

## **Promoción de crecimiento en trigo (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) por la co-inoculación de cepas nativas de *Bacillus* aisladas del Valle del Yaqui, México**

### **Growth promotion on wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) by co-inoculation of native *Bacillus* strains isolated from the Yaqui Valley, Mexico**

Jonathan Rojas Padilla<sup>1</sup>, Luis Abraham Chaparro Encinas<sup>1</sup>, Rosa Icela Robles Montoya<sup>1</sup>, Sergio de los Santos Villalobos<sup>1</sup>

**Palabras clave:** RPCV; producción sostenible; consorcio bacteriano; inoculante microbiano

**Keywords:** PGPR; sustainable production; bacterial consortium; microbial inoculant

---

#### **Resumen**

**Introducción:** Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) son un grupo de bacterias rizosféricas con la habilidad de promover el crecimiento y la salud de las plantas, y restaurar la fertilidad del suelo. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la promoción del crecimiento en el cultivo de trigo (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) por la co-inoculación de cepas nativas del género *Bacillus* aisladas del Valle del Yaqui, México, para su potencial uso como inoculante microbiano.

**Método:** Tres cepas bacterianas obtenidas de la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA), aisladas del cultivo de trigo en el Valle del Yaqui, fueron estudiadas. Primeramente, se realizó la identificación molecular de las cepas mediante la secuenciación del gen 16S RNAr, mediante la plataforma Sanger. Además, las cepas bacterianas fueron caracterizadas metabólicamente mediante actividades funcionales asociadas a la promoción del crecimiento vegetal (producción de indoles, solubilización de fósforo insoluble, y producción de sideróforos). Finalmente, el impacto de la inoculación de estas cepas individualmente, y en consorcios fue determinado utilizando el cultivo de trigo (*Triticum turgidum* L subsp. *durum*) como planta modelo, simulando las condiciones edafo-climáticas del Valle del Yaqui. Las variables morfométricas medidas fueron la longitud aérea y de raíz, peso seco aéreo y de raíz, e índice de biovolumen.

**Resultados:** Las cepas TRQ8, TRQ65 y TE3<sup>T</sup> fueron afiliadas taxonómicamente a *Bacillus megaterium*, *Bacillus paralicheniformis* y *Bacillus cabrialesii*, respectivamente; dicha clasificación fue soportada por sus características macro-microscópica como: su forma bacilar y tinción Gram positiva, que son características propias de este género bacteriano. Las cepas en

<sup>1</sup> Instituto Tecnológico de Sonora, Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano. E-mail: sergio.delossantos@itson.edu.mx

estudio tuvieron la capacidad de producir indoles, siendo *B. paralicheniformis* TRQ65 quien presentó mayor producción con 39.29 µg/mL. Mientras que en la prueba de solubilización de fósforo insoluble las 3 cepas mostraron la capacidad en un rango de índice de solubilización de 1.37 a 1.43; finalmente, solamente la cepa *B. megaterium* TRQ8 mostró un índice de producción de sideróforos de 8.17. La inoculación del consorcio *B. megaterium* TRQ8 + *B. paralicheniformis* TRQ65 mostró los mayores incrementos en las 5 variables medidas en la planta, diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) vs. el tratamiento no inoculado, la longitud aérea y radical mostró un incremento de 6 y 10% respectivamente, mientras que la biomasa seca aérea aumentó 60% y la biomasa seca radicular se incrementó en 82%. El índice de biovolumen se incrementó en 18% por la inoculación de dicho consorcio bacteriano.

**Discusión o Conclusión:** Las cepas estudiadas presentan características de promoción de crecimiento *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la co-inoculación de *B. megaterium* TRQ8 y *B. paralicheniformis* TRQ65 incrementó su capacidad de promoción del crecimiento en plantas de trigo. Por lo cual, los mecanismos asociados a dicho efecto, así como sus funciones ecológicas e interacción con los factores bióticos y abióticos de los agro-sistemas deben ser estudiadas para su validación en diferentes agroecosistemas, antes de su utilización extensiva como un inoculante microbiano.

## Abstract

**Introduction:** The rising demand for food worldwide required the development of sustainable production alternatives. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) is a group of rhizospheric bacteria with the ability to promote good plant health and growth, as well as to restore soil fertility. The objective of this study was to evaluate the growth promotion of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) plants, by co-inoculation of native *Bacillus* strains isolated from the Yaqui Valley, Mexico, for their potential use as a microbial inoculant.

**Methods:** Three bacterial strains obtained from the Collection of Edaphic Microorganisms and Native Endophytes (COLMENA), isolated from wheat commercial fields in the Yaqui Valley, were studied. First, the molecular identification of strains was performed by sequencing the 16S rRNA gene, by using the Sanger platform. In addition, bacterial strains were metabolically characterized by functional activities associated with the promotion of plant growth (production of indoles, solubilization of insoluble phosphorus, and production of siderophores). Finally, the

impact of the inoculation of these individual strains, and in consortia was determined in durum wheat (*Triticum turgidum* L subsp. *durum*), simulating the edaphoclimatic conditions of the Yaqui Valley. The morphometric variables measured were aerial and root length, aerial and root dry weight, and biovolume index.

**Results:** The strains TRQ8, TRQ65, and TE3<sup>T</sup> were taxonomically affiliated with *B. megaterium*, *B. paralicheniformis*, and *B. cabrialesii*, respectively. This classification was supported by its macro-microscopic characteristics such as its bacillary form and Gram-positive staining, which are characteristic of this bacterial genus. Those strains had the ability to produce indoles, strain *B. paralicheniformis* TRQ65 had the highest production with 39.29 µg/mL. All studied strains showed the ability to solubilize insoluble phosphorus, solubilization index ranged from 1.37 to 1.43. Finally, only *B. megaterium* TRQ8 showed a siderophore production index of 8.17. Inoculation of the *B. megaterium* TRQ8 + *B. paralicheniformis* TRQ65 consortium showed the greatest increases in the 5 variables measured, significant difference ( $p < 0.05$ ) vs. the un-inoculated treatment, aerial and radical length showed an increase of 6 and 10%, respectively, while aerial dry biomass increased 60%, and root dry weight increase 82%. This consortium showed an 18% higher biovolume index than the un-inoculated treatment.

**Discussion or Conclusion:** The strains studied showed growth promotion traits *in vitro* and *in vivo*. However, co-inoculation of these strains increased their ability to promote growth in wheat plants. Therefore, the mechanisms associated with this effect, as well as their ecological functions and interaction with the biotic and abiotic factors of agro-systems must be further studied for extensive use as a microbial inoculant.

---

## **Introducción**

La creciente demanda de alimentos a nivel mundial representa un desafío para los próximos 30 años, ya que el crecimiento acelerado de la población para el año 2050 ( $> 9 \times 10^9$  habitantes) demandará duplicar la producción de alimentos (Godfray H.C.J. *et al.*, 2010, p. 812). Entre los alimentos más importantes se encuentran los cereales, cuya producción deberá incrementarse a  $1 \times 10^6$  millones de toneladas anuales, para 2050 (United Nations, 2015, p. 66). Entre estos, el trigo es uno de los alimentos de mayor interés, debido a su aporte calórico y proteico, así como una fuente importante de micronutrientes (Poudel & Bhatta, 2017, p. 3).

La importancia de este cereal ha conducido a investigaciones exitosas en el Valle del Yaqui, Sonora, México, enfocadas a incrementar su productividad, desde los inicios de la Revolución Verde promovida por el Dr. Norman E. Borlaug (1968, p. 10). La gran demanda global por este cereal ha generado opciones productivas cada vez más robustas y eficientes, incluyendo la generación de variedades con mayores rendimientos, más calidad del grano y resistentes a enfermedades; así como la aplicación de nuevas prácticas de manejo agrícola, incluyendo técnicas y densidades de siembra, métodos de labranza, calendarios de riego, control fitosanitario y fertilización, entre otras tecnologías (Matson & Jewett, 2013, p. 299).

