

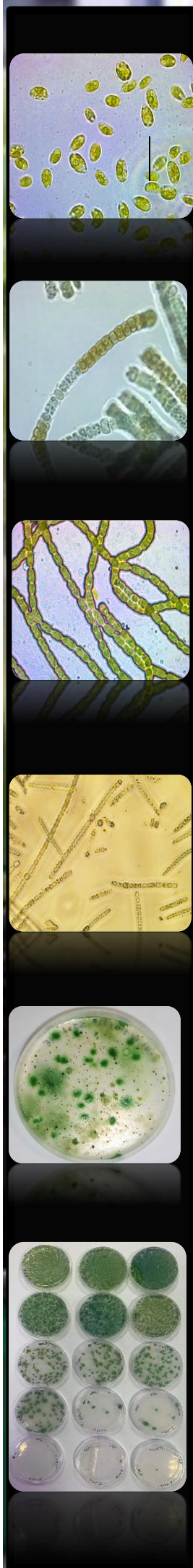


**APLICACIÓN DE CIANOBACTERIAS COMO  
AGENTES BIOFERTILIZANTES,  
BIOESTIMULANTES Y BIOPLAGUICIDAS EN  
ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO  
VEGETAL**



TESIS DOCTORAL  
Ana J. Toribio Gallardo  
Diciembre, 2021

Universidad de Almería





UNIVERSIDAD DE ALMERÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOPROCESOS  
INDUSTRIALES APLICADOS A LA  
AGROALIMENTACIÓN Y MEDIOAMBIENTE

**"APLICACIÓN DE CIANOBACTERIAS COMO  
AGENTES BIOFERTILIZANTES, BIOESTIMULANTES  
Y BIOPLAGUICIDAS EN ETAPAS TEMPRANAS DEL  
DESARROLLO VEGETAL"**

Ana J. Toribio Gallardo

Tesis Doctoral. Almería, Diciembre de 2021

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOPROCESOS  
INDUSTRIALES APLICADOS A LA AGROALIMENTACIÓN Y  
MEDIOAMBIENTE

**APLICACIÓN DE CIANOBACTERIAS COMO AGENTES  
BIOFERTILIZANTES, BIOESTIMULANTES Y  
BIOPLAGUICIDAS EN ETAPAS TEMPRANAS DEL  
DESARROLLO VEGETAL**

**APPLICATION OF CYANOBACTERIA AS BIOFERTILIZERS,  
BIOSTIMULANTS AND BIOPESTICIDES IN EARLY STAGES  
OF PLANT DEVELOPMENT**

MEMORIA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR

Fdo.: Ana Josefa Toribio Gallardo

Fdo.: Francisca Suárez Estrella  
Profesora Titular de Universidad  
Universidad de Almería

Fdo.: María José López López  
Profesora Titular de Universidad  
Universidad de Almería

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL INCLUYE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “APLICACIÓN DE CIANOBACTERIAS COMO AGENTES BIOFERTILIZANTES, BIOESTIMULANTES Y BIOPLAGUICIDAS EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO VEGETAL” SUBVENCIONADO POR PROYECTO SABANA, PROYECTO ENMARCADO EN EL PROGRAMA H2020 DE LA UNIÓN EUROPEA (N.º 727874).



## Agradecimientos

Según decía Machado, “sólo se hace camino al andar” y ¡cuánto he andado yo para encontrarme en este momento tan esperado y deseado! Siempre he creído en el dicho de “el que la sigue y la consigue”, pero lo que no se comenta es cuán importante es dar con el equipo de personas adecuado que te van a allanar el camino para que finalmente lo puedas lograr.

Indiscutiblemente, la oportunidad que me brindó D. Joaquín Moreno Casco para formar parte de su equipo de investigación, que con tanto cariño formó, fue toda una suerte y un orgullo. Era una persona que sobresalía como investigador, transmitiendo todos sus conocimientos de una forma magistral. Destacaba además por ser una excelente persona, tratando con educación y respeto tanto a compañeros, técnicos, alumnos y, en especial, a todos los miembros de su equipo, de ahí que la huella que nos ha dejado a todos sea imborrable. Siento mucho no haber podido disfrutar de sus consejos a la hora de elaborar y defender mi trabajo de Tesis, así que espero hacerlo lo mejor posible, ¡Gracias por los buenos momentos que hemos pasado!

Tras la irreparable pérdida de nuestro querido Director, quiero destacar la labor tan importante que las profesoras María José López y Francisca Suárez han realizado para mantener el entusiasmo del grupo. Con el lema “todos a una”, han conseguido que sigamos cosechando buenos resultados y que nuestro grado de implicación sea el máximo.

Para mí es un orgullo que seáis las Directoras de mi Tesis Doctoral. Es impresionante vuestra capacidad de trabajo y el dominio que tenéis en vuestras áreas de conocimiento, el cual me ha permitido desarrollar mi trabajo con una ayuda sumamente importante. Las dos sois unas grandísimas profesionales.

María José, muchas gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación, en el cual puedo mejorar profesionalmente y personalmente, así que, no se puede pedir más.

Paqui, me dirijo a ti ahora como la amiga que eres. Te tengo que agradecer tantas cosas, empezando por pensar en mí para llevar a cabo este trabajo de investigación en el área de Microbiología, y darme la oportunidad de volver a la Universidad, a mis inicios, lo que tanta ilusión me hacía. En estos años, me has dado mucho cariño y apoyo. Tus esfuerzos para que este trabajo saliera adelante han sido impresionantes, por lo que siempre voy a estar en deuda contigo. Te quiero mucho y te admiro más, ojalá con el tiempo logre parecerme un poquito a ti. Eres un referente para mí.

Macarena y Juan, muchas gracias por ser tan alegres y comprometidos, por ayudarme a conseguir parte de los objetivos planteados en esta Tesis, yendo a contrarreloj en muchas ocasiones. No dejo de aprender con vosotros y estoy muy contenta de teneros en mi vida.

María del Mar, Paloma, Angie, Pepi, que equipazo formáis. Vuestro apoyo es esencial para sacar adelante el trabajo diario del laboratorio. Siempre con una sonrisa en la cara, da gusto trabajar con vosotras.

A María Rosa (mi princesa y confidente), Rosario (mi sevillana favorita, alegre y servicial), Jesús (súper paciente y cariñoso con todas nosotras), Ana Siles (supermami y nuestra MacGyver particular), María José Estrella (una máquina de las redes sociales y la divulgación científica), Víctor (un alma pensante y buena gente). Gracias por tantísimos buenos momentos vividos en el laboratorio, por todas las risas, todos los cafés y chocolatadas. Sois los mejores compañeros y valoro mucho el tiempo que comparto con vosotros, os quiero un montón.

Y no menos importantes, porque siguen estando conmigo de una manera incondicional, mis queridísimos amig@s, Paqui Robles, Elena Cañuelo, Tamar Guetta, Beatriz Mariotti, María Salinas, Esteban Salmerón, Elena Carrión y Leonor Palma, muchas gracias por vuestro apoyo y cariño, es un privilegio teneros conmigo después de tantos años.

Me considero además una persona afortunada, por tener una familia estupenda, divertida, comprometida, que me quiere y me apoya en cualquier situación. Me han enseñado muchos valores en la vida, sobre todo el respeto a los demás. Os quiero muchísimo a todos, papá, mamá, mi hermano Andrés, Sara y mis sobrinos Adrián, Mara, Kiko, Aitana. Sin olvidar a mis tíos y mis primos. Seguid siendo tan alegres y cercanos.

Y para finalizar, a mis preciosos hijos Santi y Darío; gracias porque sois mi motivación para querer mejorar en la vida, y por alegrarme el día a día, ¡os adoro!





INDICADORES DE CALIDAD .....	8
RESUMEN .....	11
ABSTRACT.....	15
I. Introducción.....	19
I.1. Impacto de la Agricultura Intensiva .....	19
I.1.1. Consecuencias de la utilización inadecuada de fertilizantes químicos .....	21
I.1.2. Problemas derivados del control de organismos fitopatógenos en agricultura intensiva .....	23
I.2. Microorganismos y Agricultura Sostenible .....	24
I.2.1. Control Biológico frente a Control Químico .....	25
I.2.2. Interacciones planta-microorganismos: rizosfera y filosfera.....	26
I.3. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPMs): rizobacterias, hongos y micorrizas .....	28
I.3.1. Estrategias microbianas para la promoción del crecimiento vegetal .....	31
I.3.1.1. Biofertilización .....	31
I.3.1.2. Bioestimulación .....	33
I.3.1.3. Efecto biopesticida.....	36
I.4. Potencial biotecnológico de las cianobacterias.....	37
I.4.1. Aspectos generales: multifuncionalidad y versatilidad.....	37
I.4.2. Papel de las cianobacterias como agentes promotores del crecimiento vegetal .....	40
1.4.2.1 Aplicación de cianobacterias como fitoestimulantes y biofertilizantes ....	41
1.4.2.2. Acción biopesticida de las cianobacterias frente a enfermedades vegetales (preventiva, curativa) .....	44
I.4.2.3. Métodos de aplicación de cultivos y extractos de cianobacterias <i>in planta</i> .....	46
1.4.2.4. Extracción de sustancias bioactivas a partir de cultivos de cianobacterias .....	48
1.4.2.5. Establecimiento de consorcios microbianos: interacción entre microorganismos autótrofos y heterótrofos .....	53
I.5. Referencias .....	58
II. Hipótesis y Objetivos .....	71
III. Diseño Experimental.....	75
IV. Resultados.....	79
ARTÍCULO I.....	81
1. Introduction.....	83

2. Materials and methods .....	84
2.1. Cyanobacteria collection and preparation of extracts .....	84
2.2. <i>In vitro</i> Production of bioactive substances .....	84
2.3. Germination index bioassays .....	85
2.4. <i>In vivo</i> evaluation of phytostimulant activity .....	86
2.5. Statistical analyses .....	86
3. Results and discussion .....	86
3.1. <i>In vitro</i> bioprospection of plant growth promoting cyanobacteria.....	86
3.1.1. Production of siderophores, phosphate solubilization, salicylic acid and cytokinins.....	86
3.1.2. Screening of plant growth promoter strains based on germination index assay .....	89
3.2. Application of the best selected cyanobacteria as growth promoters in cucumber seedlings.....	91
4. Conclusions.....	95
5. Funding .....	96
6. Appendix A. Supplementary data .....	96
7. References.....	99
ARTÍCULO 2 .....	103
1. Introduction.....	106
2. Material and Methods .....	108
2.1 Microorganisms .....	108
2.1.1 Phytopathogenic agent .....	108
2.1.2 Collection of cyanobacteria and getting extracts .....	108
2.2 <i>In vitro</i> plant growth promotion bioassays.....	108
2.2.1 Root lengthening promotion: Germination Index .....	108
2.2.2 Seedling weight after emergence .....	109
2.3 <i>In vitro</i> antagonism bioassays towards <i>Pythium ultimum</i> .....	110
2.3.1 Dual culture protocol .....	110
2.3.2 Detached leaf bioassays .....	110
2.4 <i>In planta</i> bioassays.....	111
2.4.1 Cucumber seed bioimmersion protocol .....	111
2.4.2 Substrate infestation with a zoospore suspension of <i>Pythium ultimum</i> .....	111
2.4.3 Protective and phytostimulant effect of cyanobacteria extracts towards damping-off caused by <i>Pythium ultimum</i> in cucumber seeds after <i>biopriming</i> ...	112
2.5 Statistical analyses .....	112
3. Results and Discussion .....	113

3.1 Growth-promoting effect on germination index (GI) and increase in seedling weight (ISW).....	113
3.2 Antagonistic cyanobacteria against the in vitro growth of <i>Pythium ultimum</i> ...	115
3.3 Detached-leaf bioassay for evaluating resistance to <i>Pythium ultimum</i> after treatment with cyanobacterial extracts.....	118
3.4 Early phytostimulation and plant protection against damping-off caused by <i>Pythium ultimum</i> by seed <i>biopriming</i> with cyanobacterial extracts.....	120
4. Discussion.....	123
5. Conclusions.....	128
6. Acknowledgements.....	129
7. Appendix A. Supplementary data .....	129
8. References.....	130
ARTÍCULO 3 .....	137
1. Introduction.....	139
2. Materials and Methods.....	142
2.1 Microorganisms .....	142
2.1.1 Phytopathogenic agent .....	142
2.1.2 Collection of cyanobacteria and microalgae and getting extracts.....	142
2.2 <i>In vitro</i> bioassays .....	143
2.2.1 Antibacterial activity against <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	143
2.2.2 Determination of salicylic acid (SA) and cytokinins (CKs) in sonicated extracts .....	144
2.2.3 Effect of sonicated extracts on germination of watercress seeds .....	144
2.3 <i>In planta</i> bioassays: Treatment of tomato seedlings with sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae.....	145
2.3.1 Protective effect of the cyanobacteria and microalgae extracts by foliar and vascular application towards <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> on tomato seedlings.....	145
2.3.2 Protocol for inoculation of tomato seedlings with <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> and monitoring of infection status.....	146
2.3.3 Evaluation of foliar and root application of cyanobacterial and microalgae extracts on tomato seedlings .....	147
2.4 Statistical analyses .....	147
3. Results.....	148
3.1 <i>In vitro</i> bioassays .....	148
3.1.1 Antibacterial activity against <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	148

3.1.2 Determination of salicylic acid (SA) and cytokinins (CKs) in sonicated extracts .....	148
3.1.3 Effect of sonicated extracts on germination of watercress seeds .....	150
3.1.4 Clustering and correlation analyses .....	151
3.2 <i>In planta</i> bioassays: Treatment of tomato seedlings with sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae .....	153
3.2.1 Protective effect of the cyanobacteria and microalgae extracts by foliar and root application towards <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> on tomato seedlings.....	153
3.2.2 Evaluation of foliar and root application of cyanobacterial and microalgae extracts on tomato seedlings .....	154
4. Discussion.....	156
4.1 <i>In vitro</i> bioassays .....	156
4.2 <i>In planta</i> bioassays.....	160
5. Conclusions.....	161
6. Acknowledgements.....	162
7. References.....	162
ARTÍCULO 4 .....	171
1. Introduction.....	176
2. Material and methods.....	178
2.1 Strain collection: heterotrophic rhizobacteria and cyanobacteria .....	178
2.2 Establishment of consortia .....	178
2.2.1 Preinoculum preparation and quantification .....	178
2.2.2 Experimental block design: establishment of consortia between cyanobacteria and heterotrophic rhizobacteria.....	179
2.2.3 <i>In vitro</i> follow-up of consortia .....	179
2.3 <i>In planta</i> growth promotion .....	180
2.3.1. Preparation of plant material and microbial inoculum.....	180
2.3.2 Inoculation and effects of the consortium <i>in planta</i> .....	180
2.4 Statistical analyses .....	181
3. Results and discussion .....	181
3.1 <i>In vitro</i> establishment of consortia.....	181
3.1.1 <i>In vitro</i> monitoring of heterotrophic bacteria after establishment of consortia .....	181
3.1.2 <i>In vitro</i> monitoring of cyanobacteria after establishment of consortia .....	185
3.2 <i>In planta</i> growth promotion .....	189
3.2.1 Evaluation of the application of the different experimental blocks containing <i>P. cypripedii</i> on tomato seedlings.....	189

3.2.2 Evaluation of the application of the different experimental blocks containing <i>P. putida</i> on tomato seedlings .....	189
3.2.3 Statistical analyses of the results derived from <i>in vivo</i> bioassays .....	192
4. Conclusion .....	195
5. Acknowledgements.....	196
6. Appendix A. Supplementary data .....	196
7. References.....	198
V. Discusión.....	203
V.1. Efecto biofertilizante y bioestimulante derivado de la aplicación de cianobacterias en estados tempranos del desarrollo vegetal .....	204
V.2. Efecto fitoprotector derivado de la aplicación de cianobacterias en estados tempranos del desarrollo vegetal.....	209
VI. Conclusiones.....	223

# INDICADORES DE CALIDAD

## INDICADORES DE CALIDAD

Esta Tesis Doctoral se compone de 4 artículos, 3 que han sido publicados en revistas científicas con un elevado índice de impacto, y un cuarto pendiente de publicación:

**ARTÍCULO 1: Toribio, A.J.**, Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J. (2020). Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. *Biotechnology Reports*, 26, e00449.

### Calidad de la revista

Índice de impacto (Scimago Journal Rank, SJR, 2020): **0.932**

Categoría SJR	Cuartil en su categoría
<b>Biotechnology</b>	<b>Q1</b>
<b>Applied Microbiology and Biotechnology</b>	<b>Q1</b>

**ARTÍCULO 2: Toribio, A.J.**, Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J. (2021). Seed *biopriming* with cyanobacterial extracts as an eco-friendly strategy to control damping off caused by *Pythium ultimum* in seedbeds. *Microbiological Research*, 248, 126766.

### Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports, 2021): **5.415**

Categoría JCR	Cuartil en su categoría
<b>Microbiology</b>	<b>Q1</b>
<b>Environmental Sciences</b>	<b>n/a.</b>

**ARTÍCULO 3: Toribio, A.J.**, Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Martínez-Gallardo, López, M.J. (2021). Application of sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae for the mitigation of bacterial canker in tomato seedlings. *Journal of Applied Phycology*, <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02599-6>.

Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports, 2021):  
**3.215**

Categoría JCR	Cuartil en su categoría
<b>Biotechnology &amp; Applied Microbiology</b>	<b>Q1</b>
<b>Marine &amp; Freshwater Biology</b>	<b>Q1</b>

**ARTÍCULO 4: Toribio, A.J.**, Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., López-González, J.A., Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J. (2021). Design and validation of cyanobacteria-rhizobacteria consortia for tomato seedlings growth promotion. *Journal of Biotechnology* (enviado).



**RESUMEN**

## RESUMEN

En las últimas décadas, el uso indiscriminado de agroquímicos, sobre todo en el ámbito de la agricultura intensiva, ha provocado graves daños a nivel edáfico, ambiental y sanitario. Entre los efectos negativos más destacables se encuentran la pérdida de materia orgánica, el exceso de fertilización nitrogenada, la “esterilización” de los suelos desde un punto de vista microbiano, o la toxicidad derivada de la aplicación abusiva de plaguicidas químicos. Surge así la urgente necesidad de sustituir, en la medida de lo posible, la enorme cantidad de productos de fertilizantes, estimulantes y plaguicidas sintéticos, por otro mercado de productos de origen microbiano, más saludables y en consonancia con el concepto actual de agricultura sostenible.

Una de las alternativas que, hasta la fecha, ha tenido mejor aceptación en el mercado de los biofertilizantes, bioestimulantes y bioplaguicidas, ha sido el uso de rizobacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal. Sin embargo, recientemente, el grupo de las cianobacterias ha alcanzado una gran relevancia en este campo, no ya sólo su papel en la promoción y regulación del crecimiento vegetal, sino también por su capacidad para producir sustancias de carácter antimicrobiano.

En consonancia con lo indicado anteriormente, el objetivo general de este trabajo de Tesis fue la caracterización de una colección de cianobacterias procedentes de hábitats acuáticos y terrestres, en relación a su capacidad para actuar como agentes promotores del crecimiento y fitoprotectores, durante las fases tempranas del desarrollo vegetal. Para ello, se estableció un protocolo *in vitro* que consistió en la obtención, en primer lugar, de extractos sonicados a partir de las cepas de la colección. Se determinó, por un lado, el carácter fitotóxico/fitoestimulante de dichos extractos en semillas de berro, así como también la presencia de sustancias bioactivas (fitohormonas, sideróforos, enzimas de tipo fosfatasa), y la capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos mediante la técnica de cultivo dual *in vitro*. Una vez seleccionados los extractos más idóneos, se llevó a cabo la aplicación de los mismos en fases tempranas del desarrollo vegetal (semilla y plántula), mediante protocolos que abarcaron el tratamiento foliar, radicular o mediante *biopriming* en semillas. De este modo, se pudo evaluar el efecto fitoestimulante de los extractos en fases de pre y postemergencia, así como también

la capacidad de los mismos para prevenir o mitigar los daños provocados por la bacteria fitopatogena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, (cancro bacteriano), así como por el oomiceto *Pythium ultimum* (*damping-off*).

Finalmente, con objeto de mejorar la capacidad promotora de algunas de las cianobacterias más efectivas, se diseñaron consorcios que incluían, además del agente fototrofo, la presencia de una de las dos rizobacterias heterótrofas aportadas por el Grupo de Investigación BIO-175 de la Universidad de Almería (*Pseudomonas putida*-BIO-175 y *Pantoea cyripedii*-BIO-175). De este modo, aquellos consorcios que se establecieron de forma exitosa, fueron aplicados *in planta* con objeto de evaluar su capacidad fitoestimulante, así como las posibles sinergias entre los miembros de un mismo consorcio.

Cabe destacar, entre los resultados obtenidos, la enorme influencia de la concentración de los extractos sonicados de cianobacterias en la fase de germinación de semillas. Así, pudo observarse un efecto fitotóxico generalizado cuando se aplicaron extractos concentrados en torno a 2 g L<sup>-1</sup>, mientras que concentraciones más bajas, en torno a 0,5 g L<sup>-1</sup>, resultaron incluso fitoestimulantes. Pudo confirmarse, además, a partir de la colección de extractos, la presencia de sustancias bioactivas tales como ácido salicílico, citoquininas, sideróforos o incluso actividad tipo fosfatasa, lo cual pudo estar relacionado con los valores de germinación y estimulación radicular cuantificados en semillas de berro, así como con los valores de fitoestimulación posteriormente detectados en plántulas de pepino.

Por otro lado, el uso de la estrategia de *biopriming* en semillas de pepino a partir de extractos derivados de cianobacterias, fue exitoso como tratamiento preventivo del *damping-off* causado por *P. ultimum*. Así, la cepa SAB-M465 (*Tolypothrix* sp.) se ha posicionado como un excelente agente de control contra el *damping-off* causado por *P. ultimum* en semillas previamente tratadas con el protocolo de *biopriming*. En paralelo al efecto amortiguador de la enfermedad, esta cepa mostró un discreto efecto estimulante a nivel radicular.

En relación al control del cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, la aplicación de extractos de cianobacterias y microalgas se ha posicionado como una estrategia preventiva de gran potencial agronómico. El efecto biopesticida demostrado por parte de las cepas *Leptolyngbya*-1267 y *Scenedesmus*-677 podría estar estrechamente relacionado con

su capacidad para promover el crecimiento aéreo vegetal, así como el desarrollo de las raíces en plántulas de tomate. Sin embargo, los efectos observados fueron muy variables en función del protocolo de aplicación seleccionado. De este modo, la aplicación radicular de *Scenedesmus-677* pudo estar más dirigida al control directo de la enfermedad, mientras que la aplicación foliar y radicular de *Leptolyngbya-1267* se relacionó más con un efecto fitoestimulante y, por tanto, con una posible mejora de las respuestas de defensa.

Finalmente, aunque de forma preliminar, se pudo detectar un efecto sinérgico en algunos de los consorcios establecidos entre cianobacterias y rizobacterias heterótrofas. Sin embargo, el éxito de la asociación se vio influenciado notablemente por el medio de cultivo utilizado, el tiempo de incubación y los propios componentes del consorcio. Los resultados derivados de esta última fase del trabajo, mostraron que el recuento de las cianobacterias SAB-B866 (*Dolichospermum* sp.) y SJ2 (no identificada) aumentó en presencia de ambas rizobacterias, *Pseudomonas putida*-BIO-175 y *Pantoea cypripeddi*-BIO-175. En cuanto al tratamiento *in vivo*, los consorcios establecidos entre la cianobacteria SAB-B866 y ambas rizobacterias heterótrofas, revelaron resultados muy satisfactorios en comparación con los obtenidos tras el tratamiento con la cepa SAB-B866 de forma independiente.

Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, corroboran el importante papel de las cianobacterias como agentes promotores del crecimiento vegetal, capaces de estimular el crecimiento vegetal en fases de pre y postemergencia, así como también de prevenir o mitigar los efectos provocados por patógenos de plantas de gran incidencia en el sureste peninsular. El éxito de la aplicación de este tipo de bioproductos, fue muy dependiente del factor cepa, así como también del protocolo de aplicación seleccionado, del cultivo hospedador y del agente patógeno diana. Así mismo, aunque el diseño de consorcios a base cianobacterias y otros microorganismos rizosféricos podría suponer un importante avance en el sector de los biofertilizantes, hay que considerar que la detección de posibles sinergias puede variar en función de la mayor o menor compatibilidad entre los miembros del consorcio y que, además, un comportamiento sinérgico *in vitro* no implica necesariamente un efecto beneficioso *in planta*.

**ABSTRACT**

**ABSTRACT**

In recent decades, the indiscriminate use of agrochemicals, especially in intensive agriculture, has caused serious damage to the soil, the environment and health. Among the most notable negative effects are the loss of organic matter, excess nitrogen fertilization, the "sterilization" of soils from the microbial point of view, or the toxicity derived from the abusive application of chemical pesticides. Therefore, it is urgent to replace, as far as possible, the enormous amount of synthetic fertilizers, stimulants and pesticides with another market of microbial products, healthier and more in line with the current concept of sustainable agriculture.

To date, one of the alternatives that has had the greatest acceptance in the market of biofertilizers, biostimulants and biopesticides, has been the use of rhizobacteria and fungi that promote plant growth. However, recently, the group of cyanobacteria has achieved great relevance in this field, not only for its role in the promotion and regulation of plant growth, but also for its ability to produce substances of antimicrobial character.

In line with the above, the general objective of this Thesis work was the characterization of a collection of cyanobacteria from aquatic and terrestrial habitats, in relation to their capacity to act as growth promoting and phytoprotective agents during the early stages of plant development. For this purpose, an *in vitro* protocol was established, which consisted of obtaining, first, sonicated extracts of the strains in the collection. After, the phytotoxic/phytostimulant character of these extracts on cress seeds was determined, as well as the presence of bioactive substances (phytohormones, siderophores, phosphatase-type enzymes). In parallel, the capacity to inhibit the growth of phytopathogenic agents by means of the *in vitro* dual culture technique was also investigated. Once the most suitable extracts were selected, they were applied in early stages of plant development (seed and seedling), through protocols that included foliar, root or seed *biopriming* treatment. In this way, it was possible to evaluate the phytostimulant effect of the extracts in pre- and post-emergence phases, as well as their capacity to prevent or mitigate damage caused by the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacterial canker), as well as by the oomycete *Pythium ultimum* (*damping-off*).

Finally, in order to improve the promoting capacity of some of the most effective cyanobacteria, consortia were designed that included, in addition to the phototrophic agent, the presence of one of the two heterotrophic rhizobacteria provided by the BIO-175 Research Group of the University of Almería (*Pseudomonas putida*-BIO-175 and *Pantoea cyripedii*-BIO-175). Thus, the consortia that were successfully established were applied in plants to evaluate their phytostimulant capacity, as well as the possible synergies between the members of the same consortium.

