

Potentialities of *Bacillus* strains for promoting growth in maize (*Zea mays* L.)

Potencialidades de cepas de *Bacillus* para la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.)

Marcia M. Rojas¹, B. Tejera¹, Diana M. Bosh¹, Y. Ríos², Janet Rodríguez² and Mayra Heydrich¹

¹*Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba Calle 25 #455 e/ J e I Vedado CP 10400, La Habana, Cuba*

²*Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT).*

Calle 2 esq. 1, Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba

Email: marcia@fbio.u.cu

The *Bacillus* genus has representatives promoting plant growth. The objective of this research was to isolate and select bacteria from *Bacillus* genus, associated to the maize cultivation with potential in promoting growth in this crop of great importance in human and animal feeding. Isolations of bacteria belonging to this genus were carried out, endophytes as rhizosphere, of maize (*Zea mays* L.) hybrid cultivar P-7928. The isolates were physiologically characterized, in terms of indolic compounds production, the phosphate solubilization capacity and qualitative determination of biological nitrogen fixation. Also, the ability to form biofilms was evaluated using the method crystal violet stain on polystyrene plates. Later, the isolates with better results were entirely selected through a cluster analysis. A total of 19 isolates, 9 rhizosphere and 10 endophytes were obtained. All produce indole-acetic acid in a concentration range between 2.92 and 17.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and fix atmospheric nitrogen; nine solubilize inorganic phosphate in a range between 12.16 and 33.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Furthermore, the ability to form biofilms of 78.94% of the isolates was showed, which gives advantages in the colonization of plants. The formation of in vitro biofilm of a good strain producing and a nonproducing was compared. Both were adhered to the polystyrene plate with different pattern, which was more consistent in the EAM4 strain, with high biofilm production. The obtained results allowed selecting the native isolates ERM1, RM5, EAM5 and RM1 as the most promising to promote plant growth and their future use in the sustainable agriculture.

Key words: *Bacillus*, plant growth promoting bacteria, phosphates solubilization

The maize (*Zea mays* L.) is an annual grass plant and one of the highest production cereals in the world jointly with wheat and rice. In most of the America countries, the maize historically forms the basis of the regional feeding and one of the central aspects of the Mesoamerican and Andean cultures. Human consumption worldwide is lower than other cereals, because maize is considered a staple food for animals (Paliwal *et al.* 2001).

In order to improve the use of the maize kernel in calf feeding there were developed experiences, in which which demonstrated that the processing effect is to increase starch digestibility in the digestive tract. However, as the processing method is more intense,

El género *Bacillus* tiene representantes que promueven el crecimiento vegetal. El objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar bacterias del género *Bacillus*, asociadas al cultivo del maíz con potencialidades para la promoción su crecimiento en este cultivo de gran importancia en la alimentación humana y animal. Se realizaron aislamientos de bacterias de este género, endófitos como rizosféricos, del cultivo del maíz (*Zea mays* L.) cultivar híbrido P-7928. Se caracterizaron fisiológicamente los aislados, en cuanto a la producción de compuestos indólicos, capacidad de solubilización de fosfatos y determinación cualitativa de la fijación biológica de nitrógeno. Además, se evaluó la capacidad de formar biopelículas mediante el método de tinción con violeta cristal en placas de poliestireno. Posteriormente, se seleccionaron los aislados con mejores resultados de manera integral mediante un análisis de conglomerado. Se obtuvieron 19 aislados, 9 rizosféricos y 10 endófitos. Todos producen ácido indolacético en un rango de concentración que oscila entre 2.92 y 17.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y fijan nitrógeno atmosférico; nueve solubilizan fosfato inorgánico en un rango entre 12.16 y 33.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Además, se demostró la capacidad de formar biopelículas de 78.94 % de los aislados, lo que le confiere ventajas en la colonización de las plantas. Se comparó la formación de biopelícula in vitro de una cepa buena productora y una no productora. Ambas se adhirieron a la placa de poliestireno con diferente patrón, que fue más consistente en la cepa EAM4, con elevada producción de biopelícula. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar los aislados autóctonos ERM1, RM5, EAM5 y RM1 como los más promisorios para promover el crecimiento de las plantas y su uso futuro en la agricultura sostenible.

Palabras clave: *Bacillus*, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solubilización de fosfatos

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta gramínea anual y uno de los cereales de mayor producción en el mundo conjuntamente con el trigo y el arroz. En la mayor parte de los países de América, el maíz constituye históricamente la base de la alimentación regional y uno de los aspectos centrales de las culturas mesoamericana y andina. El consumo humano en todo el mundo es inferior al de otros cereales, porque el maíz se considera un alimento fundamental para los animales (Paliwal *et al.* 2001).

Con el objetivo de mejorar la utilización del grano de maíz en la alimentación de terneras se desarrollaron experiencias, en las que se demostró que el efecto del procesado es aumentar la digestibilidad del almidón en el tracto digestivo. Sin embargo, a medida que el método

decreases in daily liveweight gains or in the conversion efficiency are generated, associated with decreases in the dry matter intake.

Therefore, it would be possible to improve the efficiency of starch use with the choice of types of maize of high kernel size (Maresca *et al.* 2002). Lopez *et al.* (2003) showed that bran and defatted maize germ can substitute the kernel in the diet for growing pigs up to 40%, without affecting weight gains. However, the efficiency of the diet conversion is affected. In this research, the energy value estimated for growing pigs was 70% equivalent to maize, demonstrating the importance of maize kernel in these animals feeding.

Due to the economic importance of this kernel, it seeks to increase yields with the use of alternatives offered by the sustainable agriculture, in order to affect as little as possible to the environment. This includes the use of microorganisms present in the soil to produce biofertilizer that replace chemical fertilizers and thus, reduce soil damage. Among the most used microorganisms are the plant growth promoting bacteria (PGPB) (Saharan and Nehra 2011).

These microorganisms directly influence on the plants metabolism promoting the increase of water and nutrients intake and the root system development (Glick 2014). Also, they stimulate plant growth through the phytohormone synthesis, N₂ fixation and inorganic phosphate solubilization. Indirectly, the effect is exercised by enhancing the function of other beneficial organisms, present in the rhizosphere (Gupta *et al.* 2015). The PGPB include the genus *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* and *Gluconacetobacter* (Ahemad and Kibret 2014).

The members of *Bacillus* genus are characterized by being Gram-positive bacteria, bacillary form, strict aerobes or facultative anaerobes, positive catalase and endospores forming. This genus has been extensively studied, as to their antagonistic capacity of several pathogens organisms to crops of economic importance, but is necessary to deepen in the promoter activity of plant growth, to combine both effects.

As de Araujo *et al.* (2011) stated, it is very important to obtain new strains of *Bacillus* and to study their potential to stimulate plant growth. Thus the objective of this study was to isolate and select bacteria from *Bacillus* genus, associated with the maize cultivation, with potentialities in promoting plant growth.

Materials and Methods

Asolations. The sampling area is located in the agricultural areas of the Instituto de Investigaciones en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", Santiago de las Vegas, La Habana. The soil of the area used in this study is classified as red ferrallitic (Hernández *et al.* 2015).

de procesado es más intenso, se generan disminuciones en las ganancias diarias de peso vivo o en la eficiencia de conversión, asociadas con disminuciones en el consumo de materia seca. Por tanto, sería posible mejorar la eficiencia de utilización del almidón con la elección de tipos de maíz de mayor tamaño de grano (Maresca *et al.* 2002). López *et al.* (2003) demostraron que el afrecho y el germen desgrasado de maíz pueden sustituir al grano en la dieta para cerdos en crecimiento hasta 40 %, sin afectar las ganancias de peso. Sin embargo, sí se afecta la eficiencia de conversión de la dieta. En esta investigación, el valor de energía estimado para cerdos en crecimiento fue 70 % equivalente al del maíz, lo que demuestra la importancia del grano de maíz en la alimentación de estos animales.

