

# Bioestimulación de frijol guajiro y su simbiosis con *Rhizobium* por ácidos húmicos y *Bacillus mycooides*\*

## Bioestimulation of guajiro bean and its symbiosis with *Rhizobium* by humic acids and *Bacillus mycooides*

VALERO-VALERO, NELSON-OSVALDO<sup>1</sup>; VERGEL-CASTRO, CLAUDIA-MARCELA<sup>2</sup>;  
USTATE, YEISON<sup>3</sup>; GÓMEZ-GÓMEZ, LILIANA-CECILIA<sup>4</sup>

### Historial del artículo

Recibido para evaluación: 11 de Agosto 2020

Aprobado para publicación: 11 de Marzo 2021

\* Proyecto de investigación de origen: "Evaluación del efecto de *Bacillus mycooides* y ácidos húmicos sobre la nodulación de *Vigna unguiculata* inoculada con cepas de *Rhizobium* sp. bajo condiciones de laboratorio". Financiación: Universidad Popular del Cesar. Finalización: Octubre de 2020.

- 1 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA). Dr en Ciencias Agrarias. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9186-6245>
- 2 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA). Microbióloga. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9862-6906>
- 3 Universidad de La Guajira, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Grupo de Investigación en Desarrollo de Tecnologías ambientales del Carbono (DESTACAR). Biólogo. Riohacha, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3342-2897>
- 4 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias Básicas y de Educación. Grupo de Microbiología Agrícola y Ambiental (MAGYA). Bacterióloga. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1872-4878>

Correspondencia: [nelsonvalero@unicesar.edu.co](mailto:nelsonvalero@unicesar.edu.co)

Cómo citar este artículo: VALERO-VALERO, NELSON-OSVALDO; VERGEL-CASTRO, CLAUDIA-MARCELA; USTATE, YEISON; GÓMEZ-GÓMEZ, LILIANA-CECILIA. Bioestimulación de frijol guajiro y su simbiosis con *Rhizobium* por ácidos húmicos y *Bacillus mycooides*. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 19, n. 2, 2021, p. 119-134. Doi: <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1608>

## RESUMEN

Los bioestimulantes promueven cambios fisiológicos y morfológicos conducentes a mejorar la adaptación, crecimiento y productividad de las plantas en condiciones adversas. En este trabajo se evaluó el efecto bioestimulante de *Bacillus mycoides* BSC25 y ácidos húmicos derivados de lombricompost de estiércol de caprino (AH-L) y de un carbón pobre tipo lignito (AH-C), sobre frijol guajiro (*Vigna unguiculata* L. Walp). El trabajo comprendió: 1) comprobación de la presencia de rizóbios en el suelo, con capacidad de nodular *V. unguiculata*, y caracterización molecular de una cepa aislada, 2) experimentos bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento vegetal, para comprobar la estimulación del crecimiento temprano de frijol tratado con AH-L, AH-C o *B. mycoides* y la aplicación conjunta AH-B. *mycoides*, 3) un experimento de bioestimulación con AH-L, AH-C y *B. mycoides* en campo, en un suelo semiárido de la media Guajira. Se encontró que en el suelo persistía una población de *Rhizobium* sp capaz de nodular el frijol guajiro, el tratamiento con los agentes bioestimulantes favorece el crecimiento de la planta e incrementa el grado de nodulación por la población nativa de rizóbios, lo cual sugiere la conveniencia de promover esta tecnología para mejorar la producción del cultivo de frijol guajiro.

## ABSTRACT

Biostimulants promote physiological and morphological changes in the plant, leading to better adaptation in adverse conditions and increases in growth and productivity. In this work, we evaluated the biostimulatory effect of *Bacillus mycoides* BSC25 and humic acids derived from goat manure vermicompost (HA-V) and a lignite low rank coal (HA-C), on guajiro beans (*Vigna unguiculata* L. Walp). The work included: 1) checking in the soil the presence of rhizobia capable of forming nodules on *V. unguiculata*, and molecular typing of an *Rhizobium* isolated strain, 2) experiments under controlled conditions in a plant growth chamber to check the promotion of bean seedlings early growth treated separately with HA-V, HA-C or *B. mycoides* and joint application trials HA-B. *mycoides*, 3) development under a field conditions bioestimulation trial with HA-V, HA-C and *B. mycoides* in a semi-arid soil of the mean Guajira.. It was found that a population of *Rhizobium* sp. strain persistent in the soil was able to nodulate guajiro bean; in addition, treatment with both biostimulants, HA or *B. mycoides*, promote bean growth and increases nodulation degree of the rhizobia native population, these findings suggests the convenience of promote this technology to improve the production of guajiro bean crop.

## INTRODUCCIÓN

Los suelos en zonas secas están afectados por tensores ambientales que dificultan una agricultura convencional, en coyuntura con el avance de la desertificación, esto conlleva inseguridad alimentaria, por lo tanto, es necesario adaptar tecnologías pertinentes para el manejo ecológico de

## PALABRAS CLAVE:

*Vigna unguiculata* L.; *Rhizobium* sp.; Guajira; Bioestimulantes; Lombricompost; Lignito; Suelo Semiárido; Nodulación; Caprino; Carbón Pobre.

## KEY WORDS:

*Vigna unguiculata* L.; *Rhizobium* sp.; Guajira; Phytostimulants; Vermicompost; Lignite; Semi-arid soil; Nodulation; Goat; Low Rank Coal.

los suelos y cultivos. Dentro de las medidas para combatir la inseguridad alimentaria a través de la agrobiología, están las tecnologías de biocontrol, biofertilización y bioestimulación.

La bioestimulación utiliza sustancias o microorganismos que desencadenan respuestas fisiológicas que mejoran la eficiencia nutricional, tolerancia al estrés (Van Oosten *et al.*, 2017), estimulan el metabolismo y favorecen el desempeño de las plantas (Nardi *et al.*, 2016). Dentro de los agentes bioestimulantes están los insumos a base de microorganismos, fracciones de la materia orgánica humificada, hidrolizados de proteínas, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados (Nardi *et al.*, 2016), oligosacáridos, compuestos inorgánicos, extractos de algas verdes y productos botánicos (Calvo *et al.*, 2014; Du Jardin, 2015).

La estructura supramolecular de los ácidos húmicos determina su acción bioestimulante, conduciendo a la proliferación, alargamiento y modificaciones en la arquitectura de las raíces, incremento de la absorción y transporte de iones y estimulación del metabolismo primario (Aguiar *et al.*, 2018), regulación de procesos moleculares e inducción de síntesis de metabolitos secundarios (Shah *et al.*, 2018) y promoción de respuestas sistémicas frente al estrés, gracias a un efecto de “priming químico” (Canellas *et al.*, 2020., Piedade *et al.*, 2017). También promueve la exudación radical que aumenta la actividad microbiana de la rizosfera, la comunicación planta microorganismo, el establecimiento y desempeño de interacciones simbióticas, asociativas y endofíticas por microorganismos promotores del crecimiento vegetal (Bulgari *et al.*, 2019; Nunes *et al.*, 2019).

*Vigna unguiculata* L., llamada localmente frijol guajiro o frijol cabecita negra, es la leguminosa de grano de mayor importancia en el caribe seco colombiano (Araméndiz-Tatis *et al.*, 2011), presenta potencial para la intensificación de su producción ecológica en agricultura familiar por su valor nutritivo, ciclo corto, resistencia a las condiciones climáticas, tradición de consumo y su uso adicional como forraje y abono verde (Jaramillo, 2015). La intensificación en la agricultura ecológica en zonas secas amerita la adaptación de cultivares tolerantes a condiciones climáticas y ecológicas adversas, en este sentido es conveniente potenciar el desempeño de agentes bioestimulantes como aliviadores del estrés y promotores del crecimiento y desarrollo vegetal. Para el frijol guajiro esto resulta aún más conveniente sumado a la ventaja de presentar asociación eficiente con rizobios para formar nódulos fijadores de nitrógeno.