Sin embargo, el impacto de las prácticas agrícolas en combinación con las condiciones climáticas prevalecientes en el Valle del Yaqui (temperaturas extremas, baja precipitación pluvial, y alta evapo-transpiración), puede ser causa de los suelos salinos con bajo contenido de materia orgánica y nutrientes observados en la región (Cortes-Jimenez *et al.*, 2009, p. 135), impactando negativamente el óptimo aprovechamiento de los insumos agrícolas por el cultivo (*i.e.* sólo el 23% de nitrógeno aplicado es aprovechado por el cultivo) (Grahmann *et al.*, 2019, p. 5). De esta manera, a nivel mundial, el rendimiento del trigo ha disminuido gradualmente (9%) durante 1981 a 2010 (Asseng, 2015, p. 304). Por lo tanto, el mantener la productividad sustentable de trigo realizando estudios eco-fisiológicos y con microorganismos (MOOS) benéficos, son requeridos para la generación de alternativas de producción de bajo impacto bajo las condiciones edafo-climáticas actuales y futuras. Lo cual permitirá generar conocimiento científico sobre la interacción del trigo con los factores abióticos y bióticos del agro-sistema, destacando tener una mejor comprensión de las interacciones planta-suelo.

El ecosistema suelo puede contener una extensa diversidad y población de microorganismos, se estima que el 90% son bacterias, 9% actinomicetos y 1% hongos, siendo la rizósfera donde se encuentra la mayor población microbiana cultivable que se estima en  $1 \times 10^6$  UFC/cm<sup>3</sup> (Sgroy *et al.*, 2009, p. 371). La rizósfera es la porción de suelo donde los procesos mediados por MOOS están influenciados por el sistema radicular (Kloepper *et al.*, 2004, p. 219). Esta zona incluye el suelo que está en contacto con las raíces de las plantas, y a menudo se extiende a pocos milímetros fuera de la superficie de las mismas (Bringhurst, Cardon, & Gage, 2001, p. 8), teniendo un importante ambiente de interacción entre planta y microorganismos (Gray & Smith, 2005, p. 395). En esta zona la planta excreta una amplia diversidad de compuestos como aminoácidos y azúcares, los cuales proveen una fuente rica de energía y

nutrientes para los MOOS involucrados en las interacciones que pueden ser benéficas, neutras o perjudiciales para la planta (de Souza *et al.*, 2015a, p. 187; Scagliola *et al.*, 2016, p. 401).

Las RPCV son un grupo de bacterias rizosféricas con la habilidad de promover el crecimiento, la salud de las plantas y restaurar la fertilidad del suelo (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018). Para ello utilizan diversos mecanismos, entre los que destacan: I) la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Guzmán *et al.*, 2012, p. 182; Robertson & Groffman, 2015, p. 424); II) solubilización de minerales como fósforo (P) (Corrales *et al.*, 2014, p. 67; Kumar *et al.*, 2013, p. 1361); III) producción de sideróforos (Patel *et al.*, 2018, p. 81); y IV) la habilidad de producir fitohormonas (de Souza, Ambrosini, & Passaglia, 2015b, p. 401; Sheirdil *et al.*, 2019, p. 12). Además de forma indirecta, las RPCV pueden actuar como agentes de biocontrol contra fitopatógenos por medio de I) la producción de sideróforos (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018, p. 95); II) de quitinasas (Thilagar *et al.*, 2018, p. 813); III) de antibióticos (Cattelan *et al.*, 1999, p. 1670; Nyambura-Ngamau, 2012, p. 6414); y IV) la competencia por espacio y nutrientes (Martínez-Viveros *et al.*, 2010, p. 293).

De acuerdo a Numan *et al.* (2018, p. 21), los MOOS más reportados como RPCV habitan en la rizósfera y pertenecen a los géneros *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Azopirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, y *Streptomyces*. Por ejemplo, Shaharoon *et al.*, (2008, p. 147) reportó que la inoculación del cultivo de trigo con *Pseudomonas fluorescens* resultó en un incremento significativo del peso de raíz (19-43%); número de macollos por planta (10-21%); producción de grano (15-43%) y rendimiento de paja (22-39%), comparado con plantas no inoculadas. De manera similar, cepas del género *Bacillus* han demostrado que potencian el crecimiento de cultivos agrícolas como el tomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum* L.), *T. aestivum* y *T. durum* (Sood *et al.*, 2018, p. 1; Thilagar *et al.*, 2018, p. 813; Majeed *et al.*, 2015, p. 1; Robles-Montoya *et al.*, 2019, p. 201).

Por otro lado, la aplicación *Bacillus polymixa* BcP26 resultó en un incremento significativo en la absorción de N, P y K, desde 10% hasta 61% más que el control no inoculado, y la aplicación de *B. megaterium* BcM33 incrementó en 11% y 18% el peso seco de la raíz y tallo respectivamente, en el cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*) (Egamberdiyeva & Höflich, 2004, 293). Con base en lo antes señalado, el objetivo del presente trabajo fue identificar RPCV asociadas a la rizósfera del trigo en el Valle del Yaqui, mediante I) su identificación molecular;

II) características metabólicas involucradas en la promoción de crecimiento vegetal; III) el impacto de su inoculación sobre variables morfométricas en el cultivo de trigo. Esto se realizó para las tres RPCV, ya sea de forma individual y en consorcio.

## **Método**

### **Microorganismos y condiciones de crecimiento**

Las cepas bacterianas utilizadas (TE3<sup>T</sup>, TRQ8 y TRQ65) fueron seleccionadas con base en su capacidad de colonizar la rizósfera del cultivo de trigo, en lotes comerciales localizados en el Valle del Yaqui, Sonora, México (Valenzuela-Aragon, *et al.*, 2018), y por su capacidad antagónica contra *Bipolaris sorokiniana*, el agente causal de la mancha borrosa en este cereal (Villa-Rodriguez *et al.*, 2016, p. 2329; Villa-Rodriguez *et al.*, 2019, p. 135). Las cepas en estudio, criopreservadas a -80° C en glicerol al 10%, fueron crecidas en cajas de Petri conteniendo Agar Nutritivo (AN, DIBICO<sup>®</sup>) a 28±2°C por 48 h (Labnet<sup>®</sup> 311DS). La morfología de la colonia, tamaño, color, forma y el patrón de crecimiento se registró después de las 48 horas de incubación, según lo descrito por Somasegaran y Hoben (1994). La reacción de Gram se realizó según lo descrito por Vincent y Humphrey (1970). Posteriormente, una colonia de cada cepa fue individualmente transferida a un tubo Falcon (50 mL) estéril (121°C y 15 psi/15 min) con 20 mL de Caldo Nutritivo (CN, DIBICO<sup>®</sup>) y cultivadas durante 24 h en agitación a 120 rpm y 28±2°C (Labnet<sup>®</sup> 311DS), para los experimentos posteriores.

### **Identificación molecular**

La identificación molecular de las cepas en estudio se realizó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr con los oligonucleótidos FD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y RD1 (5'-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGGGGGCCCCC-3') (Bresler *et al.*, 2000, p. 904). Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) consistieron en una desnaturalización a 94°C por 3 min, alineamiento a 55°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 1 min (lo anterior se repitió durante 35 ciclos), y una extensión final a 72°C (10 min). Los amplicones fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, usando como colorante GelRed<sup>TM</sup> (Biotium<sup>TM</sup><sup>®</sup>). Los amplicones purificados fueron secuenciados mediante la plataforma Sanger. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se editaron

con el software FINCH TV (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, EE. UU.; <http://www.geospiza.com>), y fueron comparadas con la herramienta de alineamiento local básico BLASTn de NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) (Altschul *et al.*, 1990, p. 403), considerando el porcentaje de máxima identidad. Las secuencias del gen 16S ARNr fueron depositadas en la base de datos Genbank y publicadas con el número de acceso: MH057214 (TE3<sup>T</sup>), MK493638 (TRQ8) y MK493706 (TRQ65).

