

Evaluación del efecto de *Bacillus licheniformis* M2-7 como biofertilizante en cultivo de *Raphanus sativus* L. (Brassicales: Brassicaceae)

Evaluation of the effect of *Bacillus licheniformis* M2-7 as a biofertilizer in *Raphanus sativus* L. (Brassicales: Brassicaceae)

José Ángel Sánchez-Marcelo¹ , Alfredo Ramírez-Cruz¹ , Erubiel Toledo-Hernández² ,
Daysi Navez-González³ , Yanet Romero-Ramírez² , Alejandro Bolaños-Dircio^{2*} 

¹Programa Educativo de Biotecnología, Facultad Académica de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas, sin número, Ciudad Universitaria, 39070, Chilpancingo, Guerrero, México.

²Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma de Guerrero.

³Laboratorio de Microbiología Ambiental, Centro de Investigación Especializada en Microbiología, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Universidad S/N, Las Colinas, Ex Rancho Shalako, 39105, Petaquillas, Guerrero, México.

*Autor para correspondencia: alexo_guerrero@hotmail.com

Fecha de recepción:

3 de marzo de 2023

Fecha de aceptación:

30 de julio de 2023

Disponible en línea:

27 de octubre de 2023

Este es un artículo en acceso abierto que se distribuye de acuerdo a los términos de la licencia Creative Commons.



Reconocimiento-

NoComercial-

CompartirIgual 4.0

Internacional

(CC BY-NC-SA 4.0)

RESUMEN

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal poseen características que favorecen el crecimiento y la salud de las plantas. Por ello, los biofertilizantes surgen como alternativas en la agricultura sustituyendo parcial o totalmente la fertilización química. Se evaluó el efecto de un bioformulado a base de *Bacillus licheniformis* M2-7 en la germinación, crecimiento y rendimiento de *Raphanus sativus* L. Se estandarizó un bioformulado con melaza a 6 por ciento y se monitoreó el crecimiento de la cepa M2-7 de 0 a 288 h. Asimismo, se realizaron experimentos para determinar el porcentaje de germinación, crecimiento y rendimiento de la hortaliza. El porcentaje de germinación se determinó 15 días después de la siembra; el crecimiento y rendimiento, 45 días después. Los resultados demostraron que la cepa M2-7 aumentó el porcentaje de germinación (80.6%) y mejoró significativamente las variables evaluadas ($p \leq 0.05$). Los resultados sugieren el uso de *B. licheniformis* M2-7 en formulaciones para su aplicación en hortalizas.

PALABRAS CLAVE

Bacillus licheniformis; germinación; hortaliza; rendimiento.

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria possess characteristics that favor plant growth and health. Therefore, biofertilizers are emerging as alternatives in agriculture, partially or totally substituting chemical fertilization. We evaluated the effect of a bioformulation based on *Bacillus licheniformis* M2-7 on the germination, growth, and yield of *Raphanus sativus* L. A bioformulation was standardized with 6% molasses, and the growth of strain M2-7 was monitored from 0 to 288 h. Experiments were also conducted to determine the percentage of germination, growth and yield of the vegetable. The germination percentage was determined 15 days after sowing; growth and yield, 45 days later. The results showed that strain M2-7 increased the germination percentage (80.6%) and significantly improved the evaluated variables ($p \leq 0.05$). The results suggest the use of *B. licheniformis* M2-7 in formulations to be applied in vegetables.

KEYWORDS

Bacillus licheniformis; germination; vegetable; yield.

