



## Bioformulados para mantener la viabilidad de rizobacterias y su aplicación en *Theobroma cacao* L. CCN-51\*

### Bioformulated to maintain the viability of rhizobacteria and their application in *Theobroma cacao* L. CCN-51

Hayron Fabricio Canchignia Martínez<sup>1</sup>, Dayanara Nicolle Tapia Quintana<sup>2</sup>, Javier Andrés Auhing Arcos<sup>3</sup>, Crsthian John Macías Holguín<sup>4</sup>, Ángel Virgilio Cedeño Moreira<sup>5</sup>, Luis Fernando Vera Benites<sup>6</sup>

\* Recepción: 20 de octubre, 2023. Aceptación: 18 de marzo, 2024. Este trabajo formó parte de una investigación de la carrera de Ingeniería Agronómica en la UTEQ, y de una línea de investigación del Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología de la UTEQ.

<sup>1</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Departamento de Biotecnología, Quevedo, Ecuador. [hcanchignia@uteq.edu.ec](mailto:hcanchignia@uteq.edu.ec) (<https://orcid.org/0000-0003-1195-5446>).

<sup>2</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Departamento de Biotecnología, Quevedo, Ecuador. [dayanara.tapia2016@uteq.edu.ec](mailto:dayanara.tapia2016@uteq.edu.ec) (<https://orcid.org/0009-0004-0370-7893>).

<sup>3</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Departamento de Biotecnología, Quevedo, Ecuador. [javier.auhing@uteq.edu.ec](mailto:javier.auhing@uteq.edu.ec) (<https://orcid.org/0000-0003-4537-7234>).

<sup>4</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Departamento de Biotecnología, Quevedo, Ecuador. [crsthian.macias2016@uteq.edu.ec](mailto:crsthian.macias2016@uteq.edu.ec) (<http://orcid.org/0000-0003-2068-8503>).

<sup>5</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Departamento de Biotecnología, Quevedo, Ecuador. [acedenom@uteq.edu.ec](mailto:acedenom@uteq.edu.ec) (<http://orcid.org/0000-0002-6564-5569>).

<sup>6</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Departamento de Biotecnología, Quevedo, Ecuador. [luisf.vera@uteq.edu.ec](mailto:luisf.vera@uteq.edu.ec) (autor para la correspondencia; <http://orcid.org/0000-0003-4567-1919>).

## Resumen

**Introducción.** El empleo de bioformulados de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal es una alternativa para reducir la dependencia de pesticidas en la agricultura, por su acción biocontroladora de patógenos y solubilizadora de nutrientes. **Objetivo.** Evaluar los bioformulados a su viabilidad celular de las rizobacterias y su efecto en *T. cacao* L. **Materiales y métodos.** La investigación se desarrolló de enero a diciembre del año 2020 en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y en la finca “Ignolia”, La Maná, Ecuador. Se evaluaron las características potenciales para ser considerada como rizobacteria; identificación del gen *chiA* por Reacción de la Cadena de la Polimerasa. El efecto de los bioformulados sobre la viabilidad celular de rizobacterias y su aplicación a campo para evaluar productividad y estado fitosanitario de *T. cacao*. **Resultados.** Las rizobacterias tuvieron la capacidad de solubilizar nutrientes, producir enzimas hidrolíticas y generadoras de biopelículas. El 80 % de las cepas presentaron el gen *chiA*, con actividad antifúngica contra hongos patógenos. El bioformulado BIO-QPGPRs con *A. calcoaceticus*, *E. asburiae*, *S. marcescens*, *P. protegens* y *P. veronii* presentaron mayor persistencia celular (1,83E+5, 1,80E+5, 1,63E+5 y 1,63E+5) durante los 26 días. Su aplicación edáfica e inyección en temporada lluviosa incrementó las emisiones foliares con 100 y 108, además redujo la incidencia de *Phytophthora spp.*, y mejoró el rendimiento de grano seco (1270,6 kg/ha) **Conclusiones.** BIO-QPGPRs conservó las rizobacterias con viabilidad celular durante 26 días. Además, su aplicación en campo incrementó el número de emisiones foliares, reducción de incidencia de *Phytophthora spp.* en mazorcas y el incremento en rendimiento del cultivo.

**Palabras clave:** control de plagas, gen, inocuidad, microbiología, sustancia bioquímica.



## Abstract

**Introduction.** The use of bioformulated plant growth-promoting rhizobacteria is an alternative to reduce the dependence on pesticides in agriculture, due to their pathogen biocontrol and nutrient solubilizing action. **Objective.** To evaluate the effect of bioformulates on the cell viability of rhizobacteria and their effect on *T. cacao* L. **Materials and methods.** The research was developed out from January to December 2020 in the laboratories Microbiology and Molecular Biology of the State Technical University of Quevedo and in the farm “Ignolia”, La Maná, Ecuador. The potential characteristics to be considered as a rhizobacteria were evaluated; identification of the *chiA* gene by Polymerase Chain Reaction; the effect of bioformulates on the cell viability of rhizobacteria and their application in the field to evaluate productivity and phytosanitary status of *T. cacao*. **Results.** Rhizobacteria had the capacity to solubilize of nutrients, producers of hydrolytic and biofilm-generating enzymes. Eighty percent of the strains presented the *chiA* gene, with antifungal activity against pathogenic fungi. The BIOQPGPRs bioformulated with *A. calcoaceticus*, *E. asburiae*, *S. marcescens*, *P. protegens* and *P. veronii* showed greater cell persistence ( $1.83E+5$ ,  $1.80E+5$ ,  $1.63E+5$  and  $1.63E+5$ ) during the 26 days. Its edaphic application and injection in the rainy season increased leaf emissions with 100 and 108, and reduce the incidence of *Phytophthora* spp. and its edaphic application of the bacterial consortium improve dry grain yield (1270.6 kg/ha). **Conclusions.** BIOQPGPRs preserved rhizobacteria with cell viability for 26 days. Its field application increased the number of foliar emissions, the reduction of *Phytophthora* spp. incidence on pods and crop yield.

**Keywords:** microbiology, gene, pest control, biochemical substance.

## Introducción

El sector cacaotero representa uno de los rubros económicos más importantes del Ecuador (García-Cruzatty et al., 2020). El material genético “CCN 51”, está entre los cultivares con mayor extensión en el país por su alta productividad y adaptabilidad a las diversas condiciones climáticas (Boza et al., 2015). Sin embargo, este clon es susceptible a patógenos como: *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora* y *Moniliophthora perniciosa*, cuya prevalencia se incrementa con una elevada humedad relativa y baja temperatura y las deficiencias nutricionales del cultivo (Gutiérrez et al., 2016; Villamizar-Gallardo et al., 2019).

El empleo de insecticidas (Carbofuran, Metomyl, Phoxim) y fungicidas (cúpricos y triazoles) mitigan las plagas y enfermedades en el cultivo de cacao (Boateng et al., 2023). Además, para suplir las necesidades nutricionales del cultivo se utilizan en fertilizantes nitrogenados, fosforados y potásicos (Yaseen et al., 2021). Sin embargo, se han reportado que el uso prolongado de estos insumos químicos, desencadena una reducción en la eficiencia de sus componentes activos (Chandini et al., 2019), además de la resistencia de plagas y patógenos (Akrofi et al., 2017; Roman et al., 2021).

El empleo de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPRs, por sus siglas en inglés), es una alternativa para el control de patógenos y mejorar la eficiencia en la absorción de nutrientes (Babu et al., 2015). Una de sus principales características es la acción solubilizadora de nutrientes y biocontroladora por la liberación de componentes enzimáticos y ácidos orgánicos (Devi et al., 2022; Jha & Subramanian, 2018). Como la producción de exoquitinasas *chiA*, implicada en la degradación de quitina, componente principal de la pared celular de hongos fitopatógenos como ascomicetos y basidiomicetos (Morales-Ruiz et al., 2021). Esta funcionalidad permite que exista una mayor utilización de las PGPR sobre todo en problemas nutricionales y en el control de enfermedades, sin embargo, su multiplicación masiva es una de las limitantes para su producción (Tirado-Gallego et al., 2016; Tyśkiewicz et al., 2022).

Los bioformulados PGPR de bajo costo son una alternativa para aumentar la producción de microorganismos con una menor inversión (Mishra et al., 2020; **Sarmiento-López et al., 2022**). El desarrollo de esta tecnología se concentra en disponer fuentes nutricionales adecuadas en la multiplicación y protección de la biomasa bacteriana (Lobo et al., 2019), dado que los microorganismos requieren de medios específicos y el equilibrio de los mismos (Anith et al., 2017). La efectividad de los productos biológicos de origen bacteriano depende del número de colonias viables en el tiempo y del pH, por tal motivo el contenido de carbohidratos, proteínas, macro-microelementos son esenciales para una óptima multiplicación y crecimiento (Chandra & Sharma, 2021).

Las aplicaciones de bioformulaciones de PGPR en la agricultura generan una aceptación por mejorar las características morfológicas y productivas (Sriwati et al., 2019). Formulaciones de *Bacillus* sp., donde su función principal fue promover el sistema radicular de plántulas de cacao (Thomas et al., 2011). Otras investigaciones evidenciaron la eficacia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Chryseobacterium proteolyticum* en la reducción de *P. palmivora* donde confirmaron una inhibición del 100 % en mazorcas de cacao (Alsultan et al., 2019), y que las aplicaciones de microorganismos al suelo incrementan la solubilización de minerales y mejoran las características morfológicas y productivas en *T. cacao* (Hipólito-Romero et al., 2017).

Se considera de importancia el rubro cacao en la economía ecuatoriana y en función de resolver los problemas de manejo nutricional y fitosanitario del cultivo, además de promover el manejo sostenible del cultivo con alternativas inocuas y de bajo costo, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar los bioformulados a su viabilidad celular de las rizobacterias y su efecto en *T. cacao* L.

## Materiales y métodos

### Descripción de área de estudio

La investigación se ejecutó en dos etapas, una primera fase en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1,5 vía Quevedo - Santo Domingo, Ecuador (01° 00' 44" latitud Sur y 79° 28' 22" de longitud Occidental), ubicada a 73 m s. n. m. La segunda fase se desarrolló en la finca “Ignolia”, ubicada en el recinto el Moral, cantón La Maná, provincia de Cotopaxi, Ecuador (0° 57' 38" latitud Sur y 79° 16' 22" longitud Occidental), con una altitud de 187 m s. n. m.

