

Bacterias asociadas a *Sarcocornia neei* (Lag.) con aparente actividad hidrolítica y control biológico provenientes del chaco seco paraguayo

Bacteria associated with *Sarcocornia neei* (Lag.) With apparent hydrolytic activity and biological control from the Paraguayan dry Chaco

Yolanda Amelia López Benítez^{1,4}, Leandro Marcio Moreira² & Gilberto Antonio Benítez Rodas³

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Federal de Ouro Preto, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Ouro Preto, MG, Brasil.

³Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), San Lorenzo, Paraguay.

⁴Autor correspondiente: yamelopz@gmail.com.

Resumen: Las plantas halófitas muestran un nicho perfecto para aislar bacterias de interés, pues están adaptadas a ambientes extremos, estas bacterias podrían ser analizadas y explotadas por sus capacidades enzimáticas en la investigación y en diversas industrias. En este trabajo analizamos la actividad enzimática de las bacterias endofíticas y la rizosfera de *Sarcocornia neei*, una halófitas que se desarrolla en los saladares chaqueños. La actividad enzimática se determinó mediante placas de Petri, que contenían medio base, suplementado con 2 g / l (almidón, carboximetilcelulosa, pectina y caseína). Se determinó degradación enzimática por la formación de halos. Se obtuvieron un total de 83 aislamientos bacterianos, siendo Gram positivas 80 (96,3%) y Gram negativas 3 (3,6%). En los ensayos cualitativos de producción de enzimas hidrolíticas, se determinaron productores de amilasas 50,6%, celulasas 40,9%, pectinasas 36,1% y proteasas 10,8%. Los aislados bacterianos capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron mayoritariamente bacterias endofíticas, de los cuales siete aislados fueron capaces de producir simultáneamente amilasas, celulasas y pectinasas.

Finalmente, las bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *F. solani* fueron 13,8%, mientras que el 4,6% de los aislados fueron capaces inhibir el crecimiento de *K. pneumoniae* y solo el 0,6% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Palabras Clave: *Sarcocornia neei*, halófitas, enzimas hidrolíticas.

Abstract: Halophyte plants show a perfect niche to isolate bacteria of interest, as they are adapted to extreme environments, these bacteria could be analyzed and exploited for their enzymatic capacities in research and in various industries. In this paper we analyze the enzymatic activity of endophyte bacteria and the rhizosphere of *Sarcocornia neei*, a halophyte that develops in the Chaco salt marshes. Enzyme activity was determined using Petri dishes, containing base medium, supplemented with 2 g / l (starch, carboxymethylcellulose, pectin and casein). Enzymatic degradation was determined by the formation of halos. A total of 83 bacterial isolates were obtained, 80 being Gram positive (96.3%) and 3 Gram negative (3.6%). In qualitative tests for the production of hydrolytic enzymes, producers of amylases 50.6%, celluloses 40.9%, pectinases 36.1% and proteases 10.8%. The bacterial isolates capable of producing hydrolytic enzymes were mainly endophyte bacteria, of which seven isolates were capable of simultaneously producing three hydrolytic enzymes amylases, celluloses and pectinases. Finally, the bacteria capable of inhibiting the growth of *F. solani* were 13.8%, while 4.6% of the isolates were capable of inhibiting the growth of *K. pneumoniae* and only 0.6% showed antimicrobial activity against *S. aureus*.

Keywords: *Sarcocornia neei*, halophytes, hydrolytic enzymes.

Introducción

Por lo general el chaco paraguayo se caracteriza en presentar una superficie plana, y pendientes suaves en algunas regiones y relieves poco ondulados en otras. El ambiente adverso y la evaporación a través

del tiempo, en gran manera, produjo formaciones de evaporitas, haciendo así que el suelo sea halófito y xerofítico, ocasionando la formación de los saladares (Gómez Duarte, 1986).

Los vegetales adaptados a este tipo de ecosistema halófito tienen mecanismos adaptativos para

Recibido: 25/03/2021 Aceptado: 26/04/2021



resistir los factores abióticos. Este es el caso de *Sarcocornia neei* (Lag.) M.Á. Alonso & M.B. Crespo (basiónimo: *Salicornia neei* Lag.) un vegetal halófito, ampliamente distribuido, puede soportar altas concentraciones de sal acumulándola, además, es empleada en la gastronomía y se ha reportado cualidades farmacéuticas (Patel, 2016).

A las plantas se asocian bacterias que pueden ser endofíticas y rizobacterias (bacterias del interior del tejido vegetal y bacterias del suelo circundante a las raíces de las plantas) estos microorganismos pueden establecer asociaciones simbióticas con las plantas, son benéficas ya que estimulan el crecimiento vegetal, produciendo una variedad de sustancias, como las enzimas hidrolíticas en defensa contra patógenos protegiendo a la planta y adaptándola al ambiente (Ryan *et al.*, 2008).

Estas enzimas hidrolíticas que producen las bacterias son de gran importancia comercial con aplicaciones biotecnológicas en las industria alimenticia, agroindustrial y farmacéutica (Olanrewaju *et al.*, 2017; Amoozegar *et al.*, 2019; Corral *et al.*, 2019).

