

Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos

Berto Tejera-Hernández, Marcia M. Rojas-Badía y Mayra Heydrich-Pérez.

Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 No. 455 entre calles J e I, El Vedado, La Habana, Cuba.

Recibido: 22 de noviembre de 2010

Aceptado: 7 de abril de 2011

Palabras clave: *Bacillus*, interacción planta-microorganismo, promoción del crecimiento vegetal, control biológico.
Key words: *Bacillus*, plant-microbe interaction, plant growth promotion, biological control.

RESUMEN. El presente trabajo es una revisión sobre el género *Bacillus*. Este género se encuentra ampliamente distribuido en diversos ambientes como agua y suelo debido a su amplia versatilidad metabólica y la presencia de una estructura de resistencia: la endospora. La identificación de las especies de este género, mediante las técnicas convencionales es muy compleja y su taxonomía se ha revolucionado debido a la introducción de las técnicas moleculares. Actualmente, se informan más de 100 especies dentro de este género. El género *Bacillus* y otros relacionados, se han aislado de numerosos cultivos de interés económico. En este trabajo, se muestran sus potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos. Se han demostrado diferentes capacidades de *Bacillus* en asociación a plantas como la producción de fitohormonas como las auxinas, el control biológico mediado por la producción de antibióticos, sideróforos y enzimas líticas, la solubilización de fosfatos y la fijación del nitrógeno. Por otra parte, se expone el riesgo asociado a su uso en la agricultura como biofertilizantes y los diferentes marcadores de patogenicidad que pueden ser utilizados para la detección de determinantes genéticos asociados a la virulencia en el género *Bacillus*. Se exponen los estudios realizados que demuestran el efecto de especies de este género en diferentes cultivos de interés económico.

ABSTRACT. At the present work, the state-of-the-art about the potentialities of genus *Bacillus* in the plant growth promotion and biological control is presented. This genus is widely distributed in many environments such as water and soil, including extreme environments. The ubiquity of these bacteria is due to the wide metabolic versatility and the presence of a resistance structure, the endospore. The identification of the species of *Bacillus* is very difficult using traditional techniques but their taxonomy has been changed with the introduction of molecular techniques. The classification of Gram positive endospore forming bacilli change each day. Currently more than 100 species have been reported to this genus. The genus *Bacillus* and their relatives have been isolated from numerous economical important crops. This work shows the potentiality of *Bacillus* in the plant growth promotion and biological control of phytopathogenic fungi. Several capabilities have been demonstrated to Bacilli in associations with plants, such as the fitohormones production as auxins, biological control through antibiotics, siderophores and lytic enzymes production, phosphate solubilization and nitrogen fixation. On the other hand, the risk associated to its use in agriculture as biofertilizers and the different pathogenic markers which can be used in the study of *Bacillus* genus will be exposed. The studies about the effect of these species in different crops are exposed in the work.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias Gram positivas formadoras de endospora se agrupan en el género *Bacillus* y otros géneros relacionados, recientemente separados taxonómicamente. Estos microorganismos se han estudiado desde hace muchos años con fines industriales y agrícolas.¹

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en los más diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y en

suelo, y sus especies están muchas veces asociadas a plantas. En este último caso, se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos² y la fijación biológica del nitrógeno.³ En este sentido, se han realizado estudios de promoción del crecimiento vegetal⁴ y control biológico de patógenos,⁵ buscando estrategias que permitan la disminución del uso de fertilizantes químicos, que no solo encarecen la

Correspondencia:

Dra. Marcia M. Rojas Badía

Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 No. 455 entre calles J e I, El Vedado, La Habana, Cuba. Correo electrónico: marcia@fbio.uh.cu

producción, sino también, traen consigo un impacto negativo sobre el medio ambiente.⁶

El estudio integral de estas bacterias permitiría su utilización en diversas esferas, fundamentalmente en la agricultura, por lo que en el presente trabajo, se abordan los principales aspectos estudiados hasta el momento en el género *Bacillus*, así como sus potencialidades para ser utilizados en la Biotecnología Agrícola.

GÉNERO *BACILLUS*. CLASIFICACIÓN ACTUAL

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Cohn⁷ y comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. Incluye más de 100 especies⁸ y sus miembros se consideran ubicuos. En una etapa temprana de la clasificación de las especies del género *Bacillus* se tienen en cuenta dos características fundamentales: el crecimiento aerobio, la respuesta positiva a la tinción de Gram, la forma bacilar y la formación de endospora. Esto hace que exista una gran cantidad de especies de este género ocupando una gran variedad de hábitats. Debido a esto, la heterogeneidad en la fisiología, ecología y la genética dificulta la clasificación del género o la generalización sobre este.⁹

Sobre la base de estudios moleculares de la secuencia del RNAr 16S, este género se ha subdividido en cuatro grupos. El primero pertenece a *Bacillus sensu stricto* en el cual se incluye *Bacillus subtilis* y otras 27 especies.¹⁰ El segundo, también conocido como *sensu lato*, incluye bacilos formadores de esporas redondeadas, en el que se destacan las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* y unidos a estos se encuentran algunos taxos asporógenos como *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurtia* y *Planococcus* debido a que presentan cierta similitud con *Bacillus subtilis*.¹¹ Por su parte, el grupo 3 está formado por 10 representantes, dentro de los que se encuentra *B. polymyxa* y *B. macerans*, los cuales se han reclasificado en un nuevo género, *Paenibacillus*.¹² El grupo 4, se encuentra formado por especies que han sido reclasificadas en dos nuevos géneros *Aneuribacillus* y *Brevibacillus*.¹³ Por otra parte, se ha creado un nuevo género (*Virgibacillus*) en el que se ubicó la especie *B. panthotenicus*.¹⁴ Finalmente, se han descrito nuevas especies del género aisladas de diversos ecosistemas que incluyen a *B. mojavensis* y *B. vallismortis*,¹⁵ *B. ehimensis* y *B. chitinolyticus*,¹⁶ *B. infernus*,¹⁷ *B. carboniphilus*¹⁸ y *B. horti*.¹⁹