Las secuencias anteriormente mencionadas se utilizaron para construir un árbol filogenético mediante el software CLC Sequence Viewer (CLC bio, Aarhus, Denmark), con el modelo de evolución Kimura80 (Kimura, 1980, p. 111), y el modelo de construcción Neighbor-Joining. Dicha construcción se realizó con base en 1000 iteraciones para el cálculo del porcentaje de bootstrap. La secuencia del gen 16S ARNr de *Pseudomonas sp.* (MH569548) fue utilizada como “outgroup”.

### **Caracterización *in vitro* de mecanismos de RPCV en las cepas de estudio**

Para la evaluación *in vitro* de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de las cepas estudiadas, el pre-inóculo fue realizado bajo las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente se tomó 1 mL ( $1 \times 10^6$  células/mL) de cada pre-inóculo y se transfirió a 10 mL de CN (DIBICO<sup>®</sup>), incubándose durante 24 horas en agitación a 120 rpm y  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , para después centrifugar (Labnet<sup>®</sup> Harmle Z 446 K) a 3,500 rpm por 8 min. La biomasa obtenida fue lavada por duplicado con solución salina (0.9% NaCl) estéril ( $121^\circ\text{C}$  y 15 psi por 15 min) y re-suspendidos con agua destilada estéril, ajustando la concentración celular a  $1 \times 10^6$  células/mL, utilizando una cámara de Neubauer para el conteo de células.

**Producción de indoles.** 1 mL ( $1 \times 10^6$  células/mL) de las cepas TE3<sup>T</sup>, TRQ8, y TRQ65 fueron inoculadas individualmente en 10 mL de CN (DIBICO<sup>®</sup>) suplementado con 100 mg/L de L-triptófano (Sigma<sup>®</sup>), a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por 5 días y 120 rpm de agitación (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013, p. 615). Posteriormente, los cultivos celulares fueron centrifugados (4000 rpm durante 10 min), y los sobrenadantes reaccionaron individualmente en oscuridad por 30 min con el reactivo de Salkowski (4.5g de FeCl<sub>3</sub> (FagaLab<sup>®</sup>) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (J.T. Baker<sup>®</sup>) 10.8 M), en una relación 2:1 (reactivo-muestra), para determinar la concentración de indoles acorde al método colorimétrico de Glickmann & Dessaux (1995, p. 793). La formación de un color rosado indicó la producción de indoles, la cual se cuantificó por espectrofotometría a 540nm (BioTek<sup>®</sup> ELx800). Las

concentraciones de indoles producidas fueron estimadas con una curva patrón de AIA (Sigma<sup>®</sup>), en un rango de 2-50 µg/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado

**Solubilización de fósforo insoluble.** Las cepas fueron inoculadas por triplicado usando 10 µL de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/mL en cajas de Petri conteniendo Agar Pikovskaya (PVK), suplementado con azul de bromofenol (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S) (Jalmek<sup>®</sup>) y fosfato tricálcico (Biobasic<sup>®</sup>) como fuente insoluble de fósforo (Glucosa (Jalmek<sup>®</sup>) 10.0 g/L, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5.0 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Jalmek<sup>®</sup>) 0.5 g/L, NaCl (Biobasic<sup>®</sup>) 0.2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Jalmek<sup>®</sup>) 0.1 g/L, KCl (Jalmek<sup>®</sup>) 0.2 g/L, extracto de levadura (DIBICO<sup>®</sup>) 0.5 g/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Jalmek<sup>®</sup>) 0.002 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Jalmek<sup>®</sup>) 0.002 g/L, Agar (DIBICO<sup>®</sup>) 15.0 g/L, azul de bromofenol 0.025 g/L, y pH 7.0) (Pikovskaya, 1948, 315). La capacidad de las cepas para solubilizar fosfatos fue positiva con base en la formación de un halo transparente, después de 7 días de incubación a 28±2°C (Onyia & Anyanwu, 2013, p. 52).

**Producción de sideróforos.** El ensayo para detectar la producción de sideróforos por las bacterias estudiadas fue descrito por Alexander and Zuberer, (1991, p. 39), utilizando el Agar Chrome Azurol S (CAS). Este fue preparado mezclando cuidadosamente 4 soluciones, teniendo la siguiente composición, Solución 1: 10 mL de 1 mM FeCl<sub>3</sub> (disueltos en 1 mM HCl) y 50 mL de CAS (Sigma<sup>®</sup>) (1.21 mg/mL) fueron añadidos por separado a 40 mL de HDTMA (Sigma<sup>®</sup>) (1.82 mg/mL). Solución 2: 30.24 g de PIPES (Sigma<sup>®</sup>) fueron disueltos en 750 mL de solución salina (0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (FagaLab<sup>®</sup>), 0.5 g NaCl y 1 g NH<sub>4</sub>Cl (Jalmek<sup>®</sup>)), el pH fue ajustado a 6.8 con KOH (Jalmek<sup>®</sup>) al 50%, el volumen se ajustó a 800 mL, y después 15 g de agar bacteriológico (DIBICO<sup>®</sup>) fueron añadidos. Solución 3: 2 g glucosa, 2 g manitol (Jalmek<sup>®</sup>), 493 mg MgSO<sub>4</sub>, 11 mg CaCl<sub>2</sub> (Jalmek<sup>®</sup>), 1.17 mg MnSO<sub>4</sub>, 1.4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Jalmek<sup>®</sup>), 0.04 mg CuSO<sub>4</sub> (FagaLab<sup>®</sup>), 1.2 mg ZnSO<sub>4</sub> (FagaLab<sup>®</sup>), y 1 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (Jalmek<sup>®</sup>) se disolvieron en 70 mL de agua destilada. Solución 4: se filtraron 30 mL de casamino ácidos (USBiological<sup>®</sup>) al 10% (1 mg/mL). El medio de cultivo se inoculó con 10 µL de una suspensión celular de  $1 \times 10^6$  células/mL, y se incubó a 28±2 °C por 7 días. La formación de un halo color naranja-amarillo confirmó la producción de sideróforos por las cepas estudiadas (Patel *et al.*, 2018, p. 81). Los ensayos se realizaron por triplicado.

La capacidad de las cepas de estudio para producir sideróforos y solubilizar fósforo inorgánico se categorizó en 3 niveles: bajo (<1); intermedio (entre 1 y 2); o alto (> 2) (Marra *et*



*al.*, 2013, p. 603), y se determinó el índice de solubilización de fósforo insoluble (IS) y el índice de producción de sideróforos (IP) mediante la siguiente fórmula:

$$IS \text{ o } IP = \frac{\text{diámetro halo (mm)}}{\text{diámetro colonia (mm)}}$$

### **Promoción del crecimiento por las RPCV estudiadas, en cámara de crecimiento**

La capacidad de las cepas TE3<sup>T</sup>, TRQ8 y TRQ65 para promover el crecimiento vegetal fue evaluada utilizando como planta modelo el trigo variedad CIRNO C2008. El ensayo de interacción planta x RPCV se llevó a cabo en una cámara de crecimiento (BJPX-A450, BIOBASE<sup>®</sup>), simulando condiciones de campo registradas en el Valle de Yaqui (13 h oscuridad a 14°C, 2 h luz a 18°C, 7 h luz a 25°C y 2 h luz a 18°C), durante los últimos 3 años por la estación del clima REMAS (27°22'12.28" N y 109°55'51.71" O). Para esto, 250 semillas de trigo fueron desinfectadas previamente esterilizando la superficie con 1.5% (v/v) con hipoclorito de sodio (NaClO) por 10 min, y 3 lavados con agua destilada estéril (Grobelak *et al.*, 2015, p. 22). Las semillas desinfectadas fueron germinadas en toallas de papel húmedas (50 x 25 cm) enrolladas (ISTA, 1985) y transferidas asépticamente a charolas forestales (diámetro de cavidad 4.7 cm) que contenían 190 gramos de una mezcla de suelo estéril y perlita (esterilizados por 5 días consecutivos a 121°C - 15 lb/in<sup>2</sup> por 1 h), en una relación 70:30. Los pre-inóculos bacterianos fueron cultivados en tubos Falcon (50mL) con 10 mL de CN, e incubados a 28°C por 24 h en agitación continua (120 rpm). Para la preparación del inóculo se tomó 1 mL (1x10<sup>6</sup> células/mL) del pre-inóculo y se inoculó en 200 mL de CN contenidos en un matraz Erlenmeyer (1 L), e incubado bajo las condiciones mencionadas con anterioridad. Una vez que se cumplió el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar la suspensión bacteriana a 3500 rpm por 15 min, la biomasa obtenida se lavó 2 veces con agua destilada estéril y se ajustó la densidad celular a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/mL (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018).