Las bacterias son fuentes ideales para producir enzimas hidrolíticas, debido a su fácil producción, por requerir poco espacio para el cultivo, creci-

miento rápido, escalable en la industria y flexibilidad muchas veces para la manipulación genética (Sivakumar *et al.*, 2009). Algunas de las enzimas hidrolíticas producidas por las bacterias son celulasa, pectinasa, proteasa, amilasa entre otras. Las celulasas, proteasas y amilasas se utilizan para la preparación de detergente para acelerar el proceso limpieza.

Las celulasas microbianas se producen comercialmente, pues estas se complementan con los detergentes para la eliminación de la suciedad sin dañar y aumentar la suavidad de los tejidos. Las bacterias, especialmente las del genero *Bacillus*, secretan enzimas extracelulares como amilasas, proteasas y lipasas con potenciales valores comerciales (Mukesh *et al.*, 2012).

Las proteasas de los microbios son enzimas industriales importantes y representan aproximadamente el 40–60% de las ventas totales de enzimas en todo el mundo (Vijay *et al.*, 2011; Ramkumar *et al.*, 2018).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas mediante la adición de agua a través de los enlaces peptídicos, y se encuentran ampliamente en plantas,

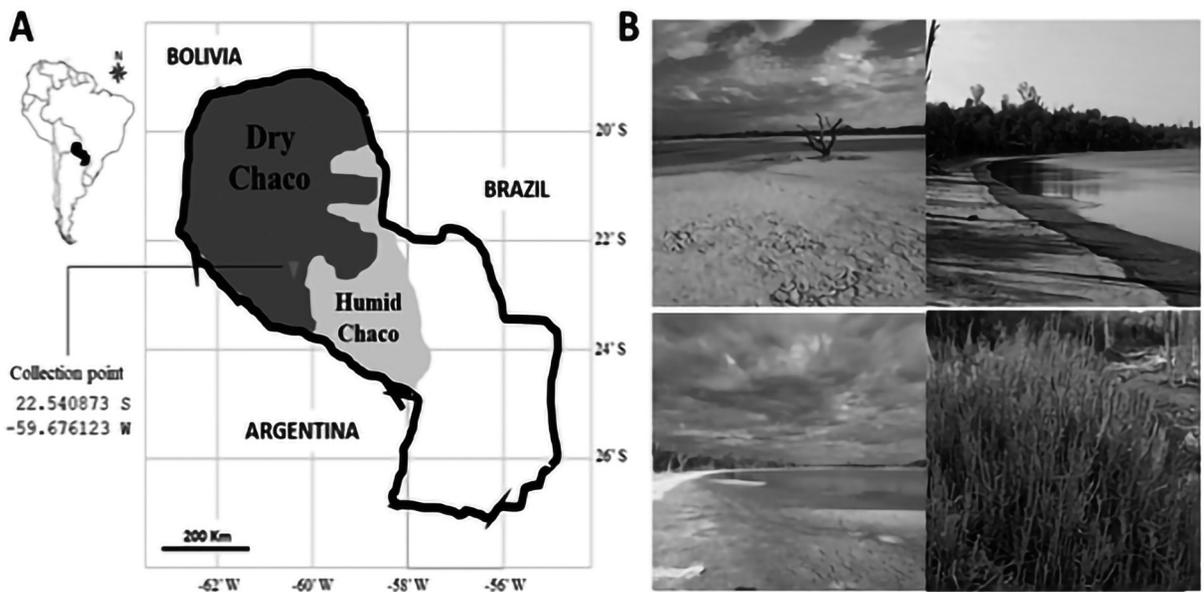


Figura 1. Localidad de muestreo. **A)** Ubicación geográfica del sitio de muestreo. **B)** Saladares del Chaco Seco Laguna Capitán (imágenes propias).

animales y microorganismos (Niyonzima & More, 2015). Debido a sus amplias aplicaciones, muchas proteasas de microorganismos se han estudiado en las últimas décadas, la mayoría de ellas se encuentran en cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* (Rahman *et al.*, 2010).

Otra enzima de importancia industrial con varias aplicaciones biotecnológica es la pectinasa, se emplea en la industria de producción de biocombustibles, papel de pulpa, alimentos para animales, textiles, fibra (Rebello *et al.*, 2017).

Los microorganismos han proporcionado una variedad de metabolitos secundarios con interesantes actividades biológicas notables que actúan como biorreguladores, moléculas de señalización / detección de quórum, fármacos antimicrobianos entre otros beneficios industrial, debido a todas estas cualidades este trabajo tuvo como objetivo analizar el potencial biotecnológico que pudieran tener las bacterias de la rizosfera y raíces de *Sarcocornia neei* aisladas de los saladares chaqueños.

Métodos

Zona de muestreo, aislamiento bacteriano y condiciones de cultivo

El muestreo se realizó en el Departamento de Boquerón Chaco, en las cercanías de la Laguna Capitán, en las coordenadas -22.540873 S, -59.676123 W. Se escogió este sitio de muestreo por la ubicación de las lagunas saladas y por ser un ambiente halófito y xerofítico (Figura 1). Para el aislamiento de bacterias de la rizosfera, las muestras de raíces y suelo circundante fueron colectadas por conveniencia durante períodos comprendido entre abril y agosto de 2019.

Para cumplir con la cantidad de muestra representativa se decidió colectar de manera aleatoria 10 plantas de *Sarcocornia neei*, según el recorrido de cuadrícula a 17 metros de las orillas de la laguna salada (Atlas *et al.*, 1998).