La co-inoculación de dos o más microorganismos benéficos parece ser más efectiva para estimular el crecimiento vegetal, debido al efecto sinérgico, por esta razón actualmente se está trabajando en el desarrollo de este tipo de biofertilizantes de segunda generación (Muñoz-Rojas *et al.*, 2016). Se ha visto que varias cepas microbianas actúan como “helpers” para el establecimiento y desempeño de la simbiosis *Rhizobium* leguminosa, tal es el caso de especies de *Azospirillum* (Cubillos, 2021), *Pseudomonas* (Egamberdieva *et al.*, 2010), actinomicetes (Solans *et al.*, 2016) y *Bacillus*.

El género *Bacillus* comprende bacterianas promotoras del crecimiento vegetal que expresan todos los mecanismos directos e indirectos de bioestimulación, además, su adaptación a diversidad de condiciones ambientales, versatilidad metabólica, presencia de endosporas y la motilidad, otorgan a este grupo grandes ventajas para su utilización en biofertilización (Tejera-hernández and Heydrich-Pérez, 2011); en suelos bajo condiciones áridas y semiáridas estas ventajas adquieren especial importancia frente a otros microorganismos comúnmente utilizados como bioinoculantes. Se han observado efectos positivos en el crecimiento vegetal por la coinoculación de bacterias del género *Bacillus* con rizobios en soja (Bai *et al.*, 2003), con *Rhizobium* spp. en arveja (Rajendran *et al.*, 2008), *Bacillus thuringiensis* con *Rhizobium leguminosarum* en guisantes (Mishra *et al.*, 2009), *Bacillus* sp. con *Rhizobium tropici* en *Phaseolus vulgaris* L, *Bacillus* sp. con *Mesorhizobium* sp. en garbanzo. Incluso la coinoculación de *Bacillus simplex* modifica el desarrollo de la arquitectura radical y la morfología de los nódulos de *Rhizobium* en guisantes (Schwartz *et al.*, 2013).

El propósito de este trabajo fue evaluar la bioestimulación del frijol guajiro, incluyendo el establecimiento de la simbiosis con rizobios naturalmente presentes en un suelo semiárido típico del departamento de La Guajira, por el tratamiento con una cepa nativa de *Bacillus mycoides*, adaptada a las condiciones de aridez, en conjunto con dos tipos de ácidos húmicos.

## MÉTODO

### Extracción de ácidos húmicos (AH)

Como fuente de AH se utilizaron dos materias primas comunes en el departamento de La Guajira, un carbón pobre tipo lignito generado como subproducto de la minería de carbón y lombricompost de estiércol de caprino. Se obtuvo el extracto húmico total (EHT) aplicando el método clásico de extracción con soluciones alcalinas, en este caso NaOH 1N, siguiendo la metodología estándar descrita para cada tipo de muestra por la International Humic Substances Society (Chang *et al.*, 2014). Posteriormente se separó la fracción de AH por precipitación utilizando HCl 1N hasta pH 2, se lavó y se secó el extracto por liofilización.

### Comprobación de la presencia de rizóbios en el suelo, purificación y tipificación de cepas

Se tomaron semillas de frijol guajiro cultivado por los pobladores locales en la localidad de Uribia, en una zona semiárida del a media Guajira, se lavaron con detergente durante 10 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua potable y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2,5 % por 15 minutos, se enjuagaron tres veces con agua estéril y se dejaron en imbibición por 24 horas; después se llevaron a germinar en cámara húmeda; luego se seleccionaron plántulas homogéneas y se sembraron en 5 materas plásticas con 300 g de un suelo no esterilizado, recién colectado en los 20 cm del horizonte superficial en un terreno localizado en una zona semiárida en el municipio de Uribia, en el departamento de La Guajira, en predios de la granja de la fundación Cerrejón Progreso para La Guajira (11°35'36.5"N 072°19'26.6"W) a una altitud de 10 m.s.n.m., una temperatura media de 34 °C y humedad relativa del 76 % . Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento Sanyo MLR-351 bajo un fotoperíodo de 12 horas, humedad relativa entre 60 y 80 %, temperatura entre 26 y 29 °C y riego por capilaridad. A los 35 días se desenterraron las plantas, se lavaron minuciosamente y se colectaron los nódulos desarrollados, se mantuvieron por una hora en solución de NaCl 0,85 %, posteriormente, se desinfectaron siguiendo el protocolo descrito en (Mendoza y Bonilla, 2014).

Los nódulos desinfectados se cortaron por la mitad bajo condiciones estériles, se seleccionaron secciones de nódulos activos que presentaron coloración roja brillante y se sembraron sobre la superficie de agar YMA; también se hizo un macerado de nódulos activos con solución salina (NaCl 0,85 %) y se prepararon diluciones para inocular y extender alícuotas de 100 µL en la superficie de agar YMA con adición de rojo congo y se incubaron a 30–32 °C por 2 semanas, los diferentes tipos de colonias formadas se purificaron en nuevas cajas de agar YMA se caracterizaron atendiendo a su morfología en agar YMA+ azul de bromotimol, pruebas bioquímicas con base en las características planteadas en (Mulford *et al.*, 2012) y el crecimiento en diferentes medios de cultivo (Peptona Glucosa Agar + Púrpura de Bromocresol, Levadura Manitol Agar + Rojo Congo, Levadura Lactosa Agar, Agar xilosa Lactosa Desoxicolato y Hektoen). También se evaluó el crecimiento en diferentes valores de pH (4, 5, 6, 8, 9 y 11) en medio YMA, en concentraciones de sal (0,01, 1 y 2 %) en caldo Levadura Manitol, y diferentes temperaturas (4,5, 30, 37 y 44 °C) en agar YMA. Se aplicaron pruebas de resistencia a antibióticos (tetraciclina 5,0 µg/mL y cloranfenicol 10,0 µg/mL). Así se seleccionaron aislamientos presuntivos de rizóbios.

Dos aislamientos presuntivos de rizóbios fueron enviados a la corporación Corpogen para su tipificación molecular, para ello se amplificó el gen ribosomal 16S mediante PCR, se purificaron los fragmentos de PCR y se hizo la secuenciación, mediante el método Sanger, utilizando los iniciadores 337F, 518F, 800R, y 1100R, con este resultado se llevó a cabo el análisis taxonómico de la secuencia problema utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), del NCBI (National Center for Biotechnology Information), comparando contra la base de datos RNA de referencia "refseq\_rna". Se hizo análisis de la secuencia problema mediante las herramientas "Classifier" y "SeqMatch", alojadas en el sitio Web de RDP (Ribosomal Data Project), la primera herramienta para determinar la taxonomía de la secuencia problema y la segunda para identificar las secuencias más similares en la base de datos de RDP, con la secuencia. Para el alineamiento múltiple se usó el algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), de la secuencia problema con las treinta secuencias de mayor similitud reportadas por Blast. Luego se generó un árbol filogenético usando el modelo de distancia ge-

nética de Tamura-Nei (TN93), con el método de "NeighborJoining" y el método de "Bootstrap" con mil réplicas y se hizo la clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

### Ensayo de crecimiento y nodulación en plantas inoculadas con *Rhizobium* sp

De los dos aislamientos presuntivos de rizóbios, la tipificación molecular indicó que uno corresponde a *Rhizobium* sp, entonces con este se desarrolló un ensayo con el fin de comprobar que este aislamiento es causante de la nodulación, además de evaluar la magnitud del incremento en la nodulación de las plantas de frijol al hacer bioaumentación con un inóculo de dicho aislamiento en comparación con la nodulación ocasionada por la población de base de rizóbios en el suelo, la cual se denominó "nodulación basal". Se hizo propagación masiva de la cepa de *Rhizobium* sp en medio de cultivo levadura manitol líquido, en erlenmeyers de 250 mL ocupados con 150 mL de cultivo, bajo agitación permanente a 120 rpm y una temperatura de 30 °C. Posteriormente se tomó el cultivo y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, el pellet formado con la biomasa microbiana fue resuspendido en agua peptonada y centrifugado nuevamente, finalmente se ajustó un inóculo a una concentración de  $10^8$  células\* $mL^{-1}$  en solución de NaCl al 0,85 %.