### Caracterización bioquímica a la capacidad solubilizadora de minerales

Las cepas bacterianas (Cuadro 1) se reactivaron de forma individual en medio de cultivo King B líquido (KBL) a 28 °C a 180 rpm por 24 h, y se usaron para determinar: la capacidad hidrolítica de urea a dióxido de carbono por el método de Christensen (1946), la actividad fosfatasa (Pikovskaya, 1948), y la producción de ácidos orgánicos para solubilización de potasio (Hu et al., 2006) y de zinc (Saravanan et al., 2004). La generación de biofilm se determinó de forma cualitativa por el método de cristal violeta (Alexander & Zuberer, 1991) y producción de quitinasa (Moon et al., 2017). En cada prueba se empleó como control negativo agua desionizada estéril.

La producción de ureasa, fosfatasa, ácidos orgánicos y quitinasa se evaluó por el tamaño del halo. La presencia de biofilm se determinó por la aparición de biopelículas formadas en los tubos de ensayo por la adhesión de bacterias, así mismo se definieron valores por la intensidad del anillo en el tubo. Los valores se registraron de acuerdo con la metodología definida por Holt et al. (1994), donde se definieron los siguientes valores cualitativos: (++) mayor presencia, presencia (+) y ausencia (-).

**Cuadro 1.** Características de las rizobacterias con producción de metabolitos antagonísticos, sideróforos, producción de AIA y cultivo de procedencia. Ecuador, 2020.

**Table 1.** Characteristics of rhizobacteria with antagonistic metabolite production, siderophores, AIA production and crop of origin. Ecuador, 2020.

| Organismo               | Cepas   | Metabolitos antagonísticos |     |     |      | Sideróforos | Producción de AIA | Cultivo de procedencia |
|-------------------------|---------|----------------------------|-----|-----|------|-------------|-------------------|------------------------|
|                         |         | PR                         | HCN | Prn | DAPG |             |                   |                        |
| <i>A. calcoaceticus</i> | BMR2-12 |                            |     | +   |      | +           |                   | Banano                 |
| <i>S. marcescens</i>    | PM3-8   | +                          | +   |     |      | +           |                   | Banano                 |
| <i>P. protegens</i>     | CHA0    | +                          | +   | +   | +    | +           | +                 | Tabaco                 |
| <i>P. veronii</i>       | R4      | +                          |     | +   |      | +           | +                 | Uva                    |
| <i>E. asburiae</i>      | PM3-14  | +                          | +   | +   |      | +           |                   | Banano                 |

**PR:** proteasa **HCN:** cianuro de hidrógeno **Prn:** Pirrolnitrina **DAPG:** 2,4-diacetilfloroglucinol, sideróforos, **AIA:** producción de ácido indol-3-acético (Peñañiel Jaramillo et al., 2016; [Chávez Arteaga et al., 2018](#); Montes et al., 2016). / **PR:** protease **HCN:** hydrogen cyanide **Prn:** pyrrolnitrin **DAPG:** 2,4-diacetylphloroglucinol, siderophores, **IAA:** production of Indole-3-acetic Acid (Peñañiel Jaramillo et al., 2016; [Chavez Arteaga et al., 2018](#); Montes et al., 2016).

### Determinación de la presencia del gen *chiA* por PCR

El ADNg bacteriano se obtuvo al emplear PureLink™ Genomic DNA Mini Kit - Thermo Fisher Scientific, según el protocolo descrito por el fabricante. Para la amplificación molecular se empleó los primers específicos *chiAF* (5'GATATCGACTGGGAGTCC3') y *chiAR* (5'CATAGAAGTCGTAGGTCATC3'), con producto de amplificación 225 pb (Ramaiah et al., 2000). La reacción de PCR se realizó en 20  $\mu$ L, con: 5,0  $\mu$ L Buffer (1X); 1,2  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (6 mM); 1,0  $\mu$ L de DNTP's (0,2 mM); 1  $\mu$ L / cada primer (0,2 mM); 0,2  $\mu$ L de Taq polimerasa (Promega®); 1  $\mu$ L de ADN (50 ng/mL); 11,6  $\mu$ L de  $H_2O$ . Se empleó un termociclador (TECHME®) y se ajustó su perfil térmico a 94 °C durante 4 min; 35 ciclos de desnaturalización a 92°C; alineamiento a 58°C; y polimerización a 72°C a 1 min, seguidos de 7 min de extensión a 72 °C. Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y teñidos en bromuro de etidio. Los fragmentos se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®).

### Bioformulaciones líquidas para determinación de viabilidad celular de las rizobacterias

Las cepas *Acinetobacter calcoaceticus* BM2-12, *Serratia marcescens* PM3-8, *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *Enterobacter asburiae* PM3-14, provenientes del banco de germoplasma de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, seleccionadas por su propiedad antifúngica, nematicida y promotoras de crecimiento vegetal (Cuadro 1), fueron reactivadas. Luego, se cultivaron de forma individual en 100 mL de KBL [(g/L): peptona de carne 20,0; glicerol, 15,0 mL; fosfato dipotásico, 1,5; sulfato de magnesio heptahidratado, 1,5; agua destilada (pH 7,2)], suplementado con chloramphenicol (13  $\mu$ g/mL), ampicilina (40  $\mu$ g/mL) por 48 h (King et al., 1954) (Figura 1A).

El pre-inóculo de las cinco bacterias se recuperó por sedimentación y se aplicó de forma individual un volumen de 100 mL a una concentración de  $1,0E+8$  UFC/mL en 40 L de medio de cultivo alternativo (Cuadro 2). Se procedió a su respectiva fermentación y/o masificación de forma individual mediante fermentadores con capacidad de 50 L. Se mantuvieron en agitación con una presión de aire de 0,007 MPa durante 24 h; cada fermentador contenía un filtro de nitrocelulosa de 0,45 micras x 47 mm a entrada y salida del flujo de aire (Figura 1B). Al finalizar las 24 h de agitación se colectaron tres muestras de 50 mL de cada tratamiento en tubos Falcon. El número de muestras forman parte de las repeticiones, se tomaron a consideración tres unidades experimentales por cada repetición y se conservaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 26 días.

**Cuadro 2.** Composición de los diferentes formulados para el crecimiento y viabilidad de rizobacterias. Ecuador, 2020. **en estudio**

**Table 2.** Composition of the different formulation under study for the growth and viability of rhizobacteria. Ecuador, 2020.

| <b>Formulado</b>   | <b>Ingrediente</b>                 |     |
|--------------------|------------------------------------|-----|
| <b>BIO-M3</b>      | Melaza (g/L)                       | 20  |
|                    | Harina de maíz (g/L)               | 20  |
|                    | Sal en grano (g/L)                 | 5,0 |
|                    | Glicerina (mL)                     | 7,0 |
|                    | pH                                 | 6,5 |
| <b>PGPRs-4N</b>    | Melaza (g/L)                       | 20  |
|                    | Harina de maíz (g/L)               | 20  |
|                    | Sal en grano (g/L)                 | 5,0 |
|                    | Roca fosfórica (g/L)               | 1,5 |
|                    | Glicerina (mL)                     | 7,0 |
|                    | pH                                 | 6,5 |
| <b>BIO-IMPULSE</b> | Melaza (g/L)                       | 20  |
|                    | Harina de maíz (g/L)               | 20  |
|                    | Sal en grano (g/L)                 | 5,0 |
|                    | Roca fosfórica (g/L)               | 1,5 |
|                    | Glicerina (mL)                     | 7,0 |
|                    | Aceite mineral (mL)                | 5,0 |
|                    | pH                                 | 6,5 |
| <b>BIO-QGPRs</b>   | Melaza (g/L)                       | 10  |
|                    | Harina de maíz (g/L)               | 20  |
|                    | Sal en grano (g/L)                 | 5,0 |
|                    | Roca fosfórica (g/L)               | 1,5 |
|                    | Glicerina (mL)                     | 7,0 |
|                    | Fijador (mL)                       | 5,0 |
|                    | Lixiviado de raquis de banano (mL) | 15  |
|                    | pH                                 | 6,5 |

### VARIABLES EVALUADAS

Para la determinación de la viabilidad celular de las rizobacterias se recuperaron muestras de 100 ul a (1, 6, 11, 16, 21 y 26 días) después de su proceso de fermentación. Se evaluaron las siguientes variables: unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en tiempo y potencial de hidrógeno (pH), con base en las metodologías de (Dickson, 1993; Sharpe & Kilsby, 1971) (Figura 1C).

### Aplicación de bioformulados en plantaciones de *T. cacao* CCN-51

El bioformulado se seleccionó por su mayor viabilidad celular de las rizobacterias evaluadas de la fase *in vitro*, para la multiplicación y/o masificación. El bioformulado se fermentó durante 24 h y se homogenizó en relación v/v al 20 %, se obtuvo una concentración bacteriana de 7,6E+6 UFC/mL para su aplicación en plantación de CCN-51



**Figura 1.** Proceso de multiplicación celular de las rizobacterias en formulaciones líquidas, Quevedo, 2020. **A)** Crecimiento del pre-inoculo bacteriano. **B)** Fermentación de las bacterias en tanques de 50 L. **C)** Concentración celular 24 horas después del análisis microbiológico.

**Figure 1.** Process of cell multiplication of the rhizobacteria in liquid formulations, Quevedo, 2020. **A)** Growth of the bacterial pre-inoculum. **B)** Cell development in 50 L fermenters. **C)** Cell concentration 24 hours after microbiological analysis.

de cuatro años de edad. La forma de aplicación de los bioformulados con sus respectivos controles se describe en el (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Descripción la forma de aplicación de los bioformulados. Ecuador, 2020.

