrollo de plantas de jardín sanas, evitando el uso de productos tóxicos al ambiente. El reto actual será llevar este conocimiento a las ciudades para su aplicación en agricultura urbana y techos verdes, con el fin de contribuir a la reversión de daños en el ambiente.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todas las empresas, organizaciones y agricultores que han hecho uso de la tecnología INOCREP. También agradecemos a la VIEP-BUAP y a la Dirección de Internacionalización de la Investigación por el apoyo otorgado para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1]. Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Tejada Moral M, editor. Cogent Food Agric [Internet]. 2016 Dec 31;2(1):1127500. Available from: <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- [2]. Umair M, Muhammad I-H, Muhammad S, Adeela A, Farooq A, Sikandar H. A brief review on plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a key role in plant growth promotion. Plant Prot [Internet]. 2018;2(2):77–82. Available from: <https://esciencepress.net/journals/index.php/PP/article/view/76>
- [3]. Miliute I, Buzaitė O, Baniulis D, Stanys V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. Žemdirbystė (Agriculture). 2015;102(4):465–78.
- [4]. Molina-Romero D, Bustillos-Cristales M del R, 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.
- [5]. Michiels K, Vanderleyden J, Van Gool A. Azospirillum — plant root associations: A review. Biol Fertil Soils [Internet]. 1989;8(4):356–68. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00263169>
- [6]. Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Munive-Hernández JA, Baez-Rogelio A, et al. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2016;1(1):1–10. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.26a62fnd2t88>
- [7]. Moreno-Valencia FD, Plascencia-Espinosa MÁ, Muñoz-Rojas J. Isolation and screening of plant growth promoting bacteria for their application in forest species. Mex J Biotechnol. 2018;3(3):36–53.
- [8]. Mirza BS, Mirza MS, Bano A, Malik KA. Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and

- phytohormone-producing *Enterobacter* strains. Aust J Exp Agric [Internet]. 2007;47(8):1008–15. Available from: <https://doi.org/10.1071/EA06151>
- [9]. Korir H, Mungai NW, Thuita M, Hamba Y, Masso C. Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil. Front Plant Sci [Internet]. 2017;8:141. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00141>
- [10]. Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes JL, et al. Effect of *Rhizobium*–*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. Plant Soil [Internet]. 2008;312(1):25–37. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9606-4>
- [11]. Singh I. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. Eur J Biol Res. 2018;8(4):191–213.
- [12]. Muñoz-Rojas J, Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Fuentes-Ramírez LE, Munive-Hernández JA. Formulación de un inoculante multiespecies para potenciar el crecimiento de plantas [Internet]. México; MX2013007978A, 2013. p. 1–36. Available from: https://www.researchgate.net/publication/309550250_Formulacion_de_un_inoculante_multie_species_para_potenciar_el_crecimiento_de_plantas
- [13]. Morales-García YE, Baez A, Quintero-Hernández V, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, et al. Bacterial mixtures, the future generation of inoculants for sustainable crop production. Sustainable Development and Biodiversity 23. In: Maheshwari DK, Dheeman S, editors. Field Crops: Sustainable Management by PGPR. First. Swizerland: Springer Nature Swizerland AG; 2019. p. 11–44.
- [14]. Matilla MA, Krell T. Bacterias rizosféricas como fuente de antibióticos. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2017;2(1):14–21. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.mglzgs108ub3>
- [15]. Hernández-Tenorio A-L. Viabilidad de bacterias de un inoculante multi-especies y su efecto a corto plazo, en el crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic [Internet]. 2014. Available from: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/6343>

- [16]. Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales M del R, et al. Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. PLoS One [Internet]. 2017 Nov 8;12(11):e0187913. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>
- [17]. Muñoz-Rojas J, Alatorre-Cruz JM, Bustillos-Cristales M del R, Morales-García YE, Hernández-Tenorio A-L, Baez-Rogelio A, et al. Multi-species formulation to improve the growth from plants semi-desertic zones [Internet]. México; MX20150 14278A, 2015. p. 1–28. Available from: https://www.researchgate.net/publication/315800535_Multi-species_formulation_to_improve_the_growth_from_plants_semi-desertic_zones
- [18]. Cesa-Luna C, Baez A, Quintero-Hernández V, De la Cruz-Enríquez J, Castañeda-Antonio MD, Muñoz-Rojas J. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. Acta Biológica Colomb. 2020;25(1):140–54.
- [19]. Pazos-Rojas LA, Rodríguez-Andrade O, Catalina Muñoz-Arenas L, Morales-García Y, Corral Lugo A, Quintero-Hernandez V, et al. Desiccation-tolerant rhizobacteria maintain their plant growth Promoting capability after experiencing extreme water stress. J Appl Microbiol [Internet]. 2018;1(May):1–13. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Jesus_Munoz-Rojas/publication/325094145_Desiccation-Tolerant_Rhizobacteria_Maintain_their_Plant_GrowthPromoting_Capability_after_Experiencing_Extreme_Water_Stress/links/5af5ed014585157136cb7b95/Desiccation-Tolerant-Rhi
- [20]. Rodríguez-Andrade O, Corral-Lugo A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Rivera-Urbalejo AP, Molina-Romero D, et al. Identification of *Klebsiella variicola* T29A genes involved in tolerance to desiccation. Open Microbiol J. 2019;13(1):256–67.
- [21]. Rodríguez-Andrade O, Bernal P, Martínez-Contreras RD, Morales-García YE, Molina-Romero D, Marín-Cevada V, et al. Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y/o por congelación-descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2018;3(10):1–13. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.sczcuhvyg2lw>
- [22]. Corral-Lugo A, Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Ramírez-Valverde A, Martínez-Contreras RD, Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por