Debido a la importancia económica de este grano, se busca aumentar los rendimientos con la utilización de alternativas que brinda la agricultura sostenible, con el propósito de afectar lo menos posible al medio ambiente. Esto incluye el uso de microorganismos presentes en el suelo para producir biofertilizantes que sustituyan a los fertilizantes químicos y que por tanto, disminuyan los daños al suelo. Entre los microorganismos más utilizados están las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés) (Saharan y Nehra 2011). Estos microorganismos influyen directamente en el metabolismo de las plantas promoviendo el aumento de la toma de agua y nutrientes y el desarrollo del sistema radical (Glick 2014). Además, estimulan el crecimiento vegetal a través de la síntesis de fitohormonas, la fijación de N₂ y la solubilización de fosfato inorgánico. De manera indirecta, el efecto lo ejercen al estimular el funcionamiento de otros organismos beneficiosos, presentes en la rizosfera (Gupta *et al.* 2015). Las PGPB incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Gluconacetobacter* (Ahemad y Kibret 2014).

Los miembros del género *Bacillus* se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, de forma bacilar, aerobios estrictos o anaerobios facultativos, catalasa positiva y formadores de endosporas. Este género se ha estudiado ampliamente, en cuanto a su capacidad antagonista de diversos organismos patógenos a cultivos de importancia económica, pero es necesario profundizar en la actividad promotora del crecimiento vegetal, para combinar ambos efectos.

Como plantean de Araujo *et al.* (2011), es muy importante la obtención de nuevas cepas de *Bacillus* y el estudio de sus potencialidades para estimular el crecimiento vegetal. Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este estudio fue aislar y seleccionar bacterias del género *Bacillus*, asociadas al cultivo del maíz, con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal.

Materiales y Métodos

Aislamientos. El área de muestreo se encuentra en las áreas agrícolas del Instituto de Investigaciones en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", Santiago de las Vegas, La Habana. El suelo del área utilizada en

Isolations were performed from samples of aerial, root and rhizosphere of three plants of maize to obtain endophytes microorganisms.

For isolation, the plants were taken to separate the root of the aerial part. To isolate rhizobacteria, 1g of the root with rhizosphere soil was placed in a tube containing 9 mL of saline solution (NaCl 0.85%) and it was vigorously stirred using a (Genie) stirrer. To obtain endophytes, roots, stems and leaves were disinfected with sodium hypochlorite at 25% for 15 minutes. After this time, they were washed several times with sterile distilled water and macerated in sterile saline solution.

The samples were heated at 80 °C for 30 minutes and cultivated by dissemination in Tryptone Soy Agar (TSA, OXOID) medium. They were incubated at 30 °C for 24 h.

From the colonies with different characteristics, the microscopic observation with Gram stain was performed to check the purity and determine the micromorphological and staining characteristics. Also, the presence of spores, mobility and catalase activity, recommended in Bergey's Manual for Bacillaceae family (Claus and Berkeley 1986) was determined. Pure strains with these characteristics were stored in tubes of Nutrient Agar and 20 % glycerol at -20 °C.

Determination of potential as growth promoters. The determination of indole acetic acid (IAA) production was performed according to the methodology which used Salkowski reagent (Glickmann and Dessaux 1995), in Tryptone Soy (TS) liquid medium. For this, the cultures were centrifuged at 5000 r.min⁻¹ for 15 minutes. Absorbance at wavelength of 535 nm was determined. In parallel, a pattern curve synthetic IAA was performed. This experiment was performed with three replications per strain. As a negative control the corresponding uninoculated medium was used.

To quantify phosphates solubilization, the strains which were positive in the qualitative assay were used. They were cultured in tubes with liquid medium NBRIP (Nautiyal 1999), which were incubated at 30 °C under stirring conditions in orbital shaker for 48 h.

This test was conducted according to the vanadomolybdate methodology proposed by Kundsén and Beegle (1988). The absorbance of samples at wavelength of 880 nm was determined in the spectrophotometer (Genesys 20). The reading of the results was performed at 48 h of incubation. In parallel, a pattern curve K₂HPO₄ was performed. They were used to test three replications per isolates. As a negative control, the uninoculated culture medium was used.

Qualitative determination of N fixation capacity was performed on semisolid nitrogen free medium (Glucose 10 g, KH₂PO₄ 0.41 g, K₂HPO₄ 0.52 g, Na₂SO₄ 0.05 g, CaCl₂ 0.2 g, MgSO₄ 7H₂O 0.1 g, FeSO₄ 7H₂O 0.005 g, Na₂MoO₄·H₂O 0.0025 g, bacteriological Agar

este estudio se clasifica como ferralítico rojo (Hernández *et al.* 2015).

Se realizaron aislamientos a partir de tres plantas que se tomaron como muestras de la parte aérea, de la raíz del cultivo del maíz (*Zea mays* L.) y de la rizosfera para obtener microorganismos endófitos.

Para el aislamiento, se tomaron las plantas para separar la raíz de la parte aérea. Para aislar rizobacterias se colocó 1g de la raíz con suelo rizosférico en un tubo que contenía 9 mL de solución salina (NaCl al 0.85 %) y se agitó vigorosamente con la utilización de un agitador (Genie). Para la obtención de los endófitos, las raíces, tallos y hojas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 25 % durante 15 min. Luego de este tiempo, se lavaron varias veces con agua destilada estéril y se maceraron en solución salina estéril.

Las muestras se calentaron a 80 °C durante 30 min. y se sembraron por disseminación en medio Agar Triptona Soya (TSA, OXOID). Se incubaron a 30 °C durante 24 h.

De las colonias con características diferentes, se realizó la observación microscópica con tinción de Gram para comprobar la pureza y determinar las características micromorfológicas y tintoriales. Además, se determinó la presencia de esporas, movilidad y actividad catalasa, recomendadas en el Manual de Bergey para la familia Bacillaceae (Claus y Berkeley 1986). Las cepas puras con estas características se conservaron en tubos de Agar Nutriente y en glicerol al 20% a -20°C.

Determinación del potencial como promotores del crecimiento. La determinación de la producción de ácido indolacético (AIA) se realizó según la metodología que emplea el reactivo de Salkowski (Glickmann y Dessaux 1995), en medio líquido Caldo Triptona Soya (TSB). Para esto, los cultivos se centrifugaron a 5000 r.min⁻¹ durante 15 min. Se determinó la absorbancia a longitud de onda de 535 nm. Paralelamente, se realizó una curva patrón AIA sintético. Este experimento se realizó con tres repeticiones por cepa. Como control negativo se utilizó el medio correspondiente sin inocular.

Para cuantificar la solubilización de fosfatos, se utilizaron las cepas que resultaron positivas en el ensayo cualitativo. Se sembraron en tubos con medio NBRIP líquido (Nautiyal 1999), que fueron incubados a 30 °C en condiciones de agitación en zaranda orbital durante 48 h.

Este ensayo se realizó según la metodología del vanadomolibdato, propuesta por Kundsén y Beegle (1988). Se determinó la absorbancia de las muestras a longitud de onda de 880 nm en el espectrofotómetro (Genesys 20). La lectura de los resultados se realizó a las 48 h de incubación. Paralelamente, se realizó una curva patrón K₂HPO₄. Se utilizaron para el ensayo tres repeticiones por aislados. Como control negativo, se utilizó el medio de cultivo sin inocular.