Among the results obtained, the enormous influence of the concentration of the sonicated extracts of cyanobacteria on the germination index stands out. Thus, a generalized phytotoxic effect was observed when concentrated extracts around 2 g L<sup>-1</sup> were applied, while lower concentrations, around 0.5 g L<sup>-1</sup>, were even phytostimulant. The presence of bioactive substances such as salicylic acid, cytokinins, siderophores or even phosphatase-type activity, could also be confirmed from the collection of extracts, which could be related to the germination and root stimulation values quantified in watercress seeds, as well as to the phytostimulation values subsequently detected in cucumber seedlings.

On the other hand, the use of the *biopriming* strategy in cucumber seeds from extracts derived from cyanobacteria was successful as a preventive treatment of *damping-off* caused by *P. ultimum*. Thus, strain SAB-M465 (*Tolypothrix* sp.) has been positioned as an excellent control agent against *damping-off* caused by *P. ultimum* on seeds previously treated with the *biopriming* protocol. In parallel to the suppressive effect of the disease, this strain showed a discrete stimulating effect at the root level.

In relation to the control of bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the application of extracts of cyanobacteria and microalgae has been positioned as a preventive strategy with great agronomic potential. The biopesticidal effect demonstrated by the strains *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677 could be closely related to their ability to promote aerial plant growth as well as root development in tomato seedlings. However, the observed effects were highly variable depending on the selected application protocol. Thus, the root application of *Scenedesmus*-677 could be more directed to direct disease control, whereas the foliar and root application of *Leptolyngbya*-1267 was more

related to a phytostimulant effect and, therefore, to a possible potentiation of defense responses.

Finally, although preliminary, a synergistic effect could be detected in some of the consortia established between cyanobacteria and heterotrophic rhizobacteria. However, the success of the association was significantly influenced by the culture medium used, the incubation time and the consortium components themselves. The results derived from this last phase of the work showed that the counts of the cyanobacteria SAB-B866 (*Dolichospermum* sp.) and SJ2 (unidentified) increased in the presence of both rhizobacteria, *Pseudomonas putida*-BIO-175 and *Pantoea cyripedii*-BIO-175. As for the *in vivo* treatment, the consortia established between the cyanobacterium SAB-B866 and both heterotrophic rhizobacteria revealed very satisfactory results compared to those obtained after treatment with the SAB-B866 strain independently.

Therefore, the results obtained in this work corroborate the important role of cyanobacteria as plant growth promoting agents, capable of stimulating plant growth in the pre- and post-emergence phases, as well as preventing or mitigating the effects caused by plant pathogens of high incidence in the southeastern peninsular. The success of the application of this type of bioproducts was highly dependent on the strain factor, as well as on the selected application protocol, the host crop and the target pathogen. Likewise, although the design of consortia based on cyanobacteria and other rhizospheric microorganisms could represent an important advance in the biofertilizer sector, it should be considered that the detection of possible synergies may vary depending on the greater or lesser compatibility between the members of the consortium. In addition, a synergistic behavior *in vitro* would not necessarily imply a beneficial effect on the plant.



# INTRODUCCIÓN

## **I. Introducción**

### **I.1. Impacto de la Agricultura Intensiva**

El concepto de agricultura intensiva implica una elevada actividad agrícola con el fin de obtener un mayor rendimiento de la superficie cultivada, en el menor periodo de tiempo posible, y así maximizar beneficios y garantizar la sostenibilidad a largo plazo en el suministro de alimentos (Aznar-Sánchez et al., 2020). En las últimas décadas, la provincia de Almería se ha convertido en un paradigma de este tipo de sistema agrícola de alto rendimiento, siendo actualmente un modelo de innovación industrial y tecnológica tanto a nivel nacional como internacional. La principal ventaja de la agricultura intensiva es que satisface plenamente la demanda del mercado, incluso en zonas densamente habitadas. En general, los agricultores controlan cada vez de forma más exitosa y concienzuda la generación de residuos orgánicos e inorgánicos procedentes de la agricultura intensiva. A modo de ejemplo, cabe destacar la importante gestión de restos vegetales que se lleva a cabo por parte del agricultor, el empleo de materiales biodegradables y compostables, que reducen la cantidad de residuos plásticos generados o la sustitución de abonos minerales por abonos orgánicos (Aznar-Sánchez et al., 2020). Sin embargo, a pesar de la eficacia demostrada, las prácticas agrícolas intensivas no están exentas de limitaciones. El uso regular de plaguicidas y herbicidas en la agricultura intensiva hace que, en la actualidad, esta actividad represente una de las causas más importantes de contaminación ambiental (Savci, 2012), y puede provocar además la aparición de resistencias por parte de determinadas plagas y agentes fitopatógenos.

En la Figura 1 se muestran algunas lesiones en plantas de cultivos hortofrutícolas más relevantes del sureste español, causadas por diversos agentes fitopatógenos, en concreto bacterias y hongos, que afectan a raíz, tallos, hojas y frutos.

### Lesiones Bacterias fitopatógenas en cultivos hortícolas almerienses



*Clavibacter michiganensis*  
subsp. *michiganensis*  
<http://www.state.mn.us>



*Xanthomonas campestris*  
<http://www.alamys.es>



*Pectobacterium carotovorum*  
subsp. *carotovorum*  
<http://www.hortomallas.com>



*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*  
<http://www.hortomallas.com>

### Lesiones Hongos fitopatógenos en cultivos hortícolas almerienses



*Phytophthora capsici*  
<http://www.agenciadenoticias.unal.edu.co>



*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*  
<http://www.pnwhandbooks.org>



*Rhizoctonia solani*  
<http://www.ipmimages.org>



*Pythium ultimum*  
<http://www.koppert.mx>

**Figura 1.** Ejemplos de lesiones en plantas de diferentes cultivos hortícolas provocadas por bacterias y hongos fitopatógenos.

En concreto, los plaguicidas químicos afectan negativamente a la diversidad microbiana del suelo. Además, el lixiviado de estos plaguicidas químicos a través del suelo, y dirigido hacia grandes masas de agua subterráneas es otro factor negativo derivado del uso excesivo de este tipo de productos, ya puede representar un alto nivel de toxicidad para los organismos acuáticos.

Por otro lado, la explotación intensiva del suelo acaba provocando el agotamiento y la erosión de las tierras de cultivo (Figura 2), derivando en la pérdida de materia orgánica, y en la necesidad de utilizar grandes cantidades de fertilizantes químicos, que a medio-largo plazo pueden causar graves daños ecológicos y ambientales (Tyagi et al., 2019).



**Figura 2.** Problemas derivados de la explotación intensiva de los suelos agrícolas. (<https://www.greenteach.es/suelos-y-degradacion-del-suelo-causas-y-consecuencias/>)

### **I.1.1. Consecuencias de la utilización inadecuada de fertilizantes químicos**

La nutrición de la planta es uno de los factores más importantes a la hora de controlar la productividad y la calidad de los suelos de cultivo. Los niveles de nutrientes en los suelos afectan a la calidad y al rendimiento de los mismos. Para ello debe existir un equilibrio entre macronutrientes, micronutrientes y microbiota del suelo, ya que bacterias y hongos influyen en la fertilidad del suelo y actúan como consumidores de CO<sub>2</sub>. Desafortunadamente, el suelo, debido al efecto de la agricultura intensiva, se empobrece respecto al contenido en nutrientes y como resultado, se convierte en ineficiente (Savci, 2012). Por lo tanto, los productores, necesitan incrementar el carácter fértil del suelo, considerándose ésta una actividad agrícola prioritaria para restablecer los nutrientes y combatir las plagas y enfermedades, entre otras funciones.

La fertilización va más allá del simple hecho de aportar nitrógeno, fósforo y potasio al suelo, en las dosis y concentraciones recomendadas por cultivo y superficie.

Es más que evidente que en las últimas décadas se están incrementando las prácticas agrícolas no sostenibles, ya que los cultivos dependen de aportes químicos cada vez mayores y de una mayor frecuencia en su aplicación (Figura 3). De hecho, es habitual encontrar niveles anormalmente altos de nutrientes que pueden saturar el suelo y anular la eficacia de otros elementos vitales. Esto, provoca la contaminación de los recursos naturales, y numerosos perjuicios entre los que destacan el aumento de la salinidad del suelo, la acumulación de metales pesados, la eutrofización del agua y la acumulación de nitratos.



**Figura 3.** Utilización de fertilizantes químicos en una plantación agrícola. (<https://www.bioecoactual.com>)

Otra consideración a tener en cuenta es que, al no realizarse un uso selectivo de los plaguicidas, también pueden verse afectadas especies beneficiosas, como polinizadores y microorganismos que habitan en el suelo y que contribuyen a su fertilidad.

En definitiva, se necesitan otras estrategias que incluyan compuestos o fórmulas distintas de los fertilizantes químicos convencionales para aumentar el rendimiento de los cultivos sin comprometer el medio ambiente y la salud de los consumidores.

### **I.1.2. Problemas derivados del control de organismos fitopatógenos en agricultura intensiva**

La infección de los cultivos por patógenos puede ocasionar graves problemas que van desde una disminución del rendimiento, hasta importantes pérdidas económicas (Evers et al., 2007). Los principales fitopatógenos que causan pérdidas significativas en el rendimiento de los cultivos agrícolas, incluyen hongos (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*), oomicetos (*Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*), bacterias (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xantomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*), virus y nemátodos. Como mecanismos de adaptación, dispersión y supervivencia, adoptan diferentes estrategias entre ellas la producción de esporas de mayor o menor grado de resistencia, la secreción de enzimas u otras sustancias químicas quelantes (sideróforos) o de naturaleza antibiótica, así como la tolerancia a condiciones de limitación de nutrientes. Los dos principales mecanismos de defensa de las plantas contra los patógenos son la resistencia (la capacidad del hospedador para limitar la multiplicación del patógeno) y la tolerancia (la capacidad del hospedador para reducir el efecto de la infección sobre su aptitud, independientemente del nivel de multiplicación del patógeno) (Pagán y García-Arenal, 2018). Por todo ello, si las plantas evolucionan hacia la resistencia, se reduciría la prevalencia del patógeno en la población huésped, mientras que, si las plantas evolucionan hacia la tolerancia, la prevalencia aumentaría (Roy y Kirchner, 2000). Por lo tanto, ambas estrategias pueden tener un impacto significativo, aunque diferente, en la dinámica de las poblaciones de plantas y fitopatógenos.

Las plantas se defienden con una amplia variedad de mecanismos físicos y químicos contra los patógenos. Los mecanismos constitutivos, como las cutículas, se complementan con los mecanismos de resistencia inducible, desencadenados por estímulos reconocidos por receptores específicos de reconocimiento (Köhl et al., 2019). Por otro lado, la resistencia genética de las plantas se considera una alternativa clave y prometedora para controlar las enfermedades y plagas de los cultivos. Sin embargo, los patógenos se adaptan con frecuencia a la resistencia genética y la superan, especialmente cuando está determinada por genes principales (Pilet-Nayel et al., 2017).

La información temprana sobre la salud de los cultivos y la detección de enfermedades puede facilitar el control de las mismas mediante estrategias de gestión adecuadas. Entre los métodos tradicionales, la rotación de cultivos es una de las prácticas más usuales, que consiste en cultivar diferentes tipos de cosechas en la misma tierra de cultivo de forma secuencial, para mantener la fertilidad del suelo y evitar requerir el mismo conjunto de nutrientes. También contribuye a reducir la erosión del suelo y a aumentar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, el monocultivo de especies de alto rendimiento, como el arroz, la soja, el maíz o diversos cultivos hortícolas, provoca una elevada incidencia de plagas y enfermedades, así como el agotamiento del suelo. Por tanto, la reducción de la diversidad de los cultivos, supone el desarrollo de resistencias por parte de los agentes patógenos, lo que se traduce en el uso urgente y abusivo de plaguicidas químicos, muy perjudiciales para el ser humano y el medio ambiente.

Los suelos por otro lado, albergan ciertas comunidades microbianas que podrían participar en la defensa de las plantas. Se han descrito seis líneas generales de defensa que son: la inmunidad de la planta, y la microbiota endofítica, filosférica, radicular, rizosférica y edáfica (Enebe y Babalola, 2021). Estas líneas de defensa se caracterizan por suprimir la acción de los fitopatógenos mediante la colonización activa de las superficies de las raíces y de la filosfera, la competencia por los nutrientes, el parasitismo y la depredación de los patógenos invasores y otros mecanismos que implican *quorum quenching*.

## **I.2. Microorganismos y Agricultura Sostenible**

Hoy en día, numerosos factores amenazan la capacidad de las actuales prácticas agrícolas para satisfacer las necesidades alimentarias de la población mundial. Entre ellos destaca la escasez de recursos, el cambio climático, la pérdida de biodiversidad, la erosión, la salinización, así como la contaminación del suelo y de los recursos hídricos. Ante este reto, el concepto de agricultura sostenible ha cobrado gran importancia (Velten et al., 2015). Por sostenible se entiende que su impacto en el medio ambiente sea mínimo, por lo tanto, se recomienda un uso sensato y a menudo, limitado de fertilizantes minerales y protectores químicos de los cultivos, teniendo en cuenta las necesidades de los agricultores. A su vez, debe

darse la misma importancia al mantenimiento a largo plazo de los recursos naturales y humanos, dirigiéndonos hacia un sistema de producción y consumo de alimentos sostenible, lo que implica la consideración de una importante responsabilidad social (Sarker, 2017).

### **I.2.1. Control Biológico frente a Control Químico**

Si bien es cierto que los avances tecnológicos y científicos de los últimos 50 años, han provocado un increíble aumento en el rendimiento de los cultivos agrícolas (Lassaletta et al., 2016; Pretty, 2018), no hay que olvidar que la aplicación continuada y abusiva de agroquímicos (fertilizantes, plaguicidas, herbicidas e insecticidas de síntesis química) puede derivar en graves perjuicios medio ambientales, así como sobre la salud (Mahanty et al., 2017; Sponsler et al., 2019; Dar et al., 2021). Por tanto, dada la importancia de trabajar con sistemas agrícolas sostenibles, actualmente se está priorizando y promoviendo el uso de productos más acordes con una agricultura ecológica, o también denominada, orgánica.

En este sentido, se conoce que la aplicación de fertilizantes orgánicos afecta de forma notable a la biodiversidad del suelo. Así, Xiong et al. (2017) pusieron de manifiesto que la aplicación de fertilizantes orgánicos reducía la aparición de enfermedades del suelo y remodelaba la estructura y función de la comunidad bacteriana del suelo. Además, durante los últimos años, el uso de bioinoculantes microbianos como alternativa al control químico en diversos sistemas agrícolas ha supuesto un gran avance en el sector, a pesar de que sus efectos beneficiosos son difíciles de reproducir, dada su vulnerabilidad a diversos tipos de estrés ambiental (sequía, salinidad y temperaturas extremas).

Microorganismo promotor del crecimiento de las plantas (PGPM), es un término que se aplica a todos los microorganismos, ya sean bacterias, actinomicetos, hongos o algas, que tienen un efecto beneficioso sobre el crecimiento vegetal mediante la acción de mecanismos diversos que mejoran la fertilización, fitoestimulación o la supresión de enfermedades. Los PGPMs desempeñan un papel importante en agricultura sostenible, ya que aumentan la producción de diversos cultivos, mejoran la fertilidad del suelo y promueven la diversidad y la interacción con otros microorganismos beneficiosos, inhibiendo a su vez el crecimiento y la acción de



potenciales patógenos, y en general, manteniendo la sostenibilidad de los sistemas (Santoyo et al., 2021). En el apartado 1.3., se detallará el papel de este importante grupo microbiano como alternativa a la utilización de agroquímicos.

### **I.2.2. Interacciones planta-microorganismo: rizosfera y filosfera**

Las plantas, al ser organismos sésiles, no pueden escapar a las condiciones adversas de su entorno. Las interacciones entre las plantas y los microorganismos pueden producirse tanto en la parte aérea de las plantas como en la rizosfera (Hartmann et al., 2008). La última década ha sido testigo de grandes avances en la investigación de las interacciones planta-microorganismo. Se han realizado numerosos esfuerzos por catalogar la presencia de comunidades microbianas en función de las especies de plantas, y se han desarrollado herramientas biotecnológicas y modelos innovadores para comprender el impacto de la microbiota sobre las funciones del huésped (Gong y Xin, 2021). Los microorganismos se consideran indicadores de calidad del suelo debido a su rápida respuesta y sensibilidad a los cambios ambientales (Xu et al., 2017).

La rizosfera comprende la capa de la superficie del suelo que rodea a las raíces y es considerada la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos del suelo. Es un lugar competitivo y un ecosistema dinámico, rico en nutrientes, lo que favorece el aumento de la población de microorganismos presentes en ella, tanto de especies microbianas patógenas, como de aquellas otras beneficiosas que actúan como promotores del crecimiento de las plantas. La gran diversidad de microorganismos que se asientan en la rizosfera (microbiota de la raíz) se ve influenciada por las condiciones ambientales, las características del suelo, y la genómica de las plantas. Las plantas influyen en las comunidades microbianas de la rizosfera segregando diversos metabolitos a nivel radicular y, a su vez, los microorganismos influyen en el crecimiento y la salud de las plantas (Sugiyama, 2019). Parte de los metabolitos derivados de las plantas en la rizosfera, son rápidamente degradados por los microorganismos del suelo; otros permanecen en el suelo, obedeciendo a una dinámica y distribución espacio-temporal específica (Cesco et al., 2010). Para simular la dinámica de los metabolitos de origen vegetal y microbiano en la rizosfera, es necesario analizar su movimiento, degradación y

adsorción en función de la materia orgánica y mineral del suelo, ya que la estabilidad de los mismos varía con la composición de los suelos (Sugiyama, 2019).

Por otra parte, la microbiota de la filosfera habita en la superficie de las hojas. Depende de los metabolitos emitidos por las plantas para su nutrición y protege a las plantas de la infección de patógenos aéreos (Leveau, 2019). Esta última función podría estar mediada por la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia entre microorganismos o la activación de los mecanismos de defensa de la planta (Vogel et al., 2016; Preininger et al., 2018). Además de la protección contra las enfermedades, la microbiota de la filosfera puede influir en muchos otros aspectos relacionados con la nutrición vegetal (Mattos et al., 2008), con la adaptación a estreses abióticos como sequía, rayos ultravioleta o heladas (Kumar et al., 2016; Arun et al., 2020), y con diversas funciones metabólicas de las plantas (Gargallo-Garriga et al., 2016), en concreto, aquellas relacionadas con la fotosíntesis. Los microorganismos presentes en la filosfera, pueden colonizar la superficie (microbiota epifítica) o el interior del tejido foliar (microbiota endofítica). La microbiota epifítica parece mucho más diversa y abundante en comparación con la microbiota endofítica (Chen et al., 2020), debido posiblemente, al efecto tanto de factores ambientales como del propio huésped. Al estar dentro de la planta, la microbiota endofítica probablemente interaccione de forma más íntimas con las células de la planta y experimente un microambiente sorprendentemente diferente, en comparación con la microbiota epifítica. No obstante, el origen de la microbiota endofítica de la filosfera, probablemente sea epifítico, produciéndose la entrada a través de los estomas o de lesiones, o incluso rizosférico, de forma que se produzca la entrada a nivel de las raíces y la migración a las hojas a través del tejido vascular (Chi et al., 2005).

Diversos estudios sugieren que la microbiota de las hojas y de las raíces vegetales puede proceder de una fuente similar, es decir, del suelo. O bien, que las dos comunidades pueden interactuar entre sí en entornos naturales (por ejemplo, a través del viento, salpicaduras de lluvia o el movimiento de los insectos) (Vogel et al., 2016; Tkacz et al., 2020; Liu et al., 2020). Muchos factores ambientales y ecológicos, como luz solar, la irradiación ultravioleta y las precipitaciones, la infección por insectos o patógenos, el uso de fertilizantes y el tipo de suelo, influyen en gran medida en la composición de la microbiota foliar y rizosférica (Vogel et al.,

2016; Tkacz et al., 2020; Liu et al., 2020). Estudios recientes han comparado la riqueza y diversidad bacteriana de los diferentes hábitats. En general, la menor riqueza y diversidad se localizó en la filosfera en comparación con lo observado en el suelo. En la filosfera, los microorganismos están directamente expuestos a una alta radiación UV, a gradientes de temperatura más altos y a sustancias antimicrobianas (plaguicidas) (Bulgarelli et al., 2013), lo que podría justificar la menor biodiversidad del entorno de la filosfera. Por otro lado, en la rizosfera, los exudados radicales y los compuestos volátiles producidos por las raíces de las plantas ejercen un poder selectivo sobre las distintas comunidades microbianas rizosféricas (Backer et al., 2018). Según los resultados obtenidos por Dong et al. (2019), las diferencias metabólicas a nivel de los diferentes tejidos vegetales podrían también dar forma a la composición de la microbiota endófitas en las distintas partes de la planta, aunque ciertamente, son necesarias más pruebas experimentales.

### **I.3. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPMs): rizobacterias, hongos y micorrizas**

En numerosas revisiones, se ha descrito el papel de las interacciones suelo-planta-microorganismo en la resolución de problemas derivados de la agricultura intensiva. De hecho, muchos de los microorganismos asociados a las plantas estimulan su crecimiento y mejoran su resistencia a las tensiones bióticas (enfermedades y plagas) y abióticas (salinidad, sequía, contaminación, etc.). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) se asocian a las raíces de las plantas, y tienen la capacidad de promover y estimular el crecimiento de éstas mediante diversos mecanismos (Rehman et al., 2020). Algunas de las más importantes pertenecen a los géneros *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Annapurna et al., 2013), así como algunos géneros de cianobacterias de especial relevancia como es el caso de *Nostoc*, *Phormidium*, *Scytonema* y *Anabaena* (Rai et al., 2019). Por un lado, las rizobacterias favorecen el crecimiento de la planta mediante la fijación de nitrógeno o bien mediante mecanismos directos que facilitan la absorción de nutrientes o aumentan la disponibilidad de los mismos. Todo ello sumado a la mineralización de compuestos orgánicos, la solubilización de nutrientes minerales y la producción

de fitohormonas, ayudan a regular el crecimiento de las plantas en diversas condiciones ambientales (Bhattacharyya y Jha, 2012). Por otro lado, las rizobacterias son una comunidad muy diversa y sus efectos pueden producirse a través de la acción antagonista local contra los patógenos del suelo o a través de la inducción de la resistencia sistémica (ISR) por parte de la propia planta (Barriuso et al., 2008). Esto lo consiguen mediante la producción de sideróforos, antibióticos y enzimas líticas, así como mediante la competencia por los nutrientes y la regulación de las condiciones de estrés. Las rizobacterias antagonistas, por tanto, tienen la capacidad de controlar el patógeno y también de promover indirectamente el crecimiento de las plantas. Por todo ello, gracias a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal es posible reducir la aplicación de fertilizantes químicos, lo que resulta beneficioso desde el punto de vista económico y medioambiental (Babalola, 2010).

Por otra parte, las micorrizas surgen de la relación beneficiosa entre las raíces de las plantas superiores y un grupo heterogéneo de hongos, que colonizan esas raíces de forma superficial (ectomicorrizas) o internamente (endomycorizas). Las plantas, al ser organismos sésiles, se benefician de la captación diaria de minerales y agua por parte de los hongos micorrícicos, y por su parte la planta proporciona el alimento fotosintetizado al hongo asociado. Por lo tanto, las micorrizas desempeñan un papel único y muy importante en el ciclo de los nutrientes del suelo, que se une a la capacidad de transformar los contaminantes en minerales útiles, lo que también es importante para la salud medioambiental (Jansa et al. 2013).

Atendiendo a los mecanismos de colonización de los hongos micorrícicos, las micorrizas se pueden clasificar en dos tipos: ectomicorrizas y endomicorrizas. La ectomicorriza se encuentra generalmente en asociación con plantas leñosas, mientras que la endomicorriza puede desarrollarse en una amplia categoría de especies vegetales, incluidos cultivos hortícolas. Ambos tipos proporcionan a la planta huésped protección frente a patógenos vegetales, además de estimular el crecimiento de la planta y acelerar el desarrollo de las raíces.

De igual modo, otros hongos beneficiosos del suelo de carácter asimbióticos (no micorrícicos) influyen en el ciclo de los nutrientes, participan en la conversión de la materia orgánica del suelo en formas más simples y disponibles para las plantas,

y moldean la estructura de la población microbiana rizosférica (Hashem et al., 2018). Durante décadas, una extensa literatura ha puesto de manifiesto la importancia de los hongos en la salud del suelo. Los hongos del suelo desempeñan un papel crucial en el mantenimiento principal de la vida terrestre. De hecho, son típicos colonizadores y descomponedores de tejidos vegetales muertos, que forman una red de micelio, compuesta por tubos rígidos y ramificados (hifas), llenos de protoplasma. Así, la población de hongos del suelo, en coordinación con otros macro y microorganismos, descomponen la materia orgánica y mejoran la disponibilidad de los nutrientes para el crecimiento de las plantas.

El papel de los hongos es también especialmente relevante cuando se trata de proteger los cultivos contra los microorganismos patógenos (Frac et al., 2018). Este es el caso de algunos hongos antagonistas pertenecientes a los géneros *Glomus* sp. o *Trichoderma* sp., que suprimen la actividad de algunos patógenos fúngicos (Pascual, 2016; Dawidziuk et al., 2016). Algunos hongos destacan como agentes de control biológico dada su fácil manipulación y conservación *in vitro*, así como su capacidad para secretar y sobreexpresar compuestos endógenos o exógenos no tóxicos y con capacidad biopesticida (Sinno et al., 2020). Además, se conoce que muchos hongos beneficiosos promueven el crecimiento de las plantas y actúan como bioestimulantes o biofertilizantes, por lo que su aplicación en la agricultura también puede reducir el uso de fertilizantes químicos (Guzmán-Guzmán et al., 2019).

Más allá de lo indicado, los recientes avances en el campo de la promoción y protección del crecimiento vegetal subrayan la importancia del papel que desempeñan los microorganismos en los ciclos bioquímicos terrestres, y en el flujo global del carbono (Wagg et al., 2019). La agricultura moderna se enfrenta a nuevos retos, en los que se combinan enfoques moleculares y ecológicos con el fin de lograr un mayor rendimiento de los cultivos, al tiempo que se reducen los impactos ambientales negativos. En esta situación, la promoción del crecimiento de las plantas, y el incremento de la resistencia de las mismas frente a plagas y enfermedades, son estrategias clave para mejorar el rendimiento de los cultivos y la adaptación de los mismos frente a factores de naturaleza biótica y abiótica (Umesha et al., 2018; Yadav et al., 2018).