**Table 3.** Description of the form of application of bioformulates. Ecuador, 2020.

| Aplicación | Descripción                                                                                                                                                                                                                                                              | Frecuencia de aplicación durante el año 2020   |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Edáfico    | Se realizó una limpieza de 0,60 m desde el centro del tallo hacia la corona de la planta, y se aplicó vía edáfica 250 mL/planta de bioformulados al 20 % en relación v/v con la ayuda de un pulverizador de mochila Cooper Pegler CP3 Classic Knapsack Sprayer CP846320. | Cuatro veces (enero, marzo, julio, septiembre) |
| Foliar     | Se esparció al área foliar 300 ml/planta de bioformulados al 20 % v/v mediante una fumigadora.                                                                                                                                                                           |                                                |
| Inyección  | A una altura de 0,20 m desde la base del tallo, se perforó un hoyo de 8 cm de profundidad con un diámetro de 1,2 cm y una inclinación de 45°, con 10 mL/planta de bioformulado al 20 % en relación v/v, la perforación se selló con parafilm.                            | Tres veces (enero, abril, agosto)              |
| Químico    | Se aplicó fungicida de forma foliar 3 kg/ha de oxiclورو de cobre (Oxithane) y 1 kg/ha de fertilizante completo soluble 13-40-13 (kristalon - YaraTera).                                                                                                                  |                                                |
| Control    | De forma foliar, se aplicó 200 ml de agua destilada                                                                                                                                                                                                                      |                                                |

### Variables evaluadas

Las variables de evaluar en CCN-51 fueron: a) número de emisión foliar (brote joven), para lo cual se contabilizaron los brotes dos meses después de la poda de formación y mantenimiento; b) incidencia de *Phytophthora* spp., *M. royeri*; c) rendimiento del cultivo (kg/ha), con base en la metodología descrita por Anzules



(2019); y d) número de granos, que se obtuvo al contar el total de semillas de cada mazorca. Estas variables fueron obtenidas cada mes (temporada de lluvia y seca), durante un año.

### Labores culturales

Como labores culturales se realizaron dos podas (formación y mantenimiento) durante el año en los meses de enero y junio, además se realizó un control de maleza cuatro veces al año, con aplicaciones de paraquat (2,0 L/ha) y desmalezadora a motor. La fertilización química se realizó en tres aplicaciones fraccionadas de urea (N46 %) 150 g/planta; DAP (N 18 %, P 46 %, S 1,1 %, Mg 0,9 %) 70 g/planta; KCl (K 60 %) 150 g/planta y Sulfato de Mg (P 3 %, Ca 4 %, Mg 20 %, S 9 %, Si 18 %) 29 g/planta. Su aplicación del fertilizante se realizó al voleo, mediante aplicación directa al suelo, desde la base de la planta a un metro a la redonda lo que cubrió la corona de forma homogénea (Ruales et al., 2011).

### Diseño experimental y análisis de datos

El experimento de viabilidad celular de rizobacterias se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial conformado por formulados y cepas. Se realizaron tres réplicas con tres unidades experimentales. A nivel campo, en la aplicación de bioformulados en plantaciones de *T. cacao* CCN-51, se empleó un diseño factorial en bloques completamente al azar (DBCA), para su temporada y formas de aplicación. Cada tratamiento contenía cuatro repeticiones con cuatro unidades experimentales, se evaluaron 16 plantas por tratamiento.

Para garantizar la confiabilidad en la estadística paramétrica como ANDEVA, los datos fueron sometidos a normalidad mediante Shapiro-Wilk y se aplicó la prueba de Bartlett para verificar el supuesto de homogeneidad de la varianza. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANDEVA) y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey, al nivel de significancia de ( $P \leq 0,05$ ). Para el análisis se utilizó el software estadístico Infostat 2020 y la versión 19.1.0 del software Minitab (Di Rienzo et al., 2020; Minitab, 2021).

## Resultados

### Caracterización bioquímica con potencial a ser considerada

Las cinco rizobacterias mostraron la capacidad de hidrolizar urea y producción de quitinasa, solubilizadora de fósforo, potasio y zinc de una fuente insoluble presente en el medio. Además, cuatro cepas fueron productoras de biofilm (Cuadro 4; Figura 2).

### Identificación del gen *chiA* por PCR

Se determinó la presencia de *chiA*, gen que codifica el dominio catalítico de las quitinasas bacterianas con un producto de amplificación de 225 pb en las rizobacterias (PM3-8, PM3-14, BM2-12, CHA0). No existió amplificación en la cepa R4 y el control negativo (agua) (Figura 3).

### Determinación de la viabilidad celular y plataforma de multiplicación de rizobacterias

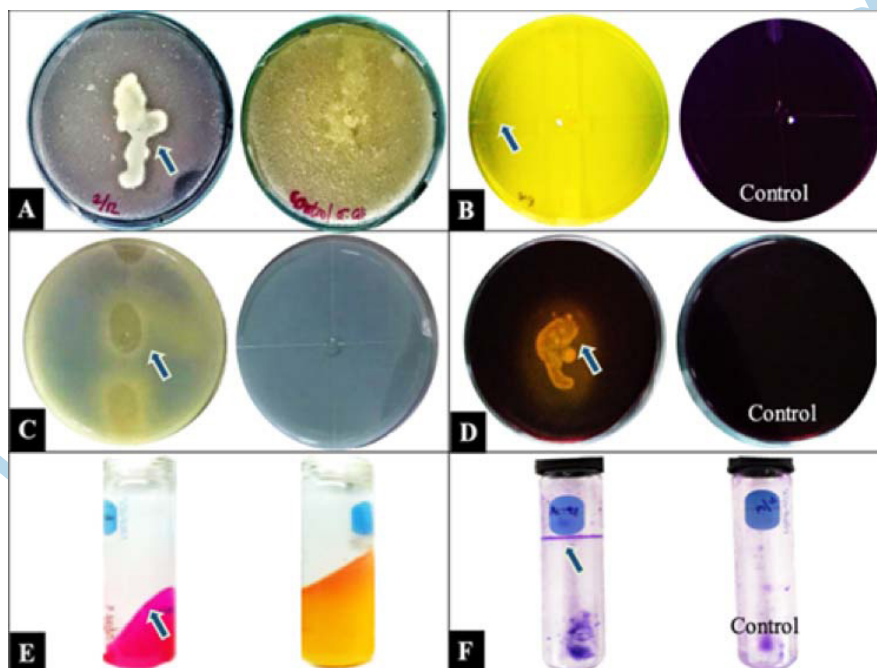
La generación de los bioformulados define valores significativos al proceso de multiplicación de rizobacterias, viabilidad celular y sus interacciones ( $p < 0,001$ ) en los días (1, 6, 11, 16, 21 y 26). La viabilidad celular al día 1: los bioformulados BIO-QPGPRs, BIO-M3 y PGPRs-4N alcanzan la concentración celular de CHA0 con

**Cuadro 4.** Selección de rizobacterias con capacidad a la producción de quitinasa, ureasa, fosfatasa, ácidos orgánicos y biopelículas. Ecuador, 2020.

**Table 4.** Selection of rhizobacteria with capacity to produce chitinase, urease, phosphatase, organic acids and biofilms. Ecuador, 2020.

| Cepas  | Caracterización bioquímica |           |                          |        |                       |         |
|--------|----------------------------|-----------|--------------------------|--------|-----------------------|---------|
|        | Quitinasa                  | Fosfatasa | Ácido orgánico (Potasio) | Ureasa | Ácido orgánico (Zinc) | Biofilm |
| BM2-12 | ++                         | ++        | ++                       | +      | ++                    | +       |
| PM3-14 | +                          | +         | ++                       | +      | +                     | -       |
| PM3-8  | ++                         | +         | +                        | +      | ++                    | +       |
| CHA0   | ++                         | ++        | +                        | ++     | +                     | ++      |
| R4     | ++                         | +         | +                        | ++     | ++                    | ++      |

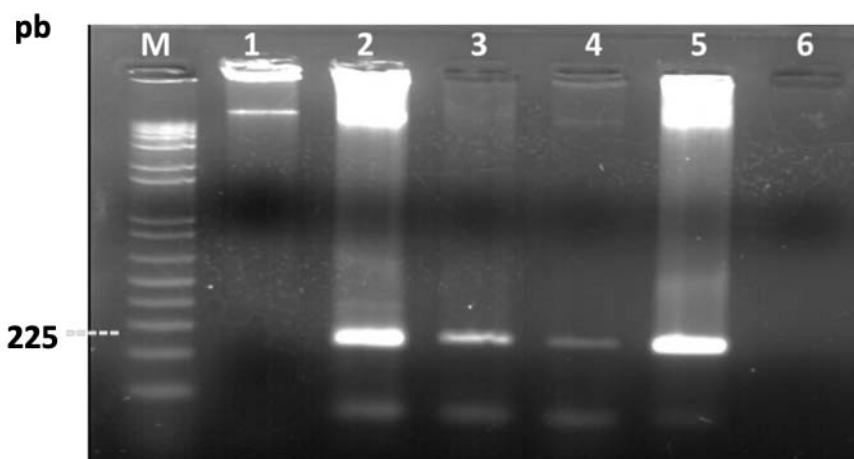
Los signos indican: (-) ausencia, (+) presencia, (++) mayor presencia. / Signs indicate: (-) absence, (+) presence, (++) increased presence.



**Figura 2.** Producción enzimática de las PGPR para la solubilización de cada componente **A.** quitinasa **B.** ácidos orgánicos para la solubilización de potasio **C.** fosfatasa **D.** ácidos orgánicos para la solubilización de zinc **E.** ureasa **F.** Biofilm. Flechas indican el sitio de liberación de compuestos por las PGPR, Ecuador, 2020.

**Figure 2.** Enzymatic production of PGPRs for solubilization of each component **A.** chitinase **B.** organic acids for potassium solubilization **C.** phosphatases **D.** organic acids for zinc solubilization **E.** urease **F.** Biofilm. Arrows indicate the site of compound release by PGPRs, Ecuador, 2020.





**Figura 3.** Amplificación del gen *chiA* por PCR para la identificación de cepas bacterianas productoras de quitinasas. Del carril 1–6 (R4, CHA0, BM2-12, PM3-8, PM3-14, Control, M (marcador de masa molecular Ladder 100 pb Invitrogen), Ecuador, 2020.