La determinación cualitativa de la capacidad de fijación de nitrógeno se realizó en medio semisólido libre de nitrógeno (Glucosa 10 g, KH₂PO₄ 0.41 g, K₂HPO₄ 0.52 g, Na₂SO₄ 0.05 g, CaCl₂ 0.2 g, MgSO₄ 7H₂O 0.1 g, FeSO₄ 7H₂O 0.005 g, Na₂MoO₄·H₂O 0.0025 g, Agar

1.8 g, distilled H₂O 1 L) and inoculated by puncture with the obtained isolates. The isolates ability to grow in the medium without nitrogen for five successive sweeps was observed.

Determination of the ability to form biofilms. For this experiment the isolates were cultured on TS medium and incubated for 24 h at 37 °C under stirring conditions in orbital shaker. Then, the cell concentration to 10⁸ cells.mL⁻¹ was fitted, corresponding to 0.5 tube of McFarland (Jorgensen 1993) scale and were added 2 mL of each cultures in wells of polystyrene multiwell plates. These were incubated at 50 rpm and 30 °C for 8 h (Hsueh *et al.* 2006).

Subsequently, the contents of each well was removed, the plates were washed with distilled water and let to dry at room temperature. Then, they were stained for 10 minutes with 2 mL of crystal violet at 0.5 %. After, they were washed with distilled water and dried.

Later were added 2 mL of ethanol at 70%. Finally, the absorbance reading of the contents of each well at 590 nm was performed.

They were used for the experiment three replications per isolates and as negative control, the uninoculated medium.

After crystal violet staining, washing and drying of the plates, the biofilm formation in the bottom of the wells was observed in a trinocular biological microscope bright field, Zoel Model N-200M, China. Photographs were taken with a digital camera attached and Software Motic Images 2000 1.2 Micro-Optical Industrial Group Co.LT.

Statistical analysis. For data analysis, normality testing and variance homogeneity for all experiments variable were performed using the Statistica program version 8.0 (StatSoft 2007) they were performed. In the case where the normality and variance homogeneity was carried out, an ANOVA was performed and subsequently, Tukey test (Sigarra 1985).

A cluster analysis with the Euclidean distance application was performed for selecting strains that were completely better and proved to be promising for plant growth in maize cultivation. The results of the production of 3 indole-acetic acid and phosphate solubilization were used for this. They were taken as positive, the highest values obtained in each of the analyzed experiments and as negative, the lowers.

Results and Discussion

From the isolates made in the cultivation of maize (*Zea mays* L.) hybrid cultivar P-7928, there were obtained nine isolates from the rhizosphere and ten endophytes. For the selection of the members of this genus, was taken into account that the bacteria grow after treatment at 80 °C for 30 minutes, the response to the Gram stain, the shape, the endospores presence, motility and catalase enzyme activity, which all responded positively. Strains were named when consider the area

bacteriológico 1.8 g, H₂O destilada 1 L) y se inoculó por punción con los aislados obtenidos. Como control negativo se utilizó medio sin inocular. Se observó la capacidad de los aislados para crecer en el medio sin nitrógeno durante cinco pases sucesivos.

Determinación de la capacidad de formar biopelícula. Para este experimento se sembraron los aislados en medio TSB y se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones de agitación en zaranda orbital. Luego, se ajustó la concentración celular a 10⁸ células.mL⁻¹, correspondiente al tubo 0.5 de la escala McFarland (Jorgensen 1993) y se añadieron 2 mL de cada uno de los cultivos en pocillos de placas multipozos de poliestireno. Estas se incubaron a 50 rpm y 30 °C durante 8 h (Hsueh *et al.* 2006). Posteriormente, se eliminó el contenido de cada pocillo, las placas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Seguidamente, se tiñeron durante 10 min con 2 mL de violeta cristal al 0.5%. Luego, se lavaron con agua destilada y se secaron. Después se les adicionó 2 mL de etanol al 70 %. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia del contenido de cada pocillo a 590 nm.

Se utilizaron para el experimento tres repeticiones por aislados y como control negativo, el medio sin inocular.

Después de la tinción con violeta cristal, lavado y secado de las placas, se observó la formación de la biopelícula en el fondo de los pocillos en un microscopio biológico trinocular de campo claro, Zoel modelo N-200M, China. Se tomaron fotografías con cámara digital acoplada y Software Motic Images 2000 1.2 Micro-Optical Industrial Group Co.LTD.

Análisis estadísticos. Para el análisis de los datos, se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza a todas las variables de los experimentos mediante el programa Statistica versión 8.0 (StatSoft 2007). En el caso en que se cumplió con la normalidad y homogeneidad de varianza, se realizó un ANOVA y posteriormente, la prueba de Tukey (Sigarra 1985).

Se realizó un análisis de conglomerado con aplicación de la distancia Euclidiana para la selección de las cepas que fueran mejores integralmente y que resultaran promisorias para el crecimiento vegetal en el cultivo del maíz. Se utilizaron para ello los resultados de la producción de ácido 3 indolacético y la solubilización de fosfatos. Se tomaron como positivos, los mayores valores obtenidos en cada uno de los experimentos analizados y como negativo, los menores.

Resultados y Discusión

A partir de los aislamientos realizados en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.) cultivar híbrido P-7928, se obtuvieron nueve aislados de la rizosfera y diez endófitos. Para la selección de los miembros de este género, se tuvo en cuenta que las bacterias crecieran después del tratamiento a 80 °C durante 30 min, la respuesta a la tinción de Gram, la forma, la presencia de endosporas, la motilidad y la actividad de la enzima catalasa, a la

from they where isolated (R: rhizosphere, RE: root endophytes and EAP: endophytes of the aerial part) and it was assigned a consecutive numbers for each case.

Fontes *et al.* (2009), in the cultivation of Brazilian sweet corn, found more frequently the *Bacillus* genus among endophytes bacteria. When performing a molecular analysis of the isolated strains, concluded that the isolates found belonged to the species *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. cereus*.

In studies carried out in environments of importance to agriculture, this genus has been also found between rhizosphere microorganisms. The species *B. badius*, *B. macerans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* are highlighted (Wu *et al.* 2006), which showed potential in promoting plant growth.

Hernandez *et al.* (2003) found the *Bacillus* genus as one of the isolates when analyze the rhizosphere of Francisco Mejorado" cultivar in different types of soils in Cuba. This genus had the highest percentage of appearance after *Pseudomonas*, *Azospirillum* and *Azotobacter*.

Among the plant growth promoting hormones can be found auxins, gibberellins and cytokinins. Among the auxins, is the indole-3-acetic acid (IAA), whose production is widely distributed among plant growth promoting bacteria (PGPB) (Molina *et al.* 2015). It has been shown that the beneficial effects of rhizosphere microorganisms are related to auxins production, which may affect the initiation of lateral roots, their growth or both development processes. This brings about increase of the exploratory plant capacity and increases nutrient uptake (Ortiz *et al.* 2009).

The 19 obtained strains produced IAA in TS medium without addition of tryptophan, whose concentrations are between 2.92 and 17.01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 1). There are no significant differences in IAA production between the isolates RM1, RM4, RM5, RM7, EAM3, EAM4, EAM5, EAM6, EAM7, ERM1, ERM3, which are the highest producers of this plant hormone.

These results agree from the quality and quantity point of view with those obtained by Swain *et al.* (2007) and Yu *et al.* (2016). Swain *et al.* (2007) showed that the inoculation of bacteria from this species to the yam plant (*Dioscorea rotundata* L.) increased the length of the stem and roots, as well as their fresh weight. This may be related to the production of such metabolite.