INTRODUCCIÓN

El rábano (*Raphanus sativus* L.) es un tubérculo cultivado y consumido en todo el mundo y se considera parte de la dieta humana (Manivannan et al. 2019). En la mayoría de los estados productores de rábano en México, el cultivo se realiza de manera intensiva, con un alto consumo de agroquímicos, lo que puede ocasionar impactos negativos en el medio ambiente debido al uso excesivo: pérdida de fertilidad de los suelos agrícolas, contaminación del medio ambiente y problemas de salud humana (Goklany 2021). Asimismo, los agroquímicos incrementan los costos de producción, lo que afecta la economía de los agricultores (Janssens et al. 2020). En consecuencia, la búsqueda de estrategias biotecnológicas respetuosas con el medio ambiente se vuelve importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

El desarrollo de biofertilizantes que involucran microorganismos benéficos (bacterias promotoras de crecimiento vegetal u hongos) representa una opción para sustituir los fertilizantes químicos, ya que tienen la capacidad de favorecer el crecimiento y la salud de las plantas (Verma et al. 2018; Pirttilä et al. 2021). Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) colonizan la rizosfera o el interior de las plantas y, mediante sus actividades metabólicas, aumentan la disponibilidad de nutrientes que las plantas pueden absorber fácilmente (Verma et al. 2018). Los mecanismos por los cuales las bacterias aumentan la fertilidad del suelo son: fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos insolubles en el suelo, producción de auxinas y giberelinas, los cuales son productos que promueven el crecimiento de las plantas (Maçik et al. 2020; Chaudhary et al. 2021). Dentro de los géneros bacterianos ampliamente utilizados en la agricultura se encuentran *Pseudomonas* y *Bacillus* (Azeem et al. 2022).

En México, existen biofertilizantes que han mostrado beneficios en los rendimientos de producción. Sin embargo, se necesitan estudios enfocados al desarrollo de nuevas formulaciones que permitan tener una mejor estabilidad en almacenamiento y mantengan la actividad al ser aplicados en los cultivos. La producción de biofertilizantes efectivos y de bajo costo implica múltiples fases, desde la elección, el aislamiento y selección de microorganismos para encontrar

el más eficiente, hasta la realización de varias pruebas en campo antes de pasar a la etapa comercial (Vassileva et al. 2021). También es importante encontrar materias primas más baratas que sean ricas en nutrientes, carbono y fuentes de nitrógeno, con el objetivo de utilizarlas como sustrato para cultivar microorganismos benéficos (Namfon et al. 2017).

En varios estudios realizados se ha mostrado el papel de las BPCV en el aumento de la disponibilidad de nutrientes y la promoción del crecimiento de las plantas. Song et al. (2021) demostraron que la inoculación de *Azotobacter chroococcum* aumentó los contenidos de nitrógeno total (N) y fósforo total (P) en las plantas de maíz, en relación con el control sin inocular. El peso promedio de grano durante 4 años fue mayor (+17.07%) en el tratamiento con *A. chroococcum* que en el tratamiento control. En estudios similares, la coinoculación de caña de azúcar con diferentes cepas (*Bacillus* sp. BACBR04, *Bacillus* sp. BACBR06 y *Rhizobium* sp. RIZBR01), junto con el uso de composta como fuente de fósforo (P), dio como resultado mayor contenido de P en los brotes, en comparación con los tratamientos no inoculados, así como un aumento del contenido de nitrógeno en el tejido vegetal (Estrada-Bonilla et al. 2021). Filipini et al. (2021) evaluaron la inoculación de *Rhizobium tropici* y *Azospirillum brasilense*, solos o en combinación, en el crecimiento y rendimiento de granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). La aplicación de las cepas aumentó la biomasa, el nitrógeno acumulado y el rendimiento de grano del frijol.