### **I.3.1. Estrategias microbianas para la promoción del crecimiento vegetal**

Los cálculos actuales estiman que la producción agrícola mundial de alimentos tendría que duplicarse para poder alimentar a una población que crece de forma preocupante (Fitton et al., 2019). Ante esta realidad la idea de reducir la dependencia de agroquímicos (fertilizantes químicos y plaguicidas) parece algo utópica. Para lograr este objetivo, es imprescindible explorar y conocer qué ocurre en las interacciones mutualistas que se dan entre las raíces de las plantas y la microbiota rizosférica. Cuando este potencial se aproveche plenamente en el escenario agrícola, será posible avanzar hacia una agricultura realmente sostenible y segura (Bajic y Sánchez, 2020).

Para ello, las investigaciones se centran en la evaluación de la diversidad genética y bioquímica de los microorganismos rizosféricos, su caracterización en relación a la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfatos, el aporte de nutrientes, la producción de hormonas vegetales y de sustancias capaces de captar hierro (sideróforos). También se avanza en la prospección y selección de los microorganismos más eficientes en experimentos de inoculación en condiciones ambientales controladas de laboratorio, invernadero y campo, al igual que se analizan los costes de producción cuando se utilizan inoculantes microbianos en sustitución de otros compuestos químicos (Pedraza et al., 2010).

#### ***I.3.1.1. Biofertilización***



El desarrollo de una agricultura sostenible depende en parte de la reducción del uso de fertilizantes y plaguicidas químicos inorgánicos convencionales, muy efectivos, pero a la vez, con un enorme impacto negativo sobre la salud y el medioambiente (Alori et al. 2017).

El término biofertilizante (Babalola, 2010) surge de la comprensión de las excelentes interacciones existentes entre la microbiota de la rizosfera y la planta huésped. En un sentido amplio, por biofertilizante se entiende aquella sustancia que contiene microorganismos tales como bacterias, algas verde-azules (cianobacterias), microalgas, hongos micorrízicos o no simbiotes, y que cuando es aplicado al suelo, a una semilla o a una planta, coloniza la rizosfera y promueve el

crecimiento, aumentando el suministro o la disponibilidad de nutrientes para la planta huésped, representando una alternativa beneficiosa a las prácticas de la fertilización química (Vessey, 2003). Los microorganismos utilizados como biofertilizantes para la producción sostenible de alimentos, presentan la capacidad de fijar N, solubilizar K y P u oxidar S, entre otras, de forma que promueven el crecimiento vegetal. Los factores que hay que tener en cuenta a la hora de llevar a cabo formulaciones microbianas con fines de biofertilización, incluyen los siguientes: perfil de crecimiento del microorganismo en condiciones óptimas, formulación del inóculo, el método de aplicación y soporte, y almacenamiento de los productos.

Para que el biofertilizante sea adecuado para fines agrícolas, los aislados microbianos beneficiosos deben incorporarse en formulaciones que prolonguen su vida útil, es decir, el plazo entre la producción y la aplicación en el campo. Las cianobacterias son microorganismos emergentes para el desarrollo agrícola sostenible. El grupo de cianobacterias más utilizado para el desarrollo de biofertilizantes es el de las diazotrofas (fijadoras de nitrógeno), capaces de controlar la deficiencia de nitrógeno en las plantas, mejorar la aireación del suelo y la capacidad de retención de agua, y producir vitamina B12. *Nostoc linkia*, *Anabaena variabilis*, *Aulosira fertilisima*, *Calothrix* sp., *Tolypothrix* sp. y *Scytonema* sp. son algunas de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno más eficaces, normalmente presentes en áreas de cultivo (Singh et al., 2016; Chittora et al., 2020). Así mismo, los extractos e hidrolizados de microalgas han sido también considerados como excelentes biofertilizantes (Zodape, 2001).

En la Figura 4 se muestran los beneficios del empleo de biofertilizantes de origen microbiano (cianobacterias) para fomentar la agricultura sostenible y la mitigación de los problemas causados por el uso de fertilizantes químicos en el campo agrícola. Se sugiere que la aplicación de cianobacterias y su contribución a la sustitución de fertilizantes de origen químico podría ser rentable y respetuosa con el medio ambiente, considerándose el medio más seguro para la restauración de tierras degradadas.

Ventajas del uso de biofertilizante cianobacterial	Inconvenientes del uso de fertilizantes químicos
	
<input type="checkbox"/> Aumentan la diversidad de la microbiota beneficiosa del suelo, las asociaciones planta-microorganismo y la fertilidad del N del suelo	<input type="checkbox"/> Desestabilizan las asociaciones planta-microorganismo e inhiben la fijación simbiótica del N al suprimir la microbiota beneficiosa del suelo
<input type="checkbox"/> Ayudan a suprimir ciertos patógenos y parásitos de las plantas nacidos en el suelo y protegen de las enfermedades	<input type="checkbox"/> Reblandecen los tejidos de las plantas, lo que provoca una mayor susceptibilidad a las enfermedades y a los animales domésticos
<input type="checkbox"/> Colaboran para suprimir ciertos patógenos y parásitos de las plantas nacidos en el suelo y protegen de las enfermedades	<input type="checkbox"/> Colaboran en la pérdida de los nutrientes de los suelos por fijación, lixiviación o emisiones
<input type="checkbox"/> Amplian el contenido de materia orgánica del suelo, mejoran el estado de los nutrientes del suelo y lo amortiguan contra la acidez, la alcalinidad y la salinidad y restauran la fertilidad del suelo	<input type="checkbox"/> Aumentan la descomposición del suelo, lo que conduce a su acidificación o alcalinización, y a la reducción de su fertilidad, todo lo cual causa un daño irreparable al ecosistema en general
<input type="checkbox"/> Intensifican la diversidad metamórfica del suelo y la fuerza del sumidero de CH <sub>4</sub> a largo plazo	<input type="checkbox"/> Suprimen el número de metanótrofos del suelo y el potencial de sumidero de CH <sub>4</sub>

**Figura 4.** Fertilización química o biofertilización. Figura modificada de Singh et al. (2016).

### 1.3.1.2. Bioestimulación

Los bioestimulantes vegetales suscitan interés en la agricultura moderna como herramienta para mejorar el rendimiento de los cultivos, la resistencia al estrés ambiental y la eficiencia en el uso de los nutrientes. Los bioestimulantes abarcan diversos grupos de organismos procariotas y eucariotas, de forma que numerosas especies bacterianas, fúngicas y algales son potenciales candidatos para ser utilizados como bioestimulantes. Entre ellos, microalgas y cianobacterias suscitan un interés creciente por parte de los científicos, empresas privadas y agricultores por su naturaleza versátil y eficacia demostrada. Destacan por su estructura unicelular simple, su alta eficiencia fotosintética, su capacidad de crecimiento heterotrófico, su adaptabilidad a las aguas residuales domésticas e industriales, y a la posibilidad de ser manipuladas desde un punto de vista metabólico para la obtención de valiosos bioproductos (Chiaiese et al., 2018).

Es complicado entender la base biológica de los bioestimulantes debido a los diversos tipos de productos presentes en el mercado, así como a la gran diversidad de procesos industriales utilizados en su preparación. Algunos de estos productos se basan en un concentrado húmico mientras que otros poseen una base realmente biótica. Para algunos autores, la definición de bioestimulante hace referencia a "un



producto formulado de origen biológico que mejora la productividad de las plantas como consecuencia de las propiedades novedosas o emergentes de los constituyentes combinados, y no como única consecuencia de la presencia de nutrientes vegetales esenciales conocidos, reguladores del crecimiento vegetal o compuestos fitoprotectores" (Yakhin et al., 2017). Los bioestimulantes no aportan nutrientes como función principal, a diferencia de los fertilizantes, y no se dirigen al control directo de plagas y patógenos, como es el caso de los plaguicidas. La función de un bioestimulante es proporcionar herramientas a las plantas respecto a la regulación/modificación de los procesos fisiológicos de señalización, metabolismo, captación y transporte, lo que conduce a un mayor crecimiento de las mismas, a una mayor eficiencia en el uso de los nutrientes, a mitigar las limitaciones inducidas por el estrés y a aumentar el rendimiento y calidad de los cultivos (Calvo et al., 2014). La función biológica puede ser modulada positivamente mediante la aplicación de moléculas, o mezclas de moléculas, para las que no se ha definido un modo de acción explícito. La mayoría de los bioestimulantes que se utilizan hoy en día, son mezclas complejas de sustancias químicas derivadas de un proceso biológico, o de la extracción de materiales biológicos. A menudo se considera que la complejidad de estas mezclas es esencial para el rendimiento del bioestimulante, y que los bioestimulantes pueden tener propiedades del conjunto que no pueden dilucidarse completamente conociendo las características de los componentes por separado.

Para la producción de bioestimulantes se utiliza una diversidad de sustancias contenidas en las materias primas, como metabolitos primarios del tipo aminoácidos, azúcares, nucleótidos y lípidos (Aharoni y Galili, 2011), y otros metabolitos secundarios que se forman a partir de diferentes vías metabólicas. Con frecuencia, los bioestimulantes muestran una composición multicomponente y pueden incluir hormonas vegetales o sustancias similares a las hormonas (fitohormonas, Tabla 1), aminoácidos, péptidos, proteínas, azúcares, lípidos, vitaminas, nucleótidos, sustancias húmicas o compuestos fenólicos, entre otros.

**Tabla 1.** Diez grupos de compuestos fisiológicamente activos de tipo hormonal identificados en plantas superiores y su actividad fisiológica básica. Tabla modificada de Tarakhovskaya et al. (2007).

<b>Nombre</b>	<b>Ruta Biosintética</b>	<b>Lugar de la síntesis</b>	<b>Actividad fisiológica básica</b>
<b>Auxinas</b>	A partir de triptófano o indol	Primordio de la hoja, hojas jóvenes y frutos en desarrollo	Inducción del crecimiento por elongación, diferenciación de los elementos del floema, dominancia apical, tropismos, inicio de la formación de raíces, etc.
<b>Citoquininas</b>	Modificación bioquímica de la adenina	Las puntas de las raíces, las hojas jóvenes y semillas en desarrollo	Control de la división celular; desarrollo de las yemas; desarrollo de la lámina foliar; retraso de la senescencia
<b>Giberelinas</b>	Desde gliceraldehído-3-fosfato	Los tejidos de los brotes jóvenes y semillas en desarrollo	Elongación del tallo; inicio de la germinación de las semillas
<b>Etileno</b>	Desde metionina	Tejidos estresados y frutos en maduración	Inducción de la senescencia; inicio de las respuestas defensivas
<b>ABA</b>	Desde carotenoides	Raíces y hojas expandidas	Control de la función del aparato estomático, inhibición del crecimiento, latencia de las semillas
<b>Poliaminas</b>	Por descarboxilación de arginina u ornitina	Varios tejidos	Regulación del crecimiento y el desarrollo a concentraciones micromolares
<b>Brasinoesteroides</b>	Desde ácido mevalónico	Varios tejidos	Control de la división, crecimiento por elongación, diferenciación del sistema vascular
<b>Jasmónidos</b>	Desde ácidos grasos poliinsaturados	Varios tejidos	Desarrollo de respuestas defensivas
<b>Salicilatos</b>	A partir de fenilalanina	Varios tejidos	Inducción del complejo de respuestas defensivas durante la patogénesis
<b>Péptidos señal</b>	Desde aminoácidos	Varios tejidos	Inicio de respuestas defensivas; identificación de la autoincompatibilidad

Muchos productos bioestimulantes se han clasificado en grupos y categorías completamente divergentes en cuanto a su función, uso y tipo de actividad. Por ejemplo, los productos a base de humatos suelen describirse como enmiendas para la salud del suelo, mientras que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) podrían clasificarse como biofertilizantes, fitoestimuladores y bioplaguicidas (Martínez-Viveros et al., 2010; Bhattacharyya y Jha, 2012). De hecho, Du Jardin (2015) propone que los biofertilizantes son una subcategoría de los bioestimulantes.

Los bioestimulantes se han utilizado en todas las fases de la producción agrícola, como tratamiento de semillas, en pulverización foliar sobre plantas adultas en desarrollo y en productos ya cosechados. No obstante, el efecto de los bioestimulantes sobre el vegetal puede ser muy dependiente del modo de aplicación, de las dosis, del tipo de cultivo y de las distintas sustancias bioactivas que lo componen, por lo que predecir su eficacia se ha convertido en un reto actual en el sector agrobiotecnológico.

#### ***1.3.1.3. Efecto biopesticida***

La reducción de materia orgánica y el aumento de la incidencia de determinadas enfermedades vegetales son problemas muy comunes en aquellos cultivos que crecen en suelos muy sometidos a la presión de agroquímicos (Tripathi et al., 2020), lo cual no es deseable desde el punto de vista agronómico ni sanitario.

En las últimas décadas ha cobrado especial importancia el uso de microorganismos beneficiosos para el control de enfermedades y plagas de los cultivos (Figueiredo et al., 2016). Los bioplaguicidas son productos basados en microorganismos vivos como bacterias, hongos, cianobacterias y microalgas o extractos naturales, que se obtienen de animales o plantas (EPA, 2021). Los compuestos activos aislados de estos microorganismos tienen propiedades antimicrobianas, antivirales, citotóxicas, insecticidas o fitotóxicas (Ulloa-Ogaz et al., 2015). Pueden controlar plagas agrícolas específicas, agentes fitopatógenos (bacterias y hongos) o nemátodos entomopatógenos, de ahí que, además de ser respetuosos con el medio ambiente y específicos frente al huésped (Essiedu et al.,

2020), se posicionen como una gran promesa para controlar la pérdida de rendimiento agrícola sin comprometer la calidad del producto.

Los bioplaguicidas por lo general inhiben o interrumpen la síntesis de proteínas (Svidritskiy et al., 2013). También pueden alterar la permeabilidad de la membrana plasmática y provocar la fuga de sustancias (aminoácidos y electrolitos), desencadenando la muerte celular (Gwinn, 2018). Estos productos son altamente eficaces en pequeñas cantidades y se descomponen rápidamente sin dejar residuos, por lo que son firmes candidatos para ser utilizados como alternativa a los pesticidas químicos convencionales (Damalas y Koutroubas, 2018). Sin embargo, a pesar de los beneficios descritos, su uso no se ha extendido tanto como se esperaba, debido a los altos costes de producción y a los inconvenientes derivados de las autorizaciones reglamentarias. Además, la sensibilidad de estos productos a las condiciones ambientales desfavorables y el estrecho espectro de actuación frente a los patógenos y plagas que controlan pueden ser un inconveniente a la hora de ser aplicados.

## **I.4. Potencial biotecnológico de las cianobacterias**

### **I.4.1. Aspectos generales: multifuncionalidad y versatilidad**

Las cianobacterias poseen mecanismos celulares que las convierten en microorganismos muy versátiles y adaptables a distintas condiciones ambientales (Rojas et al., 2020). Presentan una tasa de crecimiento elevada, aunque muy dependiente de las variaciones en los niveles de nutrientes, así como de otros factores abióticos y bióticos. Existen numerosas características de las cianobacterias que las hacen ser microorganismos muy interesantes a la hora de escalar su producción a nivel industrial. Las cianobacterias pueden producir oxígeno molecular como subproducto de la fotosíntesis, no compiten por las materias primas del suelo y pueden crecer en suelos no productivos, y son conocidas por producir una gran variedad de compuestos bioactivos de gran utilidad en distintos campos de la biotecnología (Thajuddin y Subramanianm, 2005). Algunos de estos compuestos bioactivos son cianotoxinas con un demostrado potencial para ser utilizadas en el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer. Otra de las aplicaciones más prometedoras de las cianobacterias es como recurso

energético, para la producción de biocombustibles, así como para la depuración de aguas residuales o la biorremediación de suelos contaminados (Acién-Fernández, et al., 2018). Otros productos valiosos derivados del metabolismo de las cianobacterias se utilizan como antioxidantes, polímeros biodegradables, suplementos nutricionales o colorantes. A continuación, se describen de forma más detallada algunas de las aplicaciones más importantes del cultivo de cianobacterias.

*Producción de biocombustibles.* Debido a la escasez y agotamiento de los combustibles fósiles, los cuales aportan alrededor del 85% de la demanda total de energía, se hace necesaria la búsqueda de nuevos recursos energéticos sostenibles con el medio ambiente y a su vez, gestionar el uso de los subproductos generados durante el proceso. Las cianobacterias, gracias a su capacidad fotosintética y su alto contenido en ácidos grasos y lípidos pueden convertir hasta el 10% de la energía solar en biomasa, en comparación con el 1% que se obtienen a partir de los cultivos energéticos tradicionales, como la caña de azúcar o el maíz (Anahas y Muralitharan, 2018).

*Como alimento para humanos y piensos animales.* Las proteínas procedentes de las cianobacterias, ya sea como fuente de alimento o suplemento, han sido objeto de atención (Priyadarshani y Rath, 2012). Algunas cepas de *Anabaena* spp. y *Nostoc* spp. se consumen como alimento humano con un alto contenido de fibra y proteína. Por otro lado, la cianobacteria marina *Phormidium valderianum* ha demostrado ser una fuente completa de alimento en acuicultura y es ampliamente utilizada para la elaboración de piensos. Y no menos importantes en la industria alimentaria son los ácidos grasos poliinsaturados y los polisacáridos obtenidos de cianobacterias.

*Obtención de productos de valor añadido.* Las cianobacterias destacan por la producción de pigmentos del grupo de los carotenoides y las ficobiliproteínas, con un gran valor comercial al ser utilizados como suplementos para la alimentación animal y humana y como colorantes alimentarios. A su vez, son antioxidantes que pueden desempeñar un importante papel en la prevención y control de enfermedades. Además, una gran variedad de estos productos se utiliza en el campo de los cosméticos y productos medicinales (antimicrobianos, antivirales, antifúngicas, antiinflamatorios, antitumorales, inmunosupresores). Otros productos

extraídos de las cianobacterias pueden utilizarse para la obtención de plásticos biodegradables (Zahra et al., 2020).

*Biorremediación de ambientes contaminados.* Las cianobacterias tienen el potencial de ser utilizadas para la biorremediación de varios contaminantes del suelo y del agua, como metales pesados, petróleo crudo, plaguicidas, fenoles y otros compuestos xenobióticos (Lian et al., 2018).

También pueden ayudar a combatir la desertificación, en asociación con bacterias, algas, musgos, líquenes u hongos, que forman las costras biológicas del suelo en distintas regiones geográficas (Zahra et al., 2020).

A continuación, en la Figura 5 se muestra a modo de resumen, la amplia versatilidad de las cianobacterias y su carácter multifuncional, tanto en agricultura sostenible como en otros aspectos de la gestión medioambiental.



**Figura 5.** Efectos beneficiosos de la aplicación de inoculantes de naturaleza algal. Figura modificada de Renuka et al. (2018).

#### **I.4.2. Papel de las cianobacterias como agentes promotores del crecimiento vegetal**

En los últimos tiempos, el concepto de "agricultura orgánica", que implica un uso mínimo de fertilizantes químicos, está dando paso a la aplicación de otros productos más ecológicos como el compost, el estiércol de granja, el abono verde o de microorganismos que actúan como biofertilizantes. Entre los biofertilizantes más utilizados, las cianobacterias constituyen el principal insumo en el cultivo del arroz, mejorando la fertilidad del suelo debido a su capacidad para fijar carbono y nitrógeno (Yadavalli y Hegggers, 2013). En esta última década, las investigaciones centran sus esfuerzos en la búsqueda de diferentes cepas de bacterias, microalgas y cianobacterias, que puedan actuar como inoculantes eficaces para promover el crecimiento de las plantas, y la productividad de diversos cultivos (Prasanna et al., 2012; Gupta et al., 2013). A tales efectos se trabaja con la elaboración de formulaciones de inoculantes que combinen el uso de bacterias y cianobacterias en consorcios, para evaluar sus efectos sinérgicos como biofertilizantes en cultivos económicamente importantes, como el arroz, el trigo y las hortalizas.

El potencial de las cianobacterias como recurso para la obtención de compuestos bioactivos se atribuye a su notable capacidad de sintetizar productos útiles como polisacáridos, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, lípidos y otros metabolitos a partir del CO<sub>2</sub> atmosférico. Además, son muchos los estudios que han informado de la presencia de fitohormonas (citoquinina, auxina, giberelinas y brasinoides) en extractos celulares procedentes de varias especies de microalgas y cianobacterias (Chiaiese et al., 2018). Estas fitohormonas desempeñan un papel clave en el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

Se puede confirmar, por tanto, que las cianobacterias influyen positivamente en el crecimiento de las plantas por medio de asociaciones casuales, establecimiento de relaciones simbióticas, o por el simple hecho de estar presentes en las proximidades de la rizosfera. Contribuyen al crecimiento y desarrollo vegetal ya sea mediante la transferencia directa o indirecta de N, mejorando la calidad del suelo y el estado de los nutrientes, solubilizando los fosfatos poco disponibles para la planta, así como mediante la producción de hormonas y vitaminas que promueven el crecimiento vegetal. Además, mejoran el entorno general del suelo

mediante el secuestro de CO<sub>2</sub>, la fijación de N<sub>2</sub>, la eliminación de contaminantes por biosorción y la renovación de los nutrientes del suelo (Rai et al., 2019).

#### ***1.4.2.1 Aplicación de cianobacterias como fitoestimulantes y biofertilizantes***

Las cianobacterias son microorganismos procariotas fotoautótrofos, en ocasiones heterótrofos facultativos, capaces de utilizar diversas fuentes de carbono y nitrógeno, y destacan por su gran plasticidad fisiológica ya que proliferan bajo condiciones agrícolas y ecológicas muy diversas (Pham et al., 2017). Promueven activamente la germinación, el crecimiento y desarrollo de la planta, debido a la producción de hormonas vegetales como auxinas, citoquininas y giberelinas, como es el caso de los géneros *Anabaena*, *Anabaenopsis* y *Calothrix* (Manjunath et al., 2011; Singh et al., 2016; Joshi et al., 2020). En el sector agrícola, después del nitrógeno, el fósforo es el segundo nutriente más importante para las plantas. En este sentido, también se ha sugerido que las cianobacterias, con la ayuda de enzimas fosfatasa, pueden solubilizar y movilizar los fosfatos orgánicos insolubles presentes en el suelo y mejorar su biodisponibilidad, aumentando la adquisición de nutrientes por parte de las plantas (Singh et al., 2016; Joshi et al., 2020). Por tanto, el uso de cianobacterias como agentes biofertilizantes se posiciona como una estrategia prometedora desde el punto de vista agronómico porque muestran una gran adaptabilidad ambiental; aportan biomasa al suelo, y contribuyen a la regulación de las funciones biológicas de otros microorganismos beneficiosos del suelo (Ördög et al., 2004; 2021). Su relevancia es tal, que la abundancia y diversidad de las cianobacterias pueden cambiar las condiciones del suelo, al igual que las condiciones del suelo pueden cambiar las poblaciones de cianobacterias (Múnera-Porras et al., 2020).

La aplicación de fertilizantes líquidos preparados a partir de microalgas y cianobacterias mejora el crecimiento vegetal respecto a lo observado con el uso de fertilizantes de base química, no sólo por la presencia de potasio, fósforo y nitrógeno, sino porque también son ricos en metabolitos reguladores del crecimiento vegetal, ejerciendo en la planta efectos similares a los descritos por parte de otras rizobacterias (Osman et al., 2010). Se trata de compuestos fenólicos, flavonoides, los cuales, junto a las proteínas, son precursores clave de fitohormonas



y compuestos aromáticos secundarios, que desempeñan un papel esencial en la embriogénesis, la organogénesis, así como, en la protección contra el estrés osmótico (Chiaiese et al., 2018). En el mismo contexto, otros trabajos describen que estos biofertilizantes mejoran el contenido en materia orgánica del suelo, reducen el contenido de materia oxidable, y no menos importante, proporcionan oxígeno a la rizosfera sumergida, amortiguan el pH y mejoran la salinidad (Biswajita et al., 2020). El efecto ventajoso de los fertilizantes líquidos a base de microalgas en las plantas de cultivo implica, por tanto, una mayor capacidad de soportar condiciones ambientales adversas, así como la mejora de los rendimientos de producción. Los biofertilizantes a base de microalgas contribuyen en gran medida al desarrollo de una agricultura sostenible (Deepika y MubarakAli, 2020).

Las cianobacterias filamentosas de los géneros *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. son las comúnmente caracterizadas como biofertilizantes. Pueden formar asociaciones simbióticas con plantas y otros microorganismos (Rana et al., 2012; Swarnalakshmi et al., 2013).

Algunos de los efectos más destacados de la aplicación de cianobacterias como biofertilizantes y bioestimulantes se ponen de manifiesto en el incremento de la longitud de las raíces vegetales, en el tamaño o porte vegetativos de la planta, así como en el rendimiento de los cultivos. La composición bioquímica inherente a estos microorganismos revela la idoneidad de los mismos para ser utilizados como biofertilizantes y fitoestimulantes. Supraja et al. (2020) informaron sobre el contenido en proteínas de las cianobacterias y microalgas, lo cual, sumado al contenido en macro y microelementos como Na, K y Ca, así como de carbohidratos, son en gran parte responsables del efecto promotor del crecimiento vegetal.

La concentración óptima de extracto de microalgas y cianobacterias que puede tener un efecto fitoestimulante, depende de la especie y del contenido bioquímico de las cepas utilizadas, las condiciones ambientales y la planta a la que se dirige. De hecho, la aplicación de extractos de cianobacterias a una dosis mayor de la óptima podría tener graves efectos fitotóxicos. A pesar de ello, el efecto de los bioestimulantes vegetales no puede evaluarse únicamente en función del crecimiento de la planta. Los resultados obtenidos por Mutale-joan et al. (2020) sugieren que, además del crecimiento de la planta, algunos extractos de

cianobacterias y microalgas desencadenan otros procesos bioquímicos, como la acumulación de metabolitos lipofílicos, relacionados con la tolerancia al estrés abiótico y la defensa de las plantas, así como la acumulación de piridina-3-carboxamida que también podría repercutir más en la calidad de los cultivos que en su productividad. Por lo tanto, los bioproductos basados en microalgas y/o cianobacterias podrían ser aplicados con fines muy diversos desde un punto de vista agrícola. No todas las especies de cianobacterias y microalgas tienen actividad fitoestimulante, lo que sugiere que esta propiedad se debe a la presencia de metabolitos "específicos de cada especie". Por tanto, la obtención y fraccionamiento de extractos de microalgas y cianobacterias, y la posterior realización de pruebas agronómicas a partir de los compuestos bioactivos purificados, podría ser de enorme utilidad para el estudio en profundidad de los mecanismos de acción derivados de este tipo de extractos.

Algunos ejemplos que apoyan la capacidad biofertilizante y bioestimulante de microalgas y cianobacterias se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cianobacterias y microalgas promotoras del crecimiento vegetal. Modificada a partir del trabajo Renuka et al. (2018).