Other authors showed the ability to produce IAA for the genus in study, at concentrations higher than those obtained, but with the use of tryptophan as an inducer in the culture medium (Ali *et al.* 2009). It has also been shown that high concentrations of auxins have opposite effect, that is to say, inhibit plant growth (Arshad and Frankenberger 1997).

If the results of the production of IAA of isolates

que todos respondieron positivamente. Las cepas se nombraron al considerar la zona de donde se aislaron (R: rizosfera, ER: endófitos de raíz y EA: endófitos de la parte aérea) y se les asignó una numeración consecutiva para cada caso.

Fontes *et al.* (2009), en el cultivo del maíz tierno brasileño, encontraron con mayor frecuencia al género *Bacillus* entre las bacterias endófitas. Al realizar un análisis molecular de las cepas aisladas, concluyeron que los aislados encontrados pertenecían a las especies *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. cereus*.

En estudios realizados en ambientes de importancia para la agricultura, también este género se ha encontrado entre los microorganismos rizosféricos. Se destacan las especies *B. badius*, *B. macerans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* (Wu *et al.* 2006), que mostraron potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal.

Hernández *et al.* (2003) encontraron el género *Bacillus* como uno de los aislados al analizar la rizosfera del cultivar "Francisco Mejorado" en diferentes tipos de suelos en Cuba. Este género fue el de mayor porcentaje de aparición después de *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter*.

Entre las hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal se pueden encontrar auxinas, giberelinas y citoquininas. Entre las auxinas, está el ácido 3-indol acético (AIA), cuya producción se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Molina *et al.* 2015). Se ha demostrado que los efectos beneficiosos de los microorganismos rizosféricos están relacionados con la producción de auxinas, lo que puede afectar la iniciación de las raíces laterales, su crecimiento o ambos procesos de desarrollo. Esto trae consigo aumento de la capacidad exploratoria de la planta e incrementa la toma de nutrientes (Ortiz *et al.* 2009).

Las 19 cepas obtenidas producen AIA en medio TSB sin adición de triptófano, cuyas concentraciones se encuentran entre 2.92 y 17.01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 1). No existen diferencias significativas en cuanto a la producción de AIA entre los aislados RM1, RM4, RM5, RM7, EAM3, EAM4, EAM5, EAM6, EAM7, ERM1, ERM3, que son los mayores productores de esta fitohormona.

Estos resultados concuerdan desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo con los obtenidos por Swain *et al.* (2007) y Yu *et al.* (2016). Swain *et al.* (2007) demostraron que la inoculación de bacterias de esta especie a la planta de ñame (*Dioscorea rotundata* L.) incrementó la longitud del tallo y las raíces, así como su peso fresco. Esto pudiera estar relacionado con la producción de este tipo de metabolito.

Otros autores demostraron la capacidad de producir AIA para el género en estudio, en concentraciones superiores a las obtenidas, pero con la utilización de triptófano como inductor en el medio de cultivo (Ali *et al.* 2009). También se ha demostrado que concentraciones de auxinas muy

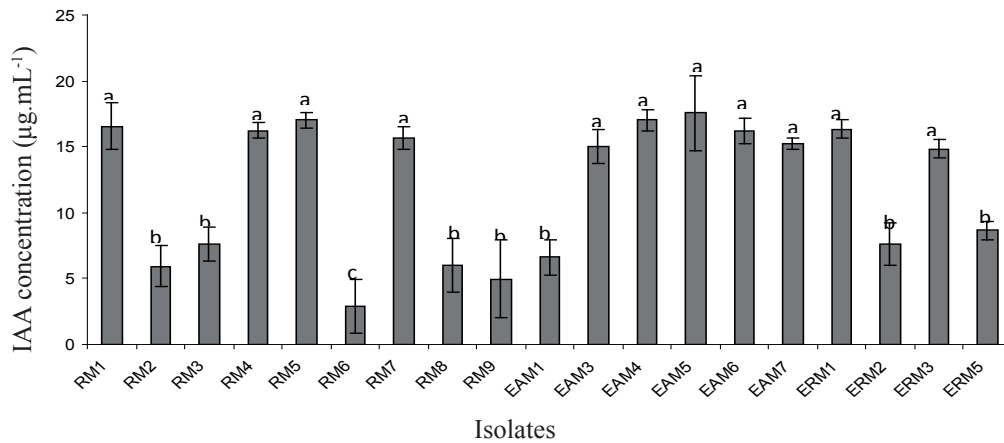


Figure 1. Auxin production in Triphthone Soy culture medium by *Bacillus* strains associates to the maize (*Zea mays* L.) cultivation. No common letters indicate significant differences for Tukey test at $p < 0.05$. In each treatment is indicated the standard deviation of the mean of three repetitions. $Esx = 0,692284$.

are compared with other microbial genera that produce this type of metabolite, it is observed that are similar to those of *Rhizobium sp.* and *Azospirillum genera* (de Souza *et al.* 2013).

The quantification of phosphate solubilization at 48 h showed that strains RM1, RM2, RM5, EAM5, ERM1, ERM2 and ERM5 there were not showed significant differences (figure 2), being RM2 that of the highest solubilization value. The strains RM3 and RM9 were those of lower values. The strains that have high concentrations of soluble phosphate in the culture medium could potentially act as promoters of plant growth in soils with high levels of undissolved phosphates.

One of the mechanisms by which bacteria can contribute to plant growth is providing nutrients non normally available to plants. Between these are the phosphates and PGPB, which can perform the solubilization of them (Kumar *et al.* 2014). The values found in the studied strains were similar to those obtained for members of this bacterial genus, isolated from other crops (Mishra *et al.* 2015).

elevadas tienen efecto contrario, es decir, inhiben el crecimiento vegetal (Arshad y Frankenberger 1997).

Si se comparan los resultados de la producción de AIA de los aislados con otros géneros microbianos que producen este tipo de metabolito, se constata que son similares a los de géneros *Rhizobium sp.* y *Azospirillum genera* (de Souza *et al.* 2013).

La cuantificación de la solubilización de fosfatos a las 48 h demostró que las cepas RM1, RM2, RM5, EAM5, ERM1, ERM2 y ERM5 no presentaron diferencias significativas (figura 2), siendo RM2 la de mayor valor de solubilización. Las cepas RM3 y RM9 fueron las de menores valores. Las cepas que presentan altas concentraciones de fosfato soluble en el medio de cultivo podrían actuar potencialmente como promotoras del crecimiento vegetal en suelos con altos niveles de fosfatos no disueltos.

Uno de los mecanismos a través de los que las bacterias pueden contribuir al crecimiento vegetal es proporcionándoles nutrientes que no sean normalmente asequibles para las plantas. Entre estos se hallan los fosfatos y las PGPB, que pueden llevar a cabo la

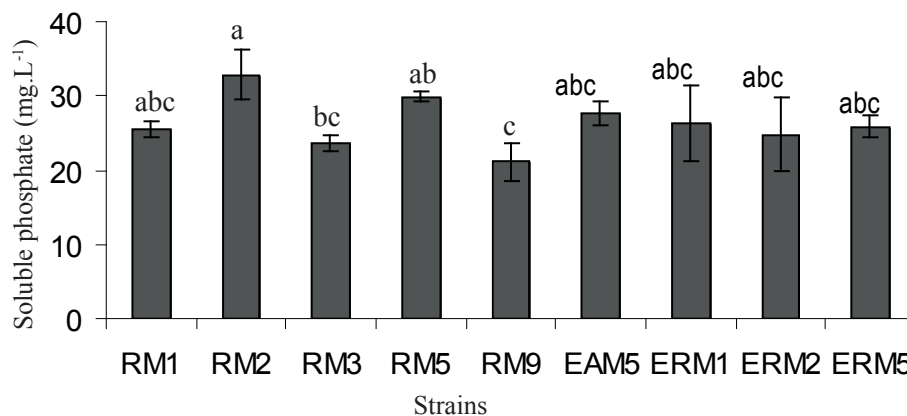


Figure 2. Phosphate solubilization in NBRIP liquid medium by *Bacillus* strains at 48 h. No common letters indicates significant differences for Tukey test at $p < 0.05$. In each treatment is indicated the standard deviation of the mean of three repetitions of each strain. $Esx = 0,787587$.