Recientemente se ha reportado que la cepa de *Bacillus licheniformis* M2-7 presenta mecanismos de promoción vegetal como la producción de auxinas, giberelinas, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno (Bolaños-Dircio et al. 2021). También se ha evaluado su efecto en cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.), con resultados favorables en germinación, crecimiento y rendimiento de esta hortaliza (Bolaños-Dircio et al. 2021). Además, se ha reportado también su capacidad para controlar hongos fitopatógenos (Albarrán-de la Luz et al. 2022; Bahena-Oregón et al. 2022). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un bioformulado donde el ingrediente activo fue *Bacillus licheniformis* M2-7 sobre germinación, crecimiento y rendimiento del cultivo de rábano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa *Bacillus licheniformis* M2-7, perteneciente a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Facultad Académica de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. La cepa se cultivó en 50 mL de medio LB líquido con la siguiente composición en g/L: 10.0 peptona de caseína, 5.0 extracto de levadura y 10.0 NaCl; se incubó a 37 °C a 180 rpm durante 24 h. Se utilizaron semillas de *Raphanus sativus* L. (Rabano champion) (Golden® Vegetables Seeds, Guadalajara, México).

Estandarización del bioformulado de *Bacillus licheniformis* M2-7

Para el diseño del bioformulado, se utilizó *B. licheniformis* M2-7, obtenida de un cultivo de LB líquido de 24 h de incubación; se inoculó en medio con melaza a 6 por ciento, como única fuente de carbono, y se incubó a 37 °C a 180 rpm por 12 días. Para monitorear el crecimiento de la bacteria, se realizaron lecturas de absorbancia con el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer modelo #6131 (Marshall Scientific LLC, Boston, Estados Unidos), a una longitud de onda DO_{600} en los intervalos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 o 36 h, desde 0 hasta las 288 h de incubación. Por cada muestra establecida, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 50 μ L en medio LB sólido. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El recuento de las colonias se reportó en UFC/mL.

Prueba de germinación de semillas

Las semillas de rábano fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio a 5 por ciento durante 5 min, lavados con agua estéril, etanol a 80 por ciento, durante 1 min y lavados nuevamente con agua estéril. Se utilizaron 50 semillas de rábano para su inoculación por inmersión en 50 mL del bioformulado durante 1 h. Como testigo, se usaron 50 semillas tratadas con 50 mL de agua destilada estéril. Después, se sembraron en un semillero de 200 cavidades, se incubaron a temperatura ambiente y el porcentaje de germinación se registró a los 15 días.

Se realizó el trasplante en macetas de plástico que contenían ½ kg de suelo esterilizado y se colocaron a temperatura ambiente.

Diseño experimental

Las plántulas de rábano fueron trasplantadas en macetas de plástico que contenían ½ kg de suelo esterilizado y se colocaron a temperatura ambiente. El diseño experimental fue completamente al azar con 3 tratamientos y 10 repeticiones: Tratamiento 1 (Fertilizante químico, Triple 17 [2 g/L]), tratamiento 2 (Bioformulado de *B. licheniformis* M2-7 [1×10^8 UFC]) y tratamiento 3 (Agua destilada estéril). La unidad experimental estuvo constituida por una maceta con una planta de rábano. Los datos de las variables (longitud de hoja, número de hojas y peso total) fueron analizados mediante un análisis de varianza entre medias estadísticas (ANOVA) y comparación mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el software GraphPad Prism, versión 6.0 (Dotmatics, Boston, Estados Unidos) para Windows.

RESULTADOS

Bacillus licheniformis M2-7 en medio con melaza

Se evaluó el crecimiento de la cepa M2-7 en medio con melaza a 6 por ciento como única fuente de carbono. Originalmente, se inició el cultivo con una DO_{600} de 0.053 y 4.84×10^3 UFC/mL. Por medio de las lecturas espectrofotométricas, se observó que *B. licheniformis* M2-7 alcanza su crecimiento máximo a las 216 h (DO_{600} de 2.22, Figura 1A). Además, se evidenció el crecimiento bacteriano en UFC/mL, para alcanzar hasta 2.5×10^7 UFC/mL durante esta fase de crecimiento bacteriano (Figura 1B).

Porcentaje de germinación de *Raphanus sativus* L.

El bioformulado con melaza a 6 por ciento a base de *B. licheniformis* M2-7 mostró un efecto positivo en la germinación de semillas de rábano. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las semillas tratadas con la cepa M2-7 respecto al control, con 80.6 por ciento y 50 por ciento de germinación, respectivamente (Figura 2).