Cianobacteria/microalga	Cultivo	Efectos
<i>Calothrix elenkinii</i>	Arroz	Aumento del crecimiento de la planta; Aumento de la producción de hormonas vegetales; aumento de la actividad de las enzimas hidrolíticas y de defensa; cambios espaciales y temporales en las comunidades microbianas
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	Tomate	Aumento de la tasa de germinación y del crecimiento de las plantas
<i>Chlorella vulgaris</i>	Maíz y Trigo	Aumento del índice de germinación de las semillas y del crecimiento de las plantas
<i>Nannochloropsis</i>	Tomate	Biofertilizante orgánico de liberación lenta Aumento del contenido de azúcares y carotenoides en los frutos

A pesar del gran interés que suscita el desarrollo de nuevos bioestimulantes a base de microalgas y cianobacterias, son pocos los productos bien caracterizados con un rendimiento fiable. Esto se debe principalmente, a la variabilidad de cepas que se utilizan a nivel industrial. La falta de conocimiento sobre los mecanismos moleculares a través de los cuales ejercen su acción este tipo de productos, hace complicado predecir sus efectos sobre los cultivos, especialmente cuando se aplican en suelos muy diferentes y bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y humedad (Colla y Rouphael, 2015).

#### ***1.4.2.2. Acción biopesticida de las cianobacterias frente a enfermedades vegetales (preventiva, curativa)***

Las interacciones suelo-planta-microorganismo son complejas y tienen un papel primordial tanto en la salud como en la productividad de las plantas. Numerosos estudios describen cómo las plantas son capaces de protegerse de los daños originados por el estrés oxidativo, así como de agentes patógenos y condiciones ambientales adversas. La colonización de microorganismos promotores del crecimiento, incluidas cianobacterias, a nivel de la raíz, es uno de los principales mecanismos de defensa que utiliza la planta para combatir este tipo de problemas (Renuka et al. 2018; Meena et al., 2020; Basu et al., 2021). También se ha postulado que los extractos celulares de cianobacterias contienen sustancias promotoras del crecimiento y elementos inorgánicos, que mejoran el establecimiento de las comunidades microbianas del suelo y proporcionan también resistencia contra las enfermedades (Koffi et al., 2018). En definitiva, algunos microorganismos beneficiosos para las plantas pueden actuar de forma directa o indirecta contra los patógenos y las plagas vegetales reduciendo su población o mitigando los daños producidos en la planta. Son los llamados bioplaguicidas o biopesticidas, que actúan contra los agentes patógenos a través de la competencia por el espacio y los nutrientes, la producción de compuestos antimicrobianos o el ataque directo, entre otros mecanismos (Kumar, 2018).

Aunque se conoce que los productos de origen cianobacteriano, pueden utilizarse como tecnología alternativa para aumentar la productividad en sistemas agrícolas sostenibles, hay poca información disponible sobre el papel de las

cianobacterias en el ámbito de la protección de cultivos. No obstante, algunos estudios describen la eficacia de estos organismos en función de su potencial para producir compuestos antimicrobianos que actúan contra patógenos humanos y vegetales (Singh et al., 2016). En concreto, se ha podido ver el efecto inhibitor de los ácidos grasos insaturados y los carotenoides extraídos eficazmente de determinadas especies de cianobacterias, sobre el crecimiento de especies de bacterias patógenas grampositivas. Estos compuestos bioactivos bacteriostáticos o bactericidas pueden actuar de forma independiente o mediante acciones sinérgicas, aunque su mecanismo de acción exacto aún se desconoce (Alsenani et al., 2021). Destacan especialmente por su actividad antimicrobiana los géneros *Nostoc*, *Anabaena*, *Leptolyngbya*, *Tolypothrix*, *Scytonema* o *Calothrix*, entre otros.

Hay que tener en cuenta la cantidad y la calidad de los compuestos antimicrobianos que producen, ya que varían según la especie de cianobacteria, su fase de crecimiento y las condiciones ambientales a las que están expuestas. Además, producen una gran variedad de vitaminas y otros metabolitos secundarios bioactivos, que también tienen actividades herbicidas, insecticidas e inmunosupresoras (Swain et al., 2017). Algunas cianobacterias pueden secretar cianuro de hidrógeno, que funciona como sustancia antibacteriana y antifúngica, permitiendo el biocontrol de fitopatógenos (Panou y Gkelis, 2020). Michalak et al. (2017), por su parte, informaron sobre las propiedades de los polisacáridos derivados de algunas algas, los cuales suelen desencadenar la activación de las respuestas de defensa de la planta contra estreses abióticos y bióticos, proporcionando así resistencia frente a patógenos vegetales.

Por último, se ha descrito que varias cianotoxinas producidas por cianobacterias, pueden mostrar actividad biocida, de forma que inhiben el crecimiento de bacterias, virus, hongos y algunos invertebrados como crustáceos y bivalvos (Burja et al., 2001). Estas cianotoxinas poseen un gran potencial para actuar como sustancias de carácter pesticida que podrían ser aplicadas en los campos de cultivo como insecticidas, herbicidas, alguicidas y fungicidas (Biondi et al., 2004; Berry et al., 2008).

Además de las cianobacterias, varias cepas de microalgas producen compuestos biológicamente activos que actúan a modo de antimicrobianos (Ranglová et al.,

2021). Los extractos de dichas cepas, pueden aplicarse como alternativa a los plaguicidas químicos, ya que protegen los cultivos frente al ataque de patógenos y, en paralelo, pueden mejorar el crecimiento de las plantas y (Costa et al., 2019). Destaca la actividad de dos especies de microalgas, *Chlamydomodium fusiforme* y *Chlorella vulgaris* por su actividad biopesticida contra ciertos patógenos de plantas.

#### ***1.4.2.3. Métodos de aplicación de cultivos y extractos de cianobacterias in planta***

El uso de cianobacterias como acondicionadores del suelo en varios cultivos de cereales, legumbres, hortalizas y herbáceas, se ha estudiado de ampliamente desde hace décadas. Actualmente, existe un importante mercado destinado a la aplicación de biomasa de microalgas y cianobacterias, así como de sus extractos y subproductos con fines agronómicos. Los estudios más recientes se han llevado a cabo mediante la aplicación de cultivos frescos o deshidratados de microalgas y cianobacterias, o bien en forma de extractos acuosos. Entre los efectos directos documentados de la inoculación de cianobacterias en suelos de cultivo destacan la estabilización y mejora de la estructura del mismo, el enriquecimiento en nutrientes y el aumento del contenido de humedad. Tales efectos se deben, en parte, a que las cianobacterias son los principales productores implicados en el ciclo del C-N, (Mandal et al., 1999; Manjunath et al. 2016; Pandey et al., 2019). La inoculación de cianobacterias directamente en el medio rizosférico en forma de biomasa seca, o formando parte de algún tipo de enmienda orgánica (compost) se ha denominado tradicionalmente "algalización" (Mishra y Pabbi, 2004; Rodríguez et al., 2006; Saadatnia y Riahi, 2009; Mahmood et al., 2016). En cualquier caso, se ha comprobado que dicha práctica provoca un aumento de la tasa de germinación, un mejor desarrollo de las plantas y un mayor rendimiento en una gran variedad de cultivos. A su vez, proporciona protección contra agentes fitopatógenos. Sin embargo, se han detectado grandes diferencias cuando la biomasa se aplica semanas antes del trasplante.

Otras prácticas alternativas para la aplicación de bioinoculantes son la inoculación foliar y radicular. Ronga et al. (2019) pusieron de manifiesto que a menudo, debido a los problemas fisicoquímicos asociados a la estructura del suelo, los nutrientes esenciales derivados de los iofertilizantes aplicados directamente al

suelo pueden no llegar a estar disponibles para las plantas. De este modo la pulverización foliar, que implica la absorción del bioestimulantes a través de los estomas, se considera una alternativa potencialmente efectiva. La mayor dificultad en el suministro de nutrientes a través de la biofertilización foliar es aplicar la cantidad adecuada sin dañar las hojas. Al igual que con los agroquímicos sintéticos, existe una dosis límite a partir de la cual puede ocurrir un efecto fitotóxico (García-González y Sommerfeld, 2016). Por otra parte, el método de aplicación foliar parece ser más eficaz si se aplica en condiciones de alta humedad relativa, cuando los estomas de las hojas están abiertos, con el fin de aumentar la permeabilidad y absorción del producto (Ronga et al., 2019).

Estudios recientes han confirmado el efecto beneficioso de la aplicación preventiva foliar y radicular de inoculantes microbianos a base de cianobacterias en cultivos hortícolas, estando dicho efecto relacionado con el carácter promotor del crecimiento vegetal y protector frente a la enfermedad causada por la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los resultados pusieron de manifiesto, que la aplicación foliar de los extractos de cianobacterias mejoró el desarrollo de la parte aérea de la planta, mientras que la aplicación radicular fue más eficiente para promover el desarrollo radicular. Por tanto, el efecto promotor del crecimiento vegetal podría estar estrechamente relacionado con el método de aplicación de los extractos. En cuanto al control del chancro bacteriano, la aplicación radicular de los extractos de cianobacterias estaría más relacionada con el control de la enfermedad, mientras que tanto la aplicación foliar como radicular parece estar relacionada con el fortalecimiento de la planta y, por tanto, con una mejora en la respuesta defensiva de la misma (Toribio et al., 2021a, b). Previamente, en la misma línea de investigación, otros autores determinaron que la aplicación foliar de la microalga *Chlorella fusca* reducía la incidencia de la enfermedad causada por el hongo patógeno *Colletotrichum orbiculare* en hojas de pepino (Kim et al., 2018).

Otra estrategia de inoculación que ha alcanzado un papel relevante es el *biopriming* de semillas. Consiste en sumergir las semillas en un extracto microbiano durante un tiempo determinado, con el fin de conseguir un efecto de “imprimación” eficaz y que influya positivamente sobre el estado de emergencia y post-emergencia de la semilla., asegurando posteriormente un mejor desarrollo de la planta y un

mayor rendimiento de los cultivos (Anitha et al., 2013). Algunos autores han combinado la técnica de *biopriming* en semillas con el uso de matrices sólidas a base de alginato (Toribio et al., 2021a), para facilitar la colonización de la cubierta de las semillas. En este sentido, el alginato ha sido considerado una de las opciones más utilizadas para la preparación de formulaciones microbianas semisólidas, ya que mejora la capacidad de colonización de los microorganismos sin reducir la viabilidad celular (Schoebitz et al., 2013).

El-Mougy y Abdel-Kader (2013) comprobaron además que mediante la técnica de *biopriming* es posible estimular la respuesta defensiva vegetal e inducir la activación de mecanismos de resistencia contra estreses de tipo abiótico y biótico. Gracias al *biopriming* se consigue un apoyo nutricional y defensivo que afecta a la expresión génica, a la activación de distintas rutas bioquímicas, y a la acumulación o excreción de metabolitos, de forma que se puede ver alterado el fenotipo de la planta, y con ello resistir o tolerar condiciones de estrés y, al mismo tiempo, mejorar su productividad (Prabha et al., 2019).

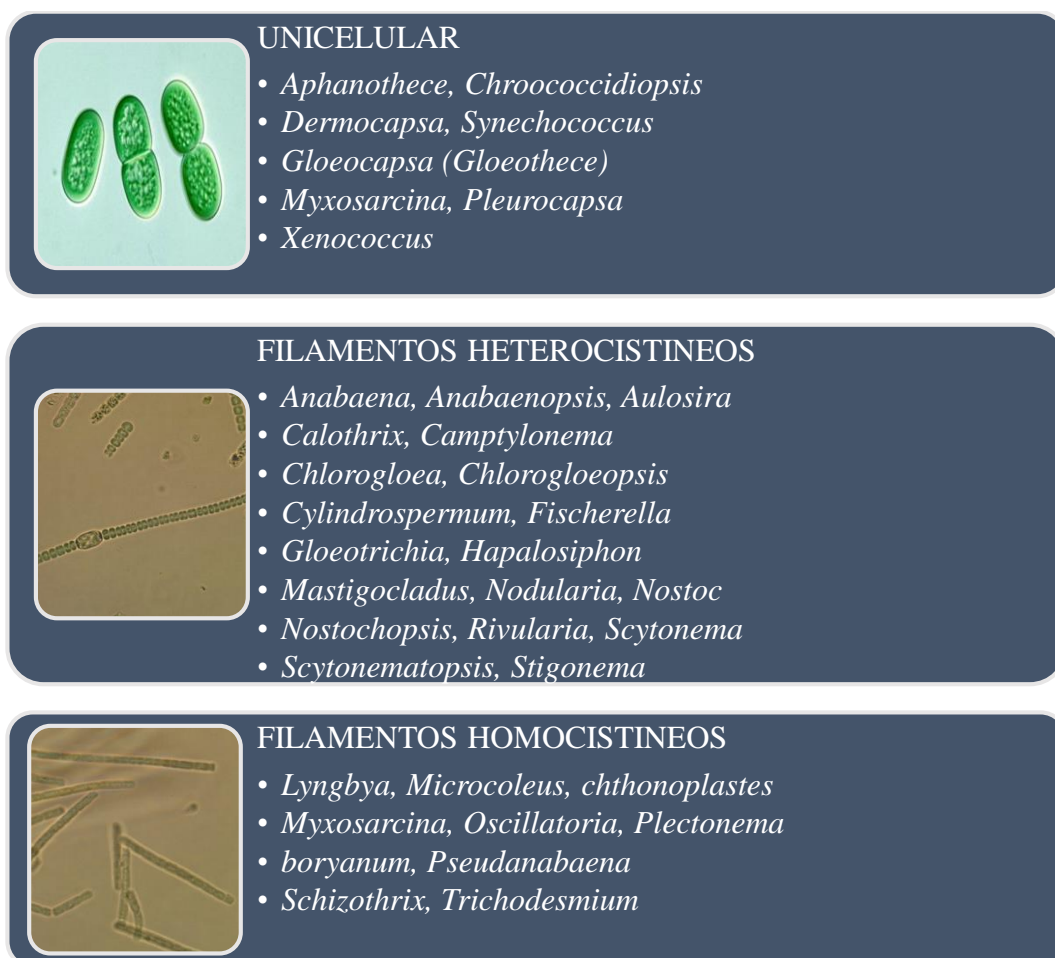
#### ***1.4.2.4. Extracción de sustancias bioactivas a partir de cultivos de cianobacterias***

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos capaces de producir una amplia variedad de metabolitos que pueden ser aplicados con fines alimentarios, agrícolas, farmacéuticos e industriales. Su rápida tasa de crecimiento y su capacidad de adaptación a hábitats extremos, las convierte en candidatos idóneos para la producción a gran escala de sustancias bioactivas. Para estimular el crecimiento de este grupo de microorganismos y la producción de dichos metabolitos, se han puesto a punto diversos protocolos en función del tipo de especie y de los requerimientos específicos de tipo nutricional, y ambiental. Así, la optimización del cultivo de microalgas y cianobacterias, pasa por la manipulación de las condiciones de cultivo (concentraciones de nutrientes, intensidad de la luz, fuente de carbono, salinidad y temperatura) e incluso la aplicación de activadores químicos, como fitohormonas u otras sustancias químicas que regulan las vías biosintéticas (Chiaiese et al., 2018).

Una vez optimizado el protocolo dirigido a la producción de estos metabolitos a gran escala, el siguiente paso es la obtención de los mismos a partir de los cultivos

o extractos microbianos. Para ello, se han desarrollado diferentes técnicas de extracción (Prasanna et al., 2018; Puglisi et al., 2018). Las técnicas convencionales incluyen el uso de disolventes orgánicos, mientras que los nuevos métodos de extracción en cambio, apuestan por la obtención de extractos sin disolventes, en un entorno más seguro tanto para las plantas como para los seres humanos (Michalak et al., 2015).

Un factor importante a tener en cuenta a la hora de seleccionar un método de extracción adecuado, es la resistencia a la rotura de la pared celular cuya composición varía mucho entre especies, formas y tamaño celular (Figura 6), además de estar influenciada por las condiciones ambientales y la etapa de crecimiento (Bernaerts et al., 2018). Todo ello ha derivado en la puesta a punto de una gran variedad de métodos de naturaleza física, térmica o enzimática que tienen como principal objetivo producir la lisis celular.



**Figura 6.** Heterogeneidad morfológica de las cianobacterias. Figura modificada de Singh et al. (2016).



Las técnicas de extracción, por tanto, requieren la rotura de la pared celular para que se liberen los compuestos bioactivos (Samarasinghe et al., 2012). Esto puede lograrse mediante (i) métodos mecánicos/físicos (calor, homogeneización, microondas, sonicación, nitrógeno líquido o liofilización), (ii) métodos químicos (hidróxido de sodio, ácidos clorhídrico o sulfúrico, choque osmótico, ácido nitroso, detergentes, agentes quelantes), y (iii) medios enzimáticos (celulasa, proteasa, entre otras).

Los métodos mecánicos/físicos son más exigentes desde un punto de vista energético. El estrés térmico se ha aplicado tradicionalmente como un método de disrupción celular, de forma que, mediante rondas repetidas de congelación/descongelación, se forman cristales de hielo intracelulares que causan la rotura de las paredes y membranas celulares (Singh et al., 2010). Sin embargo, actualmente, destaca la liofilización como método mecánico/físico de rotura celular. Durante la liofilización, se forman cristales de hielo intracelulares, que posteriormente son sublimados, provocando la deshidratación de la muestra. Este proceso, sobre todo si no se utilizan agentes crioprotectores, provoca daños en la pared y membrana celular, ya que el agua intracelular se expande al congelarse, dando lugar a la formación de poros. Por tanto, el daño causado por la liofilización a nivel de las estructuras externas celulares es suficiente para extraer la mayoría de compuestos solubles en agua y de bajo peso molecular, hecho que ha sido confirmado en estudios previos (Lee et al., 2017; Stirk et al., 2020).

Por otro lado, la sonicación es considerada por algunos investigadores una técnica útil mediante la cual se consigue la liberación de metabolitos intracelulares a partir de cultivos de microorganismos (Viswanathan et al., 2012; Bermúdez-Sierra et al., 2013). Es una técnica basada en la conversión de energía eléctrica en mecánica por medio de ondas sonoras pulsadas con frecuencias de entre 20 a 40 kHz, lo que genera en la célula un efecto de compresión-descompresión rápida que se mantiene durante un tiempo establecido. Los daños en la estructura de la pared celular son ocasionados por medio de perforaciones de carácter interno o externo (Zheng et al., 2011).

Otro enfoque relacionado con la disrupción celular es la lisis química ácida o alcalina. En este caso, se utiliza ácido clorhídrico o sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido nitroso o cloruro sódico concentrado, que se añaden a la biomasa para hidrolizarla en sus moléculas constituyentes (Michalak y Chojnacka, 2014; Mehta et al., 2015).

Respecto a los métodos enzimáticos, se describen como menos destructivos, ya que solo perforan ligeramente las membranas y paredes externas o aumentan la permeabilidad de la pared celular y la membrana, en lugar de romperla. Estos métodos enzimáticos están ganando popularidad, a pesar de representar un coste adicional (Michalak y Chojnacka, 2014).

De forma particular, se describen métodos más avanzados de lisis celular que implican la no degradación del material genético. En este caso, gracias a la ultrasonificación se consigue la degradación de la envoltura celular y se obtiene un ARN de buena calidad. En este caso, las vibraciones se transmiten al líquido como ondas de presión acústica expansivas y compresivas alternas. Los cambios de presión generan millones de microburbujas (cavidades), que se expanden durante las fases de baja presión e implosionan violentamente durante las fases de alta presión. La cantidad acumulada de energía generada por las cavidades que implosionan es extremadamente alta, lo cual provoca que se incremente la temperatura, y se produzcan los diferentes cambios físicos, químicos y bioquímicos en el microentorno de las células (Tiam et al., 2019).

Como ejemplo de sustancias bioactivas obtenidas a partir de la extracción de cianobacterias y microalgas destacan las fitohormonas, pigmentos, polisacáridos, sustancias con actividad biológica, indicadas en Tabla 3.

**Tabla 3.** Fitohormonas y otras sustancias bioactivas encontradas en varios grupos de microalgas y cianobacterias. Tabla modificada de Tarakhovskaya et al. (2007), Michalak y Chojnacka (2015) y Singh et al. (2016)

Grupo	Fitohormonas y otras sustancias bioactivas
<b>Chlorophyta</b>	AIA (géneros: <i>Enteromorpha</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Cladophora</i> , <i>Caulerpa</i> )
	Citoquininas (géneros: <i>Protococcus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Chlamydomonas</i> )
	ABA (géneros: <i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Haematococcus</i> )
	Ácido lunulárico (género <i>Enteromorpha</i> )
	Ácido Jasmónico (género <i>Dunaliella</i> , <i>Chlorella</i> )
	Poliaminas (géneros <i>Ulva</i> , <i>Chlorella</i> )
	Brasinoesteroides (género <i>Hydrodictyon</i> )
	Clorofila a y b, $\beta$ -caroteno
	Amilosa, amilopectina, celulosa, pectina, xilano
	Esteroles (colesterol, 24-metilencolesterol)
<b>Phaeophyta</b>	AIA (géneros: <i>Macrocystis</i> , <i>Laminaria</i> , <i>Fucus</i> , <i>Ascophyllum</i> )
	Citoquininas (géneros: <i>Fucus</i> , <i>Ascophyllum</i> , <i>Sargassum</i> , <i>Macrocystis</i> )
	Giberelinas (género <i>Fucus</i> )
	ABA (géneros: <i>Ascophyllum</i> , <i>Laminaria</i> )
	Poliaminas (género <i>Dyctiota</i> )
	Clorofilas a, c
	Alginato, celulosa, laminarina
	Polifenoles
Esteroles (colesterol, fucosterol)	
<b>Rhodophyta</b>	AIA (géneros: <i>Botryocladia</i> , <i>Porphyra</i> )
	Citoquininas (género <i>Porphyra</i> )
	Ácido Jasmónico (género <i>Gelidium</i> )
	Poliaminas (géneros: <i>Cyanidium</i> , <i>Gelidium</i> , <i>Grateloupia</i> )
	Rodomorfinas (género <i>Griffithsia</i> )
	Ficobilinas (ficoeritrinas), clorofila a
	Agar, carragenina, celusosa, manano, porfirano, xilano
	Esteroles (colesterol)
<b>Cyanophyta</b>	AIA (géneros: <i>Oscillatoria</i> , <i>Chlorogloea</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Chlorogloeopsis</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Glactothece</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Plactonema</i> , <i>Synechocystis</i> )
	Citoquininas (géneros: <i>Arthronema</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Chlorogloeopsis</i> )
	Ácido Jasmónico (género <i>Spirulina</i> )
	Giberelinas (géneros: <i>Anabaenopsis</i> , <i>Cylindromum</i> )
	Ficobilinas (ficocianina), clorofila a
	Compuestos antibacterianos (malyngolide), antivirales (glicolípidos, spirulan)

#### ***1.4.2.5. Establecimiento de consorcios microbianos: interacción entre microorganismos autótrofos y heterótrofos***

Estudios previos han demostrado que determinadas poblaciones microbianas cooperativas que afectan al crecimiento y promoción de la salud vegetal (Brader et al., 2014; Vurukonda et al., 2018), pueden contribuir al desarrollo de prácticas agrícolas más sostenibles (Barea et al., 2005). Estas poblaciones microbianas pueden interaccionar entre si, y ejercer un efecto positivo no sólo sobre las plantas, sino también sobre el suelo, de forma que contribuyen a la estabilidad y productividad de los sistemas agrícolas y de los ecosistemas naturales. De ahí que la búsqueda de nuevos agentes promotores del crecimiento vegetal sea esencial para garantizar una producción segura y sostenible de alimentos vegetales para el consumo humano (Mógor et al., 2018).

Las cianobacterias y microalgas son componentes indispensables de la microbiota del suelo y viven en simbiosis con múltiples microorganismos del entorno rizosférico, lo que indica que esta asociación puede ser importante para su existencia (Dittami et al., 2014). Cada especie muestra una capacidad particular para producir metabolitos implicados en estrategias de fertilización, fitoestimulación y fitoprotección, por lo que la sinergia entre especies diferentes puede derivar en la obtención de mejores resultados cuando se aplican consorcios microbianos, en relación a la aplicación de cultivos axénicos. Algunos ejemplos que apoyan estas estrategias se muestran en la Tabla 4, en la que se describen los efectos más característicos causados por la aplicación de diversos consorcios de cianobacterias y microalgas en distintos cultivares.

**Tabla 4.** Cianobacterias y microalgas aplicadas como consorcios y descripción de los principales efectos como agentes promotores del crecimiento vegetal. Modificada a partir del trabajo Renuka et al. (2018).