**Figure 3.** PCR amplification of the *chiA* gene for the identification of chitinase-producing bacterial strains. From lane 1-6 (R4, CHA0, BM2-12, PM3-8, PM3-14, Control, M (Invitrogen 100 bp Ladder molecular mass marker), Ecuador, 2020.

(7,87E+11, 6,63E+9 y 4,80E+8 UFC/mL), respectivamente. La disponibilidad de los nutrientes del bioformulado BIO-IMPULSE mantuvo la viabilidad celular en las rizobacterias (R4 y PM3-8), con 1,05E+10 UFC/mL. Esto indica que el alto contenido de UFC/mL está relacionada con la alta disponibilidad de los nutrientes, que mejora su actividad biológica del bioformulado (Cuadro 5).

La viabilidad celular al día 6, el bioformulado BIO-M3 y BIO-QPGPRs logra mantener la UFC/mL en (4,77E+8 y 3,83E+8) en la rizobacteria CHA0, respectivamente. La viabilidad celular se reduce en BIO-IMPULSE con 1,53E+8 UFC/mL, de las rizobacterias PM3-8 y R4 (Cuadro 5). Viabilidad celular al día 11, disminuyó el número de células UFC/mL en BIO-IMPULSE, BIO-M3 y PGPR-4N entre (3,73E+5 y 1,87E+7), a diferencia de BIO-QPGPRs que mantiene su concentración celular de (4,37E+7 y 6,07E+7) para las rizobacterias (CHA0, M2-12, BM3-14, PM3-8, R4). Sin embargo, el bioformulado BIO-M3 mantiene la concentración celular en 2,03E+8 UFC/mL para CHA0, (Cuadro 5).

La viabilidad celular al día 16, el bioformulado BIO-M3 y BIO-QPGRs mantuvo la concentración celular en (CHA0 y PM3-14) en (2,70E+7 y 1,10E+7 UFC/ml). La disponibilidad de células vivas para las rizobacterias (CHA0, M2-12, PM3-8 y R4) tienen un efecto negativo en BIO-IMPULSE que decreció en su totalidad la presencia de células vivas (Cuadro 5).

La viabilidad celular al día 21, el bioformulado BIO-IMPULSE evidenció una respuesta negativa al proceso de almacenamiento de rizobacterias con la disminución de su totalidad de células vivas para BM3-14. Al contrario, en BIO-QPGPRs y BIO-M3 mantuvieron la mayor viabilidad celular entre (1,60E+5 y 1,43E+6 UFC/ml) y (9,6E+4 y 3,60E+6 UFC/ml), respectivamente. La viabilidad celular al día 26, BIO-QPGPRs suministró las condiciones óptimas para mayor estabilidad celular a su almacenamiento en las rizobacterias (CHA0, BM2-12, BM3-14, PM3-8 y R4) con (1,83E+5, 6,30E+4, 1,80E+5, 1,63E+5 y 1,63E+5 UFC/ml), respectivamente (Cuadro 5). Este bioformulado BIO-QPGPRs es la alternativa viable para masificar y preservar células bacterianas hasta los 26 días. Esta alternativa es sustituto viable para la masificación de PGPRs, por su bajo costo y viabilidad en el tiempo, para la aplicación en cultivos agrícolas en la segunda fase de investigación (aplicación en campo).

**Cuadro 5.** Unidades formadoras de colonias en bioformulaciones de rizobacterias durante 26 días de evaluación. Los valores de p indican el efecto de los factores sobre la variable dependiente mediante un ANDEVA de dos vías (formulado × bacteria). Ecuador, 2020.

**Table 5.** Colony-forming units in rhizobacterial bioformulations during 26 days of evaluation. P values indicate the effect of the factors on the dependent variable using a two-way ANOVA (formulated × bacterial). Ecuador, 2020.

| Formulados             | Bacterias | Día 1    | Día 6 | Día 11   | Día 16 | Día 21   | Día 26 |          |     |          |    |          |   |
|------------------------|-----------|----------|-------|----------|--------|----------|--------|----------|-----|----------|----|----------|---|
| BIO-QPGPRs             | CHA0      | 7,87E+11 | A     | 3,83E+8  | AB     | 4,70E+7  | BC     | 1,57E+6  | DEF | 1,60E+5  | DE | 1,83E+5  | A |
| BIO-QPGPRs             | BM2-12    | 1,11E+10 | B     | 5,50E+7  | EFG    | 4,37E+7  | BCD    | 3,23E+6  | CDE | 1,73E+5  | DE | 6,30E+4  | B |
| BIO-QPGPRs             | PM3-14    | 6,17E+9  | B     | 1,90E+8  | DE     | 5,40E+7  | BC     | 1,10E+7  | B   | 1,43E+6  | C  | 1,80E+5  | A |
| BIO-QPGPRs             | PM3-8     | 1,27E+9  | B     | 2,57E+8  | BCD    | 6,07E+7  | B      | 1,53E+6  | DEF | 2,10E+5  | DE | 1,63E+5  | A |
| BIO-QPGPRs             | R4        | 1,27E+9  | B     | 2,57E+8  | BCD    | 6,07E+7  | B      | 1,47E+6  | EF  | 2,43E+5  | DE | 1,63E+5  | A |
| BIO-IMPULSE            | CHA0      | 3,53E+8  | B     | 1,27E+7  | FG     | 3,73E+5  | F      | 0        | F   | 0        | E  | 0        | C |
| BIO-IMPULSE            | BM2-12    | 8,70E+7  | B     | 3,90E+6  | G      | 5,17E+5  | F      | 0        | F   | 0        | E  | 0        | C |
| BIO-IMPULSE            | PM3-14    | 6,07E+9  | B     | 3,07E+6  | G      | 2,67E+6  | F      | 2,10E+4  | F   | 0        | E  | 0        | C |
| BIO-IMPULSE            | PM3-8     | 1,05E+10 | B     | 1,53E+8  | DEFG   | 4,00E+5  | F      | 0        | F   | 0        | E  | 0        | C |
| BIO-IMPULSE            | R4        | 1,05E+10 | B     | 1,53E+8  | DEFG   | 4,00E+5  | F      | 0        | F   | 0        | E  | 0        | C |
| BIO-M3                 | CHA0      | 6,63E+09 | B     | 4,77E+8  | A      | 2,03E+8  | A      | 2,70E+7  | A   | 3,60E+6  | A  | 0        | C |
| BIO-M3                 | BM2-12    | 1,27E+08 | B     | 1,60E+8  | DEF    | 1,87E+7  | DEF    | 4,83E+5  | F   | 9,60E+4  | DE | 2,53E+4  | C |
| BIO-M3                 | PM3-14    | 1,00E+9  | B     | 3,50E+8  | ABC    | 1,80E+7  | DEF    | 2,70E+6  | CDE | 2,63E+6  | B  | 0        | C |
| BIO-M3                 | PM3-8     | 1,27E+9  | B     | 2,27E+8  | CD     | 2,93E+7  | CDE    | 2,47E+6  | CDE | 2,13E+5  | DE | 0        | C |
| BIO-M3                 | R4        | 1,27E+9  | B     | 2,27E+8  | CD     | 2,93E+7  | CDE    | 2,93E+6  | CDE | 2,40E+5  | DE | 0        | C |
| PGPRs-4N               | CHA0      | 4,80E+8  | B     | 2,57E+7  | FG     | 2,93E+7  | CDE    | 2,30E+6  | CDE | 2,57E+5  | D  | 1,60E+4  | C |
| PGPRs-4N               | BM2-12    | 3,73E+7  | B     | 1,20E+7  | FG     | 6,63E+5  | F      | 3,30E+5  | F   | 2,73E+4  | DE | 0,00E+0  | C |
| PGPRs-4N               | PM3-14    | 1,13E+8  | B     | 7,13E+6  | G      | 6,10E+6  | EF     | 3,27E+6  | CD  | 2,10E+5  | DE | 1,63E+4  | C |
| PGPRs-4N               | PM3-8     | 4,73E+8  | B     | 4,10E+7  | EFG    | 1,23E+7  | EF     | 3,00E+6  | CDE | 1,13E+5  | DE | 1,63E+4  | C |
| PGPRs-4N               | R4        | 4,73E+8  | B     | 4,10E+7  | EFG    | 1,23E+7  | EF     | 3,47E+6  | C   | 1,10E+5  | DE | 1,63E+4  | C |
| <b>P (formulados)</b>  |           | < 0,0001 |       | < 0,0001 |        | < 0,0001 |        | < 0,0001 |     | < 0,0001 |    | < 0,0001 |   |
| <b>P (bacterias)</b>   |           | < 0,0001 |       | < 0,0001 |        | < 0,0001 |        | < 0,0001 |     | < 0,0001 |    | < 0,0001 |   |
| <b>P (interacción)</b> |           | < 0,0001 |       | < 0,0001 |        | < 0,0001 |        | < 0,0001 |     | < 0,0001 |    | < 0,0001 |   |

Los valores con letras similares no presenta diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ) por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Al tiempo de muestreo (1, 6, 11, 16, 21 y 26 días). / Values with similar letters do not present significant statistical differences at the level of ( $p \leq 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison procedure. At sampling time (1, 6, 11, 16, 21 and 26 days).

### Determinación del pH de los formulados

Los niveles de pH a procesos de biofermentación y conservación de las células bacterianas determinan valores significativos para los bioformulados, rizobacterias y sus interacciones ( $p < 0,001$ ) en los días (1, 6, 11, 16, 21 y 26). Se deduce que el cultivo bacteriano presenta una disminución considerable del pH en los días (6, 11, 16, 21 y 26) en comparación al día 1. A la evaluación del pH día 21, la composición del bioformulado BIO-M3 logra mantener un pH entre (4,07, 4,13, 4,22) para las rizobacterias (CHA0 BM2-12 y PM3-8), respectivamente (Cuadro 6).

La acidificación continua del medio causa la muerte celular de los microorganismos, por efecto de los ácidos orgánicos que afectan la adecuada estabilidad de pH en el medio. Al día 26, se tomaron en consideración que algunos valores de pH se mantienen y otros reducen de forma sustancial. Situación que presentó BIOQ-PGPRs con BM2-12, donde se mantiene el nivel de pH entre (3,73 y 4,43). La reducción del pH está sujeto a los compuestos acidificantes que formaron las bacterias por la disponibilidad de azúcares y proteínas, y su capacidad de liberar enzimas como los ácidos orgánicos que disminuyen los niveles de pH del medio.