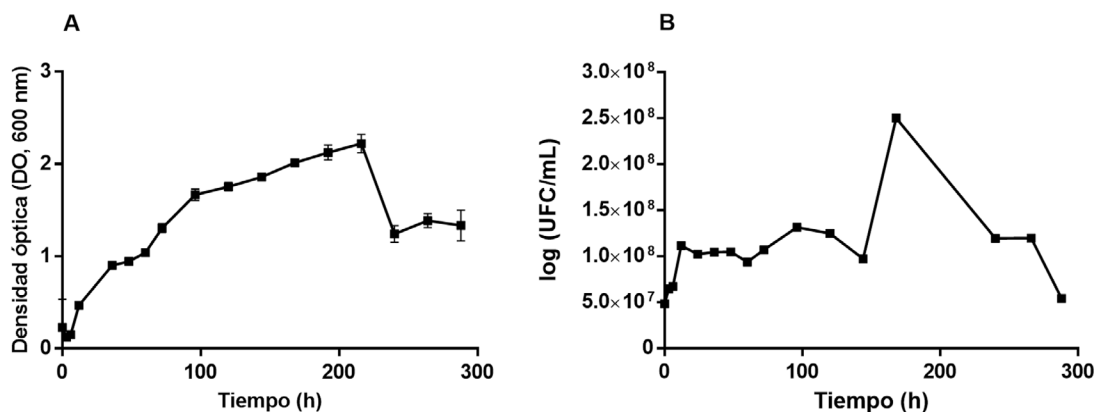


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano de *Bacillus licheniformis* M2-7 en medio con melaza a 6 por ciento. Se realizó la medición de la absorbancia de DO₆₀₀ (A) y la cuantificación de UFC/mL (B) a los diferentes tiempos. Las barras de error indican la Desviación Estándar (DE) de tres repeticiones (n=3).

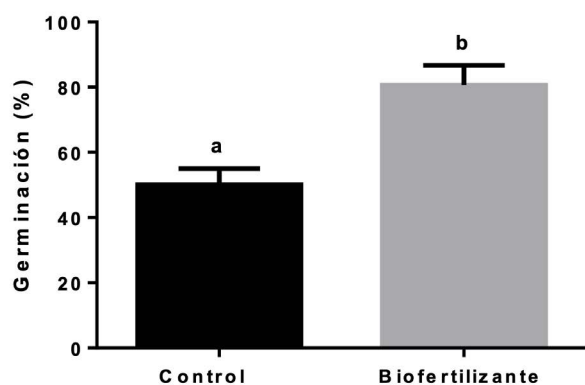


Figura 2. Porcentaje de germinación de semillas de rábano. Las barras son las medias ± Desviación Estándar (DE) de tres experimentos independientes (n=50). Prueba t de Student; letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Bacillus licheniformis M2-7 en el crecimiento de rábano

El efecto del bioformulado mostró diferencias significativas en todas las variables evaluadas con respecto al fertilizante químico y al control a los 45 días después de la siembra. La longitud de la hoja registró un porcentaje de 28.34 por ciento; el número de hojas, 30.43 por ciento, y el peso total del tubérculo, 9.27 por ciento (Cuadro 1; $p \leq 0.05$).

Cuadro 1. Efecto del biofertilizante *Bacillus licheniformis* M2-7 en el crecimiento y rendimiento de *Raphanus sativus* L.

Tratamiento	Longitud de la hoja (cm)	Núm. de hojas	Peso total del tubérculo (g)
Triple 17	11.50 ± 0.56b	4.60 ± 0.81b	50.7±3.91b
<i>B. licheniformis</i> M2-7	14.76 ± 0.60a	6.00 ± 0.63a	55.4±6.64a
Control	11.50 ± 0.44b	3.50 ± 0.83b	42.4±3.70c

Los valores son medias ± Desviación Estándar (SD) de tres experimentos independientes (n=10). ANOVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas.