In this study the nitro-fixer ability of all isolates was qualitatively determined, when inoculated in semisolid nitrogen-free medium for five successive sweeps, as there was growth in the inoculation area in the semisolid nitrogen-free medium. Therefore, the microorganism was growing at the expense of atmospheric dinitrogen.

This would mean great contribution in the development of plant growth, since the dinitrogen is a limiting factor for its limited availability in the cultivated soil, in addition to the use of chemical fertilizers in large quantities it is an environmental danger (Bishnoi 2015).

The microorganisms able to carry out the biological nitrogen fixation are highly valued and used to increase the yields of different crops. *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* and *Pseudomonas* are among the microbial genera which have this ability. *Bacillus* is one of the genera that are reported as dinitrogen fixer. It has been reported that the species *Bacillus fusiformis* shows high nitrogenase activity, so it is used in promoting the growth of plants, such as corn, wheat and rice (Rózycki *et al.* 1999). This characteristic is interesting to use these strains in the subsequent development of a biofertilizer.

According to Arruda *et al.* (2013), the selection of PGPB with multiple potentialities for growth promotion suggests that they may have a better effect on plants at the level of greenhouse and in the yields of corn crop in the field. However, the physiological expression of bacteria under laboratory conditions does not guarantee their growth promoting activity in association with the plant (Fuentes and Caballero 2006). Therefore, it is essential to carry out studies plant- PGPB interaction to check the benefits of this interaction.

Biofilms are defined as communities of microorganisms which growth embedded in an exopolysaccharides matrix, adhering to an inert surface or a living tissue. Biofilms growth is the standard way of bacteria growth in nature. The ability of biofilms formation is not seemed to be restricted to any specific group of microorganisms. It is considered that, in appropriate environmental conditions, all microorganisms have the ability to form biofilms (Cairns *et al.* 2014).

The ability to form biofilms on the surface of the plant may be a competitive advantage. In this case, the ability of biofilms to adhere to abiotic surfaces like polystyrene plates was studied, which in vivo would allow a closer interaction of microorganisms with the plant, keeping interacting longer.

The isolates RM1, RM2, RM3, RM4, RM5, RM6, EAM 1 EAM 3 EAM4, EAM5, EAM7, ERM2, ERM3 and ERM5 have not significant differences and are the highest values (figure 3). For RM8 and RM9, which did not show significant differences, were the

solubilización de los mismos (Kumar *et al.* 2014). Los valores encontrados en las cepas estudiadas fueron similares a los obtenidos para miembros de este género bacteriano, aislados de otros cultivos (Mishra *et al.* 2015).

En este estudio se determinó cualitativamente la capacidad nitro fijadora de todos los aislados, al inocularlos en medio semisólido libre de nitrógeno durante cinco pases sucesivos, ya que se produjo crecimiento en la zona de inoculación en el medio semisólido libre de nitrógeno. Por tanto, el microorganismo estuvo creciendo a expensas del dinitrógeno atmosférico.

Esto significaría gran aporte en el desarrollo del crecimiento de la planta, ya que el dinitrógeno es un factor limitante por su escasa disponibilidad en el suelo cultivado, además de que el uso de fertilizantes químicos en grandes cantidades constituye un peligro ambiental (Bishnoi 2015).

Los microorganismos capaces de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno son muy valorados y utilizados para aumentar los rendimientos de diferentes cultivos. *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* se hallan entre los géneros microbianos que poseen esta capacidad. El *Bacillus* es uno de los géneros que se informa como fijador del dinitrógeno. Se ha referido que la especie *Bacillus fusiformis* muestra alta actividad nitrogenasa, por lo que se utiliza en la promoción del crecimiento de plantas, como el maíz, trigo y arroz (Rózycki *et al.* 1999). Esta característica resulta interesante para utilizar estas cepas en el desarrollo posterior de un biofertilizante.

Según plantean Arruda *et al.* (2013), la selección de PGPB con múltiples potencialidades para la promoción del crecimiento sugiere que pueden tener mejor efecto en las plantas a nivel de invernadero y en los rendimientos del cultivo del maíz en el campo. Sin embargo, la expresión fisiológica de las bacterias en condiciones de laboratorio no garantiza su actividad promotora del crecimiento en asociación con la planta (Fuentes y Caballero 2006). Por ello, resulta imprescindible llevar a cabo estudios de interacción planta-PGPB para comprobar los beneficios de esta interacción.

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos, adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. El crecimiento en biopelículas representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La capacidad de formación de biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos. Se considera que, en condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos tienen la capacidad de formar biopelículas (Cairns *et al.* 2014).

La capacidad de formar biopelículas en la superficie de la planta puede constituir una ventaja competitiva. En este caso, se estudió la capacidad de las biopelículas de adherirse a superficies abióticas como las placas de poliestireno, lo que in vivo permitiría una interacción más estrecha de los microorganismos con la planta, manteniéndolos en interacción durante más tiempo.

smaller values. The isolates RM7, EAM6 and ERM1 showed differences from to the rest of the mentioned isolates, with intermediate values between them. There are authors which delimit above 0.2 absorbance as a definition of biofilm-forming strains (Wakimoto *et al.* 2004). When considering this opinion, in this research 78.94 % of the strains can be considered positive.

It has been shown that the *Bacillus* genus is among the bacteria with ability to form biofilms which are used in agro- ecosystems managements.

Biofilms formation is also important, because it reduces the risk of susceptibility of bacteria that

Los aislados RM1, RM2, RM3, RM4, RM5, RM6, EAM1, EAM3, EAM4, EAM5, EAM7, ERM2, ERM3 y ERM5 no presentan diferencias significativas y constituyen los valores más altos (figura 3). En el caso de RM8 y RM9, que tampoco presentaron diferencias significativas, fueron los valores menores. Los aislados RM7, EAM6 y ERM1 mostraron diferencias con respecto al resto de los aislados mencionados, con valores intermedios entre estos. Hay autores que delimitan por encima de 0.2 de absorbancia como definición de cepas formadoras de biopelículas (Wakimoto *et al.* 2004). Al considerar este criterio, en este trabajo 78.94 % de las cepas se pueden considerar positivas.