**Cuadro 6.** Potencial de hidrógeno (pH) en bioformulaciones de rizobacterias durante 26 días de evaluación. Los valores de p indican el efecto de los factores sobre la variable dependiente mediante un ANOVA de dos vías (formulado × bacteria). Ecuador, 2020.

**Table 6.** Hydrogen potential (pH) in rhizobacterial bioformulations during 26 days of evaluation. The p values indicate the effect of the factors on the dependent variable using a two-way ANOVA (formulated × bacterial). Ecuador, 2020.

| Formulados             | Bacterias | Día 1    |     | Día 6    |    | Día 11   |      | Día 16   |   | Día 21   |    | Día 26   |      |
|------------------------|-----------|----------|-----|----------|----|----------|------|----------|---|----------|----|----------|------|
| BIO-QPGPRs             | CHA0      | 4,29     | HI  | 3,88     | E  | 3,81     | EFG  | 3,77     | K | 3,77     | G  | 3,81     | EFG  |
| BIO-QPGPRs             | BM2-12    | 4,21     | IJK | 3,66     | G  | 3,37     | I    | 3,31     | O | 4,34     | A  | 4,43     | A    |
| BIO-QPGPRs             | PM3-14    | 4,26     | HIJ | 3,98     | D  | 3,93     | DEF  | 3,98     | G | 3,99     | E  | 3,92     | DE   |
| BIO-QPGPRs             | PM3-8     | 4,35     | H   | 3,84     | EF | 3,89     | EF   | 3,94     | H | 3,95     | E  | 3,85     | DEF  |
| BIO-QPGPRs             | R4        | 4,13     | K   | 3,84     | EF | 3,76     | EFGH | 3,81     | J | 3,81     | FG | 3,73     | FGHI |
| BIO-IMPULSE            | CHA0      | 4,30     | H   | 3,78     | F  | 3,92     | DEF  | 3,90     | I | 3,85     | F  | 3,74     | FGH  |
| BIO-IMPULSE            | BM2-12    | 5,10     | C   | 4,78     | B  | 4,23     | BC   | 4,12     | D | 4,07     | J  | 3,74     | FGH  |
| BIO-IMPULSE            | PM3-14    | 4,20     | JK  | 3,86     | EF | 3,92     | DEF  | 3,49     | M | 3,76     | G  | 3,58     | IJ   |
| BIO-IMPULSE            | PM3-8     | 4,86     | EF  | 3,97     | D  | 3,68     | FGH  | 3,72     | L | 3,53     | H  | 3,57     | J    |
| BIO-IMPULSE            | R4        | 4,74     | G   | 3,62     | G  | 3,50     | HI   | 3,46     | N | 3,42     | I  | 3,33     | K    |
| BIO-M3                 | CHA0      | 5,23     | B   | 5,04     | A  | 4,78     | A    | 4,29     | B | 4,13     | C  | 3,72     | FGHI |
| BIO-M3                 | BM2-12    | 5,05     | C   | 3,91     | DE | 3,98     | CDE  | 4,07     | E | 4,07     | D  | 3,96     | CDE  |
| BIO-M3                 | PM3-14    | 5,43     | A   | 4,65     | C  | 4,40     | B    | 4,01     | F | 3,95     | E  | 3,63     | B    |
| BIO-M3                 | PM3-8     | 5,12     | C   | 5,05     | A  | 4,92     | A    | 4,25     | C | 4,22     | B  | 4,18     | HIJ  |
| BIO-M3                 | R4        | 5,03     | CD  | 4,97     | A  | 4,88     | A    | 4,67     | A | 3,81     | FG | 3,72     | FGHI |
| PGPRs-4N               | CHA0      | 5,04     | CD  | 4,61     | C  | 4,19     | BCD  | 4,08     | E | 3,83     | F  | 3,66     | HIJ  |
| PGPRs-4N               | BM2-12    | 5,03     | CD  | 3,67     | G  | 3,54     | GHI  | 3,88     | I | 3,24     | K  | 3,35     | K    |
| PGPRs-4N               | PM3-14    | 4,83     | F   | 3,91     | DE | 4,32     | B    | 4,08     | E | 3,99     | E  | 3,68     | GHIJ |
| PGPRs-4N               | PM3-8     | 4,95     | DE  | 3,87     | E  | 3,80     | EFG  | 4,23     | C | 4,00     | E  | 3,98     | CD   |
| PGPRs-4N               | R4        | 5,28     | B   | 3,88     | E  | 4,01     | CDE  | 3,84     | J | 3,83     | F  | 4,10     | BC   |
| <b>P (formulados)</b>  |           | < 0,0001 |     | < 0,0001 |    | < 0,0001 |      | < 0,0001 |   | < 0,0001 |    | < 0,0001 |      |
| <b>P (bacterias)</b>   |           | < 0,0001 |     | < 0,0001 |    | < 0,0001 |      | < 0,0001 |   | < 0,0001 |    | < 0,0001 |      |
| <b>P (interacción)</b> |           | < 0,0001 |     | < 0,0001 |    | < 0,0001 |      | < 0,0001 |   | < 0,0001 |    | < 0,0001 |      |

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ) por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Al tiempo de muestreo (1, 6, 11, 16, 21 y 26 días). / Values with similar letters do not present significant statistical differences at the level of ( $p \leq 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison procedure. At sampling time (1, 6, 11, 16, 21 and 26 days).

### **Incidencia del bioformulado BIOQ-PGPRs en CCN-51 a su forma de aplicación en temporada seca y lluviosa**

Las rizobacterias crecieron en el bioformulado BIOQ-PGPRs y su aplicación a campo se realizó en consorcio en parcelas de CCN-51, que define valores significativos a la forma de aplicación (edáfica, foliar e inyección), temporada (lluviosa y seca) y sus interacciones para las variables morfológicas y productivas.

La evaluación de emisión foliar de las aplicaciones de rizobacterias en CCN-51, tuvo un aumento del número de hojas con similar respuesta a su aplicación edáfica e inyección en temporada lluviosa y seca, con (100 y 52) y (108 y 53), respectivamente (Cuadro 7). Hubo un incremento de la masa foliar por las aplicaciones de las rizobacterias, a diferencia de la parcela de CCN-51 tratadas con control químico y sin aplicación, se redujo la emisión foliar con 73 y 35 en temporada lluviosa y seca, respectivamente (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Emisiones foliares, número de granos y rendimiento de *T. cacao* durante la época seca y lluviosa del 2020. Los valores de p indican el efecto de los factores sobre la variable dependiente mediante un ANOVA de dos vías (forma de aplicación × época). Ecuador, 2020.

**Table 7.** Leaf emissions, bean number and yield of *T. cacao* during the dry and rainy seasons of 2020. The p values indicate the effect of the factors on the dependent variable using a two-way ANOVA (application method × time). Ecuador, 2020.

| Forma de aplicación            | Época    | Número de emisiones foliares |   |      | Número de granos |      |   | Rendimiento kg/ha |     |        |   |      |   |
|--------------------------------|----------|------------------------------|---|------|------------------|------|---|-------------------|-----|--------|---|------|---|
| Edáfico                        | Lluviosa | 100                          | ± | 11,9 | AB               | 51   | ± | 2,2               | A   | 157,3  | ± | 43,6 | D |
| Edáfico                        | Seca     | 52                           | ± | 3,9  | DE               | 42,2 | ± | 4,5               | BCD | 1270,6 | ± | 235  | A |
| Foliar                         | Lluviosa | 97                           | ± | 17,9 | AB               | 45,2 | ± | 1,4               | ABC | 117,4  | ± | 39,5 | D |
| Foliar                         | Seca     | 61                           | ± | 17,2 | CDE              | 44,8 | ± | 3,5               | ABC | 486    | ± | 146  | C |
| Inyección                      | Lluviosa | 108                          | ± | 18,2 | A                | 46,2 | ± | 3,1               | ABC | 85,6   | ± | 25,9 | D |
| Inyección                      | Seca     | 53                           | ± | 10,6 | DE               | 36,8 | ± | 3,7               | D   | 804    | ± | 129  | B |
| Químico                        | Lluviosa | 73                           | ± | 13,9 | BCD              | 46,8 | ± | 3,3               | AB  | 94,3   | ± | 15,1 | D |
| Químico                        | Seca     | 54                           | ± | 5,9  | DE               | 45   | ± | 1,3               | ABC | 723    | ± | 103  | B |
| Testigo                        | Lluviosa | 84                           | ± | 16,6 | ABC              | 40,2 | ± | 2,1               | CD  | 60,7   | ± | 20,5 | D |
| Testigo                        | Seca     | 35                           | ± | 6,5  | E                | 36,4 | ± | 3,6               | D   | 473    | ± | 63,9 | C |
| <b>P (forma de aplicación)</b> |          | 0,001                        |   |      | <0,0001          |      |   | <0,0001           |     |        |   |      |   |
| <b>P (época)</b>               |          | <0,0001                      |   |      | 0,0005           |      |   | <0,0001           |     |        |   |      |   |
| <b>P (interacción)</b>         |          | 0,0255                       |   |      | 0,0001           |      |   | <0,0001           |     |        |   |      |   |

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $P \leq 0,05$ ) por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar  $\pm$  corresponden a  $n = 16$ . Values with similar letters do not present significant statistical differences at the level of ( $P \leq 0,05$ ) by Tukey's multiple comparison procedure. Standard deviation  $\pm$  values correspond to  $n = 16$ .

La formación de granos en CCN-51, bajo aplicaciones edáficas de las rizobacterias generan un promedio anual de 47 semillas/mazorca entre las temporadas (lluviosa y seca). Con similar respuesta en la parcela de CCN-51 tratadas con fertilizante foliar y fungicidas (químico), generan un promedio de 46 semillas/mazorca entre las dos temporadas (Cuadro 7). Este resultado nos define el proceso de colonización de las rizobacterias en CCN-51 ejercen cambios a nivel fisiológico que permiten asimilar los nutrientes para favorecer a la formación de mazorcas.