Principales características

Este género comprende una amplia diversidad de tipos fisiológicos, donde se destacan características como la degradación de la mayoría de los sustratos derivados de plantas y animales, incluyendo celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos y otros; además su capacidad para la producción de antibióticos, la nitrificación, la desnitrificación, la fijación de nitrógeno, la litotrofia facultativa, la acidofilia, la alcalofilia, la psicofilia, la termofilia y el parasitismo, ejemplifican su capacidad de sobrevivir en diversos ambientes.²⁰ Los miembros de este género se caracterizan por ser Gram positivos, de forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y formadores de endosporas.²¹

Su ciclo de vida se divide en dos fases: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante el primer estado, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un medio donde las condiciones son favorables. Cuando los nutrientes comienzan a escasear, la bacteria esporula, formando una endospora, la cual puede permanecer viable en el ambiente por largos periodos de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables

para volver a su forma vegetativa. También se ha visto que existe una gran distribución de estas endosporas, estructura que les permite sobrevivir en condiciones extremas de temperatura desecación, pH entre otros.²²

AISLAMIENTOS DEL GÉNERO DE HÁBITATS NATURALES

La presencia de endosporas bacterianas constituye una estructura de resistencia que puede permanecer viable durante una gran cantidad de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para el desarrollo de la forma vegetativa. Esto justifica la gran cantidad de especies de este género que se encuentran en una gran variedad de hábitats.⁹

Estas bacterias se han aislado a partir de una amplia variedad de ambientes acuáticos y terrestres, como ecosistemas dulceacuícolas,²³ aguas^{24,25} y sedimentos marinos,^{26,27} incluso en ambientes con condiciones extremas tales como polvo,²⁸ sedimentos marinos²⁹ y hasta lagos con elevadas concentraciones de cloruro de sodio,³⁰ entre otros. También existen cepas muy virulentas en las especies *B. anthracis* y *B. cereus* que se han encontrado asociadas al ser humano y algunos animales.³¹

Principales especies del género presentes en suelo asociadas a plantas

El suelo constituye el sustrato en el que la mayor variedad de microorganismos se pueda encontrar. Esto se justifica por la presencia de elevadas concentraciones de nutrientes que existen en él. Los géneros más comunes encontrados en ecosistemas terrestres son *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus*, entre otros.³² Este último comprende una amplia variedad de especies que se encuentran en muchas ocasiones, asociadas a las plantas, ejerciendo un efecto positivo sobre el crecimiento a través de una serie de mecanismos que involucran la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos.³³

Los miembros de este género, se han aislado de numerosos cultivos de interés económico como la caña de azúcar,³⁴ el algodón,³⁵ el trigo,³⁶ el maíz,³⁷ la papa³⁸ y el arroz.^{39,40}

Dentro de las especies que se pueden aislar de forma más frecuente asociadas a las plantas, ya sea la rizosfera o los tejidos internos, se destacan *B. subtilis*,⁴¹ *B. megaterium*,⁴² *B. licheniformis*,⁴³ *B. circulans*⁴⁴ y *B. cereus*.^{45,46} Se han descrito diferentes potencialidades en cepas de este género para promover el crecimiento de las plantas (Tabla 1), aunque sin dudas, se ha estudiado más profundamente la capacidad de ejercer efecto antagónico contra una gran variedad de hongos fitopatógenos.

MECANISMOS DE ACCIÓN DEL GÉNERO *BACILLUS* EN BENEFICIO DE LAS PLANTAS

La promoción del crecimiento vegetal por parte de las especies del género *Bacillus* puede ocurrir de forma directa o indirecta. Un efecto directo sobre la promoción del crecimiento vegetal se observa en bacterias rizosféricas que tienen la capacidad de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de minerales como el fósforo y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Por su parte, la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con la producción de sustancias que actúan como antagonistas de patógenos o induciendo resistencia en las plantas.⁵¹

Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias orgánicas naturales o sintéticas que en peque-

Tabla 1. Aislamientos de especies del género *Bacillus* de diferentes cultivos de interés económico y sus potencialidades para promover el crecimiento o el control biológico de hongos patógenos.