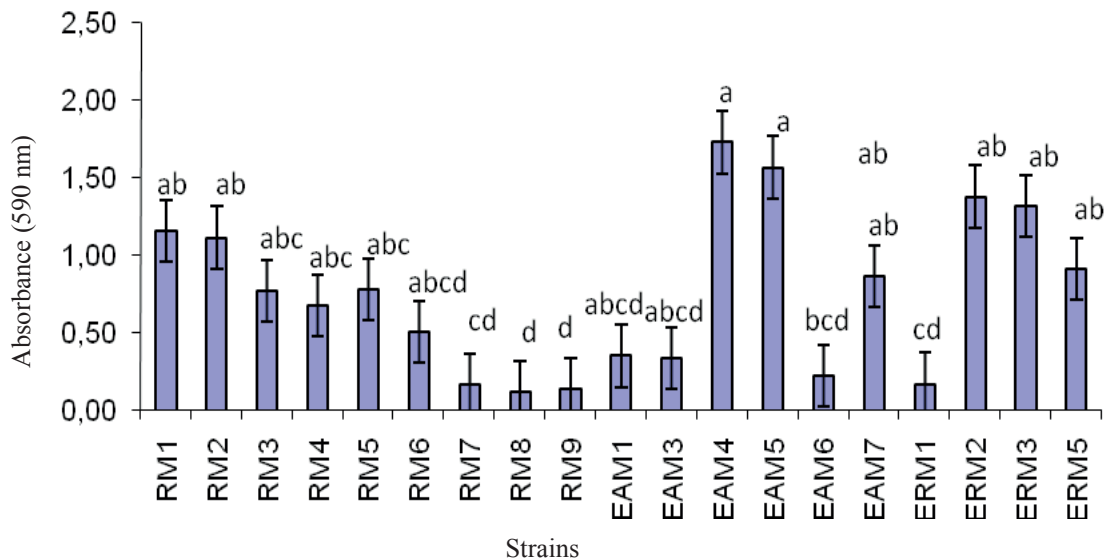


Figure 3. Biofilms formation in TS medium by strains associated to the maize (*Zea mays* L.) cultivation. Means of the three replications per each strain. No common letters indicates significant differences for SNK parametric test for $p < 0.05$ between treatments. In each treatment is indicated the standard deviation of the mean. $Es_x = 0.091801$.

conform to adverse environmental conditions. It is also important because it increases the access to resources and niches that require critical mass and cannot be used effectively by isolated cells. The acquisition of new genetic traits, nutrients availability and metabolic cooperation are also suggested as a means that allowed optimizing the survival of the population in the biofilm (Anderson and O'Toole 2008). Another advantage of biofilms is that they protect the plant against pathogens and abiotic stress (Timmusk *et al.* 2009).

Taking into account the obtained results, microscopic observations of biofilms formed in polystyrene plates by a high producing biofilm strain (EAM4) and a non-producer (RM9) (figure 4) were made. If it is compare with the control, there can be seen a cluster of cells, in which these are inoculated (B and C), which is different in both strains tested. In other bacteria, such as *Escherichia coli*, they have been determined different adhesion patterns, even in grouped strains as enterohemorrhagic (Wakimoto *et al.* 2004).

Se ha demostrado que el género *Bacillus* se encuentra entre las bacterias con capacidad para formar biopelículas que se usan en manejos de agroecosistemas.

La formación de biopelículas también es importante, ya que disminuye el riesgo de susceptibilidad de las bacterias que las conforman ante condiciones medioambientales adversas. También es importante porque aumenta el acceso a los recursos y a los nichos que requieren de masa crítica y no pueden utilizarse eficazmente por células aisladas. La adquisición de nuevos rasgos genéticos, la disponibilidad de nutrientes y la cooperación metabólica también se sugieren como medios que permiten optimizar la supervivencia de la población en la biopelícula (Anderson y O'Toole 2008). Otra ventaja de las biopelículas es que protegen la planta contra los patógenos y el estrés abiótico (Timmusk *et al.* 2009).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se hicieron observaciones microscópicas de las biopelículas formadas en placas de poliestireno por una cepa altamente productora de biopelícula (EAM4) y una no productora (RM9) (figura 4). Si se compara con el control, se puede observar que existe un agrupamiento de las células, en

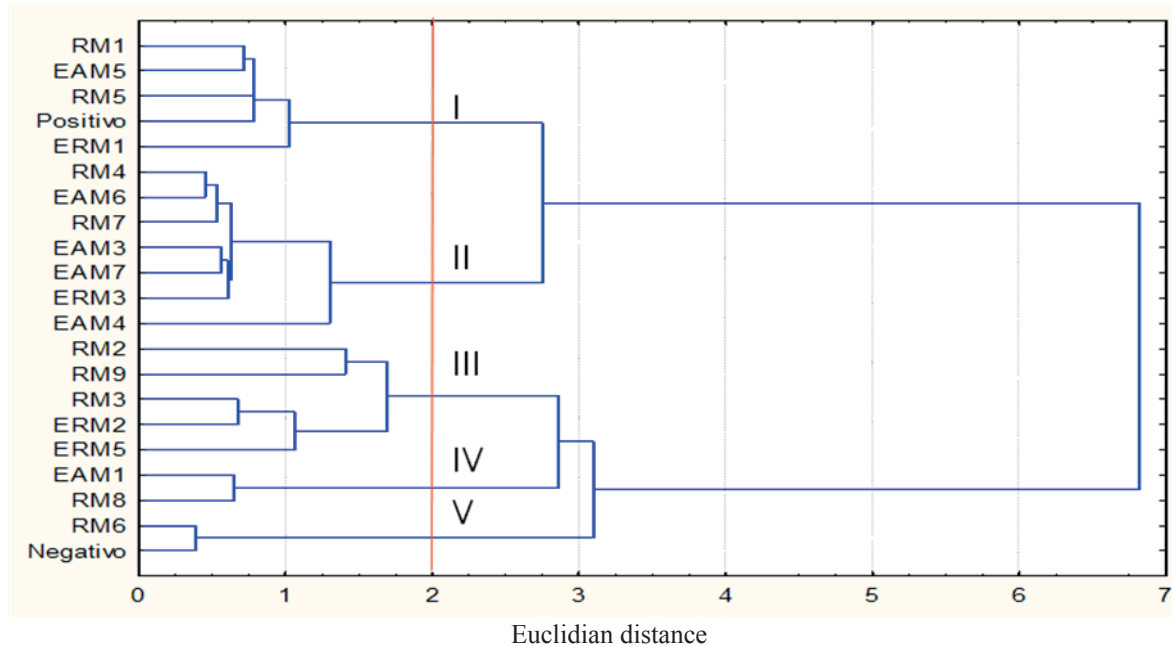


Figure 4. Grouping of the strains achieved from maize cultivation in accordance with the ability of produce auxins and solubilize phosphates. Dendrogram calculated from the values obtained in the experiment. The positive control consists on the highest values in each of the experiments and the negative control by the lowest.

Bacterial interactions, growth and biofilms formation on the surface of the root involve complex mechanisms. The interaction between the roots and surrounding microorganisms form a single self-regulating complex system (Beauregard *et al.* 2013).

Biofilms formation is very beneficial for plants and to microorganisms associated with them, therefore it is a characteristic to consider if it were to produce a biofertilizer with the isolates obtained from this crop. Most of the plant-bacterium associations involve the physical interaction between bacteria and plant tissues. Direct observations of bacteria adhered to surfaces of plants have revealed variables multicellular associations, described as micro-colonies, aggregates and cell clusters (Beauregard *et al.* 2013). These multi-cellular structures exhibit many of the attributes that define the biofilms, groups of cells embedded in an exopolysaccharides matrix (EPS) on a solid surface.

In biocontrol agents, as *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, is associated the regulation of biofilms formation with the growth inhibition of *Fusarium oxysporum* in the cucumber rhizosphere (Xu *et al.* 2014).

The exopolysaccharides production is important in biofilms formation and also can contribute to the interaction of bacteria with roots and root accessories (Bogino *et al.* 2013).

Taking into account the values obtained in the experiments, a cluster analysis was carried out, which took as positive values the higher values of each of the capacities (in this case IAA production and phosphates

el que estas se encuentran inoculadas (B y C), que es diferente en ambas cepas probadas. En otras bacterias, como *Escherichia coli*, se han determinado diferentes patrones de adherencia, incluso en cepas agrupadas como enterohemorrágicas (Wakimoto *et al.* 2004).