DISCUSIÓN

Bacillus licheniformis M2-7 creció favorablemente en medio líquido enriquecido con melaza a 6 por ciento. Varios estudios indican la importancia de la melaza para el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos en las fermentaciones, donde la principal fuente de carbono y energía es la sacarosa (Beudeker et al. 1989). Pantoja et al. (2018) validaron el medio mínimo de sales (MMS) suplementado con melaza (6%) para la producción de sustancias húmicas (SH) de *Microbacterium* sp (BSC3). En el medio de cultivo se obtuvo mayor velocidad de crecimiento microbiano y menor tiempo de duplicación; la cepa bacteriana conservó su capacidad de producir SH. Gojic-Cvijovic et al. (2018) estandarizaron un medio con melaza para la producción de levadura por *Bacillus licheniformis* NS032; Mota-Pacheco et al. (2019) documentaron la adaptación de *Bacillus licheniformis* a concentraciones de melaza de caña con incremento hasta de 11 g/L, donde hubo aumentos en el rendimiento y la tasa de crecimiento a escala de biorreactor. El uso de melaza representa una alternativa económica para la producción a gran escala de biofertilizantes con fines agrícolas.

El crecimiento y desarrollo de las plantas a menudo depende del tipo de interacciones planta-microbio que funcionan en la rizosfera. Varios estudios reportan el potencial de las especies del género *Bacillus* como BPCV, pues promueven el crecimiento de las plantas (Mumtaz et al. 2017; Akinrinlola et al. 2018). En este estudio encontramos que el porcentaje de germinación de semillas de rábano inoculadas con el bioformulado fue superior al del control, al alcanzar 80.6 por ciento ($p \leq 0.05$). Este mecanismo se atribuye a la capacidad de *Bacillus licheniformis* M2-7 de producir fitohormonas como las auxinas (Bolaños-Dircio et al. 2021). Bolaños-Dircio et al. (2021) encontraron que la inoculación de esta cepa bacteriana a las semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) mejoró significativamente la germinación hasta 89 por ciento después de 15 días de la siembra. Kaymak et al. (2009) demostraron que *Bacillus subtilis* BA142 y *B. megaterium* M3 mejoraron el porcentaje y tasa de germinación en semillas de rábano. James et al. (2023) demostraron que la inoculación de *Bacillus licheniformis* NJ04 aumentó significativamente la longitud de la raíz (16.29 ± 0.91 cm) y la longitud de los brotes (9.66 ± 0.11 cm) de las plantas de *Solanum lycopersicum* L. en condiciones de estrés salino.

Bacillus licheniformis M2-7 presentó un efecto promotor de crecimiento vegetal en el crecimiento y rendimiento de rábano. En un estudio previo, Hernández-Castillo et al. (2014) estudiaron el efecto de tres especies de *Bacillus* en chile 40 días después del trasplante. Encontraron que las cepas *B. amyloliquefaciens* (B1), *B. licheniformis* (B3) y *B. subtilis* (B13) aumentaron significativamente el crecimiento y rendimiento del chile verde (var. Jalapeño) respecto al fertilizante químico y al testigo con incrementos promedio de 28 y 34.5 por ciento. De O Nunes et al. (2023) demostraron que la inoculación de *B. subtilis* FMCH002 y *B. licheniformis* FMCH001 a semillas de tomate aumentó el peso fresco y seco del sistema radicular, el volumen y la longitud de las raíces en comparación con el control. Además, las cepas produjeron auxinas después de 48 h de incubación *in vitro*.

CONCLUSIONES

Bacillus licheniformis M2-7 creció favorablemente en medio con melaza (6%) como única fuente de carbono

y energía, y mejoró significativamente la germinación, el crecimiento y el rendimiento de *Raphanus sativus* L. con respecto al fertilizante químico y al control.