Origen	Zona	Especie	Actividad de interés agrícola	Referencia
Alfalfa	Rizosfera	<i>B. cereus</i>	Antagonismo contra <i>Phytophthora megasperma</i> .	Handelsman <i>et al.</i> , 1990 ⁴⁵
Arroz	Rizosfera	<i>Bacillus pocheonensis</i> <i>Bacillus</i> sp.	Producción de ácido indolacético, solubilización de fosfatos.	Beneduzi <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁷
		<i>Bacillus</i> sp.	Antagonismo contra <i>Alternaria</i> sp., <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Pyricularia oryzae</i> , producción de sideróforos.	Chaiharn <i>et al.</i> , 2009 ⁴⁸
		<i>Bacillus</i> spp.	Producción de ácido indolacético, solubilización de fosfatos.	Rojas <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁰
Aguacate	rizoplano	<i>B. subtilis</i>	Antagonismo contra <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , producción de enzimas hidrolíticas y lipopéptidos.	Carzola <i>et al.</i> , 2007 ⁴¹
Hierbas de pastos	Rizosfera	<i>Bacillus</i> sp.	Solubilización de fosfatos.	Souchie <i>et al.</i> , 2006 ⁴⁹
Café	Rizosfera	<i>B. subtilis</i>	Antagonismo contra <i>Fusarium stilboides</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. xylarioides</i> , producción de lipasas, proteasas, β -1,3-glucanasa.	Muleta <i>et al.</i> , 2007 ⁵⁰
Soya	Rizosfera	<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. cereus</i>	Antagonismo contra <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y <i>Pythium ultimum</i> . Producción de quitinasas, celulasas, proteasas, auxinas.	León <i>et al.</i> , 2009 ⁴⁶
Manzana	Rizosfera	<i>B. circulans</i>	Solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético, sideróforos, inhibición del crecimiento de hongos.	Metha <i>et al.</i> , 2010 ⁴⁴

ñas concentraciones influyen sobre el metabolismo de las plantas, lo que trae consigo variaciones en su crecimiento y desarrollo, tanto por inhibición como por promoción.⁵²

Dentro de los reguladores del crecimiento vegetal se encuentran las fitohormonas, formadas por un grupo de sustancias con actividad biológica que actúan sobre una determinada parte de la planta causando un efecto de crecimiento específico o de diferenciación.⁵³ Entre ellas, se pueden encontrar auxinas, giberelinas y citoquininas.

En el caso del género *Bacillus*, se ha demostrado la producción de fitohormonas por las especies *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* en la rizosfera de la planta *Alnus glutinosa*.³³ Por otra parte se ha informado la producción de este tipo de metabolitos en *Bacillus subtilis* aislados de la planta *Dioscorea rotundata* L. en la que ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento vegetal.⁵⁴

En el laboratorio de los autores, se ha demostrado la capacidad de cepas de *Bacillus* spp. asociadas al cultivo del arroz para producir auxinas mediante el método colorimétrico de Salkowski, cuyos resultados varían entre los 1 y 17 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabla 2).⁴⁰ La producción de este tipo de metabolito podría estar involucrada en la estimulación del crecimiento de las plantas de arroz.

Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los nutrientes limitantes del crecimiento de las plantas. Dentro de las funciones que se le han atribuido, se encuentran la captación, almacenamiento y transferencia de energía, además de formar parte de macromoléculas tales como, ácidos nucleicos y fosfolípidos presentes en la membrana citoplasmática. Una gran cantidad de fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son inmovilizados después de su aplicación, permaneciendo de forma inaccesible para la planta.⁵⁵ Esto permite predecir que aquellos microorganismos que colonicen la raíz de estas plantas y que tengan la capacidad de solubilizar este fósforo, como por ejemplo, bacterias de los géneros *Bacillus* y *Enterobacter*, actúen como promotores del crecimiento vegetal.⁴⁹

El género *Bacillus* es uno de los más estudiados respecto a esta capacidad y dentro de él se destacan las especies *B. megaterium* y *B. subtilis* debido a que excretan al medio ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización,⁵⁶ aunque también pueden actuar enzimas como las fitasas.⁵⁷ En este sentido, Rudresh *et al.*⁵⁸ han determinado que *B. megaterium* subsp. *phosphaticum* constituye una especie promisoriosa en la que se han ob-

Tabla 2. Caracterización fisiológica y actividad antagonica de aislados de *Bacillus* asociados al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.).⁴⁰

Aislados de <i>Bacillus</i> spp.	Concentración de auxinas en medio TSB ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Diámetro de solubilización de fosfato inorgánico en medio NBRIP sólido (cm)	Antagonismo frente a <i>Pyricularia grisea</i> de inhibición en medio PDA sólido (%)	Antagonismo frente a <i>Alternaria solani</i> de inhibición en medio PDA sólido (%)	Antagonismo frente a <i>Curvularia</i> sp. de inhibición en medio PDA sólido (%)	Antagonismo frente a <i>Fusarium</i> sp. de inhibición en medio PDA sólido (%)
JRRB1	11,40	0,3	70,91	68,65	50,96	50,96
JRRB2	11,09	0	84,11	81,36	65,91	76,63
JRRB3	10,73	0,33	79,49	72,89	68,21	49,42
JRRB6	12,97	0,3	76,42	85,61	61,31	51,34
JRRB7	11,45	0,3	76,42	67,81	60,54	52,11
JRRB8	16,43	0	36,92	47,47	36,02	16,48
JRRB9	15,96	0	85,14	68,65	88,89	77,01
LSB3	2,47	0,3	83,6	73,73	69,73	63,61
LSB4	3,81	0,36	91,8	87,28	91,95	90,04
LSB6	1,39	0	87,69	80,52	90,42	81,23
LSB9	1,94	0,3	88,72	83,91	91,95	90,42
LSB10	3,00	0,3	86,67	85,61	91,95	88,89
LSB11	1,61	0,3	85,14	83,91	90,8	59,39

tenido elevados valores de eficiencia de solubilización de fosfatos inorgánicos *in vitro*.