Cianobacteria/microalga	Cultivo	Efectos
<b>Consortios de dos cepas de <i>Anabaena</i> y <i>Nostoc</i></b>	Arroz	Denominada algalización; mejora el rendimiento de los cultivos y la fertilidad del suelo
<i>Anabaena doliolum</i> HH-209, <i>Cylindrospermum sphaerica</i>	Mijo perlado y trigo	Aumento del crecimiento y del rendimiento de las plantas; mejora de la mineralización del carbono y del nitrógeno
<b>Biofilms de consorcios entre <i>Anabaena</i> con <i>Trichoderma</i>/<i>Azotobacter</i>/<i>Mesorhizobium</i>/<i>Nostoc</i></b>	Maíz, algodón, arroz, trigo, garbanzo, okra, crisantemo	Mejora de las características de crecimiento de la planta y del rendimiento; mejora de la absorción de macro y micronutrientes; activación de la maquinaria antioxidante de la planta; aumento del nitrógeno disponible en el suelo, mejora de las actividades enzimáticas de los microorganismos del suelo (deshidrogenasa, fijación de nitrógeno); modulación de estructura y función de la rizosfera
<i>Calothrix ghosei</i> , <i>Hapalosiphon intricatus</i> , <i>Nostoc sp.</i>	Trigo	Aumento del crecimiento de las plantas; aumento del rendimiento del grano
<b>Consortios de cianobacterias y sus consorcios con eubacterias</b>	Trigo	Aumento de la actividad enzimática del suelo (actividad deshidrogenasa hidrolasa, fosfatasa alcalina); mejora de la biomasa microbiana del suelo; mejora del crecimiento y del rendimiento de las plantas, de la absorción de micronutrientes y su translocación a los granos
<i>Nostoc</i> 2S9B y <i>Anabaena</i> cepas LC2, C5	Maíz, remolacha, frijol, trigo	Aumento de la longitud y el peso seco de las plantas; aumento del contenido de nitrógeno en la raíz y el brote
<b>Consortios entre cianobacterias y algas verdes</b>	Trigo	Mejora de la actividad microbiana del suelo; aumento del carbono orgánico del suelo y de los macro y micronutrientes; aumento del crecimiento y el rendimiento de las plantas

En general, las cianobacterias son las más utilizadas para la fertilización con N, la agregación del suelo, la absorción de nutrientes y el biocontrol, mientras que las

algas verdes resultan más eficaces para mejorar el crecimiento de las plantas y la calidad nutricional de los frutos. Por lo tanto, la combinación de dos o más cepas con diferentes rasgos potenciales, puede ser una estrategia útil para aumentar la eficacia de los biofertilizantes de algas, (Chittapun et al., 2018). En la misma línea, la biotecnología agrícola está poniendo a punto paralelamente, la formación de consorcios, entre las cianobacterias y bacterias de interés agronómico que apoyan el crecimiento fotoautotrófico de sus socios, de modo que la producción, el crecimiento y el ciclo de los nutrientes mejoran con respecto a lo que una sola especie o población puede lograr por sí sola en condiciones ambientales similares (Paerl et al., 2000). Según Kouzuma y Watanabe (2015), las interacciones mutualistas entre microalgas y las bacterias son de tres tipos: mediante intercambio de nutrientes, transducción de señales y transferencia de genes. En general, el intercambio de nutrientes se considera el más común e importante. Es conocido que las microalgas liberan materia orgánica fotosintetizada en forma de carbono orgánico disuelto, o moléculas de señalización para alimentar comunidades bacterianas específicas y a su vez, las bacterias contribuyen sintetizando importantes compuestos como CO<sub>2</sub>, micronutrientes como el Fe o vitaminas, que actúan como cofactores de las enzimas en las vías metabólicas clave de las microalgas. Todo ello conduce a la obtención de cultivos de algas más robustos, capaces de soportar mejor las perturbaciones ambientales (Biondi et al., 2017). Además de desempeñar un papel en la mejora de la producción de microalgas, las bacterias asociadas pueden ayudarlas a realizar tareas más complejas con diversas aplicaciones biotecnológicas de gran interés. Dicha cooperación favorece el efecto biofertilizante, bioestimulante o biopesticida en las plantas, de igual forma cooperan en la eliminación de residuos orgánicos e inorgánicos y de sustancias peligrosas, en el tratamiento de aguas residuales de una forma más rápida y eficaz, entre otras (Su et al., 2012; Cavaliere et al., 2017). Se ha comprobado que la interacción parece ser específicas de cada especie, dependiendo del microambiente y las condiciones de cada microalga (Ramanan et al., 2016).

Otros aspectos importantes a tener en cuenta son las proporciones de inoculación de los microorganismos y el montaje experimental del consorcio que pueden ser de diferentes tipos. El sistema más común es el co-cultivo donde o bien ambas especies se disponen en suspensión, o uno de los microorganismos se inmoviliza en biofilms

mientras que el otro se encuentra en suspensión o a través de biopelículas o diferentes soportes que incrustan a ambos microorganismos.

El éxito de un consorcio microalgas-bacterias debe ser beneficioso para ambos microorganismos. La demostración de los beneficios mutuos y el automantenimiento de la asociación a lo largo de varias generaciones consecutivas, es fundamental para la validación de este enfoque. Conocer los requisitos nutricionales y ambientales específicos de cada uno de los socios, puede ayudar a la manipulación de la respuesta biotecnológica prevista (Kumar et al., 2016; Yanti et al., 2021).

Uno de los mecanismos clásicos que apoyan la coexistencia es la especialización. Las preferencias en la utilización de las fuentes de carbono pueden desempeñar un papel muy importante al repartir temporalmente los recursos entre las especies, evitando así la competencia (Tuncil et al., 2017). En otras palabras, la utilización secuencial de las fuentes de carbono convierte a los “generalistas metabólicos” en “especialistas metabólicos en serie”, separando sus nichos en el tiempo. Las microalgas y cianobacterias son organismos que presentan un enorme potencial para la producción sostenible de metabolitos de interés agronómico. Varios estudios revelan que el crecimiento de ambos grupos microbianos y el almacenamiento celular de sus metabolitos (lípidos, carbohidratos, pigmentos, proteínas, fitohormonas, etc.) puede mejorarse significativamente mediante el co-cultivo con bacterias que promueven su crecimiento. El notable aumento de la producción de biomasa y de los compuestos bioactivos como resultado del co-cultivo con bacterias heterótrofas, ha impulsado el estudio de estas interacciones mutualistas, y un ejemplo de ello se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Promoción del crecimiento microalgal de algunos consorcios artificiales de microalgas y bacterias respecto al medio de cultivo empleado. Tabla modificada de González-González y De-Bashan (2021).

Bacteria	Microalga	Promoción del crecimiento	Medio de cultivo
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 2714	11% de aumento de la densidad celular (g dw/L)	Medio N8
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> UTEX 2341	90% de aumento de la densidad celular (g dw/L)	N8-NH <sub>4</sub>
<i>Brevundimonas</i> sp	<i>Chlorella ellipsoidea</i> UTEX 247	Aumento de 50 veces la densidad celular (cel/mL), fase exponencial más larga	BBM modificado
<i>Pelagibaca bermudensis</i> KCTC 13073BP	<i>Tetraselmis striata</i> KCTC1432BP	Aumento de 2 veces la productividad de la biomasa (mg/L/d)	Medio O3
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714	16 y 11% de aumento de la densidad celular (cel/mL) y la tasa de crecimiento, respectivamente	Medio de crecimiento sintético (SGM)
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 2805	40 y 35% de aumento de la densidad celular (cel/mL) y la tasa de crecimiento, respectivamente	Medio de crecimiento sintético (SGM)
<i>Bacillus pumilus</i> ES4	<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714	Aumento de 1,5 veces la densidad celular (cel/mL)	SGM sin N
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Chlorella minutissima</i> UTEX 2341	3,5 veces la productividad de la biomasa (mg/L/d)	N8-NH <sub>4</sub> , 1% Glucosa
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Chlorella minutissima</i> UTEX 2341	3,4 veces la productividad de la biomasa (mg/L/d)	N8-NH <sub>4</sub> , 1% Glicerol
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Chlorella minutissima</i> UTEX 2341	7.2 veces la productividad de la biomasa (mg/L/d)	N8-NH <sub>4</sub> , 1% Acetato
<i>Rhizobium</i> sp. 10II	<i>Ankistrodesmus</i> sp. SP2-15	29% de aumento del peso seco (mg/L)	Medio BG11
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	22, 20 y 18% de aumento en la biomasa (g/L), la tasa de crecimiento y la productividad (mg/L/d), respectivamente	Medio BG11
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 395	Aumento del 62% del tamaño de las células	Aguas residuales sintéticas
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714	Aumento de 3 veces la densidad celular	Aguas residuales sintéticas
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1602	Aumento de 2,2 veces la densidad celular	Aguas residuales sintéticas
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Botryococcus braunii</i>	Aumento del 55% de la densidad óptica	Medio Jaworski modificado
<i>Muricauda</i> sp.	<i>Dunaliella</i> sp.	Aumento del 7% del biovolumen celular	Medio Walne's modificado
<i>Dinoroseobacter shibae</i>	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Aumento del 35% de la densidad celular	SW + medio
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	<i>Stappia</i> sp.	Aumento del 72% de la densidad celular	Medio F/2
<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Isochrysis galbana</i>	Aumento del 52% de la densidad celular	Caldo marino de Zobell
<i>Labrenzia</i> sp.	<i>Isochrysis galbana</i>	Aumento del 71% de la densidad celular	Caldo marino de Zobell



Actualmente, el desarrollo de sistemas sostenibles y rentables que utilicen agentes microbianos promotores del crecimiento vegetal o bien los metabolitos activos derivados de éstos es un área clave de desarrollo en muchas empresas y grupos de investigación relacionados con el sector agrobiotecnológico. El comportamiento positivo, en términos de crecimiento poblacional, de algunas bacterias heterótrofas en consorcio con cianobacterias y microalgas pone de manifiesto la enorme versatilidad metabólica y la capacidad adaptativa de determinadas especies microbianas, no es fácil prever cuan exitoso será un consorcio microbiano establecido de forma artificial. De hecho, para determinar el éxito de estas asociaciones microbianas, es necesario descartar fenómenos de incompatibilidad entre los miembros que la componen, y diseñar de forma adecuada la estrategia de co-cultivo así como el formato de aplicación del consorcio a escala de campo.

## **I.5. Referencias**

- Acién-Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., Fernández-Sevilla, J.M. (2018). Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. *Front. Sustain. Food. Syst.* 2, 10.3389/fsufs.2018.00059.
- Alori, E.T., Dare, M.O., Babalola, O.O. (2017). Microbial inoculants for soil quality and plant health. *Sust. Agric. Rev.* 22, 281–307.
- Alsenani, F., Tupally, K.R., Chua, E.T., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H.S., Schenk, P.M. (2021). Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharm. J.* 28, 1834–1841.
- Anahas, A.M.P.; Muralitharan, G. (2018). Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production. *Energy Convers. Manag.* 157, 423–437.
- Anitha, D., Vijaya, T., Reddy, N.V., Venkateswarlu, N., Pragathi, D., Mouli, K.C. (2013). Microbial endophytes and their potential for improved bioremediation and biotransformation: a review. *Indo Am. J. Pharm. Res.* 3, 6408–6417.
- Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L.V., Govindasamy, V., Bose, P., Ramadoss, D. (2013). PGPR-induced systemic resistance (ISR) in plant disease management. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in agrobiolgy: disease management*, Springer, Berlin, pp. 405–425.
- Arun, K.D., Sabarinathan, K.G., Gomathy, M., Kannan, R., and Balachandar, D. (2020). Mitigation of drought stress in rice crop with plant growth-

- promoting abiotic stress-tolerant rice phyllosphere bacteria. *J. Basic Microbiol.* 60, 768–786.
- Aznar-Sánchez, J.A., Velasco-Muñoz, J.F., García-Arca, D., López-Felices, B. (2020). Identification of opportunities for applying the circular economy to intensive agriculture in Almería (South-East Spain). *Agronomy* 10 (10), 1499.
- Babalola, O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32, 1559–1570.
- Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9, 1473.
- Bajic, D., Sanchez, A. (2020). The ecology and evolution of microbial metabolic strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 62, 123–128.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Aguilar, C.A., (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56 (417), 1761–1778.
- Barriuso, J., Solano, B.R., Lucas, J.A., Lobo, A.P., García-Villaraco, A., Mañero, F.J. (2008). Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *J. Plant Nutri.* 4, 1-7.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S.N., Kalam, S., Sayyed, R.Z., Reddy, M.S., El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent development, constraints, and prospects. *Sustainability* 13, 1140.
- Bermúdez-Sierra, J., Oliveira, M., Seliado, J., Arêdes, M. (2013). Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga *Scenedesmus* sp. *Tumbaga*, 79, 65–79.
- Bernaerts, T.M.M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Kermani, Z.J., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M.E., Van Loey, A.M. (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Res.* 32, 150–161.
- Berry, J.P., Gantar, M., Perez, M.H., Berry, G., Noriega, F.G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Mar. Drugs* 6, 117–146.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327-1350.
- Biondi, N., Cheloni, G., Tatti, E., Decorosi, F., Rodolfi, L., Giovannetti, L., et al. (2017) The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures. *J. Appl. Phycol.* 29, 67–78.
- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodol, F.L., Smith, G.D., Tredici, M.R. (2004). Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3313–3320.

- Biswajita, P., Somanath, B., Srimanta, P., Chhandashree, B., Rabindra, N., MubarakAli, D., Mrutyunjay, J. (2020). Delineation of gamma irradiation (60Co) induced oxidative stress by decrypting antioxidants and biochemical responses of microalga, *Chlorella* sp. *Biocat. Agri. Biotechnol.* 25, 101595.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 30–37.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838.
- Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G., Wright, P.C. (2001). Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57, 9347–9377.
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41.
- Cavaliere, M., Feng, S., Soyer, O.S., Jiménez, J.I. (2017). Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environ. Microbiol.* 19, 2949–2963.
- Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R., Weisskopf, L. (2010). Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant Soil* 329, 1–25.
- Chen, T., Nomura, K., Wang, X., Sohrabi, R., Xu, J., Yao, L., Paasch, B. C., Ma, L., Kremer, J., Cheng, Y., Zhang, L., Wang, N., Wang, E., Xin, X.F., and He, S.Y. (2020). A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature* 580, 653–657.
- Chi, F., Shen, S.H., Cheng, H.P., Jing, Y.X., Yanni, Y.G., Dazzo, F.B. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7271–7278.
- Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M.C., Rouphael, Y. (2018). Renewable sources of plant biostimulation: Microalgae as a sustainable means to improve crop performance. *Front. Plant. Sci.* 9, 1782.
- Chittapun, S., Limbipichai, S., Amnuaysin, N., Boonkerd, R., Charoensook, M. (2018). Effects of using cyanobacteria and fertilizer on growth and yield of rice, Pathum Thani I: a pot experiment. *J. Appl. Phycol.* 30, 79-85.
- Chittora, D., Meena, M., Barupal, T., Swapnil, P., Sharma, K. (2020). Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. *Biochem. Biophys. Rep.* 22, 100737.
- Colla, G., Rouphael, Y. (2015). Biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 39-48.
- Costa, J.A.V., Freitas, B.C.B., Cruz, C.G., Silveira, J., Morais, M.G. (2019). Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. *J. Environ. Sci. Health Part B* 54, 366–375.

- Damalas, C.A., Koutroubas, S.D. (2018). Current status and recent developments in biopesticide use. *Agriculture* 8, 13.
- Dar, S.A., Wani, S.H., Mir, S.H., Showkat, A., Dolkar, T., Dawa, T. (2021). Biopesticides: mode of action, efficacy and scope in pest management. *J. Adv. Res. Biochem. Pharmacol.* 4, 1–8.
- Dawidziuk, A., Popiel, D., Kaczmarek, J., Strakowska, J., Jedryczka, M. (2016). Optimal *Trichoderma* strains for control of stem canker of brassicas: molecular basis of biocontrol properties and azole resistance. *BioControl* 61, 755–768.
- Dittami, S.M., Eveillard, D., Tonon, T. (2014). A metabolic approach to study algal–bacterial interactions in changing environments. *Mol. Ecol.* 23, 1656–1660.
- Dong, C.J., Wang, L.L., Li, Q., Shang, Q.M. (2019). Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS ONE*, 14, e0223847.
- El-Mougy, N.S., Abdel-Kader, M.M. (2013). Effect of commercial cyanobacteria products on the growth and antagonistic ability of some bioagents under laboratory conditions. *J. Pathol.* 838329, 11.
- Enebe, M.C., Babalola, O.O. (2021). Soil fertilization affects the abundance and distribution of carbon and nitrogen cycling genes in the maize rhizosphere. *Amb. Express* 11, 1-10.
- EPA. (2021). Ingredients Used in Pesticide Products: Pesticides. What Are Biopesticides? Available online: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides> (accessed on 10 May 2021).
- Essiedu, J.A., Adepoju, F.O., Ivantsova, M.N. (2020). Benefits and limitations in using biopesticides: A review. *AIP Conference Proceedings* 2313, 080002.
- Fitton, N., Alexander, P., Arnell, N., Bajzelj, B., Calvin, K., Doelman, J., Gerber, J.S., Havlik, P., Hasegawa, T., Herrero, M., Krisztin, T., van Meijl, H., Powell, T., Sands, R., Stehfest, E., West, P.C., Smith, P. (2019). The vulnerabilities of agricultural land and food production to future water scarcity. *Glob. Environ. Change* 8, 101944.
- Frac, M., Hannula, S.E., Belka, M., Jedryczka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Front. Microbiol.* 9.
- García-González, J., Sommerfeld, M. (2016) Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J. Appl. Phycol.* 28,1051–61.
- Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Perez-Trujillo, M., Guenther, A., Llusia, J., Rico, L., Terradas, J., Farre-Armengol, G., Filella, I., Parella, T., and Penuelas, J. (2016). Shifts in plant foliar and floral metabolomes in response to the suppression of the associated microbiota. *BMC Plant Biol.* 16, 78.
- Gong, T., Xin, X.F. (2021). Phyllosphere microbiota: Community dynamics and its interaction with plant hosts. *J. Integr. Plant Biol.* 63, 297–304.

- González-González, L.M., De-Bashan, L.E. (2021). Toward the enhancement of microalgal metabolite production through microalgae–bacteria consortia. *Biology* 10, 282.
- Gupta, V., Ratha, S.K., Sood, A., Chaudhary, V., Prasanna, R. (2013). New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)-prospects and challenges. *Algal Res.* 2, 79–97.
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M.D., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology* 109, 6–16.
- Gwinn, K.D. (2018). Bioactive natural products in plant disease control. In: Attaur, R. (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 56, pp. 229–246.
- Hashem, A., Abd\_Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Egamberdieva, D. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant stress tolerance. In: Egamberdieva, D., Ahmad, P. (Eds.), *Plant Microbiome: Stress Response*, Springer, Singapore, pp. 81–103.
- Jansa, J., Bukovská, P., Gryndler, M. (2013). Mycorrhizal hyphae as ecological niche for highly specialized hypersymbionts – or just soil free-riders? *Front. Plant Sci.* 16, 4–134.
- Joshi, H., Shourie, A., Singh, A. (2020). Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agricultura *Advances in Cyanobacterial Biology*, Academic Press, 385-396.
- Kim, S.J., Ko, E.J., Hong, J.K., Jeun, Y.C. (2018). Ultrastructures of *Colletotrichum orbiculare* in cucumber leaves expressing systemic acquired resistance mediated by *Chlorella fusca*. *Plant Pathol. J.* 34, 113.
- Koffi, K.T., Kumar, S., Sur, D.H., (2018). Extraction of plant nutrients from freshwater algae and their role in sustainable agriculture. *Int. J. Curr. Biotechnol.* 6 (4), 1–8.
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Front. Plant Sci.* 10, 845.
- Kouzuma, A.; Watanabe, K. (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 125–129.
- Kumar, J., Babele, P.K., Singh, D., Kumar, A. (2016). UV-B radiation stress causes alterations in whole cell protein profile and expression of certain genes in the rice phyllospheric bacterium *Enterobacter cloacae*. *Front. Microbiol.* 7, 1440.
- Kumar, V.V. (2018). Biofertilizers and biopesticides in sustainable agricultura. In: Meena, V.S. (Ed.), *Role of rhizospheric microbes in soil*, Volume 1: Stress management and agricultural sustainability, Springer, Singapore, pp. 377–398.
- Lassaletta, L., Billen, G., Garnier, J., Bouwman, L., Velazquez, E., Mueller, N.D., Gerber, J.S. (2016). Nitrogen use in the global food system: past trends and

- future trajectories of agronomic performance, pollution, trade, and dietary demand. *Environ. Res. Lett.* 11, 095007.
- Lee, S.Y., Cho, J.M., Chang, Y.K., Oh, Y.-K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: a review. *Bioresour. Technol.* 244, 1317–1328.
- Leveau, J.H. (2019). A brief from the leaf: latest research to inform our understanding of the phyllosphere microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 49, 41-49.
- Lian, J., Wijffels, R.H., Smidt, H., Sipkema, D. (2018). The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae, *Microb. Biotechnol.* 11(5), 806–818.
- Liu, H., Brettell, L.E., Singh, B. (2020). Linking the phyllosphere microbiome to plant health. *Trends Plant Sci.* 5, 841–844.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 3315–3335.
- Mahmood, A., Turgay, O., Farooq, M., Hayat, R. (2016). Seed *biopriming* with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw112.
- Mandal, B., Vlek, P.L.G., Mandal, L.N. (1999) Beneficial effects of bluegreen algae and *Azolla*, excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: a review. *Biol. Fertil. Soils* 28, 329–342.
- Manjunath, M., Kanchan, A., Ranjan, K., Venkatachalam, S., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Hossain, F., Nain, L., Shivay, Y.S., Rai, A.B., Singh, B. (2016) Beneficial cyanobacteria and eubacteria synergistically enhance bioavailability of soil nutrients and yield of okra. *Heliyon* 2, e00066.
- Manjunath, M., Prasanna, R., Sharma, P., Nain, L., Singh, R. (2011). Developing PGPR consortia using novel genera *Providencia* and *Alcaligenes* along with cyanobacteria for wheat. *Archives of Agronomy and Soil Science* 57 (8), 873–887.
- Mattos, K.A., Padua, V.L., Romeiro, A., Hallack, L.F., Neves, B.C., Ulisses, T.M., Barros, C.F., Todeschini, A.R., Previato, J.O., Mendonca-Previato, L. (2008). Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *An. Acad. Bras. Cienc.* 80, 477–493.
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., 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. *J. Basic Microbiol.* 60, 828–861.
- Mehta, K.K., Evitt, N.H., Swartz, J.R. (2015). Chemical lysis of cyanobacteria. *J. Biol. Eng.* 9, 10.
- Michalak, I., Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Eng. Life Sci.* 14, 581–591.

- Michalak, I., Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* 15, 160–176.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Saeid, A. (2017). Plant growth biostimulants, dietary feed supplements and cosmetics formulated with supercritical CO<sub>2</sub> algal extracts. *Molecules* 22 (1), 66.
- Michalak, I., Górka, B., Wieczorek, P.P., Rój, E., Lipok, J., Łęska, B., Messyasz, B., Wilk, R., Schroeder, G., Dobrzyńska-Inger, A., Chojnacka, K. (2015). Supercritical fluid extraction of algae enhances levels of biologically active compounds promoting plant growth. *Eur. J. Phycol.* 51, 243–252.
- Mishra, U., Pabbi, S. (2004). Cyanobacteria: a potential biofertilizer for rice. *Resonance J. Sci. Education* 9, 6-10.
- Mógor, Á.F., Ördög, V., Lima G.P.P., Molnár, Z., Mógor, G. (2018). Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *J. Appl. Phycol.* 30, 453–460.
- Múnera-Porras, L.M., García-Londoño, S., Ríos-Osorio, L.A. (2020). Action mechanisms of plant growth promoting cyanobacteria in crops in situ: a systematic review of literature. *Int. J. Agron.* 2020, 2690410.
- Mutale-joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S., Zeroual, Y., El Arroussi, H. (2020). Screening of microalgae liquid extracts for their biostimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum L.* *Sci. Rep.* 10, 2820.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., Van Staden, J., Szigeti, J., Németh, L. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary. *J Appl. Phycol.* 16 (4), 309-314.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Takács, G., Pöthe, P., Illés, A., Bojtor, C., Széles, A., Tóth, B., van Staden, J., Nagy, J. (2021). Plant biostimulating effects of the cyanobacterium *Nostoc piscinale* on maize (*Zea mays L.*) in field experiments. *S. Afr. J. Bot.* 140,153–160.
- Osman, M.E.H., El-Sheekh, M.M., El-Naggar, A.H., Gheda, S.F. (2010). Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biology and Fertility of Soils* 46 (8), 861–875.
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., Steppe, T.F. (2000). Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ. Microbiol.* 2, 11-26.
- Pandey, S., Gupta, S., Ramawat, N. (2019). Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech* 9(7), 277.
- Panou M, Gkelis S (2020) Cyano-assassins: widespread cyanogenic production from cyanobacteria, bioRxiv.
- Pascual, J.A. (2016). The use of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in combination with *Trichoderma* spp. in sustainable agriculture. In: Arora, N., Mehnaz, S.,

- Balestrini, R. (Eds), *Bioformulations: For sustainable agricultura*, Springer, India, pp. 137–146.
- Pedraza, R., Teixeira, K.R., Fernández-Scavino, A., García de Salomone, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani-Divan, V.L., Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 11, 155-164.
- Pham, T.L., Nguyen, L.T.T., Duong, T.A., Bui, D.T.T., Doan, Q.T., Nguyen, H.T.T., Mundt, S. (2017). Diversity and bioactivities of nostocacean cyanobacteria isolated from paddy soil in Vietnam. *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 470–481.
- Pilet-Nayel, M.L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.C., Fournet, S., Durel, C.E., Delourme, R. (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Front. Plant Sci.* 8, 1838.
- Prabha, R., Singh, D.P., Yadav, S.K. (2019). Seed *biopriming* with potential microbial inoculants as sustainable options for stress management in crops. In: Singh, D., Prabha, R. (Eds), *Microbial interventions in agriculture and environment*, Springer, Singapore, pp. 211–224.
- Prasanna, C.B., Jaiswal, D., Davis, R., Wangikar, P.P. (2018). An improved method for extraction of polar and charged metabolites from cyanobacteria. *PLoS One* 13, e0204273.
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., Shivay, Y. S., Nain, L. (2012). Influence of co-inoculation of bacteria- cyanobacteria on crop yield and C- N sequestration in soil under rice crop. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (3), 1223-1235.
- Preininger, C., Sauer, U., Bejarano, A., Berninger, T. (2018). Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7265–7282.
- Pretty, J. (2018). Intensification for redesigned and sustainable agricultural systems. *Science* 362, 6417.
- Priyadarshani, I., Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – a review. *J. Algal Biomass Utiln.* 3 (4), 89-100.
- Puglisi, I., Barone, V., Sidella, S., Coppa, M., Broccanello, C., Gennari, M., Baglieri, A. (2018). Biostimulant activity of humic-like substances from agro-industrial waste of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Eur. J. Phycol.* 53, 433–442.
- Rai, A.N., Singh, A.K., Syiem, M.B. (2019). Plant growth-promoting abilities in cyanobacteria. In: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (Eds.), *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*, Elsevier Inc., pp. 459-476.
- Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M., Kim, H.S. (2016). Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol. Adv.* 34, 14–29.



- Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y.S., Nain, L. (2012). Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *Eur. J. Soil Biol.* 50, 118–126.
- Ranglová, K., Lakatos, G.E., Câmara Manoel, J.A., Grivalský, T., Suárez-Estrella, F., Acién-Fernández, F.G., Molnár, Z., Ördög, V., Masojídek, J. (2021). Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 *Chlorella* strain cultivated outdoors in inorganic medium and wastewater. *Algal Res.* 53, 102136.
- Rehman, F.U., Kalsoom, M., Adnan, M., Toor, M.D., Zulfiqar, A. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria and their mechanisms involved in agricultural crop production: A Review. *SunText Rev. Biotechnol.* 1(2), 1-6.
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P., Bux, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol. Adv.* 36, 1255–1273.
- Rodríguez, A.A., Stella, A.A., Storni, M.M., Zulpa, G., Zaccaro, M.C. (2006). Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in *Oryza sativa* L. *Saline System* 2, 7.
- Rojas, V.; Rivas, L.; Cárdenas, C.; Guzmán, F. (2020). Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as emerging sources of antibacterial peptides. *Molecules* 25, 5804.
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., Tava, A. (2019). Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agron J.* 9 (4), 146–163.
- Roy, B.A., Kirchner, J.W. (2000). Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution* 54, 51–63.
- Saadatnia, H., Riahi, H. (2009). Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant Soil Environ.* 55, 207–212.
- Samarasinghe, N., Fernando, S., Faulkner, B. (2012). Effect of high pressure homogenization on aqueous phase solvent extraction of lipids from *Nannochloris Oculata* microalgae. *J. Ener. Nat. Res.* 1, 1–7.
- Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F.I., Santos-Villalobos, S.D.L., Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R. (2021). Plant growth stimulation by microbial consortia. *Agronomy* 11(2), 219.
- Sarker, M.N.I. (2017) An introduction to agricultural anthropology: Pathway to sustainable agriculture. *J. Sociol. Anthropol.* 1, 47-52.
- Savci, S. (2012). Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. *APCBEE Procedia* 1, 287–292.
- Schoebitz, M., López, M.D., Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 751–765.