Muestras provenientes de la Rizosfera

Se utilizó 0,1 g de suelo provenientes de la rizosfera, se agregó agua estéril, se procedió a

mezclar de forma enérgica y constante por unos segundos, siendo el procedimiento con modificaciones propuestas por Felestrino *et al.* (2013), luego se tomó 100 µl de esta solución y se introdujo en medio líquido Luria-Bertani (LB), se incubó por 24 horas. Posterior a la incubación con el método de dilución 10^{-1} a 10^{-4} , se tomó 100 µl de la dilución 10^{-4} y se plaqueó en cajas de Petri 90x15 mm con medio Luria-Bertani Agar (LBA). A continuación, se incubaron a 28 °C por 10 días. Las colonias que se desarrollaron con diferentes formas y tamaños fueron transferidas en nuevas placas de Petri con medio LBA, para su posterior aislamiento. Posteriormente a cada aislado se le realizó la tinción de Gram. Todos los aislamientos fueron conservados en glicerol al 15% y almacenados a -20 °C.

Muestras de Raíces Provenientes de *S. neei*

Se tomaron cinco fragmentos de las raíces de plantas *S. neei*, de aproximadamente 1,0 - 0,5 cm. Las muestras de raíces fueron desinfectadas mediante una secuencia de soluciones: 9 g/L NaCl – 2 min, 70% de alcohol – 2 min, 2,5%, ácido clorhídrico (HCl) - 2 min y tres lavados de agua destilada, se tomó una raíz para control de esterilidad en medio líquido.

Las raíces fueron maceradas en un mortero, para depositar en un medio líquido LB, se incubó a 28 °C durante 24 horas (Felestrino, 2013).

A continuación, una alícuota de 100 µl, se inoculó en medio selectivo LBA que contenía clotrimazol, para evitar la formación de hongos. Todas las placas se incubaron a 28 °C durante un período de hasta 10 días, las bacterias que fueron desarrollándose durante los días de crecimiento fueron aislados en nuevas placas con LBA selectivo. Las bacterias aisladas fueron teñidas según el procedimiento para la tinción de Gram. Todos los aislamientos fueron catalogados, conservados en glicerol al 15% y almacenados en -20 °C (Figura 2).

Producción de Enzimas hidrolíticas

La actividad enzimática se determinó en placas de Petri 90x15 mm, que contenían medio base con

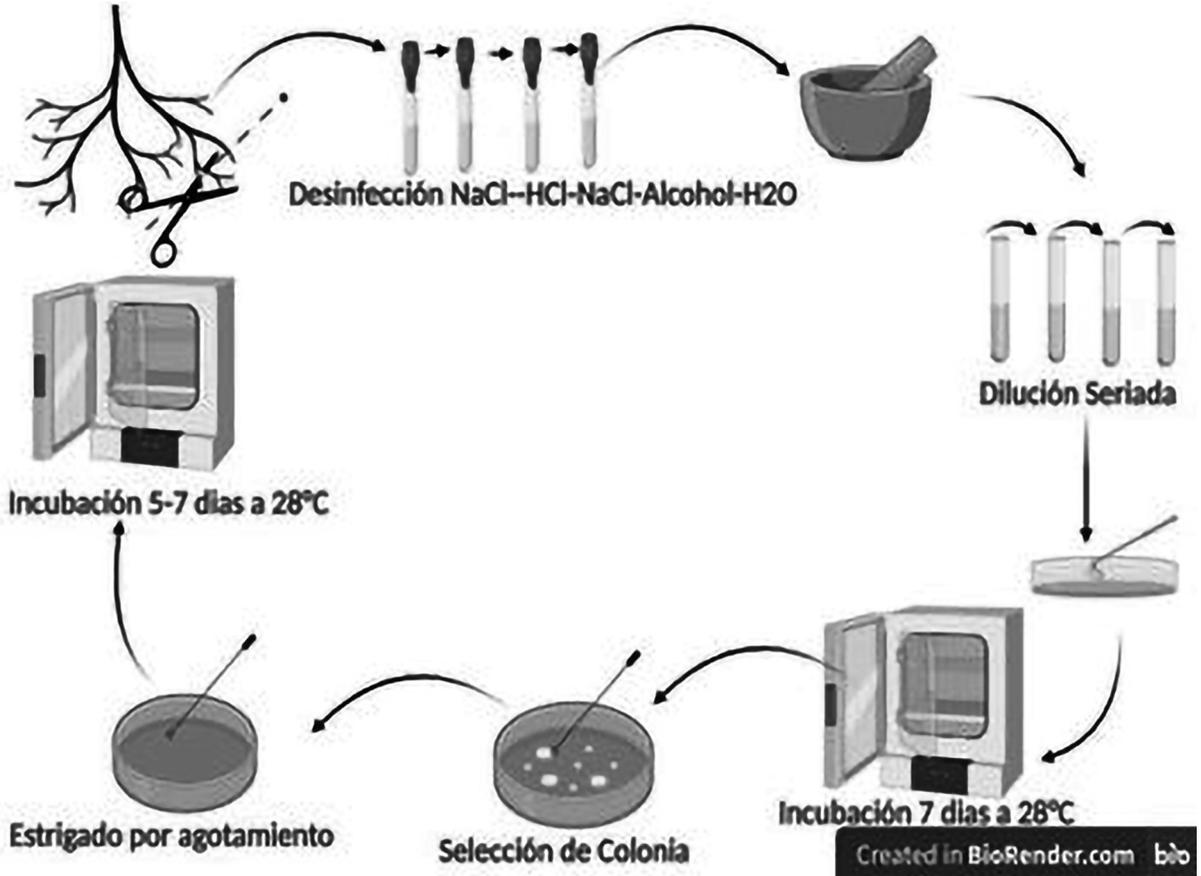


Figura 2. Resumen representativo de la metodología empleada en el aislamiento bacteriano de las raíces de *Sarcocornia neei*.