Sellado (o estampado) Masivo.” Rev Colomb Biotecnol. 2012;14(2):147–56.

[23]. Pazos-Rojas LA, Muñoz-Arenas LC, Rodríguez-Andrade O, López-Cruz LE, López-Ortega O, Lopes-Olivares F, et al. Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. PLoS One [Internet]. 2019 Jul 19;14(7):e0219554. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>

[24]. Baez-Rogelio A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Rojas J. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. Microb Biotechnol. 2017;10(1):19–21.

[25]. Santiago-Saenz YO, Hernández-Tenorio A-L, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Baez-Rogelio A, Pérez-Santos JLM, et al. Method for obtaining potato plants from the extraction of induced sprouts in controlled conditions. [Internet]. Vol. 2015014804. Mexico; MX 2015014804A, 2017. p. 1–25. Available from: https://www.researchgate.net/publication/320234265_Method_for_obtaining_potato_plants_from_the_extraction_of_induced_sprouts_in_controlled_conditions

[26]. Morales-García YE, Baez A, Quintero-Hernández V, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, et al. Bacterial

mixtures, the future generation of inoculants for sustainable crop production. In: Maheshwari DK, Dheeman S, editors. Field Crops: Sustainable Management by PGPR [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 11–44. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8_2

[27]. Morales-García YE, Baez A, Juárez-Hernández D, Hernández-Tenorio A-L, Muñoz-Rojas J. Inoculantes de segunda generación como alternativa de solución para mitigar el cambio climático. In: Seminario Survival and Ecology of Microorganisms [Internet]. Puebla, México: BUAP; 2020. p. 1–2. Available from: https://www.researchgate.net/publication/339228969_Inoculantes_de_segunda_generacion_como_alternativa_de_solucion_para_mitigar_el_cambio_climatico/stats

[28]. Pazos-Rojas LA, Marín-Cevada V, Elizabeth Y, García M, Baez A. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. Rev Iberoam Ciencias. 2016;3(7):72–85.

[29]. Nica A, Popescu A, Ibanescu D-C. Human Influence on the Climate System. Curr Trends Nat Sci [Internet]. 2019;8(15):209–15. Available from: <http://www.natsci.upit.ro>

[30]. Muñoz-Rojas J. Diseño de inoculantes de segunda generación para potenciar el

rendimiento de cultivos agrícolas. 2020. p. 1–2.

[31]. Hernández Vargas M. Escalamiento y estrategias de co-cultivo para la producción de un inoculante de segunda generación. [Internet]. 2017. Available from: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/652>

[32]. Aguilar-Piedras JJ, Xiqui-vásquez ML, García-García S, Beatriz E. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. Rev Latinoam Microbiol [Internet]. 2014;50(1 & 2):21–37. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Beatriz_Baca/publication/228628241_Produccion_del_acido_indol-3-acetico_en_Azospirillum/links/5425d0960cf238c6ea778333.pdf

[33]. Rivera-Urbalejo AP, Juárez-Hernández D, Hernández-Tenorio AL, Morales-García YE. Aplicaciones potenciales de *Gluconacetobacter diazotrophicus* para incrementar los rendimientos agrícolas. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2019;4(13):32–44. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.q150unlk56f>

[34]. Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Santos PE los. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. Int J Syst Evol Microbiol

[Internet]. 2004;54(4):1165–72. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02951-0>

[35]. Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2009 Oct 15;75(20):6581 LP – 6590. Available from: <http://aem.asm.org/content/75/20/6581.abstract>

[36]. Caballero-Mellado J. El género *Azospirillum*. In: Martínez-Romero E, Martínez-Romero J, editors. Microbios en línea [Internet]. first. Cuernavaca; 2001. Available from: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>

[37]. López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG, Lilia T-L, Medina-de la Rosa G, Armando T-HR. Antifungal and growth-promoting activity of *Azospirillum brasilense* in *Zea mays* L. ssp. mexicana. Arch Phytopathol Plant Prot [Internet]. 2017 Aug 27;50(13–14):727–43. Available from: <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1372247>

[38]. Tapia-Hernández A, Mascarúa-Esparza MA, Caballero-Mellado J. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* [Internet]. 1990;64(259):73–83. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/2148964>

[39]. Bashan Y, de-Bashan LE. Protection of Tomato Seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* by Using the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2002 Jun 1;68(6):2637 LP – 2643. Available from: <http://aem.asm.org/content/68/6/2637.abstract>

[40]. Kamnev AA, Mamchenkova P V, Dyatlova YA, Tugarova A V. FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles. *J Mol Struct* [Internet]. 2017;1140:106–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286016312935>

[41]. Trujeque-Montiel C V. Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno, simbioses de ambientes forestales de leguminosas, de la sierra norte del estado de Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2009.