- Singh, J.S., Kumar, A., Rai, A.N., Singh D.P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front. Microbiol.* 7, 529.
- Singh S.P., Sinha R.P., Daiker V, Häder D-P. (2010). Quantitative and qualitative extraction of RNA from a filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *J Appl Phycol.* 22, 113–116.
- Sinno, M.; Ranesi, M.; Gioia, L.; d’Errico, G.; Woo, S.L. (2020). Endophytic fungi of tomato and their potential applications for crop improvement. *Agriculture* 10, 587.
- Sponsler, D.B., Grozinger, C.M., Hitaj, C., Rundlöf, M., Botías, C., Code, A., Lonsdorf, E.V., Melathopoulos, A.P., Smith, D.J., Suryanarayanan, S., Thogmartin, W.E., Williams, N.M., Zhang, M., Douglas, M.R. (2019). Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. *Sci. Total Environ.* 662, 1012–1027.
- Stirk, W.A., Bálint, P., Vambe, M., Lovász, C., Molnár, Z., van Staden, J., Ördög, V. (2020) Effect of cell disruption methods in the extraction of bioactive metabolites from microalgal biomass. *J. Biotechnol.* 307, 35–43.
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2012) Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios. *Biores. Technol.* 105, 67–73.
- Sugiyama, A. (2019). The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes, and beyond—A review. *J. Adv. Res.* 19, 67– 73.
- Supraja, K., Behera B., Balasubramanian P. (2020). Efficacy of microalgal extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. *Ind. Crops Prod.* 151, 112453.
- Svidritskiy, E., Ling, C., Ermolenko, D.N., Korostelev, A.A. (2013). Blastocidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 12283–12288.
- Swain, S.S., Paidesetty, S.K., Padhy, R.N. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomed. Pharmacother.* 90, 760–776.
- Swarnalakshmi, K., Dhar, D.W., Senthilkumar, M., Singh P.K. (2013). Comparative performance of cyanobacterial strains on soil fertility and plant growth parameters in rice. *Vegetos* 26, 227-236.
- Tarakhovskaya, E.R., Maslov, Y.I., Shishova, M.F. (2007). Phytohormones in Algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54 (2), 163–170.
- Thajuddin, N., Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential application in biotechnology. *Curr. Sci.* 89, 47–57.
- Tiam, S.K., Comte, K., Dalle, C., Duval, C., Pancrace, C., Gugger, M., Marie, B., Yéprémian, C., Bernard, C. (2019). Development of a new extraction method based on high-intensity ultra-sonication to study RNA regulation of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix*. *PLoS ONE* 14, e0222029.

- Tkacz, A., Bestion, E., Bo, Z., Hortala, M., Poole, P.S. (2020). Influence of plant fraction, soil, and plant species on microbiota: A multikingdom comparison. *mBio* 11, e02785–02719.
- Toribio, A.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J. (2021a). Seed *biopriming* with cyanobacterial extracts as an eco-friendly strategy to control damping off caused by *Pythium ultimum* in seedbeds. *Microbiol. Res.* 248, 126766.
- Toribio, A.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Martínez-Gallardo, López, M.J. (2021b). Application of sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae for the mitigation of bacterial canker in tomato seedlings. *J. Appl. Phycol.* 288, 10.1007/s10811-021-02599-6
- Tripathi, S., Srivastava, P., Devi, R.S., Bhadouria, R. (2020). Influence of synthetic fertilizers and pesticides on soil health and soil microbiology. In: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation: Pesticides and Chemical Fertilisers*, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 25–54.
- Tuncil, Y.E., Xiao, Y., Porter, N.T., Reuhs, B.L., Martens, E.C., Hamaker, B.R. (2017). Reciprocal prioritization to dietary glycans by gut bacteria in a competitive environment promotes stable coexistence. *mBio*. 8, e01068–17.
- Tyagi, S.; Naresh, R.K.; Prakash, S.; Yadav, G.; Tiwari, S.; Rawat, B.; Tiwari, S.; Joshi, A.; Tyagi, A.; Sharma, N. (2019). Conservation agriculture, biofertilizers and biopesticides: A holistic approach for agricultural sustainability and food security: A review. *Int. J. Chem. Stud.* 7, 3036–3046.
- Ulloa-Ogaz, A.L., Muñoz-Castellanos, L.N., Nevárez-Moorillón, G.V. (2015). Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as a mechanism of control. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances, and Educational Programs*, Formatex Research Center, Badajoz, Spain, pp. 305–309.
- Umesha, S., Singh, P.K., Singh, R.P. (2018). Microbial biotechnology and sustainable agricultura. In: Singh, R.L., Mondal, S. (Eds.), *Biotechnology for Sustainable Agriculture*, Woodhead Publishing, Elsevier, Cambridge, UK, pp. 185-205.
- Velten, S., Leventon, J., Jager, N., Newig, J. (2015). What is sustainable agriculture? A systematic review. *Sustainability* 7, 7833-7865.
- Viswanathan, T., Mani, S., Das, K.C., Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Singh, R.K., Singh, M. (2012). Effect of cell rupturing methods on the drying characteristics and lipid compositions of microalgae. *Bioresour. Technol.* 126, 131–6.
- Vogel, C., Bodenhausen, N., Gruissem, W., Vorholt, J.A. (2016). The *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health. *New Phytol.* 212, 192–207.

- Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D., Stefani, E., 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (4), 952.
- Xiong, W., Guo, S., Jousset, A., Zhao, Q., Wu, H., Li, R., Kowalchuk, G.A., Shen, Q. (2017). Bio-fertilizer application induces soil suppressiveness against *Fusarium* wilt disease by reshaping the soil microbiome. *Soil Biol. Biochem.* 114, 238–247.
- Yadav, A.N., Verma, P., Kumar, S., Kumar, V., Kumar, M., Kumari Sugitha, T.C., Singh, B.P., Saxena, A.K., Dhaliwal, H.S. (2018). Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In: Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Amsterdam, pp. 13-41.
- Yadavalli, R., Heggers, G.R.V.N. (2013). Two stage treatment of dairy effluent using immobilized *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 11, 1–6.
- Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Yakhin, I.A., Brown, P.H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 7, 2049.
- Yanti, Y., Hamid, H., Reflin 2021. Development of the PGPR and Cyanobacteria Consortium for Growth Promotion and Control *Ralstonia syzigii* subsp. *indonesiensis* of Tomato. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 709, 012085.
- Zahra, Z.; Choo, D.H.; Lee, H.; Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments* 7, 13.
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., Dou, C. (2011). Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164 (7), 1215–1224.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## II. Hipótesis y Objetivos

Los beneficios derivados de las interacciones raíz-microorganismo, representan una solución sostenible y prometedora en términos agronómicos, por lo que no es de extrañar que en las últimas décadas se haya visto incrementado notablemente el uso de biofertilizantes. Este hecho se debe, fundamentalmente, al menor impacto ambiental que genera tanto su obtención como su aplicación, así como por su capacidad para generar sinergias positivas entre los microorganismos que habitan en los suelos donde se incorporan.

Entre los distintos tipos de biofertilizantes conocidos, las fórmulas basadas en organismos fotosintéticos, incluidos microalgas y cianobacterias, están cobrando importancia por su gran contribución, especialmente al mantenimiento de la fertilidad del suelo y a la mejora del rendimiento de los cultivos. Su presencia en suelos determina la composición y fertilidad de éstos, mediante la liberación de sustancias promotoras del crecimiento vegetal o con efecto antagonista, frente a agentes patógenos de plantas, principalmente, bacterias, hongos y nemátodos. Además, la producción de compuestos bioactivos con diferentes aplicaciones, por parte de este grupo microbiano, incrementa el interés por el aislamiento e identificación de nuevas especies potencialmente útiles en agricultura.

Teniendo en cuenta las numerosas ventajas que pueden derivarse del uso de cianobacterias en agricultura se plantean las siguientes hipótesis de partida:

- En primer lugar, aunque la capacidad biofertilizante o fitoestimulante de las cianobacterias se encuentra ampliamente descrita en literatura científica, con este proyecto de Tesis se pretende establecer la existencia de un estrecho límite entre lo que sería un efecto beneficioso para la planta por parte de algunas cianobacterias, y el efecto fitotóxico que en ocasiones deriva de la aplicación de dosis de inóculo inadecuadas.
- Por otro lado, a pesar de que las capacidades como biofertilizantes y biopesticidas de las cianobacterias se describen generalmente como propiedades independientes (no vinculadas necesariamente), se plantea la existencia de una estrecha relación entre ambos caracteres, ya que la biofertilización y fitoestimulación podrían influir, de forma directa o

indirecta, sobre la capacidad de las plantas para defenderse del ataque de patógenos vegetales.

- Otra de las hipótesis planteadas en este trabajo se basa en determinar si la técnica de *biopriming* en semillas, podría ser llevada a la práctica a partir de extractos de cianobacterias, teniendo como finalidad la fitoestimulación y fitoprotección de plántulas a corto-medio plazo.
- Finalmente, se plantea la posibilidad de que el efecto fitoestimulante de las cianobacterias pueda verse potenciado (efecto sinérgico) mediante el establecimiento de consorcios con otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPMs) o si, por el contrario, dicho efecto podría disminuir o incluso verse anulado por completo.

A la vista de las Hipótesis planteadas, el Objetivo General de este trabajo de Tesis se centró en la selección de un grupo de cianobacterias procedentes de hábitats terrestres y acuáticos, para ser aplicadas como agentes biofertilizantes, fitoestimulantes y fitoprotectores, bien en forma de extractos sonicados, o bien en forma de consorcios microbianos, junto con otras rizobacterias heterótrofas de vida libre. Este Objetivo General se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

**Objetivo 1.** Establecimiento de una colección de cianobacterias típicas de hábitats terrestres y acuáticos, a partir de Colecciones de Cultivo de reconocido prestigio nacional e internacional, y obtención de extractos acuosos mediante sonicación.

**Objetivo 2.** Evaluación de la capacidad de los extractos procedentes de cianobacterias para promover la elongación y peso radicular en estados tempranos del desarrollo vegetal, así como para producir fitohormonas y otras sustancias bioactivas de interés agronómico.

**Objetivo 3.** Estudio del efecto fitoprotector de los extractos de la colección de cianobacterias frente al *damping-off* causado por *Pythium ultimum* en semilleros de pepino, mediante la aplicación de la técnica de *biopriming*.

**Objetivo 4.** Evaluación de la influencia del método de aplicación de los extractos de cianobacterias, sobre el control de los daños producidos por la bacteria patógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (cancro del tomate) en plántulas de tomate.

**Objetivo 5.** Diseño y aplicación de consorcios de cianobacterias y rizobacterias heterótrofas de vida libre para la promoción del crecimiento en plántulas de tomate.



**DISEÑO EXPERIMENTAL**

### III. Diseño Experimental

El Diseño Experimental que se describe en el Esquema 1 se inició con la obtención de una colección de cepas de cianobacterias procedentes de Colecciones de cultivo de reconocido prestigio nacional e internacional. En el contexto del proyecto europeo enmarcado en el programa H2020 de la Unión Europea (Proyecto SABANA, nº 727874), las colecciones MACC (Széchenyi István University, Mosonmagyaróvár, Hungría) y BEA (Banco Español de Algas, Las Palmas de Gran Canaria) de cianobacterias y microalgas de hábitats terrestres y acuáticos, sirvieron de base para la selección de las cepas que fueron utilizadas para la consecución de los objetivos propuestos. En todos los casos, las cepas fueron proporcionadas en formato liofilizado.

Por otro lado, en el Esquema 1 se muestra de forma integrada cuáles fueron las dos líneas principales de trabajo que permitieron dar alcance a los objetivos previamente planteados. Aunque ambas líneas se abordaron casi de forma paralela, en la primera de ellas se evaluó de forma prioritaria el efecto biofertilizante y bioestimulante de las cepas de la colección de trabajo, mientras que la segunda línea estuvo centrada en la selección de cepas que mostraran capacidad fitoprotectora frente a patógenos de enorme incidencia en el sureste peninsular. El trabajo realizado ha derivado, finalmente, en la publicación de 3 artículos de investigación en revistas internacionales con un elevado índice de impacto (dos de ellas ubicadas dentro del primer cuartil), y un 4º artículo que se encuentra actualmente en preparación.

A continuación, se indica de forma breve la vinculación entre los Objetivos propuestos y los resultados que, hasta el momento, han sido ya publicados, o se encuentran en revisión.

Si bien el **Objetivo 1** no puede considerarse realmente como tal, si es cierto que supone una etapa imprescindible para la consecución de los objetivos siguientes. El Objetivo 1 no sólo hace referencia al establecimiento de la colección inicial de cianobacterias, sino también a la estandarización del método de sonicación que sirvió como base para la obtención de los extractos que se ensayaron posteriormente (**Artículos 1, 2 y 3**).

Para la consecución del **2º Objetivo** de este trabajo de Tesis, se analizó en primer lugar, la producción de sustancias o actividades relacionadas con la estimulación del desarrollo de las plantas, como es el caso del ácido salicílico, citoquininas y sideróforos, así como la capacidad para solubilizar fosfatos. Por otra parte, también se determinó el índice de germinación de cada cepa en semillas de berro, lo que permitió descartar aquellas con efecto fitotóxico y, por último, se evaluó el efecto promotor del crecimiento vegetal bajo condiciones controladas en plántulas de pepino (**Artículo 1**).

La ejecución del **3º Objetivo** se inició con la comprobación del efecto fitotóxico o fitoestimulante de los extractos de cianobacterias sobre la germinación de semillas de berro. Posteriormente se examinó la eficacia *in vitro* de diferentes cepas de cianobacterias sobre la inhibición del crecimiento micelial de *P. ultimum*, utilizando la técnica del doble cultivo (*dual culture*), así como mediante bioensayos en hojas cortadas de pepino. Se investigó finalmente el efecto fitoprotector *in vivo* de los extractos de las cianobacterias seleccionadas mediante un ensayo de *biopriming* en semillas de pepino (**Artículo 2**).

El **4º Objetivo** del trabajo se abordó mediante la aplicación de diversos protocolos *in vitro*, que sirvieron para determinar el potencial antagonista de los extractos frente a la bacteria fitopatógena así como para descartar problemas de fitotoxicidad. Por otro lado, a partir de los extractos más efectivos, se llevó a cabo un tratamiento preventivo en plantas de tomate mediante riego radicular y pulverización foliar (**Artículo 3**).

Para la consecución del **5º y último objetivo** se llevó a cabo un diseño artificial a escala de laboratorio de varias combinaciones de dos miembros (cianobacteria-rizobacteria heterótrofa de vida libre). Solo algunas de las combinaciones, aquellas que mostraron ser compatibles *in vitro*, fueron posteriormente aplicadas *in planta* con el objeto de determinar sus bondades como agentes fitoestimulantes (**Artículo 4**).

Esquema 1. Diseño Experimental



**RESULTADOS**

## IV. Resultados

A continuación, se muestran los manuscritos correspondientes a los cuatro artículos que componen esta Memoria de Tesis. Dos de ellos publicados en revistas Q1 de la lista JCR, un tercero publicado en revista Q1 de la lista SJR, y el último, aún pendiente de publicación. Todos ellos recopilan los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Para ser incluídos en este documento, se han tenido en cuenta las normas de autor de cada una de las revistas en las que han sido publicados.

ARTÍCULO 1: Toribio, A.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J. (2020). **Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents.** Biotechnol. Rep. 26, e00449.

ARTÍCULO 2: Toribio, A.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J. (2021). **Seed *biopriming* with cyanobacterial extracts as an eco-friendly strategy to control *damping off* caused by *Pythium ultimum* in seedbeds.** Microbiol. Res. 248, 126766.

ARTÍCULO 3: Toribio, A.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Martínez-Gallardo, López, M.J. (2021). **Application of sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae for the mitigation of bacterial canker in tomato seedlings.** J. Appl. Phycol. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02599-6>.

ARTÍCULO 4: Toribio, A.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., López-González, J.A., Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J. (2021). **Design and validation of cyanobacteria-rhizobacteria consortia for tomato seedlings growth promotion.** J. Biotechnol.(enviado)



# Artículo 1

## ARTÍCULO I

### **Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents**

A.J. Toribio, F. Suárez-Estrella\*, M.M. Jurado, M.J. López, J.A. López-González, J. Moreno.

Publicado en *Biotechnology Report*, 26 (2020), e00449.

**Resumen:** En este trabajo se clarifican algunas de las sustancias implicadas en el efecto bioestimulante mostrado por 28 cianobacterias aisladas de diferentes medios acuáticos. La producción de ácido salicílico, citoquininas, sideróforos y solubilización de fosfatos se analizaron *in vitro*, así como el efecto fitoestimulante/efecto fitotóxico en las semillas de berro a dos concentraciones diferentes de extracto (0,5 y 0,2 mg mL<sup>-1</sup>). Las cianobacterias promotoras del crecimiento vegetal más destacadas se verificaron *in vivo* a dos dosis diferentes (0,5 y 0,1 mg mL<sup>-1</sup>). El 21,4 % y el 7,1 % de las cepas probadas produjeron sideróforos o solubilización de fosfatos, respectivamente. La producción de ácido salicílico fue destacada por las cepas *Calothrix* SAB-B797, *Nostoc* SAB-B1300 y *Nostoc* SAB-M612, mientras que *Nostoc* SAB-M251 y *Trichormus* SAB-M304 fueron notables en cuanto a la producción de citoquinina. Los valores más altos de germinación se produjeron cuando los extractos se aplicaron en dosis bajas (0,5 mg. mL<sup>-1</sup>). *Nostoc* SAB-M612 provocó la estimulación del crecimiento aéreo y crecimiento radicular en las plántulas de pepino.

**Palabras clave:** Sustancias bioactivas, sideróforos, ácido salicílico, citoquininas



**Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their  
application as potential phytostimulating agents**

A.J. Toribio, F. Suárez-Estrella\*, M.M. Jurado, M.J. López, J.A. López-  
González, J. Moreno

Department of Biology and Geology, CITE II-B, University of Almería, ceiA3,  
CIAIMBITAL, 04120, Almería, Spain

\*Corresponding author: Phone: 00 34 950 015 891; Fax: 00 34 950 015 476; E-  
mail: [fsuarez@ual.es](mailto:fsuarez@ual.es) (F. Suárez-Estrella)

**Abstract**

This work clarifies some of the substances involved with the biostimulant effect shown by 28 cyanobacteria isolated from different aquatic environments. The production of salicylic acid, cytokinins, siderophores and phosphate solubilization were analyzed *in vitro*, as well as the phytostimulant/phytotoxic effect on watercress seeds at two different extract concentrations (0.5 and 0.2 mg mL<sup>-1</sup>). The most prominent plant growth promoting cyanobacteria were verified *in vivo* at two different doses (0.5 and 0.1 mg mL<sup>-1</sup>). 21.4 % and 7.1 % of the tested strains produced siderophores or phosphate solubilization, respectively. The production of salicylic acid was stood out for the strains *Calothrix* SABB797, *Nostoc* SAB-B1300 and *Nostoc* SAB-M612, while *Nostoc* SAB-M251 and *Trichormus* SAB-M304 were noticeable regard to cytokinin production. The highest values of germination occurred when the extracts were applied in low dose (0.5 mg mL<sup>-1</sup>). *Nostoc* SAB-M612 provoked the stimulation of aerial and radicular growth in cucumber seedlings.

**Keywords:** Bioactive substances, Siderophores, Salicylic acid, Cytokinins

## 1. Introduction

At present, due to the increase of the world population and the environmental damages caused by the rapid industrialization, there is a greater demand for food. To meet this requirement, the world needs to significantly improve agricultural productivity in a sustainable and ecological way, since the increase in cultivable land is unfeasible. Therefore, many of the existing agricultural practices must be replaced, as is the case of pesticides and chemical promoters of plant growth. Currently, the best alternative to these harmful crop management has been the use of plant growth promoting bacteria (PGPB). Traditionally, rhizospheric bacteria [1] and symbiotic rhizobia [2] have been highlighted as PGPB agents. However, in recent years, cyanobacteria have attained great importance due to the fact that they have not only been classified as beneficial bio-agents based on their capability to produce biomass for bio-fuels, food supplements (super foods), and biofertilizers for safe agriculture, but also for their role in regulating plant productivity [3]. In fact, cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes, exceptionally well adapted to a wide array of environments [4]. These organisms have been reported to be beneficial for soil fertility and crop production, because of their ability to fix atmospheric nitrogen, solubilize phosphate and produce plant growth regulators. This type of bacteria releases varied amounts of phytohormones (auxins, gibberellins, cytokinins), polypeptides, amino acids [5], polysaccharides [6] and siderophores [7], for the growth and development of plants, together with ammonia and small nitrogenous polypeptides during the active cell growth, as well as other secondary metabolites after death and decomposition [8]. These types of substances have been described as important factors with stimulating effects in plants [9].

Logically, the approach of a new form of doing agriculture, named as Good Agricultural Practices (GAP), involves the knowledge of the communications between the plants and the microorganisms of their environment (rhizosphere and phyllosphere) [10,11]. For that reason, cyanobacteria are gaining importance as biofertilizers [12], which implies reducing the polluting effects of synthetic fertilizers in favor of an agricultura that is environmentally friendly and economically viable [13]. Last decades, beneficial effects of cyanobacterial inoculation have been reported in different crops, especially for cereals [14] but

only few studies have characterized the chemical constituents responsible for plant growth promotion.

The general aim of this work was to study the potential of a group of 28 cyanobacteria, isolated from different aquatic environments, as plant growth promoter clarifying the potential biostimulant substances involved. In order to carry out this study, the following goals were established: (i) to analyse the production of biotic factors related to plant stimulation, such as phosphate solubilization, salicylic acid, cytokinins and siderophores; (ii) to determine the germination index of each strain, which will allow to discard those with phytotoxic effect and (iii) to evaluate the plant growth promoting effect *in planta* under controlled conditions using cucumber plants. This work could provide relevant information on the role of cyanobacteria as significant biostimulant agents to promote environmentally sustainable agricultural practices, especially in horticultural systems.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Cyanobacteria collection and preparation of extracts**

A total of 28 cyanobacteria strains isolated from freshwater and sea were studied in this work (Table 1). All of them were supplied in lyophilized form from two recognized culture collections: Mosonmagyaróvár Algal culture collection (MACC) and Spanish Bank of Algae (SBA).

To carry out all the *in vitro* and *in vivo* tests, lyophilized biomass was subjected to a quick sonication process (Branson Sonicator 150, Amplitude 40 %, 30 s), in order to obtain aqueous extracts at different concentrations (see later sections). In order to eliminate particles in suspension, extracts were precipitated after sonication at 1000 rpm during 5 min.

### **2.2. *In vitro* Production of bioactive substances**

The protocol used for the detection of siderophores (Sid) was a modified method of Schwyn and Neilands [15]. The sonicated extracts of cyanobacteria, at concentrations of 10 mg mL<sup>-1</sup> (DM: dry matter), were inoculated in culture medium prepared with the following components (composition per liter): Chrome Azurol S, 60.5 mg; Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA), 72.9 mg; Pipes, 30.24 mg;

Agar, 15 g. The medium was adjusted to pH 7.2 before the addition of 10 mL of 1 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O solution. After 14 days of incubation at 30 °C the presence of siderophores was detected by a change of color from blue to brown-orange.

Phosphate solubilization (P-sol) activity was demonstrated by growing the strains in culture medium containing 2.5 % tricalcium phosphate. A zone of clearance of the medium was detected in the case of phosphate solubilizing colonies after 14 days of incubation at 30 °C [16].

Quantification of salicylic acid (Sal) and cytokinins (Cyt) was performed from sonicated extracts of cyanobacteria prepared at the concentration of 100 mg mL<sup>-1</sup> and 25 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. The quantification of both phytohormones was carried out by immunodiagnostic tests (Plant Cytokinin CYT ELISA Kit, MyBiosource MBS269996; Plant Salicylic acid SA ELISA Kit, MyBiosource MBS9314138). The absorbance of the samples was finally carried out at a wavelength of 450 nm, in a Thermo Scientific Multiskan FC spectrophotometer.

### 2.3. Germination index bioassays

The phytotoxic effect of the extracts of cyanobacteria was verified in 100 watercress seeds at concentrations of 2 and 0.5 mg mL<sup>-1</sup> (DM: dry matter), by the technique described by Zucconi et al. [17]. The germination index calculation was made taking into account the percentage of germination of the seeds and the lengthening of the radicles, based on the following formula:

$$GI = (GSs\% * REs) / (GSdw\% * REDw)$$

Where:

GI: Germination Index

GSs%: percentage of germinated seed in the presence of the sonicated sample

GSdw%: percentage of germinated seed in the presence of distilled water

REs: mean of radicle elongation (mm) in the presence of the sonicated sample

REDw: mean of radicle elongation (mm) in the presence of distilled water

#### **2.4. *In vivo* evaluation of phytostimulant activity**

The best strains of cyanobacteria selected from the previous experiments were analysed *in vivo*. The objective in this case was to determine its potential as growth promoting agents in cucumber seedlings. A randomized experimental design consisting of 2 treatments at different concentrations of extract, 0.5 and 0.1 mg mL<sup>-1</sup> (DM: dry matter), was established. 1 L of each extract subjected to ultrasound was prepared to irrigate 30 cucumber seedlings placed in pots with a standard mixture prepared from organic substrate and vermiculite (ratio 3: 1 v / v). A set of cucumber seedlings was used as a control experiment (noninoculated plants). Plants were kept in a greenhouse at a controlled temperature of 25 ± 1° C and a photoperiod of 12 h. After 40 days, the effect of the phytostimulants was evaluated, as described previously [18]. Parameters measured to evaluate the promoter effect *in vivo* were stem and root length, stem diameter, ratio root / stem, leaf number and fresh weight.