Se tomaron semillas de frijol guajiro, se desinfectaron como se explicó anteriormente y se llevaron a imbibición durante 24 horas, posteriormente se germinaron en cámara húmeda, se tomaron semillas germinadas con un tamaño homogéneo de la radícula y se colocaron en 10 materas plásticas con 300 g del mismo tipo de suelo utilizado para el aislamiento de *Rhizobium* sp, se adicionó a cada matera 10 mL del inóculo bacteriano sobre y alrededor de la semilla, como tratamiento control en otro set de 10 materas se sembraron las semillas y se adicionaron 10 mL de solución salina estéril. Todas las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento vegetal bajo fotoperiodo 12-12 h, humedad relativa entre 60 y 80 % y temperatura entre 26 y 28 °C, el riego se hizo con agua destilada estéril a disposición por capilaridad. A los 35 días de crecimiento se desenterraron las plantas, se lavó el sistema radical minuciosamente y se realizó el conteo de nódulos formados por planta, se midió el tamaño promedio de los nódulos, se determinó la longitud de las raíces y la masa seca del follaje y raíces.

### Ensayo de estimulación del crecimiento con AH y *B. mycooides* en aplicación individual

Se realizó un ensayo en materas, con plantas de frijol guajiro, bajo las mismas condiciones de los ensayos anteriores, se utilizó el mismo tipo de suelo, pero sometido a esterilización en autoclave, con el fin de comprobar el efecto exclusivo de los tratamientos, minimizando la interferencia de otros organismos presentes en el suelo, incluyendo la población basal de rizóbios. Se estableció un experimento completamente al azar con cuatro tratamientos: 1) aplicación de un inóculo de *B. mycooides*, 2) Tratamiento con los AH extraídos del lombricompost (AH-L), 3) Tratamiento con AH extraídos del carbón (AH-C). 4) tratamiento control sin aplicación de ningún agente bioestimulante, para cada tratamiento hubo 7 repeticiones.

El inóculo de *B. mycooides* se obtuvo a partir un cultivo puro de una cepa denominada BSC25 que hace parte de la colección del laboratorio de microbiología agrícola y ambiental de la Universidad Popular del Cesar. La cepa se reactivó cultivándola en agar nutritivo, posteriormente se tomó una muestra y se transfirió a erlenmeyers de 250 mL conteniendo 150 mL de caldo nutritivo, los cultivos se mantuvieron a 30 °C en agitación en shaker a 100 rpm durante 72 h hasta obtener un crecimiento masivo, posteriormente el contenido de los recipientes se llevó a centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos, los pellets de biomasa bacteriana fueron resuspendidos en solución de NaCl al 0,85 % y vueltos a centrifugar, este procedimiento se repitió dos veces; finalmente la biomasa obtenida se diluyó en solución salina al 0,85 % y se ajustó la absorbancia de cada uno de los inóculos a 0,25 a 600 nm, se realizó un recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para confirmar la concentración de bacterias en inóculo a una concentración de  $10^8$  UFC\* $mL^{-1}$ . Se tomaron 10 mL y se aplicaron alrededor de la planta en la zona de la raíz.

Los AH se aplicaron en dosis de 5 mL a una concentración de 80 mg de C de AH \*L, en solución de  $CaCl_2$  2 mM, la aplicación de esta solución se realizó por aspersión foliar 7 días después de la emergencia de las plántulas. A

los 35 días de crecimiento se desenterraron las plantas, se lavó el sistema radical minuciosamente y se midió la masa seca de raíces y follaje.

### **Ensayo de bioestimulación mediante aplicación conjunta de AH y *B. mycooides***

Este ensayo también se llevó a cabo en cámara de crecimiento vegetal, bajo el mismo protocolo y las mismas condiciones utilizadas en el ensayo anterior, en este caso el suelo no fue esterilizado, esto con el fin de evaluar el papel de los bioestimulantes en la nodulación basal, por la población de rizóbios presente en el suelo. Se estableció un experimento completamente al azar con 6 tratamientos: 1) aplicación de un inóculo de *B. mycooides*, 2) Tratamiento con AH-L, 3) Tratamiento con AH AH-C, 4) Aplicación conjunta de AH-L y *B. mycooides*, 5) Aplicación conjunta de AH-C y *B. mycooides*, 6) Tratamiento control sin aplicación de ningún agente bioestimulante, para cada tratamiento hubo 12 repeticiones. A los 35 días de crecimiento se desenterraron las plantas, se lavó el sistema radical minuciosamente y se midió el número de nódulos de *Rhizobium* activos por planta, la masa seca de raíces y follaje, además del contenido foliar de nitrógeno (método de Kjeldahl) y fósforo (método colorimétrico).

### **Ensayo de bioestimulación en condiciones de campo**

El ensayo se llevó a cabo en predios de la granja de la fundación Cerrejón Progreso para La Guajira, bajo las condiciones ambientales descritas previamente. Se desarrolló un ensayo en bloques al azar, para ello se construyeron canteros de 12 m de largo x 1 m de ancho, en los cuales se sembraron las plantas de 8 días, propagadas en germinadores utilizando suelo de bosque como sustrato, las plantas se sembraron a una distancia de 80 cm y la distancia entre los canteros adyacentes fue de 40 cm. Se aplicaron los mismos tratamientos del ensayo anterior y para cada tratamiento en cada bloque hubo 8 repeticiones. La aplicación de los bioestimulantes se llevó a cabo antes del trasplante desde los germinadores al terreno, a cada planta se aplicaron 5 mL de la solución de AH o de la suspensión bacteriana según el tratamiento. Dos semanas después de la siembra se realizó una segunda aplicación de los tratamientos, para ello se aplicaron 30 mL de la solución de AH por aspersión foliar a cada planta según el tratamiento al que corresponda y de la misma manera 30 mL de la suspensión de *B. mycooides* en el suelo alrededor del tallo de cada planta. El manejo de riego, labranza, y control de plagas se realizó teniendo en cuenta el manejo tradicional de los cultivadores locales. A los 32 días de la siembra se desenterraron las plantas, se tomó el peso completo de cada planta y posteriormente se pesó la raíz y el follaje por separado y se llevaron al horno durante 72 h a 65 °C, pasado este tiempo se registró la masa seca del follaje y la raíz.