[42]. Blanco Y, Blanch M, Piñón D, Legaz M, Vicente C. Antagonism of *Gluconacetobacter*

diazotrophicus (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2005;99(4):366–71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172305703807>

[43]. Logeshwarn P, Thangaraju M, Rajasundari K. Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in sweet potato (*Ipomea batatas*). *Arch Phytopathol Plant Prot* [Internet]. 2011 Feb 1;44(3):216–23. Available from: <https://doi.org/10.1080/03235400902952707>

[44]. Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2005 Sep 1;54(1):57–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.011>

[45]. Silva R, Filgueiras L, Santos B, Coelho M, Silva M, Estrada-Bonilla G, et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Changes The Molecular Mechanisms of Root Development in *Oryza sativa* L. Growing Under Water Stress. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences* . 2020.

[46]. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Hari K,

Saravanan VS, Sa T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Pestic Biochem Physiol [Internet]. 2006;84(2):143–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357505000891>

[47]. Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2007 Aug 15;73(16):5308 LP – 5319. Available from: <http://aem.asm.org/content/73/16/5308.abstract>

[48]. Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environ Microbiol [Internet]. 2002 Dec 1;4(12):799–808. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>

[49]. Fernández M, Conde S, Duque E, Ramos J-L. In vivo gene expression of *Pseudomonas putida* KT2440 in the rhizosphere of different plants. Microb Biotechnol [Internet]. 2013 May 1;6(3):307–13. Available from:

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12037>

[50]. Costa-Gutierrez SB, Lami MJ, Santo MCC-D, Zenoff AM, Vincent PA, Molina-Henares MA, et al. Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of eptA. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2020;104(10):4577–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>

[51]. Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri D V, Vivanco JM, et al. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. Environ Microbiol Rep [Internet]. 2010 Jun 1;2(3):381–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x>

[52]. Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants [Internet]. Vol. 5, Frontiers in Plant Science. 2015. p. 719. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00719>

[53]. Zhao Y, Che Y, Zhang F, Wang J, Gao W, Zhang T, et al. Development of an efficient pathway construction strategy for rapid evolution of the biodegradation capacity of *Pseudomonas putida* KT2440 and its

application in bioremediation. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;143239. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972036770X>

[54]. Fernández M, Niqui-Arroyo JL, Conde S, Ramos JL, Duque E. Enhanced Tolerance to Naphthalene and Enhanced Rhizoremediation Performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 Catabolic Plasmid. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012 Aug 1;78(15):5104 LP – 5110. Available from: <http://aem.asm.org/content/78/15/5104.abstract>

[55]. Böltner D, Godoy P, Muñoz-Rojas J, Duque E, Moreno-Morillas S, Sánchez L, et al. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2008 Jan 1;1(1):87–93. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00004.x>

[56]. Santiago-Saenz YO. Efecto de un inoculante multiespecies en papa propagada en laboratorio y crecida en invernadero [Internet]. 2014. Available from: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/5931>

[57]. Vázquez Ayala FD. Estimulación del crecimiento de la flor “crisantemo” (*Chrysanthemum* sp), por la formulación

multiespecies EMMIM-1 [Internet]. 2018. Available from: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7818>

[58]. Guevara-Rivera M. Evaluación del inoculante multiespecies EMMIM-1 en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* Var. Saladette) en condiciones de invernadero. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2019.

[59]. Juárez-Hernández D. Evaluación de la capacidad de un inoculante multiespecies para estimular el crecimiento de frijol. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2013.

[60]. Hernández-Tenorio A-L. Preservación efectiva mediante liofilización de cepas del inoculante multi-especies EMMIM-1 [Internet]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018. Available from: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7830>

[61]. Azcarate Sosa M. Agricultura urbana con biotecnología del ICUAP. *Gac Univ BUAP* [Internet]. 2020;246:10–6. Available from: <https://comunicacion.buap.mx/sites/default/files/gaceta246.pdf>

[62]. Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Bustillos-Cristales M del R, Krell T, Muñoz-Rojas J. Método rápido para la obtención de axénico a partir de semillas maíz. *Elementos*.

2010;80:35–8.

[63]. Rivera-Urbalejo AP, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Morales JM, Carbajal-Armenta A, et al. Inoculación de plántulas micropropagadas de caña de azúcar con bacterias benéficas para potenciar su producción. *Alianzas y Tendencias BUAP* [Internet]. 2017;2(7):15–26. Available from:
<https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.mxf d0hkky3l3>

[64]. Fukami J, Ollero FJ, Megías M, Hungria M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* [Internet]. 2017;7(1):153. Available from:
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>