#### **2.5. Statistical analyses**

The data obtained was subjected to statistical analysis using the Statgraphics Centurion XVII program. The selection of the best phytostimulant strains was carried out by applying a multivariate analysis of variance (ANOVA) and a Fisher multiple comparison test (least significant difference test) at P < 0.05. A linkage between groups was used as a grouping method for the variables analysed *in vitro*. The interval measured in this case was the Euclidean distance squared. In addition, principal components were analysed to identify similarities or differences between the best strains, as well as groups of closely related variables. Finally, both *in vitro* and *in vivo* variables were correlated by calculating the Pearson correlation coefficient.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. *In vitro* bioprospection of plant growth promoting cyanobacteria**

##### *3.1.1. Production of siderophores, phosphate solubilization, salicylic acid and cytokinins*

All the cyanobacteria were tested to detect the presence of different metabolites or capacities of agronomic interest. By one hand, production of siderophores and phosphate solubilization were investigated by qualitative protocols. Table 1 shows

that 21.4 % and 7.1 % of the strains were capable to produce siderophores or solubilize phosphate, respectively. The diversity of the cyanobacteria capable of producing siderophores was noticeable while only 2 strains of *Nostoc* spp. (SAB-M661 and SAB-M683) were described as phosphate solubilizing. However, other *Nostoc* strains did not show this capability (SAB-B1300, SAB-M132, SAB-M150, SAB-M189, SAB-M251 and SAB-M612), therefore phosphate solubilizing is independent from the genera and it could be probably a subspecific character.

Siderophores are organic compounds produced by microorganisms which help to chelate ferric iron under iron deficient conditions, and make them available to the microbes and plants [19]. It has been described that cyanobacterial species such as *Anabaena flos-aquae* and *Anabaena cylindrica* have the ability to produce siderophores for chelating micronutrients such as Fe or Cu [20,21]. In this work, several strains of *Anabaena* spp. were capable of producing siderophores, though other genera were also involved in this phenomena such as *Cyanobacteria*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Synechococcus* and *Trichormus* (Table 1).

It has been traditionally considered that cyanobacteria could remove available phosphorus in soil by incorporating it into cell constituents or by absorbing it in excessive amounts, and then gradually releasing it to plants by exudation, autolysis or microbial decomposition of dead cells [21]. Some authors have described that cyanobacteria are able to store polyphosphate bodies to overcome short periods of P-starvation. Polyphosphate granules are used as an intracellular P-reserve and are generally present in exponentially growing cells under P-rich conditions. They can accumulate at high levels in N<sub>2</sub>-fixing cells and degrade in P-deficient cells [22]. More recently, it has also been suggested that cyanobacteria can improve the bioavailability of phosphorus to the plants by solubilizing and mobilizing the insoluble organic phosphates present in the soil with the help of phosphatase enzymes [23].

Regarding the production of phytohormone like-bioactive substances, several strains highlighted due to the production of salicylic acid and cytokinins (Table 1). Strains named *Calothrix* SAB-B797, *Nostoc* SAB-B1300 and *Nostoc* SAB-M612 were noticeable in relation to the production of salicylic acid, while *Nostoc* SAB-M251 and *Trichormus* SAB-M304 produced the most quantities of cytokinins.

**Table 1.** Prospection of cyanobacteria producing siderophores, salicylic acid, cytokinins, phosphate solubilization and watercress germination promotion. Different letters indicate values significantly different in a Fisher's Least Significant Difference test (LSD) at  $P < 0.05$ .

Code	Genera	Source <sup>1</sup>	Bioactivity <sup>2</sup>	Salicylic acid ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Cytokinins ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	GI <sup>3</sup> (0.5 $\text{mg mL}^{-1}$ )	GI (2.0 $\text{mg mL}^{-1}$ )
SAB-B0070	<i>Gloeocapsa</i>	FW	-	5.94 bc	2.63 ab	92.95 a	77.03 ab
SAB-B797	<i>Calothrix</i>	FW	-	8.40 d	3.05 abc	95.80 a	103.03 bc
SAB-B866	<i>Dolichospermum</i>	FW	-	5.80 bc	3.41 abc	94.44 a	75.22 ab
SAB-B912	<i>Anabaena</i>	FW	Sid+	5.50 bc	2.18 a	102.75 ab	120.81 c
SAB-B974	<i>Trichormus</i>	FW	-	5.65 bc	2.13 a	99.45 a	95.98 ab
SAB-B1211	<i>Leptolyngbya</i>	FW	-	5.83 c	2.71 a	100.76 ab	111.97 c
SAB-B1267	<i>Leptolyngbya</i>	FW	-	6.87 c	2.49 a	92.91 a	79.72 ab
SAB-B1269	<i>Cyanobacteria</i>	FW	Sid+	5.76 bc	2.06 a	101.53 ab	83.02 ab
SAB-B1300	<i>Nostoc</i>	FW	-	8.23 d	3.54 abc	94.70 a	90.21 ab
SAB-B1328	<i>Lyngbya</i>	FW	Sid+	5.55 bc	3.52 abc	103.42 ab	101.80 bc
SAB-B1356	<i>Nodularia</i>	FW	Sid+	4.71 b	4.19 abc	97.46 a	102.04 bc
SAB-B1572	<i>Anabaena</i>	FW	-	5.19 bc	3.57 a	101.84 ab	72.61 ab
SAB-B1579	<i>Synechococcus</i>	FW	Sid+	1.93 a	2.64 ab	67.85 a	24.90 a
SAB-M128	<i>Trichormus</i>	SW	-	4.54 b	5.54 cd	80.82 a	48.84 a
SAB-M132	<i>Nostoc</i>	SW	-	4.81 b	3.83 abc	71.94 a	59.64 a
SAB-M134	<i>Trichormus</i>	SW	-	4.84 b	5.27 cd	94.26 a	52.66 a
SAB-M150	<i>Nostoc</i>	SW	-	4.88 b	5.53 cd	97.02 a	70.65 ab
SAB-M189	<i>Nostoc</i>	SW	-	4.99 b	4.65 abc	92.24 a	74.26 ab
SAB-M205	<i>Tolypothrix</i>	SW	-	5.14 bc	4.31 abc	90.83 a	80.49 ab
SAB-M221	<i>Trichormus</i>	SW	Sid+	5.07 b	5.76 cd	83.87 a	65.77 ab
SAB-M251	<i>Nostoc</i>	SW	-	5.21 b	6.39 d	87.95 a	66.98 ab
SAB-M304	<i>Trichormus</i>	SW	-	4.76 b	6.46 d	74.43 a	19.08 a
SAB-M307	<i>Anabaena</i>	SW	-	4.68 b	5.93 cd	88.67 a	85.31 ab
SAB-M405	<i>Calothrix</i>	SW	-	5.27 bc	3.15 abc	93.99 a	78.14 ab
SAB-M465	<i>Tolypothrix</i>	SW	-	4.95 bc	5.52 bcd	94.32 a	84.60 ab
SAB-M612	<i>Nostoc</i>	SW	-	8.76 d	4.94 abc	108.60 b	83.37 ab
SAB-M661	<i>Nostoc</i>	SW	P-sol+	5.40 b	4.28 abc	99.63 a	87.39 ab
SAB-M683	<i>Nostoc</i>	SW	P-sol+	5.38 b	3.24 abc	102.59 ab	106.55 bc

<sup>1</sup>Source: Freshwater (FW); Seawater (SW)

<sup>2</sup>Bioactivity: production of siderophores (Sid) or phosphate solubilization (P-sol)

<sup>3</sup>GI: Germination Index

Cyanobacteria play a significant role in providing phytohormones that promote plant growth. Cytokinins are involved in the activation of the functions of cell division, organogenesis and late senescence of plants, meanwhile, salicylic acid is directly related to the activation of the defensive plant response. Some authors described the production of cytokinins by the genera *Arthronema* and *Calothrix* or auxins by *Oscillatoria* and *Chlorogloea* [24]. Their structural–functional plasticity confers great versatility and enables them to adapt and inhabit a wide range of environments and niches. In addition, they establish symbioses with different

members of the plant kingdom [25,26] and are capable of colonizing roots and eliciting growth promotion and defence responses in plants [27,28].

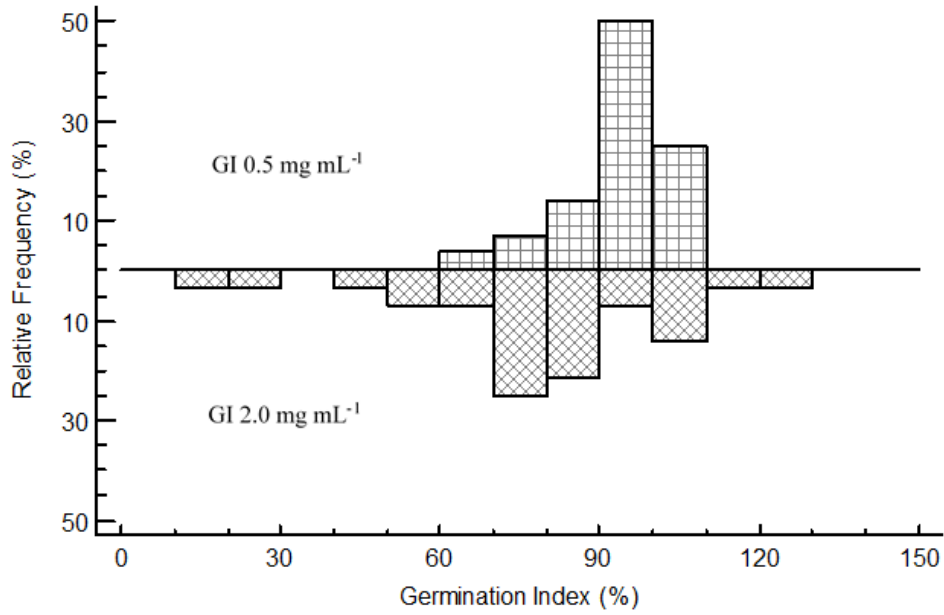
### 3.1.2. Screening of plant growth promoter strains based on germination index assay

In order to narrow search, phytostimulation test was carried out. Those strains which presented or exceeded 100 % of Germination Index (GI) were considered as phytostimulant at 0.5 and / or 2.0 mg mL<sup>-1</sup>. Thus, 7 strains reached GI values equal to or greater than 100 % when they were tested at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> while 6 of them were higher than 100 % when the extracts were applied at 2 mg mL<sup>-1</sup> (Table 1). On the one hand, strain *Nostoc* SAB-M612 was the best growth promoter in watercress seeds after applying at low dose (GI = 108.6 %); *Anabaena* SAB-B912 and *Leptolyngbya* SABB1211 were the most phytostimulant strains at 2.0 mg mL<sup>-1</sup> of extract (120.81 % and 111.97 % respectively). On the other hand, four of them were the most phytotoxic strains, *Synechococcus* SABM1579 and *Trichormus* SAB-M304 (Table 1).

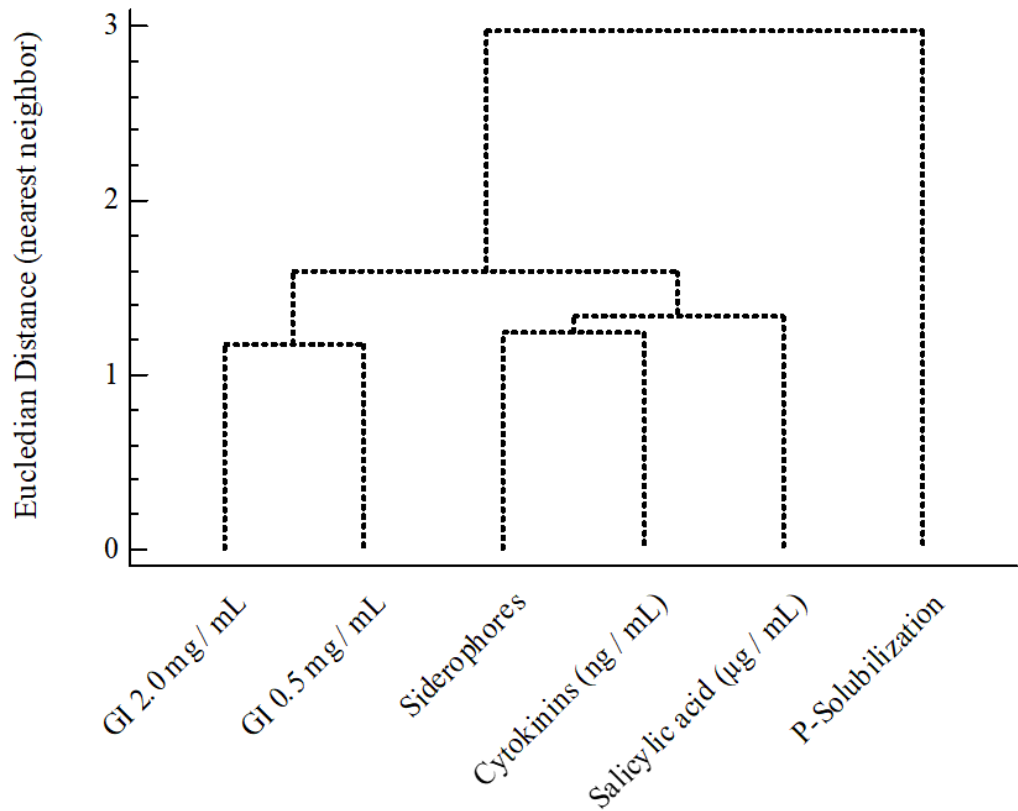
The diagram of relative frequencies revealed that the results were most homogeneous when the extracts were applied at low dose, since around 70 % of the strains showed GI values around 90–110 % (Fig. 1). Contrary to detected at low dose, the most extreme results in terms of phytotoxicity and phytostimulation were detected when those were applied at higher dose (2.0 mg mL<sup>-1</sup>).

As seen in Fig. 2, there is an important link between germination data and salicylic acid production by cyanobacteria. On the other hand, the production of cytokinins and siderophores could also be decisive during the germination and root elongation phase, although less important than salicylic acid. Both facts could reveal that, although the effect of salicylic acid, cytokinins and siderophores could have more weight in the early stages of plant development, the same does not occur with the ability solubilize phosphate (Fig. 2), which character is founded farthest in the dendrogram and could be more important during advanced phases of plant growth.





**Figure 1.** Diagram of relative frequencies concerning the variable Germination Index (GI) at 0.5 and 2.0 mg mL<sup>-1</sup>.



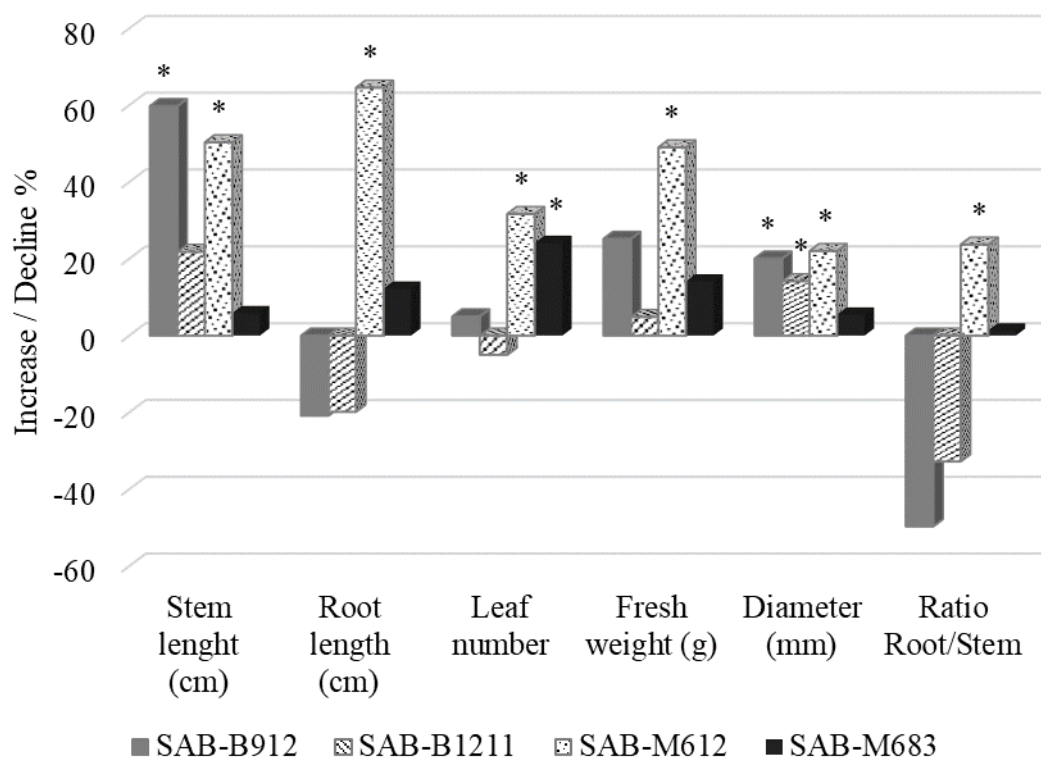
**Figure 2.** Dendrogram of the euclidean distance by the nearest neighbor method: clustering *in vitro* variables (GI: Germination Index).

### **3.2. Application of the best selected cyanobacteria as growth promoters in cucumber seedlings**

One of the main criteria taken into account for the selection of the best plant growth promoting strains was the Germination Index. In this way, the possible phytotoxic effect that cyanobacterial extracts could have on bioassays performed on cucumber seedlings was ruled out. Thus, based on the results shown in Table 1, the selected strains were SAB-B912, SAB-B1211, SAB-M612 and SAB-M683. Bioactivity (phosphate solubilization and production of siderophores) and the ability to produce phytohormones from these strains were important aspects to consider, but they were not considered for this preliminary selection.

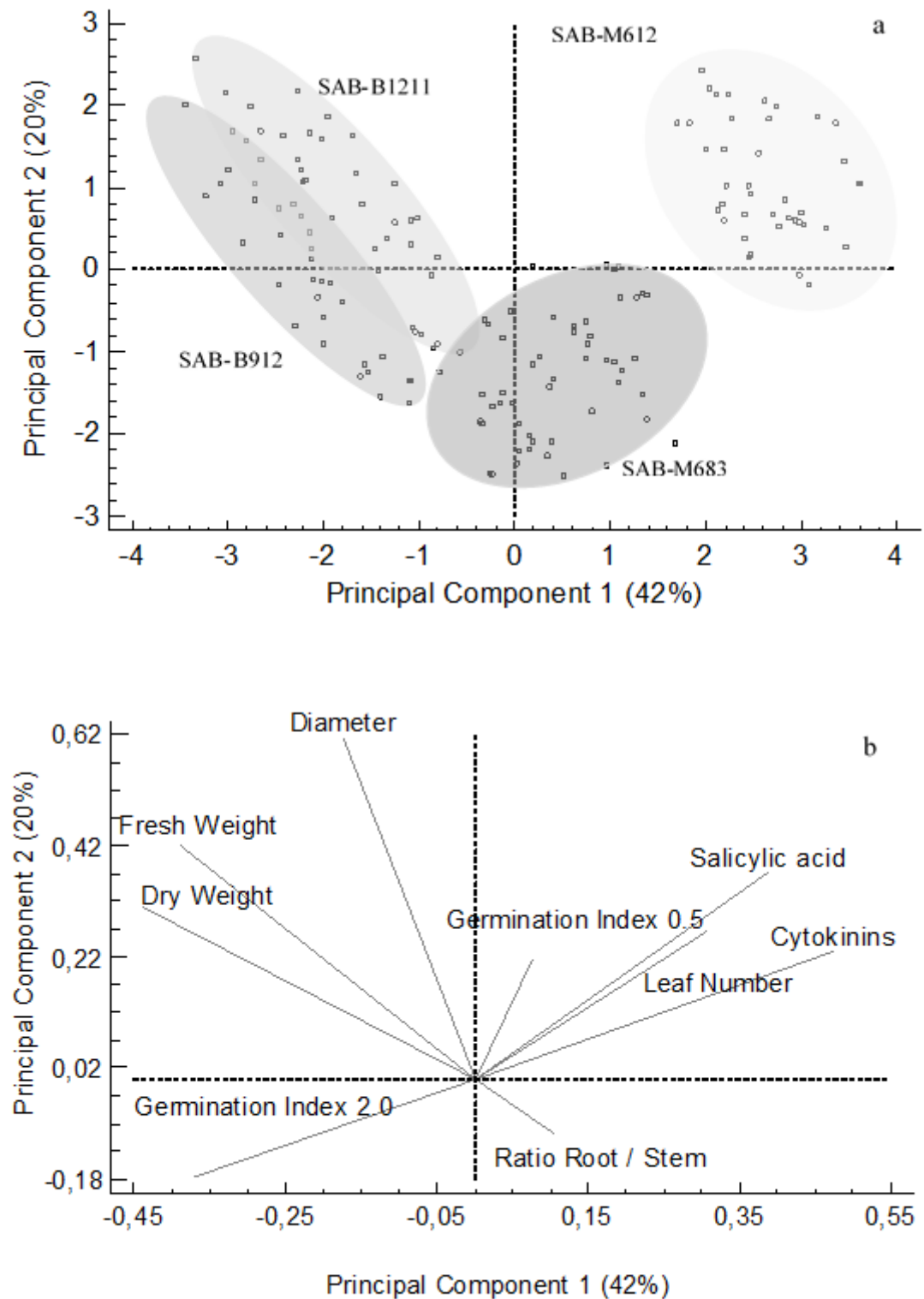
In order to objectively evaluate the results derived from the bioassay performed on cucumber seedlings, the plant growth promotion was expressed as the percentage of increase / decrease of all the variables analysed, based on the data observed in the control plant set (plants not inoculated with extracts of cyanobacteria).

As indicated above (see the Materials and Methods section), bioassays in cucumber seedlings were carried out from two different extract concentrations (0.5 and 0.1 mg DM mL<sup>-1</sup>). Taking into account that the statistical analyses did not show significant differences between both treatments (data not shown), Figure 3 represents the mean values for each variable analysed, regardless of the treatment applied at 0.1 mg DM mL<sup>-1</sup>. In this way, the results obtained revealed a clear growth promoting effect after the application of the sonicated extracts of the strains *Anabaena* SAB-B912 and *Nostoc* SAB-M612. However, only the strain named *Nostoc* SAB-M612 was capable of increasing the Root / Stem ratio in relation to what was observed in the set of control plants. This fact was due to the remarkable increase in the length of the root of the treated plants (more than 60% increase in root growth). In addition, extracts of SAB-M612 increased the stem length (50%), leaf production (30%), fresh weight (close to 50%) and thickness of the treated plants (more than 20%) in relation to untreated plants (Figure 3). A more discrete promoting effect was detected after the application of the strains SAB-B912 and SAB-M683. On the other hand, strains SAB-B912 and SAB-B1211 slightly promoted the aerial plant growth but not the radicular development.



**Figure 3.** Measurement of plant growth parameters after application of selected cyanobacteria extracts in cucumber seedlings. Data are represented as the percentage of increase or decrease based on the control plants not treated with cyanobacteria. Mean of 30 replicates was used in each case (\*: asterisk indicates values significantly different in a Fisher's Least Significant Difference test at  $P < 0.05$ ).

The Principal Component Analyses revealed the presence of two main components (PC1 and PC2) that explained more than 60% of the data variability (Figure 4). This analysis was performed bearing in mind both *in vivo* growth parameters (root and stem length, leaf number, fresh weight and stem diameter) and *in vitro* phytohormone production. In view of the results shown in the dispersion diagram (Figure 4a), clear significant differences were established between SAB-M612 and the rest of the tested strains. With respect to the Principal Component graphic, PC1 proved to have a greater influence on the production of phytohormones and the growth parameters concerning the plant weight (Figure 4b). While the production of cytokinins and salicylic acid was positively related with the Germination Index at  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  and the Root / Stem Ratio, other parameters concerning the plant size and weight were linked to Germination Index at  $2.0 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figure 4b).

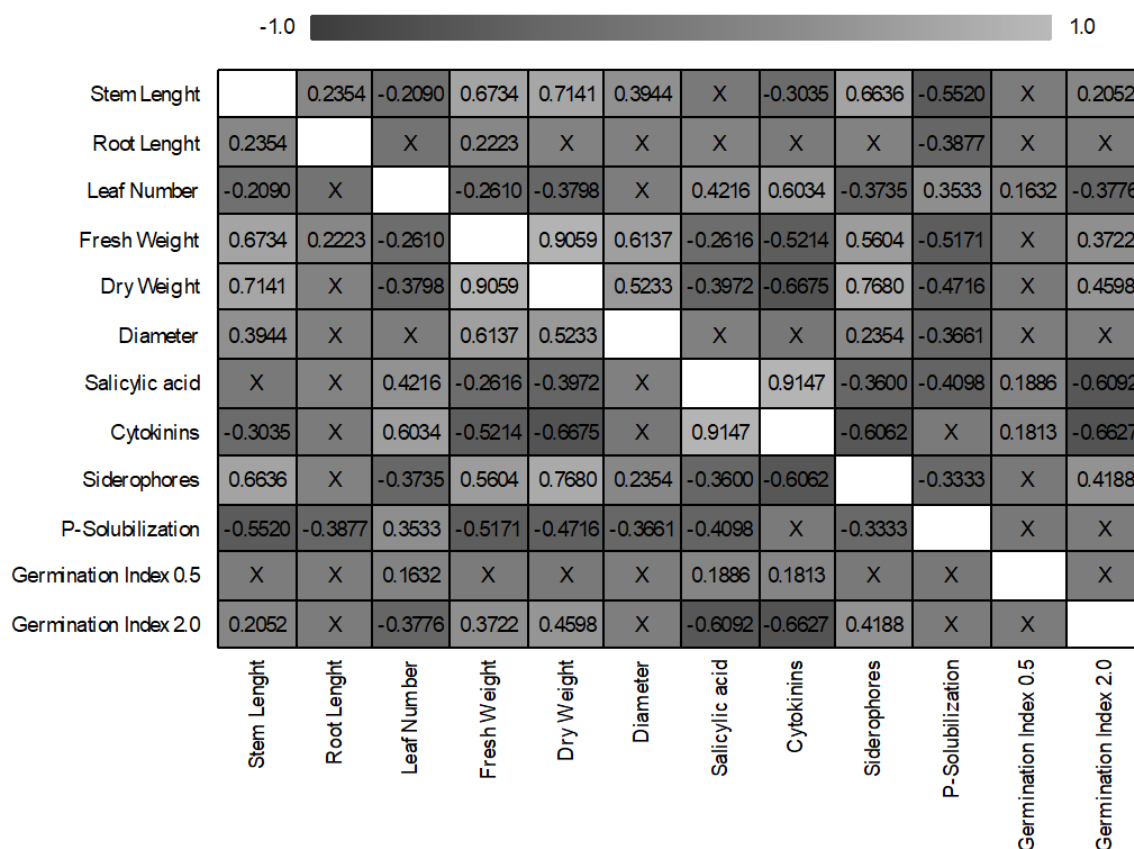


**Figure 4.** Principal Component Analyses including *in vitro* and *in vivo* variables: Dispersion Diagram to establish global differences or similarities among the cyanobacteria tested (a); the influence of the Principal Components on the variability of the parameters analyzed (b).