Se propone el uso de la cepa M2-7 en formulaciones de biofertilizantes para mejorar la germinación, el crecimiento y el rendimiento de *Raphanus sativus* L.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Daysi Navez González, Jorge Bello Martínez y Cesar Sotelo Leyva, por haber fungido como sinodales de los estudiantes Alfredo y Ángel durante el desarrollo de sus estudios de licenciatura en Biotecnología. También, a la Universidad Autónoma de Guerrero por el financiamiento a los proyectos “Semilla UAGro 2018” y “Caracterización de la cepa LYA1 de *Bacillus licheniformis* sobre la degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, Promotora de Crecimiento Vegetal y Antifúngico”.

LITERATURA CITADA

- Akinrinlola RJ, Yuen GY, Drijber RA, Adesemoye AO. 2018. Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by *in vitro* physiological traits. International Journal of Microbiology 2018: 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/5686874>
- Albarrán-de la Luz L, Rodríguez-Barrera M, Hernández-Flores G, Lopezaraiza-Mikel M, Alemán-Figueroa L, Toribio-Jiménez J, Romero-Ramírez Y. 2022. Antagonism of *Bacillus licheniformis* M2-7 against phytopathogen fungi of *Mangifera indica* L. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 38: 1-10. <https://doi.org/10.20937/RICA.54217>
- Azeem M, Haider MZ, Javed S, Saleem MH, Alatawi A. 2022. Drought stress amelioration in maize (*Zea mays* L.) by inoculation of *Bacillus* spp. strains under sterile soil conditions. Agriculture 12: 50. <https://doi.org/10.3390/agriculture12010050>
- Bahena-Oregón R, Rodríguez-Barrera MA, Rosas-Guerrero V, Méndez Bahena A, Toledo-Hernández E, Toribio-Jiménez J, Navez-González D, Palemón-Alberto F, Ortega-Acosta SA, Romero-Ramírez Y. 2022. Chapter 8.3. *Bacillus licheniformis* M2-7 inhibits the growth and affects the structure of phytopathogenic fungi of *Zea mays*.