(K_2HPO_4 2 g/l, $KHPO_4$ 2g/l, agar 15 g/l, extracto de levadura 1 g/l) suplementado con 2 g / l (carboximetilcelulosa, almidón, pectina y caseína) con el pH ajustado a 6,0. Para la visualización de la degradación enzimática se empleó el rojo congo y lugol para la determinación de la producción de amilasas, celulasas, pectinasas y proteasas, por triplicado para cada uno de los ensayos (Feoli *et al.*, 1997).

Antagonismo microbiano

Para el ensayo de inhibición del crecimiento de patógenos, se realizaron pruebas con los siguientes microorganismos *Fusarium solani* (Cepa no referenciada, identificada y aislada), *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (ATCC 43300) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), utilizando el método de arrastre, en placas de Petri con medio

YPD agar (Yeast extract peptone dextrose), donde el patógeno se agregó en el centro de la placa y por el método de arrastre a las bacterias en estudio, luego se incubó a 28°C, y 37°C para *Klebsiella pneumoniae*, luego del 6to día hasta el 12mo día se observó el crecimiento de ambos organismos, las bacterias de interés frente a los patógenos (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos de referencia utilizados para el ensayo de antagonismo, que provocan daños a su hospedador.

Organismo	Hospedador
<i>Fusarium Solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Homo sapiens</i>

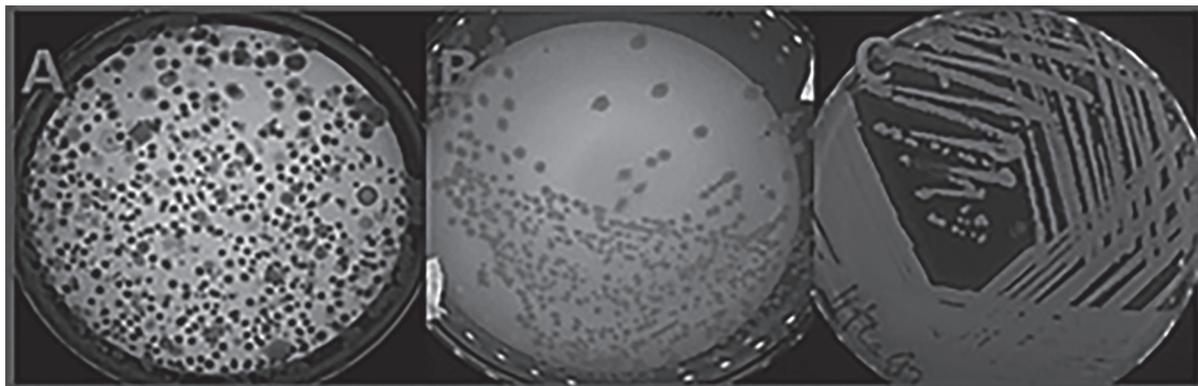


Figura 3. Aislamiento bacteriano. **A)** Aislamiento bacteriano por extensión en p. **B)** Aislamiento bacteriano por agotamiento. **C)** Colonias puras por estriado para obtención de biomasa.

Resultados y discusión

Tinción de Gram y morfología bacteriana

A partir de las raíces de *S. neei* y el suelo circundante a las raíces, se obtuvo un total de 83 aislados bacterianos, fueron aislados en medio LBA por agotamiento de asa, hasta obtener cultivos puros a partir de colonias basados en la variedad de formas y tamaño (Figura 3).

La morfología celular se observó al microscopio óptico, mediante tinción de Gram, las bacterias aisladas de las raíces como de la rizosfera se dividieron en Gram positivas con un total de 80 (96,3%) y Gram negativas solo 3 (3,6%) aislados, de las cuales 50 (60,2%) corresponde al suelo circundante (rizosfera) de las raíces de las plantas y 33 (39,7%) de las raíces (endófitas) de *S. neei*, mientras que el trabajo publicado por Szymańska *et al.* (2016), encontraron un 77,3%-87,5% de los aislados eran Gram positivos, de igual manera reportaron que el 50% de los aislados bacterianos cultivables pertenecían a las rizobacterias y el otro 50% a los endófitos proveniente de *Sarcocornia sp.*

Passari *et al.* (2017) reportaron que el número máximo de aislados bacterianos endófitos de una planta con propiedades medicinales fue de 46,7%. En el trabajo de Huang *et al.* (2019) encontraron mayor número de aislados en la rizosfera, con un 63,3%, mientras que el 36,3% provenían del interior de las raíces de *Platycodon grandiflorum*.

Rodríguez *et al.* (2020) reportaron que *Pseudomonas segetis* proveniente de *Salicornia europea*,

producen compuestos que aumentan la capacidad para defenderse contra patógenos y capaces de producir enzimas hidrolíticas: Celulasas, pectinasas, amilasas y proteasas (Figura 4).