Las variables evaluadas en cada uno de los experimentos fueron analizadas con el paquete estadístico IBPM SPSS Statistic Versión 22. Se realizaron pruebas de Normalidad (Prueba de 45 Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ ), homogeneidad de varianza, Pruebas NPar, ANOVA de Kruskal-Wallis; posteriormente se aplicaron las pruebas de comparación de promedios más pertinentes. El suelo utilizado en todos los ensayos fue objeto de caracterización según los siguientes parámetros: textura (método Bouyoucos), pH (en agua 1,1), materia orgánica (Walkley Black), Nitrógeno (Kheldal) capacidad de intercambio catiónico (acetato de amonio 1M y suma de cationes de calcio Ca, Mg, K, Na), S (fosfato monocálcico 0,008M), fósforo disponible (Olsen), Fe, Mn, Cu, Zn (Olsen-EDTA) conductividad eléctrica (extracto de saturación).

## **RESULTADOS**

### **Presencia de rizóbios en el suelo, con capacidad de nodular *V. unguiculata***

A partir de las semillas desinfectadas de *V. unguiculata* sembradas en el suelo recién colectado y sin esterilizar, crecieron plántulas que desarrollaron nódulos entre los 27 y 30 días, a partir de nódulos activos se logró aislar en medio YMA 4 morfotipos diferentes de colonias presuntivas de rizóbios, sus características morfológicas y bioquímicas diagnósticas se presentan en el cuadro 1. El clasificador de RDP determinó que la secuencia de



1439 pb corresponde a un microorganismo perteneciente al género *Rhizobium* y la comparación con la base de datos de secuencias de 16S de RDP, utilizando la herramienta SeqMatch contra aislamientos cultivados, indica que la secuencia problema ensamblada también presenta una mayor homología con secuencias de *Rhizobium*. Para la secuencia de 1420 pb correspondiente, el clasificador RDP y el análisis con SeqMatch permitió concluir que se trata de un organismo del género *Labrys*. De acuerdo a este resultado se seleccionó el aislamiento cuya identidad más probable es *Rhizobium* sp, para llevar a cabo el ensayo de nodulación.

**Cuadro 1.** Características de aislamientos bacterianos obtenidos de nódulos formados en *V. unguiculata*.

Característica	Aislamientos			
	1	2	3	4
<b>Morfología de las colonias en agar YMA</b>				
Color	Beige	Beige	Beige	Beige
Tamaño	Mediano	Mediano	Grande	Grande
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Elevación	Convexo	Convexo	Convexo	Plano
Consistencia	Mucoide	Gelatinosa	Gelatinosa	Gelatinosa
Precipit.	(-)	(-)	(+)	(-)
Transparente	Opaca	Translúcida	Translúcida	Opaca
Color en YMA+Rc	Rosa	Translúcida con Precipitado rojo en centro	Translúcida con Precipitado rojo en centro	Rosa
<b>Crecimiento en medios de cultivo diferenciales</b>				
PGA + PB	(-)	(-)	(-)	(+)
LLA	(+)	(+)	(+)	(+)
YMA + RC	(+)	(+)	(+)	(+)
XLD	(-)	(-)	(-)	(-)
Hektoen	(-)	(-)	(-)	(-)
Rx ácida YMA+AB	(+)	(+)	(+)	(+)
Rx Benedict	(-)	(-)	(-)	(+)
<b>Resistencia antibióticos</b>				
Tetrac/na 5.0µg/mL	(-)	(-)	(-)	(-)
Cloranf. 0.0µg/mL	(-)	(+)	(+)	(-)
<b>Crecimiento en NaCl en medio YMA</b>				
0,01 %	(+)	(+)	(+)	(-)
1 %	(+)	(+)	(+)	(+)
2%	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Crecimiento a diferentes valores de pH en medio YMA</b>				
4,5	(+)	(+)	(+)	(+)
6,8	(+)	(+)	(+)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Crecimiento a diferentes temperaturas en medio YMA</b>				
5°C	(-)	(-)	(-)	(-)
30°C	(+)	(+)	(+)	(+)
37°C	(+)	(+)	(+)	(+)
44°C	(-)	(-)	(-)	(-)

La inoculación con la cepa de *Rhizobium* sp incrementó el número de nódulos por planta en más del 100 % con respecto al tratamiento control sin inocular ( $p < 0,05$  prueba de Tukey) (cuadro 2), esto indica que en el suelo persistía una población de rizóbios capaces de nodular *V. unguiculata*, pero tras la bioaumentación con el inóculo de *Rhizobium* sp. se logra incrementar las posibilidades de nodulación, por otra parte, este incremento en la nodulación va acompañado de un incremento en la longitud de las raíces y en el tamaño promedio de los nódulos (cuadro 2), sin embargo no resultó evidente un efecto en la biomasa de las plantas.

**Cuadro 2.** Parámetros de nodulación y crecimiento de plántulas de *V. unguiculata* L.; inoculadas con *Rhizobium* sp.

Parámetro	<i>Rhizobium</i> sp	Control
Masa seca follaje/planta(g)	1200 ± (260)a	1130 ± (340)a
Masa seca raíz/planta (g)	220 ± (50)a	210 ± (40)a
Nº X Nódulos activos /planta	27,5 ± (5,13)a	13,3 ± (1,63)b
Ø X nódulos/planta (mm)	2,5 ± (0,2)a	1,8 ± (0,2)b
Longitud X raíces (cm)	19 ± (2,26)a	12,67 ± (2,8)b

Letras diferentes en cada variable indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ).

### Experimentos de bioestimulación

El inóculo de *B. mycooides* y los dos tipos de AH tuvieron un efecto positivo ( $p < 0,05$  Gámes Howell) sobre la acumulación de biomasa de follaje y raíces con respecto al tratamiento control (cuadro 3), aunque el tratamiento con AH-L ocasiona un efecto superior en biomasa radical, la diferencia no es significativa ( $p > 0,05$ ) con respecto al tratamiento con AH-C y el tratamiento con *B. mycooides*; así, este ensayo confirma la capacidad bioestimuladora de los dos AH y también la efectividad de *B. mycooides* como un microorganismo capaz de promover el crecimiento temprano de las plantas de frijol guajiro.

**Cuadro 3.** Efecto de los bioestimulantes aplicados individualmente, sobre crecimiento de *V. unguiculata*.

Tratamiento	Masa seca follaje (g)	Masa seca Raíz (g)
Control	0,23 ± (0,03) b	0,05 ± (0,01) b
<i>B. mycooides</i>	0,43 ± (0,07) a	0,12 ± (0,02) a
AH - L	0,45 ± (0,12) a	0,07 ± (0,02) a
AH - C	0,40 ± (0,04) a	0,07 ± (0,01) a

Letras diferentes en cada variable indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ).

El tratamiento de las plantas con los dos tipos de AH y con *B. mycooides* bajo condiciones controladas, incide positivamente incrementando el número de nódulos desarrollados por planta ( $p < 0,05$  Tukey) (figura 1a), igualmente ocurre en el tratamiento de inoculación conjunta de *B. mycooides* con cada tipo de AH, pero el efecto del tratamiento conjunto es menor en comparación con las aplicaciones individuales de AH o *B. mycooides*. El tratamiento con *B. mycooides* es el que mejor incide sobre la formación de nódulos, la respuesta al tratamiento con los dos tipos de AH resulta similar.

Este ensayo se realizó sobre el suelo sin esterilizar y sin inocular con *Rhizobium* sp.; lo que indica que si bien la bioaumentación con inóculos de *Rhizobium* sp. incrementa la nodulación (cuadro 2), la bioestimulación con AH y con *B. mycooides* también logra incrementarla a partir de la población natural que existe en el suelo, reduciendo la necesidad de una inoculación con *Rhizobium*.