Resultados obtenidos en el laboratorio de los autores han demostrado que nueve de 13 cepas probadas tienen la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos en medio de cultivo, lo que contribuiría a su efecto promotor del crecimiento de manera integral (Tabla 2).⁴⁰

Fijación biológica del nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico constituye, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera. Curiosamente, este proceso crucial solo pueden llevarlo a cabo unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariontes,⁵⁹ los cuales están distribuidos prácticamente en todas las ramas de bacterias y arqueas.⁶⁰

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso microbiano en el que el nitrógeno atmosférico se reduce a amonio y se incorpora a la biomasa, con lo que pasa a constituir la fuente principal de nitrógeno para las plantas.⁶¹ Este proceso se lleva a cabo por la enzima nitrogenasa, presente en todos los microorganismos fijadores del nitrógeno.⁶² Se estima que 175 millones de toneladas de nitrógeno por año se adicionan al suelo a través de la fijación biológica del nitrógeno⁶³ y se calcula que el 60 % del nitrógeno usado por las plantas proviene de la fijación biológica.⁶⁴ Teniendo en cuenta esto, se podría reducir considerablemente el uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura si se emplearan los microorganismos que puedan llevar a cabo esta función.⁶

El género *Bacillus* presenta una gran versatilidad metabólica y se ha demostrado su capacidad de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno.⁶⁵ Múltiples especies de *Bacillus* se han detectado en el suelo y en la rizosfera, sin embargo, no existen muchos

estudios respecto a la fijación biológica del nitrógeno por miembros de este género, los cuales desempeñan un papel importante desde el punto de vista ecológico,³⁹ la mayoría están dirigidos al género *Paenibacillus*, el cual no es analizado en este trabajo.

Se ha informado que algunas especies como *Bacillus fusiformis*, aislada de maíz, trigo y arroz, presentan una gran actividad nitrogenasa, lo que implica que sean buenos fijadores de dinitrógeno.⁶⁶ Se ha demostrado que la especie *Bacillus firmus* potencia la actividad nitrogenasa del diazotrofo *Klebsiella terrigena* E6, microorganismos aislados de la planta *Dactylus glomerata*. *B. firmus* podría proteger la nitrogenasa de *K. terrigena* del dioxígeno, ya que esta enzima se inactiva con las tensiones de dioxígeno que normalmente existen en la atmósfera, todo esto se puede traducir en un aumento de la cantidad de nitrógeno fijado por la planta por lo que se reduciría considerablemente el uso de fertilizantes nitrogenados de origen químico.⁶⁷ Por otra parte, se han formulado biopreparados a partir de *Rhizobium* y *Bacillus cereus*, en los que este último potencia la formación del nódulo por parte de *Rhizobium*, además de aumentar su actividad nitrogenasa, con lo que se podría incrementar considerablemente la producción de la leguminosa *Cajanus cajan* L.⁶⁸

En Cuba se han utilizado especies del género *Bacillus* en coinoculaciones con bacterias del género *Azospirillum* en plantas de soja. Estos trabajos han posibilitado un aumento en la actividad nitrogenasa, lo que estaría relacionado con un aumento en la fijación del nitrógeno atmosférico.⁶⁹

Control biológico de patógenos

Los microorganismos patógenos de plantas influyen de forma negativa sobre la producción de alimentos y la estabilidad de los ecosistemas. Debido a la intensificación de la producción agrícola, también ha aumentado

el uso de compuestos químicos como un método de protección de las cosechas, lo que ha incrementado efectos negativos como el desarrollo de cepas patógenas resistentes a estos compuestos, además del impacto ambiental que ellos ocasionan.⁷⁰ Por otra parte se ha observado que la aplicación de compuestos químicos en la agricultura es insuficiente para ejercer el control de patógenos en cultivos de importancia económica.⁷¹

En las últimas décadas, gran diversidad de microorganismos rizosféricos, se han descrito, caracterizado y en muchos casos probado en cuanto a su actividad como agentes de control biológico de patógenos de cultivos de importancia económica. Aprovechando las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como sideróforos, estos microorganismos ejercen su capacidad biocontroladora, lo que permite la reducción del uso de plaguicidas de origen químico, por lo que las producciones se hacen menos costosas y se disminuyen las afectaciones al medio ambiente.^{72,73} El género *Bacillus* es uno de los más explotados en este sentido dada su gran versatilidad metabólica y su amplia capacidad de producir metabolitos contra microorganismos patógenos.³³

En trabajos realizados en Cuba, se ha informado la capacidad que presentan cepas de *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus laterosporum* y *Paenibacillus polymyxa* como agentes de control biológico al ejercer efecto antagónico *in vitro* contra *Pectobacterium carotovorum*, agente causal de la pudrición blanda de la papa.⁷⁴

En cepas aisladas del cultivo del arroz en el laboratorio de los autores se ha demostrado *in vitro* la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que causan grandes pérdidas en este cultivo como es el caso de *Pyricularia grisea*, *Alternaria solani*, *Curvularia* sp. y *Fusarium* sp. Se destaca la inhibición del crecimiento fúngico de estos hongos fitopatógenos al enfrentarlos a los distintos aislados de especies pertenecientes al género *Bacillus*,⁴⁰ (Tabla 2) lo que está relacionado con la amplia versatilidad metabólica de estos microorganismos que les permite la producción de compuestos antifúngicos. La actividad antagónica contra una amplia variedad de microorganismos fitopatógenos es una ventaja de las cepas de este género que debe aprovecharse en función de la obtención de bioproductos, así como la diversidad de mecanismos que acción de estas bacterias, en los cuales se debe profundizar aún más. La determinación de los mecanismos involucrados en la actividad antagónica y la realización de experimentos PGPB-planta-patógeno contribuirían al uso de estos microorganismos en el control biológico de una amplia variedad de hongos fitopatógenos de cultivos de interés económico.