Las interacciones bacterianas, el crecimiento y la formación de biopelículas en la superficie de la raíz involucran complejos mecanismos. La interacción entre las raíces y los microorganismos circundantes constituyen un único sistema complejo autorregulado (Beauregard *et al.* 2013).

La formación de biopelículas es muy beneficiosa para las plantas como para los microorganismos asociados a ellas, por lo tanto es una característica más a tener en cuenta si se fuera a producir un biofertilizante con los aislados obtenidos a partir de este cultivo. La mayoría de las asociaciones planta-bacteria supone la interacción física entre las bacterias y los tejidos de la planta. Observaciones directas de bacterias adheridas a las superficies de las plantas han revelado asociaciones multicelulares variables, descritas como microcolonias, agregados y racimos celulares (Beauregard *et al.* 2013). Estas estructuras multicelulares exhiben muchos de los atributos que definen a la biopelícula, grupos de células embebidas dentro de una matriz de exopolisacáridos (EPS) en una superficie sólida.

En agentes de biocontrol, como *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, está asociada la regulación de la formación de biopelículas con la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en la rizosfera del pepino (Xu *et al.* 2014).

La producción de exopolisacáridos es importante en la formación de biopelículas e igualmente puede contribuir a la interacción de bacterias con las raíces y

solubilization) and as negative, the lowers. A cut at 20 % of the Euclidean distance (figure 4) was performed.

Jointly with the positive value, a group (I) was formed, in which RM1, EAM5, RM5 and ERM1 strains are included. These are strains that have the highest values in all analyzed capacities, so that may state that are the most promising for the promotion of crop growth. It is valid to note that RM5 exactly coincide with the positive value, which might suggest that it is the most promising.

There are three groups with intermediate values (II, III and IV). Group II includes EAM1 and RM8 strains. In group III, they are RM2, RM9, RM3, ERM2 and ERM5 and in group IV are grouped the strains RM4, EAM6, RM7, EAM3, EAM7, ERM3 and EAM4. In addition, a group (V) is obtained where only RM6 strain and the negative value are joining.

In this research 19 new *Bacillus* isolates were obtained from maize cultivation, root endophytes and of the aerial part, as rhizosphere. It was shown that all obtained strains have the ability to produce auxins and grow in nitrogen-free media. Nine of them solubilize phosphates, indicating their potential to promote plant growth. Fifteen strains form biofilms, which you may confer advantages in the plant colonization, important aspect for the future effectiveness of a bio-product. The RM1, EAM5, RM5 and ERM1 strains are the most promising for promoting plant growth in corn cultivation.

Acknowledgments

We thank to the Programa Nacional de Alimento Humano of CITMA in Cuba, to finance part of this research. Also, to Daysi Lugo Moya for her technical support in the development of experiments.

accesorios de la raíz (Bogino *et al.* 2013).

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en los experimentos, se realizó un análisis de conglomerado, que tomó como valores positivos los mayores valores de cada una de las capacidades (en este caso producción de AIA y la solubilización de fosfatos) y como negativos, los menores. Se realizó un corte a 20 % de la distancia euclidiana (figura 4).

Conjuntamente con el valor positivo, se formó un grupo (I), en el que se incluyen las cepas RM1, EAM5, RM5 y ERM1. Estas son cepas que presentan los mayores valores en todas las capacidades analizadas, por lo que se puede plantear que son las más promisorias para la promoción del crecimiento del cultivo. Es válido señalar que RM5 coincide exactamente con el valor positivo, lo que pudiera hacer pensar que es la más promisorias.

Existen tres grupos con valores intermedios (II, III y IV). El grupo II incluye las cepas EAM1 y RM8. En el grupo III, se encuentran RM2, RM9, RM3, ERM2 y ERM5 y en el grupo IV se agrupan las cepas RM4, EAM6, RM7, EAM3, EAM7, ERM3 y EAM4. Además, se obtiene un grupo (V) donde solo se unen la cepa RM6 y el valor negativo.

En este trabajo se obtuvieron 19 nuevos aislados de *Bacillus* a partir del cultivo del maíz, endófitos de la raíz y de la parte aérea, como rizosféricos. Se demostró que todas las cepas obtenidas tienen la capacidad de producir auxinas y crecer en medio libre de nitrógeno. Nueve de ellas solubilizan fosfatos, lo que indica sus potencialidades para la promoción de crecimiento de las plantas. Quince cepas forman biopelículas, lo que le puede conferir ventajas en la colonización de la planta, aspecto importante para la futura efectividad de un bioproducto. Las cepas RM1, EAM5, RM5 y ERM1 son las más promisorias integralmente para la promoción del crecimiento vegetal en el cultivo del maíz.

Agradecimientos

Se agradece al Programa Nacional de Alimento Humano del CITMA, en Cuba, por financiar parte de esta investigación. También, a Daysi Lugo Moya por el apoyo técnico en el desarrollo de los experimentos.

References

- Ahemad, M. & Kibret, M. 2014. "Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective". *Journal of King Saud University - Science*, 26(1): 1–20, ISSN: 1018-3647, DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
- Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K. & Hasnain, S. 2009. "Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus spp.* and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.)". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3): 519–526, ISSN: 0959-3993, 1573-0972, DOI: 10.1007/s11274-008-9918-9.
- Anderson, G. G. & O'Toole, G. A. 2008. "Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms". In: Romeo, T. (ed.), Compans, R. W., Cooper, M. D., Honjo, T., Koprowski, H., Melchers, F., Oldstone, M. B. A., Olsnes, S. & Vogt, P. K. (ed. ser.), *Bacterial Biofilms*, vol. 322, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 85–105, ISBN: 978-3-540-75417-6, Available: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-75418-3_5>, [Consulted: September 6, 2016].
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., Passaglia, L. M. P. & Vargas, L. K. 2013. "Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth". *Applied Soil Ecology*, 63: 15–22, ISSN: 0929-1393, DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.09.001.
- Arshad, M. & Frankenberger, W. T. 1997. "Plant Growth-Regulating Substances in the Rhizosphere: Microbial Production and Functions". In: *Advances in Agronomy*, vol. 62, Elsevier, pp. 45–151, ISBN: 978-0-12-000762-2, Available: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065211308605672>>, [Consulted: September 6, 2016].
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R. & Kolter, R. 2013. "*Bacillus subtilis* biofilm induction by plant