Este resultado también aporta evidencia sobre el papel del género *Bacillus* como coadyuvantes en la formación de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, como se ha descrito previamente (Rajendran *et al.*, 2008); en este caso se reporta a *B. mycooides* BSC25 como estimulante de la simbiosis de rizóbios con *V. unguiculata*. La materia humificada soluble derivada de carbón lignito se ha relacionado directamente con el favorecimiento de la nodulación por rizóbios en Soya (Gao *et al.*, 2015), a la vez que AH derivados de lombricompost incrementaron la nodula-



ción en arveja (Maji *et al.*, 2017), así, este reporte aporta evidencia adicional del efecto de estos tipos de AH sobre la nodulación por rizóbios, en este caso sobre *V. unguiculata*.

Todos los tratamientos excepto la aplicación conjunta de AH-L y *B. mycooides* ocasionaron incrementos en peso fresco (figura 1b), especialmente en la raíz ( $p < 0,05$  Tukey), sobresale el tratamiento de coinoculación de AH-C y *B. mycooides*. Para el peso seco del follaje no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (figura 1c), pero se observa una tendencia a la ganancia de peso a causa de los tratamientos, siendo el efecto más evidente en la ganancia en peso fresco; el efecto sobre la acumulación de masa seca resultó más notorio sobre la raíz (figura 1c) donde hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$  Tukey) entre el control y todos los tratamientos, a diferencia de la biomasa del follaje. Lo anterior indica que el efecto principal se presentó a nivel de raíz y sobre el peso fresco, posiblemente a causa de mejor conservación del agua en los tejidos, como ha sido reportado para plantas de maíz tratado con AH, donde la ganancia en peso fresco se relaciona con parámetros bioquímicos indicadores del alivio del estrés por sequía (Canellas *et al.*, 2020). La coinoculación de rizóbios con *Herbaspirillum seropedicae* y HA también favorece la recuperación del frijol común ante estrés hídrico (Da Piedade *et al.*, 2017).

En el cuadro 4 se muestra que hubo mayor cantidad de N foliar acumulado en las plantas tratadas con los dos tipos de AH y el AH-L en conjunto con *B. mycooides*, este último tratamiento fue el que condujo a una mayor acumulación de N (ganancia del 28 % con respecto al control), este resultado posiblemente esté relacionado con el efecto positivo de estos tratamientos sobre la formación de nódulos por *Rhizobium* (figura 1a), sin embargo el tratamiento con *B. mycooides*, en el cual hubo el mayor desarrollo de nódulos activos no correspondió a un mayor incremento en nitrógeno foliar, aun cuando incrementó en un 6 % con respecto al control.

**Cuadro 4.** Contenido foliar de P y N en plantas de *V. unguiculata* tratadas con AH-L, AH-C y *B. mycooides*.

Tratamiento	P (%)	N (%)
Control	0,45± (0,02) a	4,7 ± (0,42) a
AH-L	0,48± (0,03) a	5,5 ± (0,07) b
AH-C	0,46± (0,02) a	5,7 ± (0,5) b
<i>B. mycooides</i>	0,47± (0,02) a	5,0 ± (0,01) a
AH-L+B. <i>mycooides</i>	0,52± (0,01) b	6,0± (0,01) b
AH-C + <i>B. mycooides</i>	0,50± (0,01) b	4,8± (0,43) a

Letras diferentes en cada variable indican diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ).

El contenido de P acumulado en el follaje se incrementó en los tratamientos donde se utilizó *B. mycooides* en conjunto con AH-L y AH-C, con incrementos del 15 y 11 % respectivamente con respecto al control, denotando un efecto sinérgico entre los dos bioestimulantes, este resultado puede deberse a la capacidad de *B. mycooides* - BSC25 para solubilizar fosfatos, característica que fue comprobada para esta cepa, considerando que es un atributo común en especies del género *Bacillus* presentes en el suelo (Saeid *et al.*, 2018).

A través del ensayo en condiciones de campo (figura 2), se evidenció que todos los tratamientos ocasionan un incremento en el peso fresco de follaje y raíces (figura 2a), hubo diferencia estadística para el peso fresco total entre el tratamiento control y los tratamientos con AH-C, *B. mycooides*, y la aplicación conjunta de estos dos bioestimulantes, pero no hubo diferencia para el peso fresco del follaje en ningún tratamiento, mientras que si hubo diferencia significativa para el peso fresco de raíces ( $p < 0,05$ , Tukey) en todos los tratamientos con respecto al control.

Los resultados en el peso seco (figura 2b), presentan el mismo comportamiento descrito para el peso fresco, solamente hubo diferencia en el peso seco total entre el tratamiento con AH-C y el control, pero se aprecian valores mayores para la respuesta de las plantas bajo el tratamiento de inoculación con *B. mycooides*, mientras que la aplicación conjunta de la bacteria con cada uno de los AH parece reducir ligeramente la respuesta frente a la aplicación de la bacteria sola; todos los tratamientos presentaron diferencia significativa ( $p < 0,05$  Tukey) con respecto al tratamiento control excepto la aplicación de AH-L y la combinación de AH-L y *B. mycooides*.

La figura 2c muestra que todos los tratamientos ocasionaron un incremento en la formación de nódulos activos, sin embargo resultó mayor el efecto de *B. mycooides* de manera individual, en comparación con su aplicación conjunta con los dos tipos de AH o el tratamiento con los AH en aplicación individual, este resultado concuerda con el ensayo bajo condiciones controladas (figura 1a) y muestra el papel de los AH y especialmente de *B. mycooides* como promotor de la formación de nódulos en la simbiosis de *V. unguiculata* con la población basal de rizóbios del suelo.

En el proceso de infección de las raíces por rizóbios, y la formación de nódulos, es importante la comunicación química planta bacteria, así como el aumento en la producción de auxinas para incrementar y activar las bombas  $H^+ATP$ asas en la membrana, logrando inducir la acidificación del apoplasto para permitir el debilitamiento de las paredes de las células vegetales, tanto para permitir la proliferación de raicillas secundarias y pelos radicales, como para la entrada de la bacteria a la planta. En este sentido, el efecto “like auxin” que ha sido relacionado con cierto tipo de moléculas presentes en los AH (Scaglia *et al.*, 2016), así como una posible estimulación en la producción de exudados, lo que favorece la comunicación planta bacteria (Canellas *et al.*, 2019), pudieron ser mecanismos de bitoestimulación relacionados con la respuesta en la nodulación y en el crecimiento de las plantas de frijol guajiro.

Entonces, la tendencia hacia el debilitamiento en la respuesta observado en los tratamientos de inoculación conjunta AH-*B. mycooides*, podría estar relacionado con un nivel inadecuado por sobreexposición en el balance auxínico debido a los aportes “like auxin” de los AH, *B. mycooides*, la planta y los rizóbios. Al respecto se ha documentado que la respuesta en la promoción de crecimiento por AH depende fuertemente de la concentración y la especie vegetal (Canellas *et al.*, 2020). Igualmente se ha descrito que la densidad de rizobacterias productoras de auxinas puede conducir a efectos contrarios en el crecimiento y sanidad de *Arabidopsis thaliana* en tratamiento conjunto con la adición de lombrices de tierra en cuyas heces se libera al suelo materia orgánica transformada que contiene auxinas (Castellanos *et al.*, 2014).