- En: Sotelo-Navarro PX, Tecorralco-Bobadilla AL, Escamilla-Alvarado C, Hernández-Flores G, Nava-Bravo I, López-Díaz JA, Poggi-Varaldo HM, editores. Ambiente y bioenergía. Perspectivas y avances de la sostenibilidad. Ciudad de México, ABIARER A.C. P. 500-508.
- Beudeker RF, Van Dam HW, Van Der Plaat JB, Vallenga K. 1989. Developments in baker's yeast production. En: Verachtert H, De Mot R, editores. Biotechnology and Biocatalysis. Nueva York, Marcel Dekker Inc. P. 103-146.
- Bolaños-Dircio A, Toribio-Jiménez J, Rodríguez-Barrera MA, Hernández-Flores G, Toledo-Hernández E, Palemón-Alberto F, Romero-Ramírez Y. 2021. *Bacillus licheniformis* M2-7 improves the growth, development and yield of *Capsicum annuum* L. *Agrociencias* 55: 227-242. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i3.2415>
- Chaudhary A, Parveen H, Chaudhary P, Khatoon H, Bhatt P. 2021. Rhizospheric microbes and their mechanism. En: Bhatt P, Khatoon H, Chaudhary P, Parveen H, Chandhary A, editores. Microbial Technology for Sustainable Environment. Singapur, Springer Singapur. P. 79-93.
- De O Nunes PS, De Medeiros FHV, De Oliveira TS, De Almeida Zago JR, Bettiol W. 2023. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* promote tomato growth. *Brazilian Journal of Microbiology* 54: 397-406. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00874-3>
- Estrada-Bonilla GA, Durrer A, Cardoso EJBN. 2021. Use of compost and phosphate-solubilizing bacteria affect sugarcane mineral, nutrition, phosphorus availability and the soil bacterial community. *Applied Soil Ecology* 157: 103760. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103760>
- Filipini LD, Pilatti FK, Meyer E, Ventura BS, Lourenzi CR, Lovato PE. 2021. Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. *Archives of Microbiology* 203: 1033-1038. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>
- Gojic-Cvijovic GD, Jakovljevic DM, Loncarevic BD, Todorovic NM, Pergal MV, Ciric J, Loos K, Beskoski VP, Vrvic MM. 2018. Production on levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International Journal of Biological Macromolecules* 121: 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019>
- Goklany IM. 2021. Reduction in global habitat loss from fossil-fuel-dependent increases in cropland productivity. *Conservation Biology* 35: 766-744. <https://doi.org/10.1111/cobi.13611>
- Hernández-Castillo FD, Lira-Saldivar RH, Gallegos-Morales G, Hernández-Suárez M, Solis-Gaona S. 2014. Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. *PYTON* 83: 49-55.
- James N, Umesh M, Sarojini S, Shanmugam S, Nasif O, Ali AS, Thuy LCN, Bridhadevi K. 2023. Unravelling the potential plant growth activity of halotolerant *Bacillus licheniformis* NJ04 isolated from soil and its possible use as a green bioinoculant on *Solanum lycopersium* L. *Environmental Research* 216: 114620. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114620>
- Janssens C, Havlík P, Krisztin T, Baker J, Frank S, Hasegawa T, Leclère D, Ohrel S, Ragnauth S, Schmid E, Valin H, van Lipzig N, Maertens M. 2020. Global hunger and climate change adaptation through international trade. *Nature Climate Change* 10: 829-835. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-0847-4>
- Kaymak HC, Güvenç I, Yarali F, Dönmez MF. 2009. The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 33: 173-179. <https://doi.org/10.3906/tar-0806-30>
- Maçik M, Gryta A, Fraç M. 2020. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy* 162: 31-87. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>
- Manivannan A, Kim JH, Kim DS, Lee ES, Lee HE. 2019. Deciphering the nutraceutical potential of *Raphanus sativus*—A comprehensive overview. *Nutrients* 11: 402. <https://doi.org/10.3390/nu11020402>
- Mota-Pacheco LE, Guadarrama-Mendoza PC, Salas-Coronado R, Escalante A, Montville TJ y Valadez-Blanco R. 2019. Adaptation of *Bacillus licheniformis* to molasses for improved production of a biofertilizer strain. *Agrociencia* 53: 1183-1201.
- Mumtaz MZ, Ahmad M, Jamil M, Hussain T. 2017. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological Research* 202: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.001>
- Namfon P, Ratchanok S, Chalida D. 2017. Optimization of the liquid biofertilizer production in batch fermentation with by-product from MSG. *AIP*

- Conference Proceedings 1823: 02274. <https://doi.org/10.1063/1.4978147>
- Pantoja M, Mendoza S, Valero N. 2018. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Microbacterium sp.* (BC3) para la generación de materia orgánica a partir de ignito. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20: 31-41. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764>
- Pirttilä AM, Mohammad PTH, Baruah N, Koskimäki JJ. 2021. Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. *Microorganisms* 9: 17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040817>
- Song T, Li Z, Liu J, Zou Y, Lv C, Chen F. 2021. Evaluating the impacts of *Azotobacter chroococcum* inoculation on soil stability and plant property of maize crop. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 21: 824-831. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00404-w>
- Vassileva M, Malusà E, Sas-Paszt L, Trzcinski P, Galvez A, Flor-Peregrin E, Shilev S, Canfora L, Mocali S, Vassilev N. 2021. Fermentation strategies to improve soil bio-inoculant production and quality. *Microorganisms* 9: 1254. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061254>
- Verma M, Mishra J, Arora NK. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: Diversity and applications. En: Sobti R, Arora N, Kothari R, editores. *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. Singapur, Springer. P. 978-981. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_6