- polysaccharides". Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(17): 1621–1630, ISSN: 0027-8424, 1091-6490, DOI: 10.1073/pnas.1218984110.
- Bishnoi, U. 2015. "PGPR Interaction: An Ecofriendly Approach Promoting the Sustainable Agriculture System". In: Advances in Botanical Research, vol. 75, Elsevier, pp. 81–113, ISBN: 978-0-12-420116-3, Available: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065229615000671>>, [Consulted: September 6, 2016].
- Bogino, P., Oliva, M., Sorroche, F. & Giordano, W. 2013. "The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations". International Journal of Molecular Sciences, 14(8): 15838–15859, ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms140815838.
- Cairns, L. S., Hobbey, L. & Stanley-Wall, N. R. 2014. "Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms". Molecular Microbiology, 93(4): 587–598, ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1111/mmi.12697.
- Claus, D. & Berkeley, R. C. W. 1986. "Genus *Bacillus* Cohn 1872". In: Bergey, D. H., Sneath, P. H. A. & Holt, J. G. (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 1105–1139, OCLC: 15105585.
- de Araujo, F. F., Souza, E. C., Guerreiro, R. T., Guaberto, L. M. & de Araújo, A. S. F. 2011. "Diversity and growth-promoting activities of *Bacillus* sp. in maize". Revista Caatinga, 25(1): 1–7, ISSN: 1983-2125.
- de Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Beschoren, da C. P., Meyer, J., Vargas, L. K., Schoenfeld, R. & Passaglia, L. M. P. 2013. "The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields". Plant and Soil, 366(1–2): 585–603, ISSN: 0032-079X, 1573-5036, DOI: 10.1007/s11104-012-1430-1.
- Fontes, F. J. E., Gomes, E. A., Teixeira, G. C., Gomes, de P. L. U., Teixeira, M. A., Corrêa, L. G. V. & Bressan, W. 2009. "Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.)". Brazilian Journal of Microbiology, 40(3): 522–534, ISSN: 1517-8382, DOI: 10.1590/S1517-83822009000300014.
- Fuentes, R. L. E. & Caballero, M. J. 2006. "Bacterial Biofertilizers". In: Siddiqui, Z. A. (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 143–172, ISBN: 978-1-4020-4002-3, Available: <http://link.springer.com/10.1007/1-4020-4152-7_5>, [Consulted: September 6, 2016].
- Glick, B. R. 2014. "Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world". Microbiological Research, 169(1): 30–39, ISSN: 0944-5013, DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.009.
- Glickmann, E. & Dessaux, Y. 1995. "A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria". Applied and Environmental Microbiology, 61(2): 793–796, ISSN: 0099-2240, 1098-5336, PMID: 16534942.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K. & Singh, V. 2015. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture". Journal of Microbial & Biochemical Technology, 7(2): 96–102, ISSN: 1948-5948, DOI: 10.4172/1948-5948.1000188.
- Hernández, A., Caballero, A., Pazos, M., Ramirez, R. & Heydrich, M. 2003. "Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en diferentes suelos de Cuba". Revista Colombiana de Biotecnología, 5(1): 45–55, ISSN: 0123-3475.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p., ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Hsueh, Y. H., Somers, E. B., Lereclus, D. & Wong, A. C. L. 2006. "Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator". Applied and Environmental Microbiology, 72(7): 5089–5092, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00573-06.
- Jorgensen, J. H. 1993. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 5th ed., vol. 23, Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 32 p., ISBN: 978-1-56238-208-7, no. 24, OCLC: 31137295.
- Kumar, A., Choudhary, C. S., Paswan, D., Kumar, B. & Arun, A. 2014. "Sustainable way for enhancing phosphorus efficiency in agricultural soils through phosphate solubilizing microbes". An Asian Journal of Soil Science, 9(2): 300–310, ISSN: 0973-4775, 0976-7231, DOI: 10.15740/HAS/AJSS/9.2/300-310.
- Kundsen, D. & Beegle, D. 1988. "Recommended phosphorous tests". In: Dahnke, W. C. (ed.), Recommended chemical soil test procedures for the North Central Region, (ser. North central regional publication, no. ser. 21), Fargo, ND: ND Agricultural Experiment Station, North Dakota State University, pp. 12–15, OCLC: 20293486.
- López, N., Chicco, C. F. & Godoy, S. 2003. "Valor nutritivo del afrecho y germen desgrasado de maíz en la alimentación de cerdos". Zootecnia Tropical, 21(3): 219–236, ISSN: 0798-7269.
- Maresca, S., Santini, F. J. & Elizalde, J. C. 2002. "Comportamiento productivo de terneras alimentadas a corral con grano de maíz entero y partido". Revista Argentina de Producción Animal, 22(supl. 1): 163–168, ISSN: 0326-0550, 2314-324X.
- Mishra, B. K., Singh, B., Singh, P., Rathore, S. S., Aishwath, O. P., Kant, K. & Dubey, P. N. 2015. "Isolation and evaluation of phosphate solubilizing microorganisms from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) rhizospheric soils of Rajasthan". International Journal of Seed Spices, 5(1): 71–75, ISSN: 0019-5022.
- Molina, R. D., Bustillos, C. M. del R., Rodríguez, A. O., Morales, G. Y. E., Santiago, S. Y., Castañeda, L. M. & Muñoz, R. J. 2015. "Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico". Biológicas, 17(2): 24–34, ISSN: 2007-705X.
- Nautiyal, C. S. 1999. "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms". FEMS Microbiology Letters, 170(1): 265–270, ISSN: 0378-1097, 1574-6968, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
- Ortiz, C. R., Contreras, C. H. A., Macías, R. L. & López, B. J. 2009. "The role of microbial signals in plant growth and development". Plant Signaling & Behavior, 4(8): 701–712, ISSN: 1559-2324, DOI: 10.4161/psb.4.8.9047.
- Paliwal, B. L., Granados, G., Laffite, H. R. & Violic, A. D. 2001. El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Roma,

- Italia: FAO, 394 p., ISBN: 978-92-5-304457-3, Google-Books-ID: os79dx6BcmsC, Available: <https://books.google.com/cu/books?hl=es&lr=&id=os79dx6BcmsC&oi=fnd&pg=PA345&dq=El+ma%C3%ADz+en+los+tr%C3%B3picos:+Mejoramien+to+y+producci%C3%B3&ots=OZWCPHkU1d&sig=n10zNncC6XJL9glif4ayiPnJyO0&redir_esc=y#v=onepage&q=El%20ma%C3%ADz%20en%20los%20tr%C3%B3picos%3A%20Mejoramiento%20y%20producci%C3%B3&f=false>, [Consulted: September 6, 2016].
- Rózycki, H., Dahm, H., Strzelczyk, E. & Li, C. Y. 1999. "Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.)". *Applied Soil Ecology*, 12(3): 239–250, ISSN: 0929-1393, DOI: 10.1016/S0929-1393(99)00008-6.
- Saharan, B. S. & Nehra, V. 2011. "Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review". *Life Sciences and Medicine Research*, 21: 1–30, ISSN: 1948-7886.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y diseño experimental*. Ministerio de Educación Superior, 734 p., OCLC: 633780253, Available: <https://books.google.com/cu/books/about/Biometr%C3%ADa_y_dise%C3%B1o_experimental.html?id=cUbvXwAACAAJ&redir_esc=y>, [Consulted: September 6, 2016].
- StatSoft 2007. *STATISTICA (data analysis software system)*. version 8.0, [Windows], US: StatSoft, Inc., Available: <<http://www.statsoft.com>>.
- Swain, M. R., Naskar, S. K. & Ray, R. C. 2007. "Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora". *Polish Journal of Microbiology*, 56(2): 103–110, ISSN: 1733-1331.
- Timmusk, S., van West, P., Gow, N. A. R. & Paul Huffstutler, R. 2009. "*Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*". *Journal of Applied Microbiology*, 106(5): 1473–1481, ISSN: 1364-5072, 1365-2672, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04123.x.
- Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J. P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M. & Kawano, Y. 2004. "Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5): 687–690, ISSN: 0002-9637, PMID: 15569806.
- Wu, X. Y., Walker, M. J., Hornitzky, M. & Chin, J. 2006. "Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance". *Journal of Microbiological Methods*, 64(1): 107–119, ISSN: 0167-7012, DOI: 10.1016/j.mimet.2005.04.021.
- Xu, Z., Zhang, R., Wang, D., Qiu, M., Feng, H., Zhang, N. & Shen, Q. 2014. "Enhanced Control of Cucumber Wilt Disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by Altering the Regulation of Its DegU Phosphorylation". *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9): 2941–2950, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.03943-13.
- Yu, J., Yu, Z. H., Fan, G. Q., Wang, G. H. & Liu, X. B. 2016. "Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid Producing Root Endophytic Bacteria and Their Potential for Promoting Crop Growth". *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18: 1381–1391, ISSN: 1680-7073.

Received: July 7, 2016