El rendimiento de CCN-51 disminuyó en la temporada lluviosa, característica de este clon. En esta investigación la aplicación constante de rizobacterias a nivel edáfico ejerció un incremento de (1270,6 kg/ha - época seca) y se disminuyó a (157 kg/ha - época lluviosa). Las parcelas de CCN-51 tratadas con fertilización foliar y fungicidas (químico) alcanza 723 kg/ha en la temporada seca. Las aplicaciones de microorganismos potenciaron el mecanismo de protección de este clon y mejoraron el proceso de asimilación de minerales lo que contribuyó al incremento en producción de semillas de cacao (Cuadro 7). En temporada lluviosa se reduce la producción de mazorcas por efecto de las condiciones climáticas que disminuyen la formación de flores y el incremento de enfermedades.

### **Incidencia de enfermedades en mazorcas de CCN-51 a su forma de aplicación del bioformulado en temporada seca y lluviosa**

La aplicación del bioformulado BIOQ-PGPRs, tuvo diferencias significativas en la interacción de formas de aplicación y temporadas ( $p < 0,0001$ ). Las aplicaciones edáficas del bioformulado BIOQ-PGPRs, disminuyeron la incidencia de *Phytophthora* spp., en mazorcas de cacao, donde las rizobacterias activan el mecanismo de protección

a nivel fisiológico en CCN-51 para responder de manera más eficiente a enfermedades. La mayor incidencia de la enfermedad fue evidente en las parcelas de CCN-51 no tratadas con fungicidas químicos con un incremento de infección en mazorcas del 9,7% (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Incidencia de *Phytophthora* spp. y *M. royeri* durante la época seca y lluviosa del 2020. Los valores de p indican el efecto de los factores sobre la variable dependiente mediante un ANOVA de dos vías (forma de aplicación × época). Ecuador, 2020.

**Table 8.** Incidence of *Phytophthora* spp. and *M. royeri* during the dry and rainy seasons of 2020. P values indicate the effect of the factors on the dependent variable using a two-way ANOVA (application method × time). Ecuador, 2020.

| Forma de aplicación            | Temporada | Incidencia en mazorca (%) |   |     |    |                  |   |     |    |
|--------------------------------|-----------|---------------------------|---|-----|----|------------------|---|-----|----|
|                                |           | <i>Phytophthora</i> spp.  |   |     |    | <i>M. royeri</i> |   |     |    |
| Edáfico                        | Lluviosa  | 3,6                       | ± | 0,5 | CD | 10,9             | ± | 1,4 | B  |
| Edáfico                        | Seca      | 0,8                       | ± | 0,1 | AB | 34,1             | ± | 3   | F  |
| Foliar                         | Lluviosa  | 5,4                       | ± | 1,1 | D  | 13,6             | ± | 1,4 | BC |
| Foliar                         | Seca      | 7,8                       | ± | 0,8 | E  | 13,6             | ± | 1,4 | BC |
| Inyección                      | Lluviosa  | 8,3                       | ± | 1,2 | E  | 30,7             | ± | 1,6 | EF |
| Inyección                      | Seca      | 0                         | ± | 0   | A  | 20,9             | ± | 3,4 | D  |
| Químico                        | Lluviosa  | 2,7                       | ± | 0,8 | BC | 3,61             | ± | 0,4 | A  |
| Químico                        | Seca      | 4,0                       | ± | 1,0 | CD | 28,0             | ± | 3,3 | E  |
| Control                        | Lluviosa  | 4,0                       | ± | 1,1 | CD | 17,7             | ± | 1,8 | CD |
| Control                        | Seca      | 9,7                       | ± | 1,5 | E  | 42,9             | ± | 3   | G  |
| <b>P (forma de aplicación)</b> |           | <0,0001                   |   |     |    | <0,0001          |   |     |    |
| <b>P (época)</b>               |           | 0,1985                    |   |     |    | <0,0001          |   |     |    |
| <b>P (interacción)</b>         |           | <0,0001                   |   |     |    | <0,0001          |   |     |    |

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $P \leq 0,05$ ) por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar  $\pm$  corresponden a  $n = 16$ . Values with similar letters do not present significant statistical differences at the level of ( $P \leq 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison procedure. Standard deviation  $\pm$  values correspond to  $n = 16$ .

La proliferación de *M. royeri* en mazorcas de cacao se disminuyó bajo la aplicación del bioformulado BIOQ-PGPRs a nivel foliar, con niveles de infección del 13,6 % para sus dos temporadas, actuó sobre la mazorca de cacao. La aplicación edáfica del bioformulado PGPRs en temporada seca se incrementó un 34 % de infección en mazorca de CCN-51 (Cuadro 8). Estos resultados sugieren que la efectividad de las diferentes formas de aplicación para el control de *Phytophthora* spp. y *M. royeri* puede variar al considerar la temporada del año.

## Discusión

Las PGPR en esta investigación presentaron capacidad de producir biopelículas o exopolisacáridos, enzimas quitinasa y ureasa, diferentes tipos de fitohormonas, metabolitos fijadores de hierro (sideróforos) y solubilizadores de minerales del suelo. Las bacterias del género *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Aeromonas*

son productoras de ácidos orgánicos, control de hongos fitopatógenos por actividad de la enzima quitinasa, disminuir el estrés y estimular el crecimiento de plantas hospederas mediante la producción de fitohormonas y enzimas ACC desaminasa, y precipitación de metales pesados por la producción de biopelículas (Cadirci & Yilmaz, 2023; Haque et al., 2023; Nagrale et al., 2023; Wang et al., 2023). Esta particularidad mejora el estado fisiológico de las especies vegetales, ya sea directa o indirecta, e incrementa la productividad de cultivos agrícolas y minimiza la dependencia de los agroquímicos (Mishra et al., 2020).

Se determinó la presencia del gen *chiA* en las cepas (PM3-8, PM3-14, BM2-12, CHA0) con el producto de amplificación 225 pb, que codifica el dominio catalítico a la producción de quitinasas bacterianas. Se han reportado cepas de los géneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* con presencia del gen *chiA*, como un indicativo para el control de enfermedades en cultivos agrícolas (Cucu et al., 2019; Medina-de la Rosa et al., 2016; Okay & Alshehri, 2020; Verma et al., 2023).

Con el bioformulado BIO-QPGPRs se pudo masificar y preservar células bacterianas, hasta los 26 días. Sin embargo, la reducción de las UFC día 26 está influenciada por el metabolismo de los microorganismos y la dosis de cada ingrediente. En especial de los azúcares que pueden formar alcoholes, elemento que minimiza la presencia del oxígeno y acelera la muerte celular (Ariel-Elias et al., 2018).

Las fuentes de nutrientes, adherentes y estabilizadores juegan un rol fundamental en la protección y viabilidad de las formulaciones líquidas de bacterias (Lee et al. 2016). Esto indica que el bioformulado tiene componentes activos con la capacidad de preservar células bacterianas por un tiempo determinado. Por tal motivo, es relevante conocer las UFC/mL en los bioformulado, es indicativo de calidad del producto (Lobo et al., 2019).

Los bioformulados en estudio presentaron una disminución del pH del día 1 al 26, con pH inferiores a 5. Las PGPR desarrollan en medio con melaza a pH 4-9, sin embargo, el pH óptimo para la mayoría de los aislados bacterianos está entre 6,5 a 7 (Mustapha et al., 2022). Sin embargo, existen reportes que altas concentraciones de azucares desarrollan una inestabilidad en las características químicas (pH) de las formulaciones líquidas que ocasionan la reducción y muerte bacteriana (Guerra López & Zúñiga Dávila, 2018). Por tal motivo, los componentes utilizados en las formulaciones podrían influir en la disminución celular. En este contexto, las características de tolerancia a las condiciones ácida del formulado podría ser una alternativa para usar en suelos con estas mismas condiciones (Ma et al., 2020).

La aplicación a nivel de campo del bioformulado BIO-QPGPRs a manera de consorcio de PGPRs, en plantación de *T. cacao CCN51*, promovió las emisiones foliares en la temporada lluviosa en su aplicación foliar. La aplicación del bioformulado con *P. aeruginosa* aumentaron el número de brotes en manzanas (*Malus domestica* L.) en condiciones de campo (Sharma y Sharma, 2020). La aplicación de bioformulados PGPR en *Solanum tuberosum* mostraron mayor biomasa y área foliar en comparación a las plantas sin aplicación (Batool et al., 2020). Las PGPR tienen un efecto en el crecimiento foliar de *T. cacao* (Loguercio et al., 2023), este efecto se ocasiona porque las rizobacterias estimulan mayor densidad de cloroplastos, clorofila y nutriente por unidad de área foliar, por liberación de hormonas citoquininas.

El incremento en número de granos presentó en la interacción edáfica y época seca, está regulado por el proceso de disponibilidad de nutrientes, donde las rizobacterias juegan un rol sustancial en la capacidad de solubilizar minerales y estén disponibles para CCN-51 en comparación al control sin aplicaciones. El bioformulado con *P. fluorescens* promovió un mayor número y peso de semillas por planta de *Brassica juncea* en comparación al control (Mishra et al., 2022). Las PGPR mejoran la solubilización y eficiencia en la absorción de nutrientes que retribuyen en la producción y calidad de semillas (Hakim et al., 2021). Esto demuestra que las aplicaciones edáficas de la bioformulación son eficientes para incrementar el número de semillas en los cultivos.

La forma de aplicación edáfica en la época seca, incrementó el rendimiento del cultivo de cacao (1270,6 kg/ha), en comparación a inyección y foliar. La aplicación de la formulación de la emulsión de aceite con *P. fluorescens* FP79 productoras de AIA y citoquininas, aumentó significativamente el rendimiento del plátano (68,12 t/ha) en



comparación con el control (66,49 t/ha) (Peeran et al., 2014). Se reportó que la aplicación de formulaciones de *Pseudomonas* y *Azospirillum*, generaron un incremento en el rendimiento y calidad del fruto de tomate (Pérez-Rodríguez et al., 2020). Esta alternativa mejora la eficiencia de los agroquímicos y a el rendimiento en el cultivo de cacao.