Una de las enzimas hidrolíticas que producen las bacterias son las celulasas, las celulasas representan el grupo más destacado a nivel mundial en cuanto a enzimas, ya que tienen varias aplicaciones industriales (Kuhad *et al.*, 2011).

En los aislados obtenidos en este trabajo (Figura 5) fueron capaces de formar halos que evidencia producción de celulasas 34 (40,9%), de las cuales el 82,3% son bacterias endófitas, el 17,6% de los aislados provienen de la rizosfera (Figura 5B).

Szymańska *et al.* (2016) reportaron que el 50% fueron endófitos y el 36,8% fueron rizobacterias provenientes de *Salicornia sp.*, en el estudio de Pereira & Castro (2014), encontraron que el 62,5%

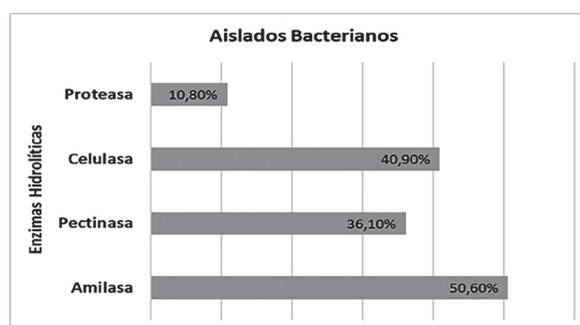


Figura 4. Representación porcentual de los aislados bacterianos que demuestran la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas.

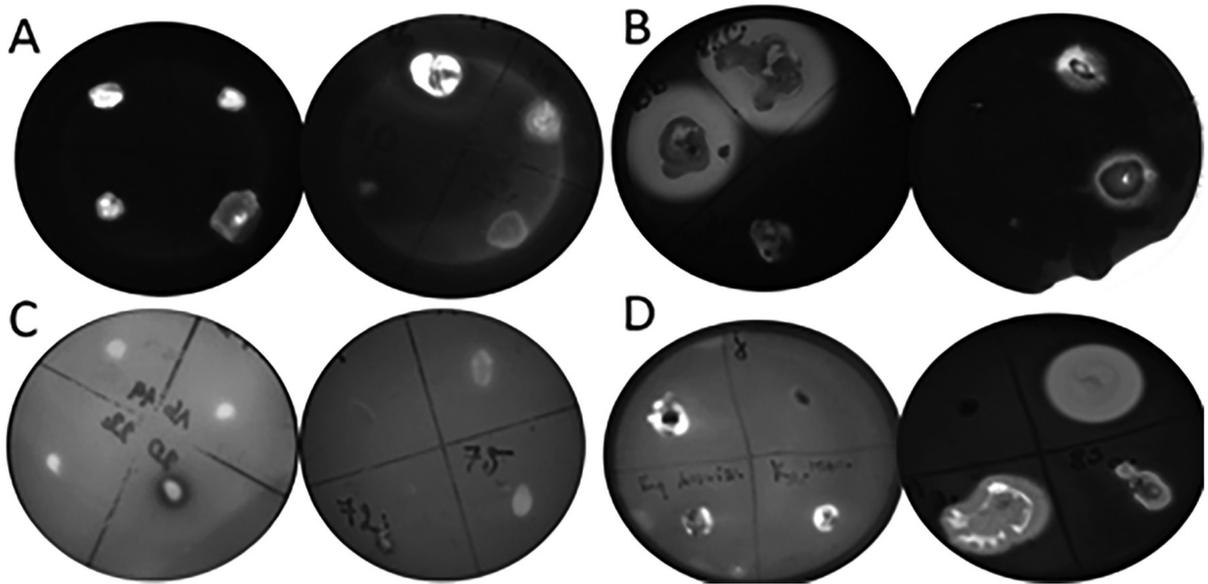


Figura 5. Aislamiento bacteriano: **A)** Aislamiento bacteriano con capacidad de producción de amilasa. **B)** Aislamiento bacteriano con capacidad de producción de celulasa. **C)** Aislados con capacidad de producción de pectinasa. **D)** Aislamiento bacteriano con capacidad de producción de proteasas.

de los aislados presentaron actividad endocelulítica.

Liu *et al.* (2019), demostraron que un grupo diverso de bacterias coloniza el tejido interior de la planta *L. ruhenicum* una halófito medicinal, donde el 32,1% de endófitos presentaron capacidad celulolíticas.

Mientras que en el estudio de Mukhtar *et al.* (2019), obtuvieron más del 40% de sus aislados con capacidad hidrolítica, provenientes de la rizosfera de un vegetal halófito.

Los resultados obtenidos en este trabajo, en relación con la producción de celulasas en condiciones de ensayo cualitativo, se obtuvo aislados bacterianos con producción de celulasas, esto es corroborado por Menéndez *et al.* (2016), donde han identificado genes relacionados con la actividad celulósica en cepas pertenecientes al género *Rhizobium*, así como en numerosas actinobacterias de los géneros *Actinosynnema*, *Cellulomonas* y *Streptomyces*, entre otros (Koeck *et al.*, 2014).

Otra enzima producida por las bacterias son las pectinasas, estas son empleadas para producción de jaleas, zumo de frutas, jugos de frutas y vino, pues mejora la extracción, la filtración y la clarificación del zumo de frutas, mejorando las cualidades del

producto final, (Kashyap *et al.*, 2001).