Producción de antibióticos

La producción de compuestos antimicrobianos es muy común entre las bacterias y los hongos. Estos compuestos son sintetizados y excretados con el objetivo de eliminar la competencia que pueda existir en su hábitat natural. En muchos sistemas de control biológico, uno o más antibióticos desempeñan un papel importante en la supresión de enfermedades. Además, se han realizado estudios moleculares que han sido efectivos para determinar esta capacidad presente en algunas bacterias, debido a la fácil obtención de mutantes defectivos en la producción de estos compuestos.⁷⁵

El género *Bacillus* ha sido estudiado ampliamente respecto a la producción de antibióticos. En este sentido, se ha informado que especies como *Bacillus subtilis* tienen la capacidad de producir una amplia variedad de

antibióticos, dentro de los que se encuentra la fengicina, con elevado potencial de aplicación en la industria-biofarmacéutica⁷⁶ y *Bacillus cereus* que tiene la capacidad de producir zwitermicina A, un antibiótico que no solo suprime el crecimiento de hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés agrícola, sino que también potencia la acción insecticida de las toxinas proteicas producidas por *B. thuringiensis*.⁷⁷

Producción de enzimas líticas

Una gran variedad de microorganismos producen enzimas de diferentes tipos que actúan contra otros microorganismos que están presentes en su hábitat. Entre ellas, se destacan las quitinasas, hidrolasas y proteasas que actúan fundamentalmente sobre los hongos. Estos hongos resultan en muchos casos fitopatógenos, lo que trae consigo grandes pérdidas en cultivos de importancia económica como el arroz,⁷⁸ sorgo,⁷⁹ y soya,⁸⁰ entre otros.

Se ha demostrado la producción de este tipo de metabolitos en *B. subtilis* y entre ellos, se destacan lipasas, proteasas y β glucanasas que actúan sobre el patógeno fúngico *Fusarium oxysporum*.³³ Por otra parte, también se ha informado la producción de quitinasas por parte de *Bacillus cereus*, lo que podría estar involucrado en el biocontrol de hongos fitopatógenos.⁸¹

Producción de sideróforos

El hierro es un elemento esencial en el crecimiento de los organismos. La escasez de este elemento en formas asimilables por los microorganismos en el suelo o en la superficie de las plantas, fomenta una gran competencia. Bajo condiciones limitantes de hierro (Fe^{3+}), el cual es muy insoluble, algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal producen sideróforos para competir por la adquisición de este elemento. Estos son compuestos de bajo peso molecular y solubles en disoluciones acuosas a pH neutro, que pueden ser fluorescentes o no.

Se ha propuesto un mecanismo de acción para el secuestro de hierro por parte de estos microorganismos. El mecanismo plantea que en condiciones de escasez de hierro, las bacterias producen y excretan los sideróforos, una vez que es secuestrado el hierro del medio, el complejo sideróforo-hierro es reconocido por receptores específicos de membrana y una vez dentro de la célula, se deposita en un sitio específico por un proceso que involucra un intercambio de ligandos que puede estar precedido o no por la reducción del hierro o por la hidrólisis del sideróforo.⁸²

La producción de este tipo de metabolito está mejor caracterizada en el género *Pseudomonas* aunque también, se ha visto que las especies del género *Bacillus* produce sideróforos, tal es el caso de la especie *Bacillus megaterium* en la que se ha descrito el sideróforo esquizokinen.⁸³ También se determinó la producción de los sideróforos bacilibactina, ácido itoico y ácido 2,3-dihidroxibenzoico por parte de la especie *B. subtilis*.^{84,85}

La presencia de este tipo de metabolito representaría una ventaja para estos microorganismos, ya que podrían adquirir el hierro proveniente del medio ambiente de una forma más fácil que el resto de los microorganismos. De esta forma, se podría aprovechar esta competencia para combatir las enfermedades en los cultivos de importancia económica producidas por microorganismos patógenos.

CONSIDERACIONES PARA LA UTILIZACIÓN DE BACILLUS EN BENEFICIO DE LOS CULTIVOS

Los miembros del género *Bacillus* desempeñan un papel dual en muchas actividades humanas. Por una

parte, especies como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*, se utilizan industrialmente en la producción de enzimas, antibióticos, disolventes y otras moléculas que podrían ser empleadas en la agricultura.¹ Otras especies como *B. thuringiensis* son utilizadas en la protección de las cosechas de diferentes cultivos,⁸⁶ por su capacidad de ser insecticidas naturales, mientras que *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal.⁸⁷ Por otra parte, algunas especies como *B. anthracis* y *B. cereus* son patógenos de los animales y los humanos.³¹ Debido a la capacidad de formación de endosporas, este tipo de microorganismo puede tolerar condiciones adversas mejor que las bacterias no esporuladas enteropatógenas y pueden proliferar en una amplia variedad de ambientes incluidos el agua y los alimentos.⁸⁸

La especie *Bacillus cereus* es una de las más importantes desde el punto de vista clínico debido a que tiene la capacidad de producir enterotoxinas, que se sintetizan durante el crecimiento vegetativo de esta especie en el intestino delgado humano en el que provocan diarreas, además de producir la toxina emética, causante de vómitos,⁸⁹ que también puede causar periodontitis y oftalmítis.⁹⁰ La especie se ha aislado de varios alimentos dentro de los que se encuentra la leche⁹¹ y se ha demostrado que la toxina responsable del síndrome emético resiste elevadas temperaturas, medios muy ácidos y no puede ser destruida por los jugos gástricos.⁹²