El suelo utilizado en todos los experimentos presentó una textura arenosa franca (arena 84 %, limo 10 %, arcilla 6 %), que ocasiona baja retención hídrica y estrés por sequía. El pH es alcalino (8) y la conductividad eléctrica de 17,8 dSm indica salinidad muy alta, lo que ocasiona estrés hídrico e influye negativamente en la absorción de nutrientes y por tanto en el crecimiento, en esta condición es importante el papel de los AH como mitigadores del estrés por salinidad (Adil Aydin, 2012). El N es muy limitante (0,25 %), por lo cual la fijación biológica de nitrógeno toma bastante importancia. El contenido de fósforo (124 ppm) puede considerarse normal; la capacidad de intercambio de cationes es baja (9,2 cmol (c)  $Kg^{-1}$ ), lo cual se relaciona con el bajo contenido en arcillas y materia orgánica (0,67 %), dificultando la nutrición con efectos como la alta deficiencia de N. El contenido de K, Mg, Ca y Na es de 0,44, 1,6, 6,7 y 0,45 cmolc\* $kg^{-1}$ , estos valores indican una baja saturación de bases; los valores de S, Fe, Mn, Cu, Zn y Bo fueron de 17,10,3,1,1 y 1,2 mg\* $Kg^{-1}$  respectivamente, siendo micronutrientes, los valores no resultan limitantes. Estas características del suelo reflejan unas condiciones fuertemente limitantes, causantes de estrés vegetal, donde las respuestas positivas de las plantas tratadas con bioestimulantes húmicos son más contundentes, debido a la regulación positiva de múltiples respuestas de defensa y adaptación vegetal ante el estrés por medio de “priming químico” (Canellas *et al.*, 2020).

Está ampliamente documentado que la naturaleza química de la supraestructura de AH del compost les confiere una bioactividad sobresaliente sobre las plantas (Cubillos *et al.*, 2017; de Aquino *et al.*, 2019). También se ha concluido sobre las propiedades bioestimulantes de los AH presentes en carbones pobres generados en la minería de carbón del caribe colombiano (Valero *et al.*, 2018). En este estudio se evidenció que los dos tipos de AH empleados, provenientes de lignito y lombricompost desencadenan una respuesta consistente como bioestimulantes para *V. unguiculata*. Por lo anterior, teniendo en cuenta la influencia de tensores ambientales en los suelos de las zonas áridas y semiáridas del norte del departamento del Cesar y La Guajira, se puede considerar muy conveniente el uso de la bioestimulación con AH sobre plantas de cultivo como el frijol guajiro, aprovechando la disponibilidad de las materias primas para su extracción. también resulta conveniente el uso de bacterias esporuladas, como *B. mycooides*, evaluada en este estudio, con características ventajosas como bioinoculante en suelos secos.

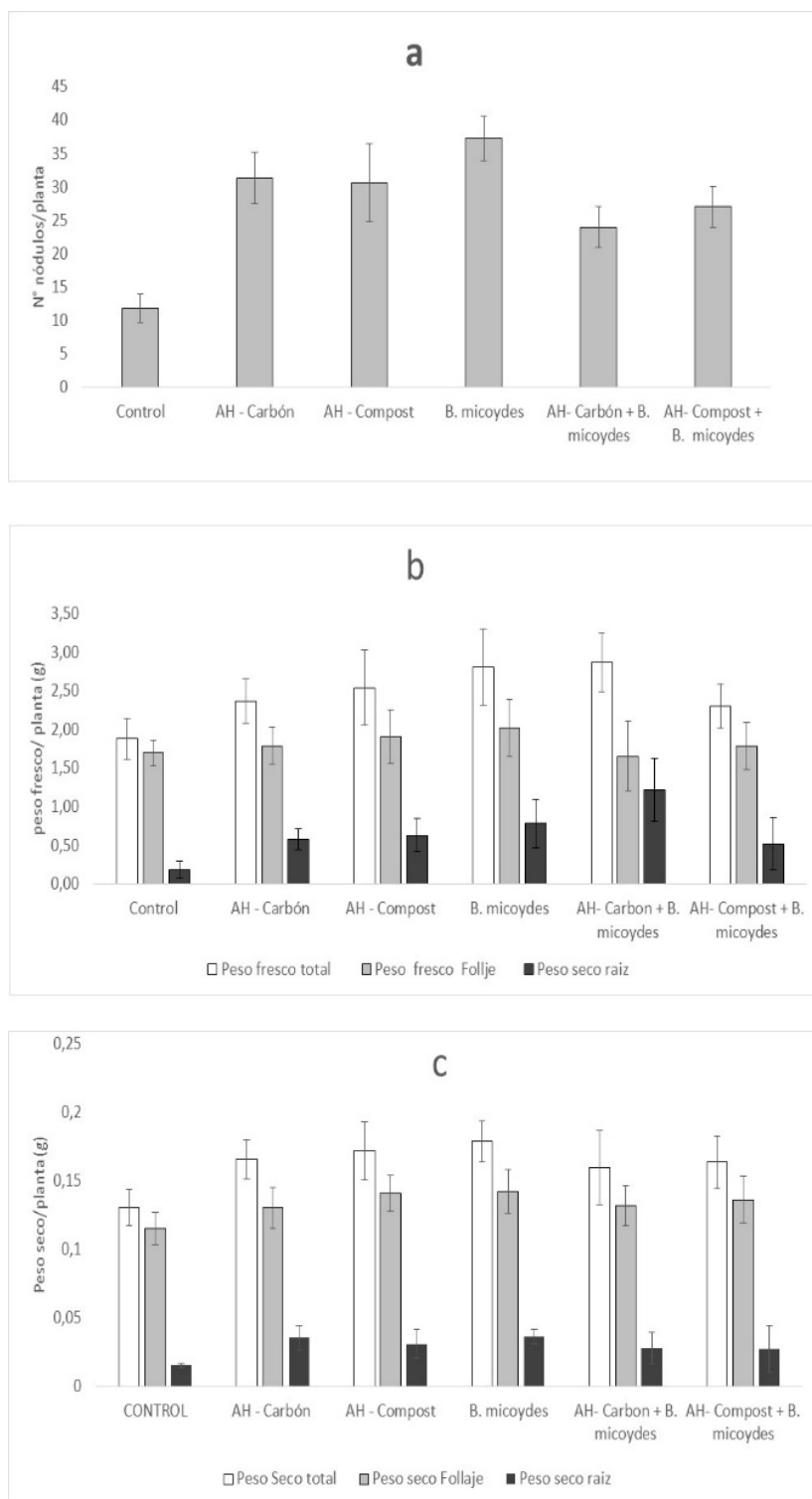
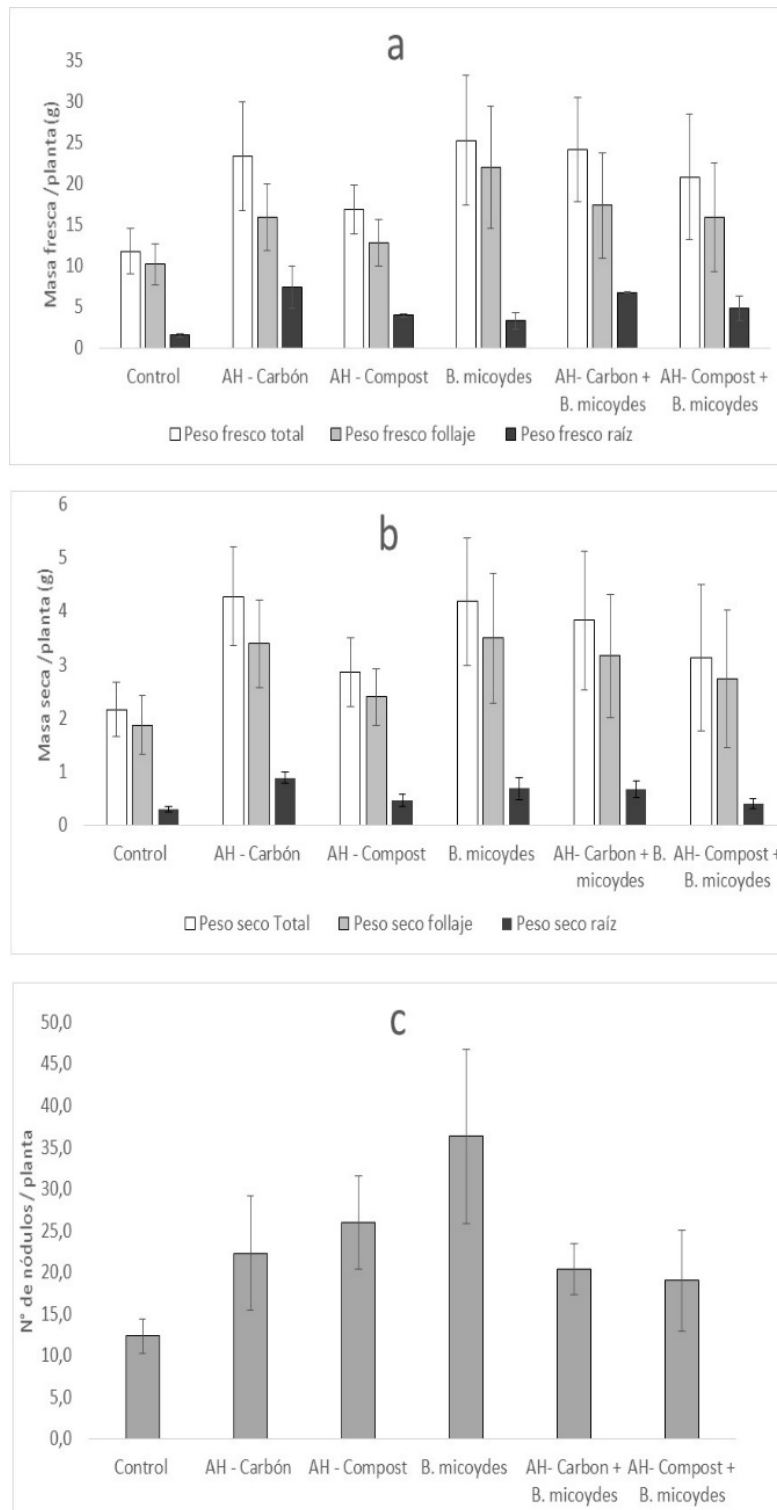