También las industrias de biocombustibles demandan esta enzima junto con las xilanasas, pues mejorar la sacarificación de la biomasa vegetal, durante la producción de biocombustible (Thite & Nerurkar, 2019).

En este ensayo cualitativo los aislados bacterianos que presentaron un halo visible de hidrólisis, fueron un total de 30 (36,1%), dato similar al trabajo de Hasan *et al.* (2020), encontraron que el 37,2% de los aislados bacterianos proveniente de *Corchorus olitorius*, con capacidad de producir pectinasa y xilanasas de manera conjunta. En cuanto al origen de los aislados según relación con *S. neei* se obtuvieron endofíticas 76,6%, las bacterias aisladas provenientes de la rizosfera 23,3% (Figura 5C).

En la literatura varias bacterias producen simultáneamente xilanasas y pectinasas como *Bacillus* sp. y *Streptomyces* sp., que son empleadas para la producción industrial (Kashyap *et al.*, 2001).

La aplicación de enzimas pectinolíticas crudas en diversos procesos industriales hace que estas enzimas sean comercialmente valiosas y un proceso de producción sea rentable, las cepas de *Bacillus safensis* y *Bacillus altitudinis* se estudiaron para la

producción de pectinasas (Thite *et al.*, 2020).

Para determinar la actividad proteolítica se empleó la técnica cualitativa de difusión en placas de agar y caseína, los aislados que producen proteasas presentan un halo visible de hidrólisis. Del total de los aislados fueron capaces de formar halos 9 (10,8%) aislados (Figura 5D).

El 77,7% de las bacterias con actividad de hidrólisis fueron endofíticas y el 22,2% fueron bacterias provenientes de la rizosfera, en el trabajo de Mukhtar *et al.* (2019), encontraron que el 47% de las bacterias aisladas presentaron actividad proteolítica y amilolítica de la rizosfera de *Atriplex amnicola* una planta halófila.

Encontramos que el 50,6% de los aislados bacterianos presentaron actividad amilolítica (Figura 5A), cifras similares a la encontrada en este estudio fueron reportados también por Carrim *et al.* (2006), donde el 60% de los aislados producían amilasa, también en el trabajo de Caneschi *et al.* (2018), encontraron que el 55% de las bacterias producían amilasas, aisladas de diferentes plantas.

En este estudio 7 aislados fueron capaces de producir las tres enzimas hidrolíticas estudiadas, mientras que Ben *et al.* (2019), lograron aislar 12 bacterias endofíticas capaces de producir siete enzimas probadas (proteasa, gelatinasa, quitinasa, celulosa, amilasa, pectinasa y glucanasa) [Tabla 2].

Existen aún pocos trabajos en la literatura sobre

bacterias productoras de enzimas en nuestro país, provenientes de plantas xerofíticas y halófitos, este es nuestro aporte a la información, que puede ser punta pie para futuras investigaciones enfocadas a la producción de enzimas y escalabilidad en la industria. La mayoría de los reportes de estas enzimas son observados en aislados bacterianos como fúngicos, (Oumer, 2017).

En estudios anteriores, sugieren que las bacterias halófitas producen enzimas con aplicaciones industriales y de investigación, debido a su naturaleza termoestable y tolerante a la sal, características óptimas para aplicaciones como producción de biocombustible, aditivos, detergentes (Corral *et al.*, 2019; Amoozegar *et al.*, 2019).

Las bacterias que crecen en simbiosis a *S. neei* podría ser explotadas por sus capacidades enzimáticas en la industria textil, biocombustible, biofertilizantes y agentes de biocontrol frente a una amplia variedad de tensiones abióticas y bióticas.

Antagonismo microbiano

A lo largo de los años se han ido encontrando bacterias que producen metabolitos secundarios, antibióticos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos, entre las bacterias más estudiadas se encuentran *Bacillus*, *Streptomyces* ssp, *Pseudomonas* spp., (Rojas Badía *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019). El sistema inmune de los vegetales tiene un

Tabla 2. Capacidad de producción de los aislados, con producción (+) y sin producción (-).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS			ACTIVIDAD HIDROLÍTICA			
Aislados	Morfología	Gram	Amilasa	Pectinasa	Celulítica	Proteasa
5R	Bacilo	+	+	-	+	-
18E	Bacilo	+	+	+	+	-
58E	Bacilo	+	+	+	+	-
64E	Bacilo	+	+	+	+	-
70E	Bacilo	+	+	+	+	-
75E	Bacilo	+	+	+	+	-
80E	Bacilo	+	+	+	+	-
83E	Bacilo	+	+	+	+	-



Figura 6. Inhibición del crecimiento de patógeno a 37°C de incubación. **A)** Inhibición en el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* de las bacterias aislada. **B)** Observación de halos en la inhibición en el crecimiento contra *Fusarium solani*. **C)** Inhibición del crecimiento en *S. aureus*.

sistema complejo de producción de metabolitos que proporciona una defensa aumentando la capacidad para expresar una resistencia, lo que permite una respuesta más rápida y fuerte frente a los patógenos. Las rizobacterias y endofíticas promotoras del crecimiento vegetal inducen la resistencia sistémica frente a los patógenos del suelo (D'Alessandro *et al.*, 2014; Lioussanne, 2010).

Los aislados que formaron un halo inhibitorio frente a *Fusarium solani* fueron unas 9 (13.8%). Mientras que frente a *Klebsiella pneumoniae* 3(4.61%) de los aislados fueron capaces inhibir el crecimiento del patógeno (Figura 6).