Finalmente, 1 mL (1x10<sup>6</sup> células/mL) de cada cepa bacteriana fue inoculado a cada plántula de trigo. Se realizó un diseño experimental aleatorio y se evaluaron 8 tratamientos con las cepas individuales y las interacciones entre éstas: 1) TE3<sup>T</sup>; 2) TRQ65; 3) TRQ8; 4) TE3<sup>T</sup>-TRQ65; 5) TE3<sup>T</sup>-TRQ8; 6) TRQ65-TRQ8; 7) CS3 (consorcio formado por las 3 cepas); y 8) un tratamiento control (plántulas sin inocular). Se realizaron 2 réplicas biológicas, cada una con 15

plántulas para cada tratamiento. Después de 45 días de la inoculación (etapa GS14 de la escala Zadoks), se procedió a la medición de parámetros morfométricos en las plantas de trigo, como: la longitud aérea (LA) y de raíz (LR); peso seco aéreo (PSA) y de raíz (PSR); e índice de biovolumen (IB = circunferencia\*longitud aérea).

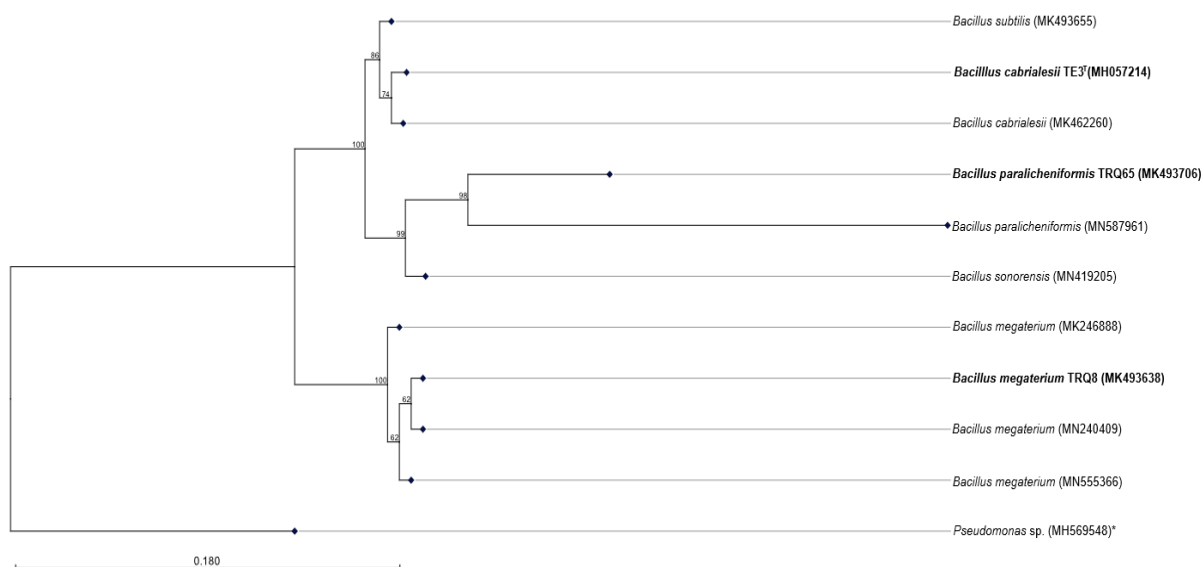
### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando el análisis de varianza ANOVA y Tukey HSD ( $P \geq 0.05$ ) empleando el software estadístico Statistica 10 para Windows®.

### **Resultados**

#### **Identificación molecular de las cepas bacterianas estudiadas**

Basados en la secuenciación del gen 16S ARNr, la cepa TRQ8 fue afiliada taxonómicamente a *B. megaterium* (cobertura 100% e identidad 99.66%) (Robles-Montoya *et al.*, 2019); TRQ65 a *B. paralicheniformis* (cobertura 100% e identidad 90.91%) (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019); y TE3<sup>T</sup> a *B. cabrialesii* (cobertura 100% e identidad 100%) (de los Santos Villalobos *et al.*, 2019). Adicionalmente, en la Fig. 1 se muestra un árbol filogenético en el que se expresan las relaciones de similitud y disimilitud que existen entre las cepas en estudio. Las secuencias relacionadas taxonómicamente se agrupan en clados, lo cual es sustentado por el valor de *bootstrap* [el porcentaje en el que un clado se repite en 1000 simulaciones al azar (iteraciones)]. La configuración de un clado se considera fiable si presenta un *bootstrap* mayor a 50. Así, los valores de 62% para *B. megaterium* TRQ8, *B. paralicheniformis* TRQ65 con 98%, y *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup> con 95 74% sustentan la afiliación taxonómica en el presente estudio.



**Fig. 1.** Árbol filogenético construido con las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas en estudio, utilizando el modelo Kimura80 y Neighbor-Joining. Los agrupamientos se determinaron con 1000 iteraciones (*bootstrap*).

\*Indica la secuencia outgroup (*Pseudomonas sp.* MH569548).

**Fig. 1.** Phylogenetic tree constructed with 16S rRNA gene sequences of studied strains, using the Kimura80 and Neighbor-Joining model. The clusters were determined with 1000 iterations (*bootstrap*).

\*Indicates the outgroup sequence (*Pseudomonas sp.* MH569548).

Por otra parte, las características morfológicas macro y microscópicas de las cepas en estudio se presentan en la Tabla 1, las cuales se distinguen por la forma de bacilo Gram positivo. Además, la capacidad de producir esporas es una de las características del género *Bacillus* y comúnmente deseada para su producción a nivel industrial.

**Tabla 1.** Características morfológicas de las tres rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

**Table 1.** Morphological traits of the three studied plant growth-promoting rhizobacteria.

Cepa	Afiliación taxonómica	Numero de Accesoión	Características Macroscópicas	Características Microscópicas	Reacción GRAM
TRQ8	<i>Bacillus megaterium</i>	MK493638	Circular con borde entero y elevación convexa	Bacilo	Gram +
TRQ65	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	MK493706	Irregular con borde ondulado y elevación plana	Bacilo	Gram +
TE3 <sup>T</sup>	<i>Bacillus cabrialesii</i>	MH057214	Irregular con borde lobulado y elevación plana	Bacilo	Gram +

### Caracterización metabólica de las RPCV *in vitro*

Las cepas estudiadas mostraron la capacidad de producir indoles, siendo la cepa *B. paralicheniformis* TRQ65 la que produjo la mayor concentración ( $39.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguida por *B. megaterium* TRQ8 y *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup> (Tabla 2). Similarmente, las 3 cepas mostraron la capacidad de solubilizar el fósforo insoluble, sin observar diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre ellas. Sin embargo, sólo la cepa TRQ8 fue capaz de producir sideróforos (IP = 8.17) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Caracterización metabólica *in vitro* de las tres rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal estudiadas.