Figura 1. Efecto de bioestimulantes aplicados individual y conjuntamente, sobre crecimiento de *V. unguiculata*.



**Figura 2.** Efecto de AH-L, AH-C y *B. mycoides* sobre *V. unguiculata* en condiciones de campo.

Teniendo en cuenta que la recomendación para la formulación de los AH y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal depende en gran medida de la concentración del agente bioestimulante y de la especie vegetal, es necesario desarrollar estudios tendientes a esclarecer el efecto de las concentraciones y la relación con el balance auxínico que podría estar implicado en la modulación de la respuesta, con el fin de aprovechar mejor las potencialidades de estos agentes bioestimulantes.

## CONCLUSIONES

El tratamiento de las plántulas del frijol guajiro con *B. mycooides*, AH-L y AH-C, en aplicaciones individuales y en conjunto, demostró el efecto de las propiedades multifuncionales de estos dos agentes como bioestimulantes vegetales; sin embargo, no fue consistente el efecto sinérgico por la aplicación conjunta. Se encontró evidencia sobre el papel de *B. mycooides*, y los AH como coadyuvante para la formación de nódulos por la población basal de rizobios presentes en el suelo.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por la Universidad Popular del Cesar a través del proyecto de investigación: Evaluación del efecto de *Bacillus mycooides* y ácidos húmicos sobre la nodulación de *Vigna unguiculata* inoculada con cepas de *Rhizobium sp.* bajo condiciones de laboratorio.

Se agradece la colaboración del laboratorio de Ciencias Ambientales de la Universidad de La Guajira y el grupo de Investigación DESTACAR.

## REFERENCIAS

- AGUIAR, N.O.; OLIVARES, F.L.; NOVOTNY, E.H.; CANELLAS, L.P. Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *Peer Journal*, 6 e5445, 2018, p. 1-28. <https://doi.org/10.7717/peerj.5445>.
- ARAMENDIZ-TATIS, H.; ESPITIA-CAMACHO, M.; CARDONA-AYALA, C. Adaptation and stability of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) bean cultivars in the tropical dry forest of Colombia. *Australian Journal of Crop Science*, v. 13, n. 6, 2019, p. 1009-1016. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.06.p1965>.
- BORRIS, R. Phyto-Microbiome in Stress Regulation. *Phyto-stimulation and Biocontrol by the Plant-Associated Bacillus amyloliquefaciens FZB42: An Update BT - Bacilli and Agrobiotechnology*. 1 ed. Singapore (Singapore): Kumar M.; Kumar V.; Prasad R. (eds), 2016, p 163-184.
- BULGARI, R.; FRANZONI, G.; FERRANTE, A. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, v. 9, n. 6, 2019. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>.
- CANELLAS, L.P.; CANELLAS, N.; SOUZA, L.E.; OLIVARES, F.L.; PICCOLO, A. Plant chemical priming by humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 7, n. 1, 2020, p. 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>.
- CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; CANELLAS, N.O.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 6, n. 1, 2019, p. 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0139-7>.

- CASTELLANOS-SUAREZ, D.E.; GIGON, A.; PUGA-FREITAS, R.; LAVELLE, P.; VELASQUEZ, E.; BLOUIN, M. Combined effects of earthworms and IAA-producing rhizobacteria on plant growth and development. *Applied Soil Ecology*, v. 80, 2014, p. 100-107.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.04.004>.
- CHANG, R.R.; MYLOTTE, R.; HAYES, M.H.; MCLNERNEY, R.; TZOU, Y.M. A Comparison of the Compositional Differences Between Humic Fractions Isolated by the IHSS and Exhaustive Extraction Procedures. *Naturwissenschaften*, v. 101, n. 3, 2014, p. 197-209.  
<https://doi.org/10.1007/s00114-013-1140-4>.
- CHIBOUB, M.; JEBARA, S.H.; ABID, G.; JEBARA, M. Co-inoculation Effects of *Rhizobium sultae* and *Pseudomonas* sp. on Growth, Antioxidant Status, and Expression Pattern of Genes Associated with Heavy Metal Tolerance and Accumulation of Cadmium in *Sulla coronaria*. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 39, n. 1, 2020, p. 216-228.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-019-09976-z>.
- CUBILLOS-HINOJOSA, J.G.; SILVA-ARAUJO, D.A.; SÁ, S.D. Rizóbios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* en Rio Grande do Sul, Brasil. *Biocología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, v. 19, n. 1, p.128-138.  
<http://dx.doi.org/10.18684>
- CUBILLOS-HINOJOSA, J.G.; VALERO-VALERO, N.O.; PERALTA, A. Effect of a low rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria for the rehabilitation of a saline-sodic soil in field conditions. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, v. 70, n. 3, 2017, p. 8271-8284.  
<https://doi.org/10.15446/rfna.v70n3.62478>.
- DE AQUINO, A.M.; CANELLAS, L.P.; DA SILVA, A.; CANELLAS, N.O.; LIMA, L.; OLIVARES, F.L.; PICCOLO, A.; SPACCINI, R. Evaluation of molecular properties of humic acids from vermicompost by <sup>13</sup>C-CPMAS-NMR spectroscopy and thermochemolysis-GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 141, 2019, p. 104634.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2019.104634>.
- DU JARDIN, P.; XU, L.; GEELLEN, D. The Chemical Biology of Plant Biostimulants. *Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs) an Introduction*. 1 ed. West Sussex (United Kingdom): John Wiley & Sons Ltd, 2020, p. 1-30.  
<https://doi.org/10.1002/9781119357254.ch1>.
- EL HASINI, S.; DE NOBILI, M.; AZZOUZI, M.; AZIM, K.; DOUAIK, A.; LAGHROUR, M.; EL ISRISSI, Y.; EL ALAOUI, M.; ZOUAHRI, A. The influence of compost humic acid quality and its ability to alleviate soil salinity stress. *International Journal of Recycling Organic waste in Agriculture*, v. 9, n. 1, 2020, p. 21-31. 2020,  
<https://doi.org/10.30486/ijrowa.2020.671213>.
- GAO, T.G.; XU, Y.Y.; JIANG, F.; LI, B.Z.; YANG, J.S.; WANG, E.T.; YUAN, L.H. Nodulation characterization and proteomic profiling of *Bradyrhizobium liaoningense* CCBAU05525 in response to water-soluble humic materials. *Scientific Reports*, v. 5, n. 10836, 2014, p. 1-13.  
<https://doi.org/10.1038/srep10836>.
- HAN, Q.; MA, Q.; CHEN, Y.; TIAN, B.; XU, L.; BAI, Y.; CHEN, W.; LI, X. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. *ISME Journal*, v. 14, n. 8, 2020, p. 1915-1928.  
<https://doi.org/10.1038/s41396-020-0648-9>.
- HTWE, A.Z.; MOH, S.M.; KYI, M.; YAMAKAWA, T. Effects of co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* SAY3-7 and *Streptomyces griseoflavus* P4 on plant growth, nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake, and yield of soybean in a field condition. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 64, n. 2, 2018, p. 222-229.  
<https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1421436>.
- JINDO, K.; OLIVARES, F.L.; DA PAIZÃO-MALCHER, D.J.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A.; KEMPENAAR, C.; CANELLAS, L.P. From Lab to Field: Role of Humic Substances Under Open-Field and Greenhouse Conditions as Biostimulant and Biocontrol Agent. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, n. 426, 2020, p. 1-10.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00426>.