En el trabajo realizado por Sharma *et al.*, (2019) identificaron una rizobacteria halotolerante que tiene efecto de estimulación de crecimiento en el maní, en los ensayos *in vitro* demostraron la activación de genes involucrados en la producción de etileno y la señalización de defensa contra *Aspergillus flavus*, esto demuestra que podría existir bacterias que resisten concentraciones elevadas de NaCl que están asociadas con plantas capaces de inhibir patógenos, es por esta razón se escogió trabajar con una planta halotolerante como *S. neei*.

En trabajos similares realizados por Cao *et al.*, (2018), caracterizaron dos aislados de *Bacillus velezensis* asociados a la rizosfera que producen tres compuestos de lipopéptidos responsables de la actividad antimicrobiana frente a *Fusarium*

oxysporum y *Ralstonia solanacearum*, diversos autores reportan actividad antimicrobiana frente a *Fusarium solani* por parte de bacterias aisladas como por ejemplo *Streptomyces sp.* (Ezra *et al.*, 2004; El-Gendy & El-Bondkly, 2010).

En otro estudio realizado por Passari *et al.*, (2017), el 47% de los aislados de una planta medicinal mostraron actividad antimicrobiana contra diversos patógenos como *E. coli*, *C. albicans*, solo el 0.59% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, muy diferente al este ensayo realizado donde se obtuvo 7.8% (Figura 7), de los aislados demostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con características meticilino resistente, lo cual demuestra que estos aislados podrían tener una gran perspectiva en las industrias agrícola y farmacéutica.

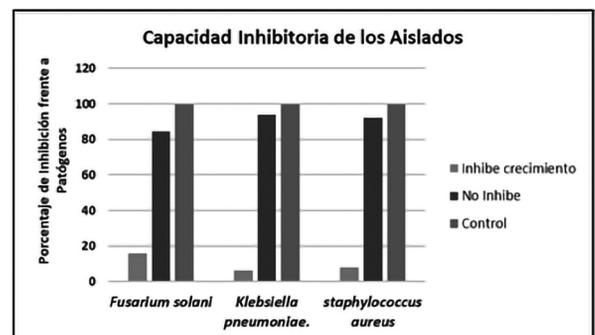


Figura 7. Representación porcentual de inhibición del crecimiento de los aislados frente a patógenos.

Conclusión

En el análisis de la actividad enzimática, se obtuvieron un total de 83 aislados, siendo Gram positivas mayoritariamente, las cuales provienen del suelo circundante (rizosfera) 60,2% y de las raíces de las plantas 39,7% (endófitas) de *S. neei*.

Los aislados capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron para celulasas 40,9%, amilasas 50,6%, pectinasas 36,1% y proteasas 10,8% aislados.

Los aislados bacterianos capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron mayoritariamente bacterias endofíticas, de los cuales siete aislados fueron capaces de producir tres enzimas hidrolíticas de las cuatro enzimas estudiadas.

Por último, las bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium solani* fueron 13,8%, el 4,6% de los aislados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y solo el 0,6% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Finalmente creemos que este tipo de trabajos puede contribuir a la investigación, en la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas, sustancias o metabolitos con potencial biotecnológico y valor económico.

Agradecimientos

Prociencia- CONACYT, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad Nacional de Asunción.

Literatura citada

- Amoozegar, M.A., Safarpour, A., Noghabi, K.A., Bakhtiary, T. & Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production. *Frontiers in microbiology*, 10(1895): 1–17.
- Atlas, R., Bartha, R. & Atlas, D. (1998). *Microbial Ecology-Fundamentals and Applications*. 4th edition. Redwood City, USA: Benjamin-Cummings. 694 pp.
- Caneschi, W.L., Felestrino, E.B., Fonseca, N.P., Villa, M.M., Lemes, C.G.C., Cordeiro, I.F., Assis, R.A.B., Sanchez, A.B., Vieira, I.T., Kamino, L.H.Y., Carmo, F.F., Garcia, C.C.M. & Moreira, L.M. (2018). Brazilian ironstone plant communities as reservoirs of culturable bacteria with diverse biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 9(1638): 1–17.
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J.D. & Ca, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8(4360): 1–14.
- Carrim, A.J.I., E.C. Barbosa & J.D.G. Vieira. (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3): 353–359.
- Corral, P., Amoozegar, M.A., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine drugs*. 18(33): 1–33.
- D'Alessandro, M., Erb, M., Ton, J., Brandenburg, A., Karlen, D., Zopfi, J. & Turlings, T.C. (2014). Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant, Cell & Environment*, 37(4): 813–826.
- El-Gendy, M.M.A. & El-Bondkly, A.M.A. (2010). Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamy-cin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. *Natural Products, an Indian Journal*, 16(1): 61–73.
- Ezra, D., Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, B. & Yaver, D. (2004). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*, 150(4): 785–793.
- Felestrino, E.B. (2013). *Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microrganismo associados à interação Langsdorffia hypogaea-hospedeira-rizósfera*. Dissertação de Mestrado. Ouro Preto, Brasil: Universi-