Al control fitosanitario de *Phytophthora* spp. y *M. royeri* en mazorcas de cacao se disminuyó bajo la aplicación del bioformulado BIOQ-PGPRs a nivel foliar y edáfica. Se han reportado estudios donde la formulación orgánica basada en PGPRs ocasionó un efecto biocontrolador por la acción de PGPR, generaron un efecto antagónico frente a hongos patógenos en especies vegetales (Chakravarty, 2023; Meena et al., 2020; Pathma et al., 2021).

Existen pocos reportes al empleo de formulaciones PGPR al control biológico de infecciones ocasionadas por hongos en CCN-51. La alternativa es viable en base a Waisen et al. (2023); Anderson y Kim (2020) que utilizaron el producto comercial *P. chlororaphis* AFS009 (Howler™, AgBiome Inc., USA) para la protección en plantas contra fitopatógenos *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotinia* sp. por la producción de fenazinas antimicrobianas, insecticidas y nematicidas (Waisen et al., 2023; Anderson y Kim, 2020). La producción de compuestos como el 2,4 diacetilcloroglucinol (DAPG), fenazinas, pioluteorina, cianuro de hidrógeno podrían estar ligados a la acción de biocontrol en enfermedades fúngicas (Balmes et al., 2022; Chávez Arteaga et al., 2020). Además, se encontraron por pruebas bioquímicas y moleculares que la mayoría de las PGPR son productoras de quitinasas, por lo cual es fundamental para el control de hongos con estructura quinolitica como *M. royeri*.

## Conclusiones

Los bioformulados de rizobacterias presentaron variabilidad en las unidades formadoras de colonias (UFC) y el potencial de hidrógeno (pH) durante el tiempo de evaluación, ubicándose el bioformulado BIOQPGPRs con las cepas *P. protegens* CHA0, M2-12, *E. asburiae* BM3-14, *S. marcescens* M3-8 y *P. veronii* R4 en UFC/mL como el medio con mayor estabilidad con las variables antes mencionadas, durante los 26 días de evaluación.

En el cultivo de cacao la forma de aplicación por inyección en la época lluviosa incrementó el número de emisiones foliares (108), además, el efecto de aplicación edáfica en la época lluviosa aumentó el número de granos (51). En época seca, el rendimiento del peso seco del cacao (1270 kg/ha) mejoró cuando las aplicaciones de los formulados se realizaron de forma edáfica. En la época seca, se presentó una disminución total de *Phytophthora* (0 %) por el efecto de las aplicaciones por inyección.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al señor Hernán Canchignia, por permitir disponer del área de investigación en la etapa de campo. Al Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica (FOCICYT) de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por el financiamiento del trabajo de investigación.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## Referencias

- Akrofi, A. Y., Terlabie, J. L., Amoako-Attah, I., & Asare, E. K. (2017). Isolation and characterization of bacteria from different cacao progenies and their antagonistic activity against the black pod disease pathogen, *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Diseases and Protection: Scientific Journal of the German Phytomedical Society*, 124(2), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0082-z>
- Alaskar, A. A., & AL-Shwaiman, H. A. (2023).** The effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on soil properties and the physiological and anatomical characteristics of wheat under water-deficit stress conditions. *Agriculture*, 13(11), Article 2042. <https://doi.org/10.3390/agriculture13112042>
- 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. <https://doi.org/10.1007/bf00369386>
- Alsultan, W., Vadamalai, G., Khairulmazmi, A., Saud, H. M., Al-Sadi, A. M., Rashed, O., Jaaffar, A. K. M., & Nasehi, A. (2019). Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora palmivora* causing black pod of cocoa in Malaysia. *European Journal of Plant Pathology*, 155(4), 1077–1091. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01834-8>
- Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2020). Insights into plant-beneficial traits of probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 69(3), 361–371. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001157>
- Anith, K. N., Vaishakhi, A. S., Viswanathan, A., Varkey, S., & Aswini, S. (2016). Population dynamics and efficiency of coconut water based liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* AMB-8. *Journal of Tropical Agriculture*, 54(2), 184–184. <http://jtropag.kau.in/index.php/ojs2/article/view/381>
- Babu, A. G., Shea, P. J., Sudhakar, D., Jung, I.-B., & Oh, B.-T. (2015). Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal(loid)-contaminated mining site soil. *Journal of Environmental Management*, 151, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.045>
- Balmes, P., Cheng, J., Hirae, K., & Kaur, H. (2022). The Effect of Environmental pH on the Antifungal Activity of *Pseudomonas protegens* CHA0 against *Verticillium dahliae*. *Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 27, 1–6.
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M. R., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>
- Blanco-Romero, E., Garrido-Sanz, D., Rivilla, R., Redondo-Nieto, M., & Martín, M. (2020).** In silico characterization and phylogenetic distribution of extracellular matrix components in the model rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* F113 and other pseudomonads. *Microorganisms*, 8(11), Article 1740. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111740>
- Boateng, K. O., Dankyi, E., Amponsah, I. K., Awudzi, G. K., Amponsah, E., & Darko, G. (2023). Knowledge, perception, and pesticide application practices among smallholder cocoa farmers in four Ghanaian cocoa-growing regions. *Toxicology Reports*, 10, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.12.008>
- Boza, E. J., Motamayor, J. C., Amores, F. M., Cedeño-Amador, S., Tondo, C. L., Livingstone, D. S., Schnell, R. J., & Gutiérrez, O. A. (2014).** Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its impact and significance on global

- cacao improvement and production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. American Society for Horticultural Science, 139(2), 219–229. <https://doi.org/10.21273/jashs.139.2.219>
- Cadirci, B. H., & Yilmaz, G. (2023). Comparison of *in vitro* antifungal activity methods using extract of chitinase-producing *Aeromonas* sp. BHC02. *The Protein Journal*, 42(2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10098-5>
- Chakravarty, G. (2023). Management of bacterial wilt disease of brinjal by *P. fluorescens* based bioformulation: Experimental investigation. *Emerging Issues in Agricultural Sciences*, 2, 130-150. <https://doi.org/10.9734/bpi/eias/v2/5978A>
- Chandini, R.K., Kumar, R., & Prakash, O. (2019) The impact of chemical fertilizers on our environment and ecosystem. In P. Sharma (Ed.), *Research trends in environmental sciences* (2<sup>nd</sup> ed., Chapter 5, pp. 71-86). De Randeep Kumar.
- Chandra, D., & Sharma, A. K. (2021). Field evaluation of consortium of bacterial inoculants producing ACC deaminase on growth, nutrients and yield components of rice and wheat. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 24(3), 293–305. <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00077-y>
- Chang, W.-S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X., & Halverson, L. J. (2007).** Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8290–8299. <https://doi.org/10.1128/jb.00727-07>
- Chávez Arteaga, K. T., Guato Molina, J. J., Rodríguez Acosta, J. L., Cedeño Moreira, Á. V., Romero Meza, R. F., & Canchignia Martínez, H. F. (2020). Rizobacterias con potencial antagonista in vitro a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Ciencia y Tecnología*, 13(2). <https://doi.org/10.18779/cyt.v13i2.387>
- Christensen, W. B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolony cultures from each other and from *salmonella* and *Shigella* types. *Journal of Bacteriology*, 52(4), 461–466. <https://doi.org/10.1128/jb.52.4.461-466.1946>
- Cucu, M. A., Gilardi, G., Pugliese, M., Matic, S., Gisi, U., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2019). Influence of different biological control agents and compost on total and nitrification-driven microbial communities at rhizosphere and soil level in a lettuce *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* pathosystem. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 905-918. <https://doi.org/10.1111/jam.14153>
- Devi, R., Kaur, T., Kour, D., Yadav, A. N., & Suman, A. (2022). Potential applications of mineral solubilizing rhizospheric and nitrogen fixing endophytic bacteria as microbial consortium for the growth promotion of chilli (*Capsicum annum* L.). *Biologia*, 77(10), 2933–2943. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01127-2>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *Infostat (Versión 2020)*. Centro de Transferencia InfoStat. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=15>
- Dickson, A. G. (1993). The measurement of sea water pH. *Marine Chemistry*, 44(2–4), 131–142. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(93\)90198-w](https://doi.org/10.1016/0304-4203(93)90198-w)
- Fatima, T., & Arora, N. K. (2021).** *Pseudomonas entomophila* PE3 and its exopolysaccharides as biostimulants for enhancing growth, yield and tolerance responses of sunflower under saline conditions. *Microbiological Research*, Article 126671. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126671>
- Feijoo, I. M. A., & Reinaldo, M. J. R. (2016).** Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Agroecosistemas*, 4(2), 31–40. <https://aes.ucf.edu/cu/index.php/aes/article/view/84>

- García-Cruzatty, L. C., Vera-Pinargote, L., Zambrano-Gavilanes, F., Zamora-Macías, A., & Cedeño-Ortega, J. (2020). Pollen production in *Theobroma cacao* L. genotypes national type and CCN-51 and its relationship with climatic factors on the Ecuadorian coast. *Acta Agrobotanica*, 73(2), Article 7323. <https://doi.org/10.5586/aa.7323>
- Guerra Lopez, M., & Zúñiga Dávila, D. (2018). Producción de *Pseudomonas* sp. LMTK32 en medio modificado para peletizar semillas de maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 161–168. <https://doi.org/10.15381/rpb.v25i1.14034>
- Gupta, P., & Diwan, B. (2017).** Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Gutiérrez, O. A., Campbell, A. S., & Phillips-Mora, W. (2016). Breeding for disease resistance in cacao. In B. A. Bailey, & L. W. Meinhardt (Eds.), *Cacao diseases* (pp. 567–609). Springer International Publishing.
- Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., Mirza, M. S., & Imran, A. (2021). Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, Article 617157. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>
- Haque, M. M., Khatun, M., Mosharaf, M. K., Rahman, A., Haque, M. A., & Nahar, K. (2023). Biofilm producing probiotic bacteria enhance productivity and bioactive compounds in tomato. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50, Article 102673. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102673>
- Hipólito-Romero, E., Carcaño-Montiel, M. G., Ramos-Prado, J. M., Vázquez-Cabañas, E. A., López-Reyes, L., & Ricaño-Rodríguez, J. (2017). Efecto de inoculantes bacterianos edáficos mixtos en el desarrollo temprano de cultivares mejorados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un sistema agroforestal tradicional del norte de Oaxaca, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.003>
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (Eds.) (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9<sup>th</sup> ed.). The Williams & Wilkin.
- Hu, X., Chen, J., & Guo, J. (2006). Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from tianmu mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 983–990. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9144-2>
- Jha, Y., & Subramanian, R. B. (2018). From interaction to gene induction: An Eco-friendly mechanism of PGPR-mediated stress management in the plant. In D. Egamberdieva, & P. Ahmad (Eds.), *Plant microbiome: Stress response* (pp. 217–232). Springer Singapore.
- Khan, A., Singh, A. V., Upadhyay, V. K., Ballabh, A., & Prasad, B. (2022). Influence of PGPR on growth and yield of oat (*Avena sativa* L.) under field conditions. (2022). *Indian Journal of Ecology*. 49(4), 1351-1356. <https://doi.org/10.55362/ije/2022/3670>
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307.
- Lee, S.-K., Lur, H.-S., Lo, K.-J., Cheng, K.-C., Chuang, C.-C., Tang, S.-J., Yang, Z.-W., & Liu, C.-T. (2016). Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7977–7987. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7582-9>

- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Loguercio, L. L., Silva, A. C. M., Ribeiro, D. H., de Lima Cruz, J. M. F., Soares, A. C. F., Marbach, P. A. S., Cruz-Magalhães, V., & De Souza, J. T. (2023). Assessing the functional diversity of rhizobacteria from cacao by partitioning root and shoot biomasses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(14), 4647–4663. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12603-3>
- Ma, Y., Wang, Y., Chen, Q., Li, Y., Guo, D., Nie, X., & Peng, X. (2020). Assessment of heavy metal pollution and the effect on bacterial community in acidic and neutral soils. *Ecological Indicators*, 117, Article 106626. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106626>
- Marina, T. A.-E., Maythsulene, I. S. O., Valacia, L. S.-L., Marta, C. C. F., Amadou, H. B., Edemilson, C. C., & Marcio, V. de C. B. C. (2018).** Shelf life enhancement of plant growth promoting rhizobacteria using a simple formulation screening method. *African Journal of Microbiology Research*, 12(5), 115–126. <https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8787>
- Medina-de la Rosa, G., López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M. G., López-Olguín, J. F., Hernández-Espinosa, M. Á., & Rivera-Tapia, J. A. (2016). Rhizosphere bacteria of maize with chitinolytic activity and its potential in the control of phytopathogenic fungi. *Archiv Für Phytopathologie Und Pflanzenschutz*, 49(11–12), 310–321. <https://doi.org/10.1080/003235408.2016.1201345>
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Harish, Tripathi, Y. N., Zehra, A., Marwal, A., & Upadhyay, R. S. (2020). PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *Journal of Basic Microbiology*, 60(10), 828–861. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000370>
- Minitab. (2021). *Guía del usuario: software estadístico* (Versión 19). Minitab Inc.
- Mishra, I., Fatima, T., Egamberdieva, D., & Arora, N. K. (2020). Novel bioformulations developed from *Pseudomonas putida* BSP9 and its biosurfactant for growth promotion of *Brassica juncea* (L.). *Plants*, 9(10), Article 1349. <https://doi.org/10.3390/plants9101349>
- Montes, C., Altimira, F., Canchignia, H., Castro, Á., Sánchez, E., Miccono, M., Tapia, E., Sequeida, Á., Valdés, J., Tapia, P., González, C., & Prieto, H. (2016). A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), Article 76. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0198-y>
- Moon, C., Seo, D. J., Song, Y. S., Hong, S. H., Choi, S.-H., & Jung, W. J. (2017). Antifungal activity and patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide degradation via chitinase produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. *Microbial Pathogenesis*, 113, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.039>
- Mustapha, Z., Zakaria, A. J., Othman, R., Mohd, K. S., & Zawawi, D. D. (2022). Effects of growth medium, pH, temperature and salinity on BRIS soil plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) growth. *International Journal of Agriculture & Biology*, 28, 149–155. [https://www.fspublishers.org/Issue.php?no\\_download=published\\_papers/72589\\_03%20doi%2015.1963%20IJAB-22-0095%20%287%29%20149-155.pdf&issue\\_id=41793](https://www.fspublishers.org/Issue.php?no_download=published_papers/72589_03%20doi%2015.1963%20IJAB-22-0095%20%287%29%20149-155.pdf&issue_id=41793)
- Nagrale, D. T., Chaurasia, A., Kumar, S., Gawande, S. P., Hiremani, N. S., Shankar, R., Gokte-Narkhedkar, N., Renu, & Prasad, Y. G. (2023). PGPR: the treasure of multifarious beneficial microorganisms for nutrient mobilization, pest biocontrol

- and plant growth promotion in field crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(4), Article 100. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03536-0>
- Okay, S., & Alshehri, W. A. (2020). Overexpression of Chitinase A Gene from *Serratia marcescens* in *Bacillus subtilis* and Characterization of Enhanced Chitinolytic Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63, Article e2020200061. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020200061>
- Pathma, J., Kennedy, R. K., Bhushan, L. S., Shankar, B. K., & Thakur, K. (2021). Microbial biofertilizers and biopesticides: Nature's assets fostering sustainable agriculture. In R. Prasad, V. Kumar, J. Singh, & C. P. Upadhyaya (Eds.), *Recent developments in microbial technologies* (pp. 39–69). Springer Nature Singapore.
- Peeran, M. F., Nagendran, K., Gandhi, K., Raguchander, T., & Prabakar, K. (2014). Water in oil based PGPR formulation of *Pseudomonas fluorescens* (FP7) showed enhanced resistance against *Colletotrichum musae*. *Crop Protection*, 65, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.010>
- Peñafiel Jaramillo, M., Barrera Álvarez, A. E., Torres Navarrete, E. D., Canchignia Martínez, H. F., Prieto-Encalada, H., & Morante Carriel, J. (2016). Producción de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid “Thompson seedless” *in vitro*. *Ciencia y Tecnología*, 9(1), 31–36. <https://doi.org/10.18779/cyt.v9i1.114>
- Pérez-Rodríguez, M. M., Pontin, M., Lipinski, V., Bottini, R., Piccoli, P., & Cohen, A. C. (2020). *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense* Increase Yield and Fruit Quality of Tomato Under Field Conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(4), 1614–1624. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00233-x>
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Ramaiah, N., Hill, R. T., Chun, J., Ravel, J., Matte, M. H., Straube, W. L., & Colwell, R. R. (2000). Use of a *chiA* probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay1. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(1), 63–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00755.x>
- Rangel, F., Santos, R. A., Monteiro, M., Lavrador, A. S., Gasco, L., Gai, F., Oliva-Teles, A., Enes, P., & Serra, C. R. (2022).** Isolation of chitinolytic bacteria from European sea bass gut Microbiota fed diets with distinct insect meals. *Biology*, 11(7), 964. <https://doi.org/10.3390/biology11070964>
- Roman, D. L., Voiculescu, D. I., Filip, M., Ostafe, V., & Isvoran, A. (2021). Effects of triazole fungicides on soil Microbiota and on the activities of enzymes found in soil: A review. *Agriculture*, 11(9), 893. <https://doi.org/10.3390/agriculture11090893>
- Saravanan, V. S., Subramoniam, S. R., & Raj, S. A. (2004). Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. *Brazilian journal of microbiology*, 35(1–2), 121–125. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822004000100020>
- Sharma, R., & Sharma, S. (2022). Development of native *Pseudomonas aeruginosa* bioformulations with plant growth promoting potential for apple crop in Himachal Pradesh. *Journal of Plant Nutrition*, 45(7), 1041–1052. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.2003399>
- Sharpe, A. N., & Kilsby, D. C. (1971). A rapid, inexpensive bacterial count technique using agar droplets. *The Journal of Applied Bacteriology*, 34(2), 435–440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1971.tb02303.x>
- Sriwati, R., Chamzurn, T., Soesanto, L., & Munazhirah, M. (2019). Field application of *Trichoderma* suspension to control cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*). *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 41(1). <https://doi.org/10.17503/agrivita.v41i1.2146>



- Stephen, L.-K., Richard, T. A., & Fredrick, K. (2020).** Biological control of black pod disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.) with *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. in vitro and in the field. *Journal of microbiology and antimicrobials*, 12(2), 52–63. <https://doi.org/10.5897/jma2020.0434>
- Thomas L, Gupta A, Gopal, M, George, P and Thomas, G V. (2011). Efficacy of rhizosphere *Bacillus* spp. for growth promotion in *Theobroma cacao* L. seedlings. *Journal of Plantation Crops*, 39(1), 19–25.
- Tirado-Gallego, P. A., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Corpoica ciencia y tecnología agropecuaria*, 17(3), 417–430. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num3\\_art:517](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517)
- Tyskiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jarozuk-Ścisiel, J. (2022). Trichoderma: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), Article 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Verma, A., Verma, S., Singh, M., Mudila, H., & Saini, J. K. (2023). Ecology and mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria. *Sustainable Agriculture Reviews* 60, 69-93.
- Villamizar-Gallardo, R., Osma, J., & Ortíz-Rodríguez, O. (2019). Regional evaluation of fungal pathogen incidence in Colombian cocoa crops. *Agriculture*, 9(3), Article 44. <https://doi.org/10.3390/agriculture9030044>
- Waisen, P., Cheng, Z., & Criley, R. (2023). Effects of *Pseudomonas chlororaphis* strain AFS009 and *Beauveria bassiana* strain GHA against plumeria rust in Hawaii. *Plant Protection Science*, 59(2), 202-207. <https://doi.org/10.17221/86/2022-PPS>
- Yaseen, M., Ahmad, A., Naveed, M., Ali, M. A., Shah, S. S. H., Hasnain, M., Ali, H. M., Siddiqui, M. H., Salem, M. Z. M., & Mustafa, A. (2021). Subsurface-applied coated nitrogen fertilizer enhanced wheat production by improving nutrient-use efficiency with less ammonia volatilization. *Agronomy*, 11(12), Article 2396. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122396>