**Table 2.** *In vitro* metabolic characterization of the three studied plant growth-promoting rhizobacteria.

Cepa	Afiliación taxonómica	Producción de indoles ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Solubilización de fosfatos (IS)	Producción de sideróforos (IP)
TRQ8	<i>Bacillus megaterium</i>	$12.03 \pm 1.93^b$	$1.38 \pm 0.04^a$	$8.17 \pm 0.01$
TRQ65	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	$39.29 \pm 0.30^a$	$1.37 \pm 0.05^a$	--
TE3 <sup>T</sup>	<i>Bacillus cabrialesii</i>	$8.21 \pm 1.35^c$	$1.43 \pm 0.04^a$	--

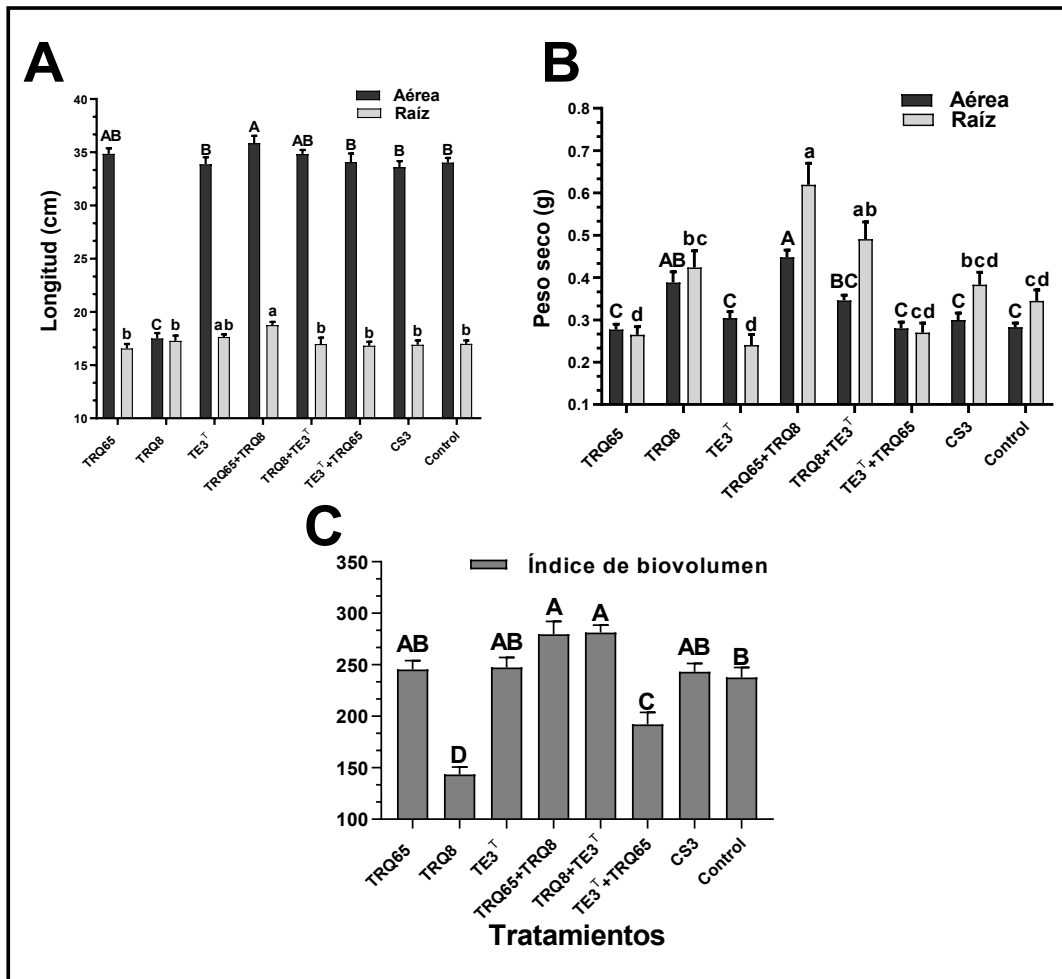
Medias (n=3) en la misma columna con la misma letra no presentan diferencias significativas, según la prueba de Tukey HSD ( $P \geq 0.05$ ). Las variaciones corresponden a la desviación estándar.

Means (n = 3) in the same column with the same letter do not show significant differences, according to the Tukey HSD test ( $P \geq 0.05$ ). The variations correspond to the standard deviation.

### Promoción del crecimiento en el trigo por las RPCV, en cámara de crecimiento

El consorcio de las cepas TRQ65+TRQ8 presentaron diferencia significativa positiva sobre las plantas de trigo comparadas con el control (no inoculado), en las 5 variables analizadas (longitud aérea, longitud de raíz, peso seco aéreo, peso seco de raíz, e índice de biovolumen), la longitud aérea y de raíz mostraron un incremento de 6% y 10%, respectivamente; mientras que el peso seco aéreo se incrementó en 60%, y el peso seco radicular mostró 82% de incremento (Fig. 2). El índice de biovolumen de las plantas inoculadas por este consorcio bacteriano (TRQ65 + TRQ8), presentó un incremento de 18%, en comparación con el control. Por otra parte, el consorcio TRQ8+TE3<sup>T</sup> mostró diferencia significativa positivas respecto del tratamiento control en las variables peso seco aéreo, peso seco de raíz e índice de biovolumen (25%, 44% y 18%), respectivamente. Por lo que respecta al consorcio TE3<sup>T</sup>+TRQ65, ninguna diferencia significativa fue observada en las variables analizadas, en contraste con las plantas no inoculadas (control).

El consorcio de las 3 cepas bacterianas (TRQ8 + TRQ65 + TE3<sup>T</sup>) mostró una tendencia a incrementar el valor de cuatro de las variables estudiadas (LA, PSA, PSR e IB); sin embargo, no se observaron diferencias significativas en comparación con el tratamiento control. Por otro lado, en los tratamientos de inoculación individual, la cepa TRQ8 mostró el mayor incremento significativo (39%) con respecto al control para la biomasa seca aérea. Lo anterior evidencia que el efecto de promoción de crecimiento más importante fue debido a la inoculación de las cepas TRQ65+TRQ8.



**Fig. 2.** Efecto de la inoculación de las cepas estudiadas (individuales o en consorcios) sobre (A) Longitud aérea y de raíz; (B) Peso seco aéreo y de raíz; y (C) Índice de biovolumen (circunferencia x longitud), bajo condiciones de cámara de crecimiento. Las literales indican diferencia significativa acorde con Tukey HSD ( $P < 0.05$ ).

**Fig. 2.** Effect of inoculation of the studied strains (individual or consortia) on (A) Aerial and radical length; (B) Aerial and radical dry weight; and (C) Biovolume index (circumference x length), under growth chamber conditions. The literals indicate significant differences according to Tukey HSD ( $P < 0.05$ ).