Otra de las especies patógenas de este género es *Bacillus anthracis*, agente causal del ántrax o carbunco. Los animales se infectan principalmente por contacto con esporas presentes en el suelo, donde estas pueden sobrevivir por largos períodos y el humano se infecta accidentalmente por contacto con aquellos. Si bien puede ser controlado por vacunación, el carbunco continúa siendo endémico en algunas áreas del mundo. Las cepas virulentas de *B. anthracis* producen toxinas y son capsuladas. Estas cepas poseen dos plasmidios relacionados con la virulencia, el pXO1, que codifica para las toxinas y el pXO2, que codifica para la cápsula.⁹⁰

A nivel molecular, *B. anthracis* es una de las bacterias más monomórficas que se conocen y hasta la fecha, los estudios epidemiológicos de este microorganismo se han visto limitados por la escasa disponibilidad de marcadores moleculares para distinguir los diferentes aislamientos o cepas. Los dos plasmidios antes mencionados son necesarios para la virulencia, por lo tanto, su presencia puede servir como una indicación de su patogenicidad.⁹³

Por otra parte, se ha determinado que la forma principal de adquisición de esta enfermedad es a través de la vía cutánea por el contacto con animales o personas infectados, aunque también puede penetrar al organismo por vía gastrointestinal, por la ingestión de carne de animales infectados o por la inhalación de las endosporas.⁸⁸

Otras especies de este género no son consideradas de importancia clínica, aunque también se ha informado ocasionalmente de su patogenicidad al ser humano,⁹⁴ dentro de estas especies se encuentra *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis*, los que han sido relacionados, eventualmente, con incidentes de enfermedades causadas por la ingestión de alimentos contaminados con estos microorganismos.⁹⁵

No obstante, hay marcadores de virulencia definidos como los mencionados plasmidios pOX1, pOX2 y el de la toxina emética que se pueden detectar en cepas potencialmente eficientes en la promoción del crecimiento vegetal y el control de patógenos, lo que garantiza de esta forma, el uso de cepas no patógenas al hombre y los animales en la Biotecnología Agrícola.

CONCLUSIONES

Sin dudas, se hace necesario estudiar las potencialidades de las bacterias en el mejoramiento de los cultivos de importancia económica y social.

En particular, el género *Bacillus* y otras bacterias Gram positivas, aerobias y esporógenas ofrecen grandes expectativas para ser aprovechadas en este sentido y se han demostrado sus potencialidades para promover el crecimiento de las plantas y el control biológico de patógenos. Teniendo en cuenta que este género ejerce un papel dual, beneficioso y perjudicial, es importante estudiar la presencia de marcadores de virulencia conocidos y caracterizados de los patógenos de este género y que constituyen, sin lugar a dudas, una limitación para la utilización comercial de las cepas bacterianas en la agricultura, pues a largo plazo podrían establecer intercambio genético con otras bacterias del suelo y producir daños en las poblaciones que utilicen estos cultivos en su alimentación.

Las especies del género *Bacillus* presentan ventajas para su utilización en la Biotecnología Agrícola como son la presencia de endosporas, la motilidad que le facilita la colonización de la planta, la capacidad de producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, sideróforos, solubilización de fosfatos y de sustancias responsables de su actividad antagonista e inhibidora, todo lo cual abre las perspectivas de su utilización en la agricultura sostenible con la consecuente preservación del medio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nelson M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. Crop Management, Plant Management Network. 2004. Consultado: 10 mayo 2010. Disponible en: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 2006;34:33-41.
- Ooi TC, Ariff, AB, Halimi MS, Shamsuddin ZH. Growth kinetics of diazotrophics *Bacillus sphaericus* UPMB cultured using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2008;4(2):15-25.
- Figueiredo MVB, Martinez CR. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24:1187-93.
- Yoon TM, Han JS, Yoo ID, Rajkarnikar A, Kim WG, Yang YY, et al. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. *sunhua*. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;99(1):213-21.
- Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech Advances*. 1998;16(4):729-70.
- Cohn F. Untersuchungen Über Bakterien. *Beitr Biol Pflanz*. 1872;1:127-224.
- Euzeby JP. List of Prokaryotic Names with standing nomenclature. 2006. Consultado: 20 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://www.bacterioCict.fr/index.html>.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9na Edition. Krieg NR, Holt J. (editores) Ed. Baltimore. London. Williams and Wilkins: 1994:p.1105-39.
- Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA. *Lett. Appl. Microbiol*. 1991;13:202-6.
- Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic interrelationship of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia* and *Planococcus*. *Int Syst Bacteriol*. 1994;44:74-82.

12. Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identifications of rRNA group bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993;64:253-60.
13. Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46:939-46.
14. Heyndrickx M, Lebbe L, Kersters K, De Vos P, Forsyth G, Logan NA. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48:99-106.
15. Roberts MS, Nakamora LK, Cohan FM. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequences, and differences in fatty acid composition. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1994;44(2):256-74.
16. Kuroshima KI, Sakane T, Takata R, Yokota A. *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolytic* members of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46():76-80.
17. Boone DR, Liu Y, Zhao ZJ, Balkwill DL, Drake GR, Stevens TO, et al. *Bacillus infernus* sp. nov. an Fe(III)-Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int Syst Bacteriol*. 1995;45:441-8.
18. Fujita T, Shida O, Takagi H, Kunugita K, Pankrushina AN, Matsuhashi M. Description of *Bacillus carboniphilus* sp. nov. *Int Syst Bacteriol*. 1996;46:116-8.
19. Yumoto I, Yamasaki K, Sawabe T, Nakano K, Kawasaki K, Ezura Y, et al. *Bacillus horti* sp. nov., a new Gram-positive alkaphilic: bacillus. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48:565-71.
20. Claus D, Berkeley RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.2. Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Baltimore: William and Wilkins. 1986:p.1105-39.
21. Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kasai H. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57:1846-50.
22. Backman PA, Wilson MA, Murphy JF. Bacteria for biological control of plant diseases. Environmentally safe approaches to crop disease control. 1997:p.95-109. New York, USA: Lewis Publishers.
23. Larrea J, Rojas M, Heydrich M, Lugo D. Aislamiento y caracterización de la comunidad bacteriana cultivable en el río Almendares. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2010;41 (Número Especial).
24. Alcaraz L, Olmedo G, Bonilla G, Cerritos R, Hernández G, Cruz A, et al. The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008;105(15):5803-8.
25. Ivanova IP, Vysotski MV, Svetashev V, Nedaskovskaya OL, Gorshkova NM, Mikhailkov VV, et al. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Internat Microbiol*. 1999;2:267-71.
26. Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl Envir Microbiol*. 2007;73(10):3272-82.
27. Sass AM, McKew BA, Sass H, Fitchel J, Timmis KN, McGenity TJ. Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline Systems*. 2008;4(8):1-11.
28. Venkateswaran K, Kempf M, Chen F, Satomi M, Nicholson W, Kern R. *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spores are radiation resistant. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(1):165-72.
29. Miranda AC, Martins OB, Clementino MM. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequencing lengths analysis. *Antoine van Leeuwenhoek*. 2008;(93):297-304
30. Lim JM, Jeon CO, Lee SM, Lee JC, Xu LH, Jiang CL, et al. *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:373-7.
31. Hoton F, Andrup L, Swiecicka I, Mahillon J. The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology*. 2005;151:2121-24.
32. Osorio NW. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev Fac Nal Agr Medellín*. 2007;60(1):3621-43.
33. Gutiérrez-Mañero FJ, Acero N, Lucas JA, Probanza A. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* L.) growth. Characterization and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil*. 1996;182:67-74.
34. Velázquez E, Rojas M, Lorite MJ, Rivas R, Zurdo-Piñeiro JL, Heydrich M, et al. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology*. 2008;48:118-24.
35. Reva ON, Smirnov VV, Petterson B, Priest FG. *Bacillus endophyticus* sp. nov. isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol*. 2002;52:101-7.
36. Beneduzi A, Peres D, Beschoren da Costa P, Bodanese MH, Pereira LM. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in Microbiology*. 2008;159:244-50.
37. Hernández A, Caballero A Pazos M, Ramírez R, Heydrich M. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) de diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2003;5(1):45-55.
38. Calvo P, Reymundo L, Zúñiga D. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*. 2008;7(1,2):141-48.
39. Trivedi P, Kumar B, Pandey A, Palni LMS. Plant Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C, editors. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Springer, 2007;p.291-9.
40. Rojas MM, Tejera B, Larrea JA, Heydrich, M. Caracterización de cepas del género *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa*). 4to Encuentro Internacional del Arroz, La Habana, 2008.
41. Cazorla FM, Romero D, Pérez-García A, Lugtenberg BJJ, de Vicente A, Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied of Microbiology*. 2007;103:1950-19.
42. Ali, B, Sabri AN, Ljung K, Shahida H. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* L. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2009;25(3):519-26.
43. Tendulkar SR, Saikumari YK, Patel V, Raghotama S, Munshi TK, Balaram P, Chattoo, BB. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103:2331-9.
44. Mehta P, Chauhan A, Mahajan R, Mahajan PK, Shirkot CK. Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. *Current Science*. 2010;98(4):538-42.
45. Handelsman J, Raffel S, Mester EH, Wunderlich L, Grau CR. Biological Control of Damping-Off of Alfalfa Seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environm. Microbiol*. 1990;56(3):713-8.
46. León M, Yaryura PM, Montecchia MS, Hernández AI, Correa OS, Pucheu NL, et al. Antifungal Activity of Selected Indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the Soybean Rhizosphere. 2009;p.1-9.
47. Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*. 2008;39:311-32.
48. Chaihar M, Chunhaleuchanon S, Lumyong S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25:1919-28.