- KAYA, C.; AKRAM, N.A.; ASHRAF, M.; SONMEZ, O. Exogenous Application of Humic Acid Mitigates Salinity Stress in Maize (*Zea mays* L.) Plants by Improving some Key Physico-biochemical Attributes. *Cereal Research Communications*, v. 46, n. 1, 2018, p. 67-78.  
<https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.064>.
- LOTFI, R.; KALAJI, H.; VALIZADEH, G.; KHALILVAND, E.; HEMATI, A.; GHARAVI-KOCHEBAGH, P.; GHASSEMI, A. Effects of humic acid on photosynthetic efficiency of rapeseed plants growing under different watering conditions. *Photosynthetica*, v. 56, n. 3, 2018, p. 962-970.  
<https://doi.org/10.1007/s11099-017-0745-9>.
- MAJI, D.; MISRA, P.; SING, S.; KALRA, A. Humic acid rich vermicompost promotes plant growth by improving microbial community structure of soil as well as root nodulation and mycorrhizal colonization in the roots of *Pisum sativum*. *Applied Soil Ecology*, v. 110, 2017, p. 97-108.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.10.008>.
- MENDOZA-LABRADOR, J.A.; BONILLA-BUITRAGO, R.R. Infectividad y efectividad de rizobios aislados de suelos de la Costa Caribe Colombiana en *Vigna unguiculata*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 16, n. 2, 2014, p. 84-89.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47246>
- MISHRA, P.K.; MISHRA, S.; SELVAKUMAR, G.; BISHT, J.K.; KUNDU, S.; SHANKAR-GUPTA, H. Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 5, 2009, p. 753-761.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-9963-z>.
- MOHANRAM, S.; KUMAR, P. Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of plant-microbe interactions. *Annals of Microbiology*, v. 69, n. 4, 2019, p. 307-320.  
<https://doi.org/10.1007/s13213-019-01448-9>.
- MULFORD, J.; CUBILLOS, J.; MILIAN, P. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp.; asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, v. 2, n. 1, 2012, p. 12-21.
- NDUNGU, S.M.; MESSMER, M.M.; ZIEGLER, D.; GAMPER, H.A.; MÉSZÁROS, É.; THUITA, M.; VANLAUWE, B.; FROSSARD, E.; THONAR, C. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. *Agriculture Ecosystems & Environment*, v. 261, 2018, p. 161-171. 2018,  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.014>.
- OLIVEIRA-NUNES, R.; ABRAHÃO-DOMICIANO, G.; SOUSA-ALVES, W.; AMARAL-MELO, A.C.; SOUSA-NOGUEIRA, F.C.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; ZINGALI, R.B.; SOARES, M.R. Evaluation of the effects of humic acids on maize root architecture by label-free proteomics analysis. *Science Reports*, v. 9, n. 1, 2019, p. 1-11.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48509-2>.
- PIECADE-MELO, A.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA-MÉDICI, L.; TORRES-NETO, A.; BARROS-DOBBSS, L.; CANELLAS, L.P. Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 4, n. 1, 2017, p. 1-9.  
<https://doi.org/10.1186/s40538-017-0090-z>.
- RAJENDRAN, G.; SING, F.; DESAI, A.J.; ARCHANA, G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 11, 2008, p. 4544-4550.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.057>.
- ROOMI, S.; MASI, A.; BATTISTA-CONSELVAN, G.; TREVISAN, S.; QUAGGIOTTI, S.; PIVATO, M.; ARRIGONI, G.; YASMIN, T.; CARLETTI, P. Protein profiling of arabidopsis roots treated with humic substances: Insights into the metabolic and interactome networks. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. 1812, 2018, p. 1-19.  
10.3389/fpls.2018.01812
- ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, n. 40, 2020, p.1-7.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>

- SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANIEK, J. Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *Molecules*, v. 23, n.11, 2018, p1-18.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23112897>
- SCHWARTZ, A.R.; ORTIZ, I.; MAYMON, M.; HERBOLD, C.W.; FUJISHIGE, N.A.; VIJANDERAN, J.A.; VILLELLA, W.; HANAMOTO, K.; DIENER, A.; SANDERS, E.R.; DEMANSON, D.A.; HIRSCH, A.M. *Bacillus simplex*—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*, v. 3, n. 4, 2013, p. 595–620.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy3040595>.
- SHAH, Z.H.; REHMAN, H.M.; AKHTAR, T.; ALSAMADANY, H.; HAMOOH, B.T.; MUJTABA, T.; DAUR, I.; ZAHRANI, Y.; ALZHRANI, H.A.; ALI, S.; YANG, S.H.; CHUNG, G. Humic substances: Determining potential molecular regulatory processes in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. 263, 2018, p. 1-12.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00263>.
- STEVENS, C.; GEELLEN, D.; XU, L. *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*. 1 ed. West Sussex (United Kingdom): John Wiley & Sons Ltd, 2020. 301p.  
<https://doi.org/10.1002/9781119357254>.
- VALERO-VALERO, N.O.; GÓMEZ-GÓMEZ, L.C.; MELGAREJO, L.M. Supramolecular characterization of humic acids obtained through the bacterial transformation of a low rank coal. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, n. 9. 2018, p. 1842–1853.  
<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180060>.
- WOZNIAK, E.; BLASZCAK, A.; WIATRAC, P.; CANADY, M. *The Chemical Biology of Plant Biostimulants. Biostimulant Mode of Action: Impact of Biostimulant on Whole Plant Level*. 1 ed. West Sussex (United Kingdom): John Wiley & Sons Ltd, 2020, p. 205-227.  
<https://doi.org/10.1002/9781119357254.ch8>.