- dade Federal de Ouro Preto. 88 pp.
- Feoli, M., Gómez, Z. & Muñoz, A. (1997). Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, (26): 33-37.
- Gómez Duarte, D.R. (1986). *Contribución al conocimiento geológico del Chaco Paraguayo*. Asunción, Paraguay: Impresión privada. 31 pp.
- Hasan, R., Aktar, N., Kabir, T., Honi, U., Halim, A., Islam, R., Sarker, M.D.H., Haque, S., Alam, M. & Islam, S. (2020). Pectinolytic Bacterial Consortia Reduce Jute Retting Period and Improve Fibre Quality. *Scientific Reports*, 10(5174): 1–9.
- Huang, C.M., Chen, W.C., Lin, S.H., Wang, Y.N. & Shen, F.T. (2019). Exploración de bacterias asociadas a raíces de la planta medicinal *Platycodon grandiflorum*. *Microbes and Environments*, 34(4): 413–420.
- Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S. & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3): 215–227.
- Koeck, D.E., Pechtl, A., Zverlov, V.V. & Schwarz, W.H. (2014). Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 29:171–183.
- Kuhad, R.C., Gupta, R. & Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011(280696): 1–10.
- Lioussanne, L. (2010). Review. The role of the arbuscular mycorrhiza associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(S1): S51–S61.
- Liu, Y.H., Wei, Y.Y., Mohamad, O.A.A., Salam, N., Zhang, Y.G., Guo, J.W., Li, L., Egamberdieva, D. & Li, W.J. (2019). Diversity, community distribution and growth promotion activities of endophytes associated with halophyte *Lycium ruthenicum* Murr. *3 Biotech*, 9(144): 1–12.
- Menéndez, E., Díez-Méndez, A., Marcos-García, M., Celador-Lera, L., Flores-Félix, J.D., Rivera, L., Robledo, M., Velázquez, E., Martínez-Molina, E., Rivas, R. & Mateos, P.F. (2016). *Rhizobium* Symbiotic Enzyme Cellulase CelC2: Properties and Applications. Pp. 81–89 in Gupta, V.K. (Ed.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. xiii + 286 pp.
- Mukesh Kumar, D.J., Poovai, P.D., Kumar, P.C.L., Saroja, Y.S., Manimaran, A. & Kalaichelvan, P.T. (2012). Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its biostoning activity. *Der Pharmacia Lettre*, 4(3): 881-888.
- Mukhtar, S., Mehnaz, S., Mirza, M.S., & Malik, K.A. (2019). Isolation and characterization of bacteria associated with the rhizosphere of halophytes (*Salsola stocksii* and *Atriplex amnicola*) for production of hydrolytic enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(1), 85–97.
- Niyonzima, F.N. & More, S.S. (2015). Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. *3 Biotech*, 5: 61–70.
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., & Babalola, O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal Of Microbiology and Biotechnology*, 33(197): 1–16.
- Oumer, O.J. (2017). Pectinase: Substrate, production and their biotechnological applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(3): 1007–1014.
- Passari, A.K., Mishra, V.K., Singh, G., Singh, P., Kumar, B., Gupta, V.K., Sarma, R.K., Saikia, R., Donovan, A.O. & Singh, B.P. (2017). Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary

- metabolites production. *Scientific Reports*, 7(11809): 1–17.
- Patel, S. (2016). *Salicornia*: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3 Biotech*, 6(104): 1–10.
- Pereira, S.I.A. & Castro, P.M.L. (2014). Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(24): 14110–14123.
- Rahman, R.N.Z.A.R, Geok, L.P., Wong, C.F., Basri, M. & Salleh, A.B. (2010). Molecular investigation of a gene encoding organic solvent-tolerant alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Journal of Basic Microbiology*, 50(2): 143–149.
- Ramkumar, A., Sivakumar, N., Gujarathi, A. M., & Victor, R. (2018). Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization. *Scientific reports*, 8(12442): 1–15.
- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E.M., Sindhu, R., Binod, P. & Pandey, A. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16(5): 381–394.
- Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I. & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific reports*, 10(4121): 1–12.
- Rojas Badía, M.M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K. & Lugo Moya, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2)5: 1–9.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278: 1–9.
- Sharma, S., Chen, C., Navathe, S., Chand, R. & Pandey, S.P. (2019). A halotolerant growth promoting rhizobacteria triggers induced systemic resistance in plants and defends against fungal infection. *Scientific reports*, 9(4054): 1–17.
- Sivakumar, N., Remya, R. & Al Bahry, S. (2009). Partial characterization of proteases produced by three fungal isolates from the rhizosphere of wild yam *Dioscorea wallichii*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(3): 71–75.
- Szymańska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., & Hryniewicz, K. (2016). Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. - community structure and metabolic potential. *Microbiological research*, 192: 37–51.
- Thite, V. S. & Nerurkar, A. S. (2019). Crude Xylanases and Pectinases from *Bacillus* spp. Along with Commercial Cellulase Formulate an Efficient Tailor-Made Cocktail for Sugar-cane Bagasse Saccharification. *BioEnergy Research*, 13: 286–300.
- Thite, V.S., Nerurkar, A.S. & Baxi, N.N. (2020). Optimization of concurrent production of xylanolytic and pectinolytic enzymes by *Bacillus safensis* M35 and *Bacillus altitudinis* J208 using agro-industrial biomass through Response Surface Methodology. *Scientific reports*, 10(3824): 1–12.
- Vijay, K. E., Srijana, M., Kiran, K. K., Harikrishna, N., Reddy, G. (2011). A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(4): 403–409.