## **Discusión y Conclusiones**

Las cepas bacterianas estudiadas, mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, fueron afiliadas taxonómicamente al género *Bacillus*; específicamente, la cepa TRQ8 a *B. megaterium*; la cepa TE3<sup>T</sup> a *B. cabrialesii*; y la cepa TRQ65 a *B. paralicheniformis* (Tabla 1 y Fig. 1). Esta afiliación taxonómica fue soportada por las características macro y microscópicas de las cepas, relacionadas al género *Bacillus* (Tabla 1), tanto en morfología colonial como celular (Heyrman *et al.*, 2009, p. 193). El género *Bacillus* es ampliamente utilizado en la biotecnología agrícola, donde el 85% de los inoculantes microbianos que actualmente se comercializan incluyen cepas de este género en su composición, debido a su amplia versatilidad metabólica (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018, p. 95)

Diversas cepas de las especies mencionadas anteriormente han sido reportadas como BPCV promisorias. *B. megaterium* ha mostrado la capacidad de regular el crecimiento en el cultivo de trigo, mejorando significativamente variables morfométricas, como longitud de raíz (68.4%) y peso seco (>50%), con respecto a plantas no inoculadas (Robles-Montoya *et al.*, 2019, p. 201), y producir polihidroxitirato (46.79% en un medio de cultivo con 1% de etanol), un metabolito de reserva involucrado en la competencia de las bacterias bajo condiciones de estrés (Aguirre *et al.*, 2017, p. 24; Sanches-Santos *et al.*, 2017, p. 1855); *B. cabrialesii* es una nueva especie recién reportada (de los Santos Villalobos *et al.*, 2019) y los trabajos con esta nueva especie bacteriana están siendo desarrollados. Sin embargo, su relación filogenética con *B. subtilis* es la más alta y este género de bacteria ha sido estudiado por su capacidad promotora del crecimiento vegetal en cultivos de tomate y trigo obteniendo incrementos en la longitud de raíz (5.2% y 5.6%, respectivamente), así como en el peso seco de raíz y parte aérea con un aumento de 60% y 45% respectivamente para cada cultivo, debido posiblemente por la solubilización de fósforo y producción de índoles (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018; Walia *et al.*, 2014, p. 145), así como por su capacidad como agente de control biológico contra *Bipolaris sorokiniana*, mostrando 98% de inhibición de crecimiento de dicho patógeno (Villa-Rodriguez, *et al.*, 2019, p. 135); mientras que *B. paralicheniformis* ha sido reportado como promotora del crecimiento vegetal, promoviendo un aumento de la biomasa seca total (17.8%), índice de biovolumen (41%), y aumento de nutrientes (34% N, 18% P, y 29% K) en el cultivo de *Capsicum annuum* (Thilagar *et al.*, 2018, p. 813), eso fue atribuido a la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas, como AIA (Angulo *et al.*, 2014, p. 338; Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018).

Además, diversas especies del género *Bacillus* se caracterizan por ser ubicuos, encontrándose principalmente como bacterias rizosféricas o endófitas asociadas a distintos cultivos agrícolas, incluido el trigo (Khalid *et al.*, 2004, p. 2303; Akinrinlola *et al.*, 2018, p. 1; de los Santos-Villalobos, 2018, p. 191). Lo anterior es atribuido a su capacidad de formar endosporas, y colonizar las plantas mediante la producción de sustancias antimicrobianas contra otros competidores (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018). Adicionalmente, el género *Bacillus* es ampliamente reportado como RPCV del crecimiento vegetal y puede ser utilizado de manera individual o en co-inoculación con otros géneros bacterianos. Por ejemplo, *B. licheniformis* 255 (cepa solubilizadora de fosfatos) incrementa la concentración de fósforo disponible en el suelo cuando es co-inoculada con *Rhizobium pisi* en *Cytisus striatus* y *Lupinus luteus* (Balseiro-Romero *et al.*, 2017, p. 676).

Las RPCV pertenecientes al género *Bacillus* actúan mediante diversos mecanismos, como la producción de fitohormonas, la secreción de antibióticos, la inducción de resistencia sistémica, producción de enzimas líticas de la pared celular de patógenos (Ghosh, Gupta, & Mohapatra, 2019; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018, p. 95; Won *et al.*, 2019, p. 8). De esta manera, es determinante estudiar los potenciales mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de las cepas promisorias, ya que éste es considerado uno de los criterios previos para conocer la interacción de las cepas bacterianas con las plantas. En el presente estudio, las 3 cepas bacterianas mostraron la capacidad para producir indoles (8.21 a 39.29 µg/mL) (Tabla 2), observando la mayor producción (39.29 µg/mL) por la cepa TRQ65. La elaboración de compuestos indólicos por bacterias ha mostrado un efecto sobre el balance hormonal en las plantas, y, por lo tanto, influye en su crecimiento (Govindasamy *et al.*, 2009, p. 71; He *et al.*, 2017, p. 1180). Así, los compuestos indólicos producidos por RPCV, y en específico por el género *Bacillus*, han sido asociados a la interacción planta-microorganismo, y su actividad promotora del crecimiento radicular y foliar en las plantas (Ali *et al.*, 2009, p. 519).

Además, las cepas estudiadas mostraron índices de solubilización de fósforo (Tabla 2) en un rango de 1.37 a 1.43, siendo la cepa *B. subtilis* quien manifestó el mayor valor. Hasta la fecha, se han descrito diversas especies bacterianas con la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico insoluble (Corrales *et al.*, 2014), pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Chen *et al.*, 2006, p. 33; Paredes & Espinosa, 2010, p. 61). Lo anterior ha sido

evidenciado por la capacidad de las cepas bacterianas para producir ácidos orgánicos, y la actividad de fitasas (mio-inositol hexakisfosfato fosfohidrolasas) para mineralizar fitatos (Idriss *et al.*, 2002, p. 2097; Jorquera *et al.*, 2008, p. 1025; Kumar *et al.*, 2013, p. 1361; Richardson & Simpson, 2011, p. 989; Singh *et al.*, 2014, p. 2981).

Por otra parte, distintos reportes han confirmado que la producción de sideróforos por cepas bacterias impacta significativamente la asimilación de varios metales, incluyendo Fe, Zn, y Cu para las plantas (Egamberdiyeva and Höflich, 2004, p. 293; Antoun, 2013, p. 353; Patel *et al.*, 2018, p. 81); así como la supresión del crecimiento de organismos patógenos (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2005, p. 1853; Joseph *et al.*, 2007, p. 141; Wahyudi *et al.*, 2011, p. 34). *B. megaterium* TRQ8 fue la única cepa que mostró la capacidad de producir sideróforos (IP = 8.18), cuando se inoculó en el medio Agar CAS (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012, p. 2615).

La función promotora del crecimiento vegetal de las cepas TRQ8, TRQ65, y TE3<sup>T</sup> fue estudiado por su inoculación en plantas de trigo. En comparación con el tratamiento control, la co-inoculación de las cepas TRQ65+TRQ8 presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en todas las variables morfológicas analizadas en el cultivo, como lo indicaron estas variables: LA = 5.5%, LR = 10.5%, PSA = 60.7%, PSR = 82-3% e IB = 17.6% (Fig. 2). La co-inoculación de *B. paralicheniformis* TRQ65 y *B. megaterium* TRQ8 mostró un incremento en la longitud y peso seco de la planta de trigo, y en el índice de biovolumen, lo cual sugiere una movilización incrementada de nutrientes en la planta (Thilagar *et al.*, 2018, p. 813). El comportamiento anteriormente descrito, fue observado por la inoculación en consorcio de las cepas TRQ8 y TRQ65; sin embargo, la inoculación de dichas cepas individualmente al cultivo de trigo no mostró diferencias significativas en comparación con las plantas no inoculadas, e incluso la inoculación de TRQ8 disminuyó en un 90% la longitud aérea, 65% el índice de biovolumen; mientras que la inoculación de TRQ65 redujo el peso seco aéreo y de raíz en un 3% y 30%, respectivamente.

Diversos estudios han evidenciado que las capacidades de las RPCV mejoran cuando son inoculadas en consorcio (Brenner *et al.*, 2008, p. 484). Por ejemplo, Dary *et al.* (2010, p. 323) y Malboobi *et al.* (2009, p. 1479) demostraron que la inoculación de consorcios binarios de RPCV como *P. putida* P13, *P. agglomerans* P5, *Bradyrhizobium* sp.750 y *Pseudomonas* sp. Az13, a plantas de *Solanum tuberosum* y *Lupinus luteus*, tienen a mayor promoción del crecimiento vegetal en variables como peso seco de raíz, peso seco aéreo, contenido de nitrógeno y



rendimiento final en el caso de *S. tuberosum*, que una cepa individual; esto debido a que al combinar bacterias con distintas capacidades metabólicas ocurre un efecto sinérgico en la utilización simultánea de compuestos orgánicos, e inorgánicos que se encuentran en el suelo. Dicho efecto sinérgico fue observado en el presente estudio, donde por influencia de la inoculación del consorcio binario *B. megaterium* TRQ8 y *B. paralicheniformis* TRQ65, hubo incrementos significativos en todas las variables morfométricas analizadas (LA, LR, PSA, PSR e IB) con respecto al tratamiento control y a las cepas inoculadas individualmente.