49. Souchie EL, Saggin-Júnior OJ, Silva EMR, Campello EFC, Azcón R, Barea JM. Communities of P-Solubilizing Bacteria, Fungi and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2006;78(1):183-93.
50. Muleta D, Assefa F, Granhall U. *In vitro* Antagonism of Rhizobacteria Isolated from *Coffea arabica* L. against Emerging Fungal Coffee Pathogens. *Eng Life Sci*. 2007;7(6):577-86.
51. Choudhary DK, Bhavdish NJ. Interactions of *Bacillus* spp. and plants-UIT special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 2009;164:493-513.
52. Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*. 2003;26:189-99.
53. Nieto KF, Frankenberger WT. Microbial productions of cytokinins. *Soil Biochemistry*. 1990;6:191-248.
54. Swain MR, Naskar SK, Ray RC. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisettis by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol J Microbiol*. 2007;56(2):103-10.
55. Rengel Z, Marschner P. Nutrient availability in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist*. 2005;168:305-12.
56. Rajankar PN, Tambekar DH, Wate SR. Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Purna river basin. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 2007;3(6):701-3.
57. Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*. 2002;148:2097-109.
58. Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can J Microbiol*. 2005;51(3):217-22.
59. Boddey RM, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil*. 2003;252:139-49.
60. Young JPW. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing microorganism. En: Stacey G, Burris RH, Evans HJ (editores). *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall: 1992:p.43-86.
61. Morot-Gaudry JF. Nitrogen assimilation by plants. Physiological, biochemical and molecular aspects. Plymouth, RU: Science Publisher Inc: 2001.pp.343-368
62. Burris HR. Nitrogenases. *J Biol Chem*. 1991;266(15):9339-42.
63. Orhan E, Esitkien A, Ercisli S, Turan M, Sahin F. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hort*. 2006;111:38-43.
64. Baca BE, Soto-Urzuá L, Pardo MP. Fijación biológica del nitrógeno. *Elementos*. 2000;7:38-43.
65. Rozycki H, Dahm H, Strzelczyk E, CY Li. Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.). *Applied Soil Ecology*. 1999;12:239-50.
66. Park C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*. 2005;160(2):127-33.
67. Zlotnikov A, Shapovalov Y, Makarov A. Association of *Bacillus firmus* E3 and *Klebsiella terrigena* E6 with increased ability for nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*. 2001;33(11):1525-30.
68. Tilak K, Ranganayaki N, Manoharachari C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Soil Science*. 2006;57(1):67-71.
69. Fernández-Pascual M, Casas MA, Rubio C, Roldos J, Jerez F, Guach L, et al. Intercropping of coinoculated soybean and sugarcane productivity. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. 2002;38:440-4.
70. Gerhardson B. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol*. 2002;20:338-43.
71. Johri BN, Sharma A, Viridi JS. Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Adv Biochem Engg/Biotechnol*. 2003;84:49-89.
72. Neilands JB. Microbial iron compounds. *Rev Biochem*. 1981;50:715-31.
73. Leroux P. Modes of action of agrochemicals against plant pathogenic organisms. *CR Biol*. 2003;326:9-21.
74. Reinoso Y, Casadesus L, García A, Gutiérrez J, Pazos V. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del genero *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 2007;10(3):187-92.
75. Hu LB, Shi ZQ, Zhang T, Yang ZM. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS Microbiology Letters*. 2007;272:91-8.
76. Steller S, Vatter J. Purification of the fengycin synthetase from *Bacillus subtilis* b213. *J Chromatograph B*. 2000;737:267-75.
77. Emert EAB, Klimowicz AK, Thomas MG, Handelsman J. Genetic of Zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(1):104-13.
78. Álvarez E, Zamora NI, Escalona M. Comportamiento de variedades de arroz frente a *Pyricularia grisea* (Sacc.) en la provincia Granma. *Rev Protección Veg*. 2001;16(1):40-3.
79. Basha S, Ulaganathan K. Antagonism of *Bacillus* species (strains BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Sciences*. 2002;82(12):1457-63.
80. Reyes-Ramírez A, Escudero-Abarca BI, Aguilar-Uscanga G, Hayward-Jones PM, Barboza-Corona JE. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *Journal of Food Science*. 2004;69(5): 131-4.
81. Mabuchi N, Hashizume I, Araki Y. Characterization of chitinase excreted by *Bacillus cereus* CH. *Canadian Journal of Microbiology*. 2000;46(4):370-5.
82. Ardon O. Iron uptake in *Ustilago maydis*: tracking the iron path. *J Bacteriol*. 1998;180:2021-26.
83. Akers HA. Isolation of the siderophore schizokinen from soil of rice fields. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983;45(5):1704-6.
84. Dertz EA, Stintzi A, Raymond KN. Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Inorg Chem*. 2006;11(8):1087-97.
85. Ito T. Enzymatic determination of itoic acid, a *Bacillus subtilis* siderophore, and 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(7):2343-45.
86. Carreras B, Rodríguez D, Piedra F. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* Berliner para el control de *Heliothis virescens* Fabricius en el cultivo del tabaco en Cuba. *Fitosanidad*. 2009;13(4):277-80.
87. Adesemoye AO, Obini M, Ugoji EO. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008;39:423-6.
88. Granum PE. *Bacillus cereus*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2nd edition. Doyle MP (editor). Washington D.C: ASM Press: 2001:p.373-81.
89. Shinagawa K, Ueno Y, Hu D, Ueda S, Sugii S. Mouse lethal activity of a Hep-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *J Vet Med Sci*. 1996;58:1027-9.
90. Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: M.P Doyle (editor) *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York: 1989:p.21-70.
91. Rowan NJ, Deans K, Anderson JG, Gemmell CG, Hunter IS, Chaithong T. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:3873-81.
92. Spencer RC. *Bacillus anthracis*. *J Clin Pathol*. 2003;56:182-7.
93. Luna VA, King DS, Peak KK, Reeves F, Hebertin-Larson L, Veguilla W, et al. *Bacillus anthracis* virulent plasmids pX02 genes found in large plasmids of two other *Bacillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(7):2367-77.
94. From C, Pukall R, Schumann P, Hormazabal V, Granum PE. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:1178-83.
95. From C, Hormazabal V, Granum PE. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int. J. of Food Microbiol*. 2007;115:319-24.