La aplicación de consorcios bacterianos, específicamente binarios y ternarios del estudio mostró un impacto positivo en las variables analizadas a la planta, lo cual refuerza lo mencionado por Brenner *et al.* (2008) quienes mencionan que las poblaciones mixtas pueden realizar funciones que son difíciles e incluso imposibles para cepas individuales. El consorcio binario conformado por las cepas TRQ8 + TRQ65 mostró que sus características de promoción en conjunto pueden lograr un resultado deseado, en comparación con los resultados del consorcio de las 3 cepas bacterianas. El empleo de un consorcio microbiano ha demostrado que entre los involucrados tienen que equilibrar dos o más tareas para que se complementen eficientemente dentro de un sistema, y esto plantea en ocasiones desafíos insuperables, cuando se trata de la aplicación de 3 o más MOOS con características similares (Keller y Surette, 2006; Eiteman *et al.*, 2008; Lynd *et al.*, 2002; Brenner *et al.*, 2008). Por ejemplo, durante la limitación de nutrientes una población minoritaria puede convertirse en la población más activa, si posee una actividad metabólica de la que depende la supervivencia de todo el consorcio (LaPara *et al.*, 2002; Boopathy *et al.*, 2015). Sin embargo, una gran cantidad de cepas o especies en un consorcio no garantiza la supervivencia, ni el efecto promotor deseado.

Finalmente, con el presente estudio se concluye que las bacterias nativas del Valle del Yaqui, asociadas al cultivo de trigo, tienen la capacidad de promover el crecimiento de este cereal, en estadios tempranos de la planta. El efecto promotor del crecimiento vegetal por las cepas estudiadas se incrementó por su inoculación en consorcio (*B. megaterium* TRQ8 + *Bacillus paralicheniformis* TRQ65), a las plantas de trigo. Por lo cual, futuros estudios deben ser desarrollados para entender la ecología de dicho consorcio bacteriano, y la interacción con el sistema suelo-planta. Esto con el objetivo de incrementar el conocimiento sobre sus mecanismos de acción, y la regulación de éstos bajo las condiciones bióticas y abióticas de los

agroecosistemas. Lo cual permitiría el uso de dichas cepas en campo, sin efectos adversos químico-biológicos al ambiente.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el financiamiento de los proyectos 253663 y 257246. Finalmente, Jonathan Rojas Padilla CVU 262903, Luis Abraham Chaparro Encinas CVU 539689 y Rosa Isela Robles Montoya CVU 627262, agradecen al CONACYT por la beca otorgada para sus estudios de posgrado.

### **Referencias**

- Aguirre, J. B. R., Gómez, L. Z. O., Villalobos, S. D. L. S., & Sánchez, M. L. (2017). Production of polyhydroxybutyrate from milk whey fermentation by *Bacillus* Production of polyhydroxybutyrate from milk whey fermentation by *Bacillus megaterium* TRQ8. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 13(1), 24–31.
- Akinrinlola, R. J., Yuen, G. Y., Drijber, R. A., & Adesemoye, A. O. (2018). Evaluation of *Bacillus* Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by *in vitro* Physiological Traits. *International Journal of Microbiology*, 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5686874>.
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 39–45. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00369386>.
- Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K., & Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9918-9>.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, Y. K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista*

- Argentina de Microbiologia*, 46(4), 338–347. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8).
- Antoun, H. (2013). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 353–355. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01169-4>.
- Asseng, S. (2015). Uncertainties of Climate Change Impacts in Agriculture. *Procedia Environmental Sciences*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.276>.
- Balseiro-Romero, M., Gkorezis, P., Kidd, P. S., Van Hamme, J., Weyens, N., Monterroso, C., & Vangronsveld, J. (2017). Use of plant growth promoting bacterial strains to improve *Cytisus striatus* and *Lupinus luteus* development for potential application in phytoremediation. *Science of The Total Environment*, 581–582, 676–688. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.12.180>.
- Borlaug, N. E. (1968). Wheat Breeding and its Impact on World Food Supply. *Third International Wheat Genetics Symposium*.
- Boopathy, R., Kern, C., & Corbin, A. (2015). Use of *Bacillus* consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 159–164. DOI:10.1016/j.ibiod.2015.02.001.
- Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483–489. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>.
- Bresler, M. M., Rosser, S. J., Basran, A., & Bruce, N. C. (2000). Gene cloning and nucleotide sequencing and properties of a cocaine esterase from *Rhodococcus* sp. strain MB1. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 904–908. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.904-908.2000>.
- Bringham, R. M., Cardon, Z. G., & Gage, D. J. (2001). Galactosides in the rhizosphere: Utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.071375898>.
- Carrillo-Castañeda, G., Munoz, J. J., Peralta-Video, J. R., Gomez, E., & Gardea-Torresdey, J. L. (2005). Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *Journal of Plant Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904160500251340>.
- Cattelan, A. J., Hartel, P. G., & Fuhrmann, J. J. (1999). Screening for Plant Growth–Promoting

- Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Science Society of America Journal*, 1670. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj1999.6361670x>.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- Corrales, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67–79. DOI: <https://doi.org/20026743>.
- Cortes-Jimenez, J. M., Troyo-Diéguez, E., Murillo-Amador, B., García-Hernández, J. L., Garatuza-Payán, J., & Suh Lee, S. (2009). Índices de calidad del agua del acuífero del Valle del Yaqui, Sonora. *Terra Latinoamericana*, 27(2), 133–141. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792009000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792009000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es).
- Dary, M., Chamber-Pérez, M. A., Palomares, A. J., & Pajuelo, E. (2010). “*In situ*” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.035>.
- de los Santos-Villalobos, S. (2018). Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional Introducción, 191–202.
- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2012). Burkholderia cepacia XXVI siderophore with biocontrol capacity against Colletotrichum gloeosporioides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1071-9>.
- de los Santos-Villalobos, S., de Folter, S., Délano-Frier, J. P., Gómez-Lim, M. A., Guzmán-Ortiz, D. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2013). Growth Promotion and Flowering Induction in Mango (*Mangifera indica* L. cv “Ataulfo”) Trees by *Burkholderia* and *Rhizobium* Inoculation: Morphometric, Biochemical, and Molecular Events. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), 615–627. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9329-5>.
- de los Santos Villalobos, S., Robles, R., Parra Cota, F., Larsen, J., Lozano, P. and Tiedje, J. (2019). *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium

- isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.
- Egamberdiyeva, D., & Höflich, G. (2004). Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *Journal of Arid Environments*, 56(2), 293–301. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(03\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(03)00050-8).
- Eiteman, M.A. et al. (2008) A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *J. Biol. Eng.* 2, 3.
- Ghosh, D., Gupta, A., & Mohapatra, S. (2019). Dynamics of endogenous hormone regulation in plants by phytohormone secreting rhizobacteria under water-stress. *Symbiosis*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-018-00589-w>.
- 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* (Vol. 61). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388360/pdf/hw0793.pdf>
- Godfray H.C.J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M. & Toulmin, C. (2010). The Challenge of Food Security. *Science*, 5967(January), 812–818. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1185383>.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Mageshwaran, V., & Annapurna, K. (2009). Detection and Characterization of ACC Deaminase in Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(1), 71–76. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03263298>.
- Grahmann, K., Dittert, K., Verhulst, N., Govaerts, B., & Buerkert, A. (2019). 15 N Fertilizer recovery in different tillage–straw systems on a Vertisol in north-west Mexico. *Soil Use and Management*, sum.12495. DOI: <https://doi.org/10.1111/sum.12495>.
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395–412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria

- (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22–28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.019>.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). (Spanish). *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 14(1), 182–190. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=85945255&lang=es&site=ehost-live>
- He, Y., Wu, Z., Tu, L., & Shan, C. (2017). Effect of encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 strain on alleviating salt stress of cotton. *Journal of Plant Nutrition*, 40(8), 1180–1189. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1264595>.
- Heyrman, J., De Vos, P., & Logan, N. (2011). *Genus XIX. Virgibacillus*. (W. B. W. Paul Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (2nd ed., Vol. 5). Springer Science & Business Media. Retrieved from <http://moscow.sci-hub.bz/2f9a77368ec03cf6b24aeba25c820745/10.1007%40978-0-387-68489-5.pdf>
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2097>.
- Jorquera, M. A., Hernández, M. T., Rengel, Z., Marschner, P., & De La Luz Mora, M. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0288-0>.
- Joseph, B., Patra, R. R., & Lawrence, R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*.
- Keller, L. and Surette, M.G. (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 249–258.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z. A., & Zahir, Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting

- rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *The Society for Applied Microbiology Journal of Applied Microbiology*, 96, 473–480. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol*, 16(1330), 111–120. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Kloepper, J. W., Reddy, M. S., Rodriguez-Kabana, R., Kenney, D. S., Kokalis-Burelle, N., Martinez-Ochoa, N., & Vavrina, C. S. (2004). Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. In *Acta Horticulturae*. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.631.28>.
- Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M. A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1299-z>
- LaPara, T.M., Zakharova, T., Nakatsu, C. H. & Konopka, A. (2002) Functional and structural adaptations of bacterial communities growing on particulate substrates under stringent nutrient limitation. *Microb. Ecol.* 44, 317–326.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577.
- Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in microbiology*, 6, 198. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00198>.
- Malboobi, M. A., Behbahani, M., Madani, H., Owlia, P., Deljou, A., Yakhchali, B., Moradi, M. & Hassanabadi, H. (2009). Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0038-y>
- Marra, L. M., Oliveira, S. M. de, Soares, C. R. F. S., & Moreira, F. M. de S. (2013). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-90162011000500015>.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. ., Crowley, D. ., Gajardo, G., & Mora, M. . (2010).

- Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>.
- Matson, P., & Jewett, P. (2013). Ecosystems and land-use change in the Yaqui Valley: Does agricultural intensification spare land for nature? In *Seeds of Sustainability: Lessons from the Birthplace of the Green Revolution*. DOI: [https://doi.org/10.5822/978-1-61091-177-1\\_4](https://doi.org/10.5822/978-1-61091-177-1_4)
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. K., Khan, A. L., ... AL-Harrasi, A. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>.
- Nyambura Ngamau, C. (2012). Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *African Journal of Microbiology Research*. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1170>.
- Onyia, C. E., & Anyanwu, C. U. (2013). Journal of Yeast and Fungal Research Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil, 4(5), 52–57. DOI: <https://doi.org/10.5897/JYFR2013.0120>.
- Paredes, M. M., & Espinosa, V. D. (2010). Ácidos Orgánicos Producidos por Rizobacterias que Solubilizan Fosfato: Una Revisión Crítica. *Terra Latinoamericana*.
- Patel, P. R., Shaikh, S S, & Sayyed, R Z. (2018). Modified chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron. *Environmental Sustainability*, 1, 81–87. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0005-3>
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologia*. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(98\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(98)00075-X).
- Poudel, R., & Bhatta, M. (2017). Review of Nutraceuticals and Functional Properties of Whole Wheat. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 07(01), 1–6. DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000571>.
- Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus



- Availability Update on Microbial Phosphorus. *PLANT PHYSIOLOGY*. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>.
- Robertson, G. P., & Groffman, P. M. (2015). *Chapter 14: Nitrogen Transformations. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00014-1>.
- Robles-Montoya, R. I., Parra Cota, F. I., & de los Santos Villalobos, S. (2019). Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech*, 9(5). DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1726-4>.
- Sanches-Santos, M., Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and biofilm by *Azospirillum brasilense* aiming at the development of liquid inoculants with high performance. *African Journal of Biotechnology*, 16(37), 1855–1862. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajb2017.16162>.
- Scagliola, M., Pii, Y., Mimmo, T., Cesco, S., Ricciuti, P., & Crecchio, C. (2016). Characterization of plant growth promoting traits of bacterial isolates from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) and tomato (*Solanum lycopersicon* L.) grown under Fe sufficiency and deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.002>.
- Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A., & Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2116-3>
- Sheirdil, R. A., Hayat, R., Zhang, X.-X., Abbasi, N. A., Ali, S., Ahmed, M., Khan Khatak, J. Z. & Ahmad, S. (2019). Exploring Potential Soil Bacteria for Sustainable Wheat (*Triticum aestivum* L.) Production. *Sustainability*, 11(12), 3361. DOI: <https://doi.org/10.3390/su11123361>.
- Singh, P., Kumar, V., & Agrawal, S. (2014). Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International Journal of Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/426483>
- Somasegaran, P., and Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia. Methods in Legume–Rhizobium Technology. Heidelberg, NY: *Springer*. DOI: 10.1007/978-1-

4613-8375-8

- Sood, G., Kaushal, R., Panwar, G., & Dhiman, M. (2018). Effect of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria on wheat (*Triticum aestivum* L.) productivity and soil nutrients. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 00(00), 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1556282>.
- Thilagar, G., Bagyaraj, D. J., Podile, A. R., & Vaikuntapu, P. R. (2018). *Bacillus sonorensis*, a Novel Plant Growth Promoting Rhizobacterium in Improving Growth, Nutrition and Yield of Chilly (*Capsicum annum* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 88(2), 813–818. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0822-z>.
- United Nations. (2015). *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables*. (W. P. N. ESA/P/WP.241, Ed.). New York: United Nations.
- Valenzuela-Aragón, B., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., Arellano-Wattenbarger, G. L., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). Plant-assisted selection: a promising alternative for *in vivo* identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) growth promoting bacteria. *Plant and Soil*, (December). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>.
- Valenzuela-Ruiz, V., Robles-Montoya, R. I., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Rodríguez-Ramírez, R., de los Santos-Villalobos, S. (2019). Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech*, 9(11): 436-442. DOI: [10.1007/s13205-019-1972-5](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5).
- Villa-Rodríguez, E., Lugo-Enríquez, C., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., & Figueroa-López, P. (2016). First Report of *Cochliobolus sativus* Causing Spot Blotch on Durum Wheat (*Triticum durum*) in The Yaqui Valley, Mexico. *Plant Disease*, 100(11), 2329. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-05-16-0634-pdn>
- Villa-Rodríguez, Eber, Parra-Cota, F., Castro-Longoria, E., Lopez-Cervantes, J., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control*, 132(In press), 135–143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>.

- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>.
- Vincent, J. M., and Humphrey, B. (1970). Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 63, 379–382. DOI: 10.1099/00221287-63-3-379.
- Wahyudi, A. T., Astuti, R. P., Widyawati, A., Meryandini, A., & Nawangsih, A. A. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*.
- Walia, A., Mehta, P., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2014). Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 84(1), 145–155. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0189-3>.
- Won, S.-J., Kwon, J.-H., Kim, D.-H., & Ahn, Y.-S. (2019). The Effect of *Bacillus licheniformis* MH48 on Control of Foliar Fungal Diseases and Growth Promotion of *Camellia oleifera* Seedlings in the Coastal Reclaimed Land of Korea. *Pathogens*. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8010006>.