The relationship between the *in vitro* and *in vivo* variables analysed is shown by a Pearson correlation analysis (Figure 5). Taking into account that Pearson's R value oscillated between -1 and +1, negative relationships between variables are represented in dark grey, while positive relationships are indicated in light grey.

In view of the results shown in Figure 5, it should be noted the positive relationship between the variable Fresh weight and other parameters related to the plant size (Root and stem length, as well as stem diameter). It is also worth noting the direct relationship between the leaf number and the capacity of the strains selected to produce salicylic acid and cytokinins ( $R^2= 0.4216$  and  $0.6034$ , respectively).

X = non significant values at 1.0 %



**Figure 5.** Correlation Pearson test including *in vitro* and *in vivo* variables analyzed ( $P < 0.01$ ). Pearson's R value oscillated between -1 (dark grey) and +1 (light grey).

The strong positive relationship between the production of salicylic acid and cytokinins was especially surprising ( $R^2= 0.9147$ ). Nonetheless, the excess of

salicylic acid and cytokinins in the germination phase could be phytotoxic, as was detected in the germination tests on cress seeds (Table 1, Figure 1 and Figure 5). This effect was specifically detected when some of the sonicated extracts of cyanobacteria were applied at  $2 \text{ mg} / \text{mL}^{-1}$  and tended to decrease when the applied concentration of the sonicated extracts was lower.

The production of both phytohormones correlated negatively with the plant weight (Figure 5) and the production of siderophores. Surprisingly, the production of salicylic acid was inversely related to the ability to solubilize phosphates ( $R^2 = -0.4098$ ), while the production of both cytokinins was negatively correlated with the stem length.

It was noticeable the link between the production of siderophores and the parameters concerning to plant size and weight. However, contrary to expectations, P-solubilization negatively correlated with the rest of plant growth parameters (Figura 5); this effect could be related with phenological state of the cucumber seedling.

In this work, it was evident that these cyanobacterial strains release varied quantities of phytohormones for plant growth and development together with other secondary bioactive metabolites. In view of the results obtained in this work, it is worth highlighting the influence of the production of both phytohormones in the germination phase. However, this effect was beneficial mainly at the lowest dose used since it was phytotoxic when higher extract doses were applied.

Recent studies also showed that cyanobacterial inoculation leads to modulation of the rhizosphere microbiome, leading to alterations in the structure and abundance of microbial communities involved in the mineralization and solubilization of nutrients [29, 30, 31]. Concretely, some studies have shown that the inoculation of cyanobacterium *Calothrix elenkinii* significantly brought about beneficial changes in the plant and rhizosphere microbiome [30, 31, 32]. Therefore, the effect provoked by the cyanobacteria results from the collaborative action among them and other microbial groups or species inhabiting in the soil rhizosphere.

#### **4. Conclusions**

Cyanobacteria are a group of photosynthetic organisms that can easily survive with the minimum requirement of light, carbon dioxide and water. They are

phototrophic and appear naturally in a multitude of agroecosystems distributed throughout the world. They fix nitrogen and produce some bioactive compounds, which improve the nutritional status of the soil, promote the growth of crops and protect them from plant pathogens. Due to their natural diversity, the capacity of cyanobacteria to grow in a variety of locations could be exploited for their commercial application as plant growth promoters.

However, the beneficial effects of cyanobacteria by treating with crude extracts on some vegetables, herbaceous and crops plants have already been well established, only few studies have characterized the chemical constituents responsible for plant growth promotion. In this work, it was surprising that the parameters related to the size and weight of the plant (with the exception of the number of leaves) correlated negatively with the production of salicylic acid and cytokinins, as well as with phosphate solubilization, contrary to what was detected in the case of siderophores production. This fact leads us to think that during the initial stages of germination and elongation of the root it is essential to establish the balance between salicylic and cytokinins, while in the later stages of seedling, the presence of siderophore-like chelating agents is decisive for the optimal development of the plant.

## **5. Funding**

This research was funded by SABANA Project (Grant No. 727874) from the EU Horizon 2020.

## **6. Appendix A. Supplementary data**

Supplementary material related to this article can be found, in the online versión. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00449>.

The following are the Supplementary data to this article:

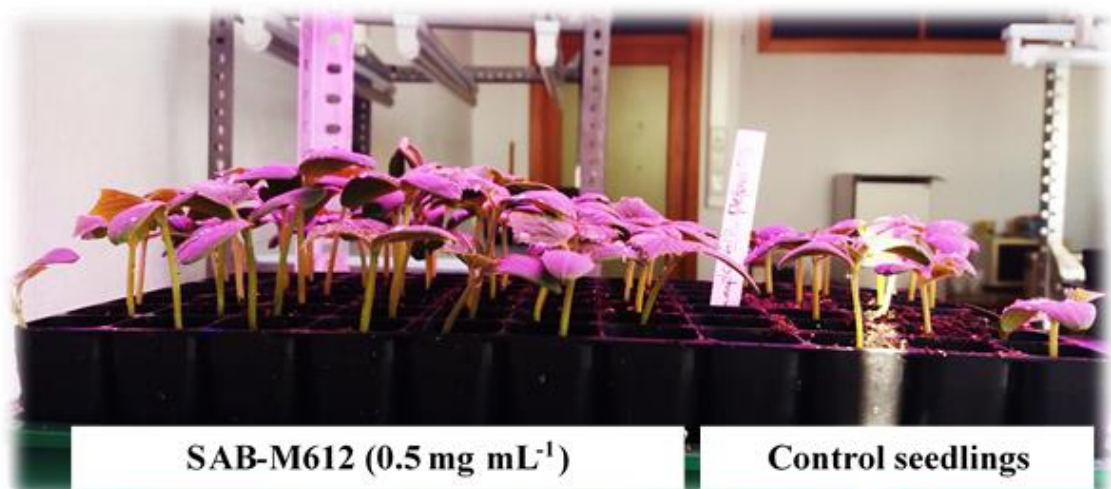
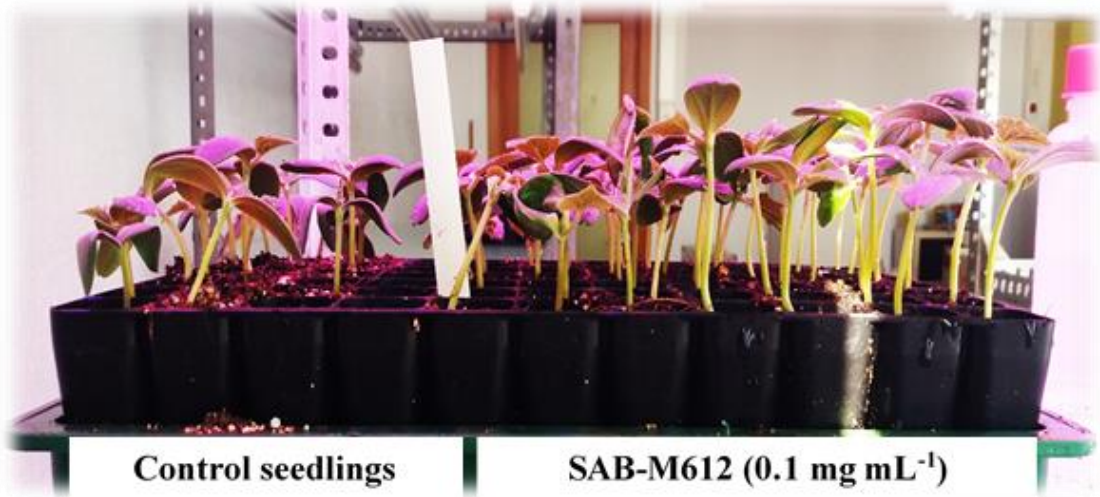
Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 3



**Supplementary Figure 1.** Bioassays in cucumber seedlings applying sonicated extracts from selected cyanobacteria.



**Supplementary Figure 2.** Cucumber seedlings after treatment with a sonicated extract of the cyanobacterium SAB-M612. Treatment dose at  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  (top) and  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  (bottom).





**Supplementary Figure 3.** Cucumber seedlings after treatment with sonicated extracts of the cyanobacteria a) SAB-B1211 (top), b) SAB-B912 (intermediate). c) Untreated Control seedlings (bottom).

## 7. References

- [1] S. Castro-Sowinski, Y. Herschkovitz, Y. Okon, E. Jurkevitch. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 276 (2009), pp. 1-11.
- [2] D. Wang, S. Yang, F. Tang, H. Zhu. Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cell Microbiol.* 14 (2012), pp. 334-342.
- [3] J.S. Singh, A. Kumar, A.N. Rai, D.P. Singh. Cyanobacteria: a precious bioresource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front. Microbiol.* 7 (2016), pp. 1-19.
- [4] J.S. Singh. Cyanobacteria: a vital bio-agent in eco-restoration of degraded lands and sustainable agriculture. *Climate Change Environ. Sustain.* 2 (2014), pp. 133-137.
- [5] N. Karthikeyan, R. Prasanna, A. Sood, P. Jaiswal, S. Nayak, B.D. Kaushik. Physiological characterization and electron microscopic investigations of cyanobacteria associated with wheat rhizosphere. *Folia Microbiol.* 54 (2009), pp. 43-51.
- [6] M.P. Maqubela, P.N.S. Mnkani, O. Malam Issa, M.T. Pardo, L.P. D'Acqui. *Nostoc* cyanobacterial inoculation in South African soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. *Plant Soil* 315 (2009), pp. 79-92.
- [7] T. Řezanka, A. Palyzová, K. Sigler. Isolation and identification of siderophores produced by cyanobacteria. *Folia Microbiol.* 63 (2018), pp. 569-579.
- [8] A. Vaishampayan, R.P. Sinha, D.P. Häder, T. Dey, A.K. Gupta, U. Bhan, A.L. Rao. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *Bot. Rev.* 67 (2001), pp. 453-516.
- [9] S. Mazhar, S. Hasnain. Screening of native plant growth promoting cyanobacteria and their impact on *Triticum aestivum* var. Uqab 2000 growth. *Afr. J. Agric. Res.* 6 (2011), pp. 3988-3993.
- [10] R. Ortiz-Castro, H.A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4 (2009), pp. 1-12.
- [11] N. Thajuddin, Subramanian, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.* 89 (2005), pp. 50-57.
- [12] N. Renuka, A. Guldhe, R. Prasanna, P. Singh, F. Bux. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol. Adv.* 36 (2018), pp. 1255-1273.
- [13] J.S. Singh, V.C. Pandey, D.P. Singh. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140 (2011), pp. 339-353.
- [14] Z. Shariatmadari, H. Riahi, M. Seyed Hashtroudi, A. Ghassempour, Z. Aghashariatmadary. Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. *Soil Sci. Plant Nutr.* 59 (2013), pp. 535-547.

- [15] B. Schwyn, J.B. Neilands. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160 (1987), pp. 47-56.
- [16] C.S. Nautiyal. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170 (1999), pp. 265-270.
- [17] F. Zucconi, A. Pera, M. Forte, M. de Bertoldi. Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle* 22 (1981), pp. 54-57.
- [18] M.V. Santoro, J. Zygadlo, W. Giordano, E. Banchio. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiol. Biochem.* 49 (2011), pp. 177-1082.
- [19] E. Ahmed, S.J. Holmström. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7 (2014), pp. 196-208.
- [20] S. Goldman, P. Lammers, M. Berman, J. Sanders-Loehr. Siderophore-mediated iron uptake in different strains of *Anabaena* sp. *J. Bacteriol.* 156 (1983), pp. 1144-1150.
- [21] W.H. Fuller, R.N. Roger. Utilisation of the phosphorus of algal cells as measured by the Neubauer technique. *Soil Sci.* 74 (1952), pp. 417-429.
- [22] D.M. McKnight, F.M. Morel. Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.* 25 (1980), pp. 62-71.
- [23] E.P.Y. Tang, W.F. Vincent, D. Proulx, P. Lessard, J. de la Noüe. Polar cyanobacteria versus green algae for tertiary waste-water treatment in cool climates. *J. Appl. Phycol.* 9 (1997), pp. 371-38.
- [24] S. Parveen, V.D. Pandey. Alkaline phosphatase activity in freshwater cyanobacteria. *Plant Archives* 11 (2011), pp. 827-830.
- [25] E.R. Tarakhovskaya, Y.I. Maslov, M.F. Shishova. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54 (2007), pp. 163-170.
- [26] R. Prasanna, P. Jaiswal, S. Nayak, A. Sood, B.D. Kaushik. Cyanobacterial diversity in the rhizosphere of rice and its ecological significance. *Indian J. Microbiol.* 49 (2009a), pp. 89-97.
- [27] R. Prasanna, L. Nain, R. Ancha, J. Shrikrishna, M. Joshi, B.D. Kaushik. Rhizosphere dynamics of inoculated cyanobacteria and their growth promoting role in rice crop. *Egypt. J. Biol.* 11 (2009b), pp. 26-36.
- [28] R. Prasanna, S. Babu, A. Rana, S.R. Kabi, V. Chaudhary, V. Gupta, A. Kumar, Y.S. Shivay, L. Nain, R.K. Pal. Evaluating the establishment and agronomic proficiency of cyanobacterial consortia as organic options in wheat-rice cropping sequence. *Exp. Agric.* 49 (2013), pp. 416-434.
- [29] R. Prasanna, S. Babu, N. Bidyarani, A. Kumar, S. Triveni, D. Monga, A.K. Mukherjee, S. Kranthi, N. Gokte-Narkhedhar, A. Adak, K. Yadav, L. Nain, A.K. Saxena. Prospecting cyanobacteria fortified composts as plant growth promoting and biocontrol agents in cotton. *Exp. Agric.* 51 (2015), pp. 42-65.

- [30] M. Manjunath, A. Kanchan, K. Ranjan, S. Venkatachalam, R. Prasanna, B. Ramakrishnan, F. Hossain, L. Nain, Y.S. Shivay, A.B. Rai, B. Singh. Beneficial cyanobacteria and eubacteria synergistically enhance bioavailability of soil nutrients and yield of okra. *Heliyon* 2 (2016), e00066; <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00066>.
- [31] H. Priya, R. Prasanna, B. Ramakrishnan, N. Bidyarani, S. Babu, S. Thapa, N. Renuka. Influence of cyanobacterial inoculation on the culturable microbiome and growth of rice. *Microbiol. Res.* 171 (2015), pp. 78-89.
- [32] K. Ranjan, H. Priya, B. Ramakrishnan, R. Prasanna, S. Venkatachalam, S. Thapa, R. Tiwari, L. Nain, R. Singh, Y.S. Shivay. Cyanobacterial inoculation modifies the rhizosphere microbiome of rice planted to a tropical alluvial soil. *Appl. Soil Ecol.* 108 (2016), pp. 195-203.



**Artículo 2**

## ARTÍCULO 2

### **Seed *biopriming* with cyanobacterial extracts as an eco-friendly strategy to control *damping off* caused by *Pythium ultimum* in seedbeds**

A.J. Toribio, M.M. Jurado, F. Suárez-Estrella \*, M.J. López, J.A. López-González, J. Moreno

Publicado en Microbiological Research. 248 (2021), 126766.

**Resumen:** Este trabajo pone de manifiesto la capacidad de varios extractos de cianobacterias de *Anabaena* spp., *Tolypothrix* spp., *Nostoc* o *Trichormus*, entre otros géneros, para controlar la incidencia del *damping-off* causado por *Pythium ultimum* en plántulas de pepino. Los protocolos aplicados para la caracterización preliminar de la colección de cianobacterias fueron muy útiles para predecir su capacidad fitotóxica, fitoestimulante y biopesticida. En primer lugar, se analizó el potencial fitoestimulante o fitotóxico de una colección de 31 extractos de cianobacterias sonicadas mediante el cálculo del índice de germinación en semillas de berro y el aumento o pérdida de peso de las plántulas. Asimismo, la colección se caracterizó en función de su capacidad para inhibir el crecimiento de *P. ultimum* mediante bioensayos de doble cultivo y ensayo de hoja cortada. Por último, tras seleccionar los extractos más eficaces, se realizó un bioensayo de *damping-off* preventivo basado en la *biopriming* de semillas de pepino. La cepa SAB-M465 demostró ser la más eficaz contra el crecimiento *in vitro* de *P. ultimum*, mientras que SAB-B912 fue más discreta en este sentido, pero resultó ser la más eficaz como estimulador de la germinación. La estrategia de *biopriming* de semillas con extractos sonicados de cianobacterias reveló un notable efecto promotor en las primeras etapas del desarrollo de la planta, aunque sólo SAB-M465 se posicionó como un agente de control eficaz contra el *damping-off* causado por *P. ultimum* en los semilleros de pepino.

**Palabras clave:** Cianobacterias; protección de plantas; bioplaguicidas; fitotoxicidad; *biopriming*; *damping-off*

**Seed *biopriming* with cyanobacterial extracts as an eco-friendly strategy to control *damping off* caused by *Pythium ultimum* in seedbeds**

A.J. Toribio, M.M. Jurado, F. Suárez-Estrella \*, M.J. López, J.A. López-González, J. Moreno

Department of Biology and Geology, CITE II-B, University of Almería, ceiA3, CIAIMBITAL, 04120, Almería, Spain

\*Corresponding author: Phone: 00 34 950 015 891; Fax: 00 34 950 015 476; E-mail: [fsuarez@ual.es](mailto:fsuarez@ual.es) (F. Suárez-Estrella)

**Abstract**

This work highlights the ability of various cyanobacterial extracts from *Anabaena* spp., *Tolypothrix* spp., *Nostoc* or *Trichormus*, among others genera, to control the incidence of *damping-off* caused by *Pythium ultimum* in cucumber seedlings. Protocols applied aimed at the preliminary characterization of the cyanobacterial collection were very useful for predicting their phytotoxic, phytostimulating and biopesticidal capacity. First, the phytostimulatory or phytotoxic potential of a collection of 31 sonicated cyanobacterial extracts was analyzed by calculating the germination index in watercress seeds and the increase or loss of seedling weight. Likewise, the collection was characterized according to its ability to inhibit the growth of *P. ultimum* by dual culture bioassays and detached-leaf test. Finally, after selecting the most effective extracts, a preventive *damping-off* bioassay was performed based on cucumber seed *biopriming*. The strain SAB-M465 showed to be the most efficient strain against the *in vitro* growth of *P. ultimum*, while SAB-B912 was more discreet in this regard, but proved to be the most effective as a germination stimulator. Seed *biopriming* strategy with sonicated extracts of cyanobacteria revealed a remarkable promoter effect in the early stages of plant development, although only SAB-M465 was positioned as an effective control agent against *damping-off* caused by *P. ultimum* in cucumber seedbeds.

**Keywords:** Cyanobacteria; plant protection; biopesticides; phytotoxicity; *biopriming*; *damping-off*

**Highlights**

- Cyanobacteria distinguished as biological control agents in seeds and seedlings
- SAB-M465 stood out as a muting agent for *damping-off* in seedbeds
- SAB-B912 stimulated plant growth in pre and post emergence phases
- Seed *biopriming* was successful as a preventive treatment against *damping-off*
- Seed *biopriming* was positioned as an eco-friendly strategy to promote plant growth



## 1. Introduction

The practice of intensive agriculture has traditionally been related to the application of chemical products that are highly polluting for the environment and sometimes dangerous for health. In order to guarantee consumer and environmental health, a sustainable and eco-friendly control of diseases affecting the early stages of plant growth is essential (Bourguet and Guillemaud, 2016; Lamichhane *et al.*, 2016).

Cucumber (*Cucumis sativus L.*) is one of the most important vegetable crops growing all over the world in open fields, tunnels and greenhouses (Soleimani *et al.*, 2009). Specifically, in the southeast of Spain, cucumber cultivation, together with tomato and pepper, is one of the main crops in terms of greenhouse production and export to other European Union countries (ARG, 2021). However, cucumber seedlings are susceptible to a wide range of pathogens. This fact leads to significant economic losses derived from the lack of quality and yield of cucumber crop under favourable conditions for disease development (Georgakopoulos *et al.*, 2002; Abbasi and Lazarovits, 2006).

In terms of diseases caused by phytopathogenic agents, *damping-off* is one of the most widely spread. A number of soil-borne pathogenic fungi have been associated with pre- or post-emergence *damping-off*. That is the case of different species of *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium* and *Rhizoctonia* (Lamichhane *et al.*, 2017). Although there is no detailed and precise estimation about the real economic impact of *damping-off* at the global level in monetary terms, an extensive literature research showed that the incidence of *damping-off* may vary from 5 to 80% (Lamichhane *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020). The oomycete *Pythium ultimum* is an important soil-borne plant pathogen that causes *damping-off* on over 300 diverse plant species including cucumber and other cucurbits (Kamoun *et al.*, 2015). These pathogens are usually polyphagous and there is no natural resistance in plants to their infections. However, controlling *damping-off* with antagonistic microorganisms can be relatively easy, if they are preventively used. In other words, antagonists need to be introduced before the potential entry of the pathogen (Li *et al.*, 2016).

The most common bacterial antagonistic agents that have been traditionally used to control *damping-off* include several species of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* (Georgakopoulos *et al.*, 2002; Carisse *et al.*, 2003). Nevertheless, cyanobacteria are also globally gaining attention as plant growth promoting and biocontrol agents in diverse crops including rice, wheat, cotton, legumes, solanaceae and cucurbitaceae (Prasanna *et al.*, 2009; Manjunath *et al.*, 2010; Prasanna *et al.*, 2015).

The inoculation of these organisms influences various metabolic processes in plants, since they activate the production of defense proteins that lead to a greater immunity of plants against pathogens (Gupta *et al.*, 2013). On the other hand, it is known that the inoculation of cyanobacteria directly in the soil or by seed immersion or *priming* causes an increase in the germination rate, a better development of plants and a higher productive yield in a wide variety of cereal, horticultural and vegetable crops (Rodríguez *et al.*, 2006; Saadatnia and Riahi, 2009).

One of the newest methods based on seed conditioning by treatment with beneficial microorganisms, *biopriming*, is gaining wide acceptance (Anitha *et al.*, 2013). This preventive method aims to achieve a durable and effective impact of the beneficial microorganisms. In this way, it ensures that the physiological processes, due to interaction seed-microorganism, provide the seed with the desired capabilities with respect to plant biostimulation and plant protection against pathogens (Harris *et al.* 2008). There are numerous researches from which the effectiveness and survival of the applied agents has been proven by the described technique, ensuring the optimal plant yield and growth (Yadav *et al.*, 2018). Nonetheless, in the particular case of cyanobacteria, the work is still very incipient.

The aim of this work was to investigate the potential bioprotective effect from a cyanobacterial collection against the *damping-off* caused by *Pythium ultimum* in cucumber seedbeds. Specific objectives were: (i) to check the phytotoxic or phytostimulant effect of the treatment with cyanobacterial extracts on the germination of watercress seeds; (ii) to examine the *in vitro* efficacy of different cyanobacterial strains on the inhibition of mycelial growth of *P. ultimum*, by dual culture technique, as well as by detached cucumber-leaf bioassays, and (iii) to

investigate both biostimulant and biopesticide impact *in vivo* by a *biopriming* preventive assay in cucumber seeds. This study will lay the foundations for future research on the utilization of cyanobacteria not only in its widely known application as biofertilizer, but also in managing crop diseases.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Microorganisms**

#### *2.1.1. Phytopathogenic agent*

An active culture of the phytopathogenic oomycete *Pythium ultimum* CECT 2365 (PU) were supplied by the Spanish Type Culture Collection (STCC). Cultures of the phytopathogenic agent were periodically kept on Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid Ltd., UK) at 4 °C until use.

#### *2.1.2. Collection of cyanobacteria and getting extracts*

A total of 31 strains of cyanobacteria were studied in this work. Strains were supplied in lyophilized form from two international culture collections: Mosonmagyaróvár Algal culture collection (MACC) and Spanish Bank of Algae (SBA). The collection included species of the genera *Anabaena*, *Calothrix*, *Cyanobacteria*, *Dolichospermum*, *Gloeocapsa*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Synechococcus*, *Tolypothrix*, and *Trichormus*. Before starting all *in vitro* and *in vivo* tests, lyophilized biomass from each strain was subjected to a quick sonication process (Branson Sonicator 150) at 40% amplitude for 3 minutes, to obtain liquid extracts at a stock concentration of 10 mg mL<sup>-1</sup>.

### **2.2. *In vitro* plant growth promotion bioassays**

#### *2.2.1. Root lengthening promotion: Germination Index*

Promotion effect on germination and radicular elongation was tested on four replicates of 25 seeds for each concentration of cyanobacterial extract prepared (2 and 0.5 mg DM mL<sup>-1</sup>) (DM: dry matter). To calculate Germination Index,

percentage of seed germination and elongation of the radicle (mm) were taken into account, based on the following formula (Zucconi, 1981):

$$GI = (Ge\% * REe) / (Gdw\% * REdw)$$

Where:

GI: Germination Index (%)

Ge%: percentage of germinated seeds in presence of extract

Gdw%: percentage of germinated seeds in distilled water

REe: mean of radicle elongation (mm) in presence of extract

REdw: mean of radicle elongation (mm) in distilled water

#### 2.2.2. Seedling weight after emergence

Weight of the seedling was tested on 100 watercress seeds at concentrations of extract 2 and 0.5 mg DM mL<sup>-1</sup>, by the modified technique described by Hegab *et al.*, (2008). Germination of the watercress seeds was carried out by using four replicates of 25 seeds for each concentration of cyanobacterial extract prepared (2 and 0.5 mg DM mL<sup>-1</sup>). The fresh weight measurement (expressed in mg) of the 25 seedlings of each Petri dish was recorded.

The increase of seedling weight (ISW) was calculated on the basis of the following formula:

$$ISW = (Ge\% * SWe) / (Gdw\% * SWdw)$$

Where:

ISW: Increase of Seedling Weight (%)

Ge%: percentage of germinated seeds in presence of extract

Gdw%: percentage of germinated seeds in distilled water

SWe: mean of seedling weight (mg) in presence of extract

SWdw: mean of seedling weight (mg) in distilled water

### 2.3. *In vitro* antagonism bioassays towards *Pythium ultimum*

#### 2.3.1. *Dual culture protocol*

Once the cyanobacteria extracts were sonicated (see section 2.1.2.), their biological activity was tested against PU by dual cultures following the protocol described by Sánchez-San Fulgencio *et al.* (2018).

Suppressive effect was demonstrated using the modified techniques of Landa *et al.* (1997). First, 2% water agar (WA) plates were prepared. Once the agar solidified, four 8-mm-diameter steel cylinders were placed equidistantly from the edge. A second layer of PDA was added on the WA plates. Once the cylinders were removed, the wells were filled with 80 µL extract of the cyanobacteria at stock concentration of 10 mg mL<sup>-1</sup>. Then, a plug of 5-day-old phytopathogen agent culture, removed from a PDA plate, was placed at the center of the assay plate. Four replicates were prepared for each combination extract-phytopathogen. *In vitro* growth inhibition of PU was measured at 25 ± 1 °C under dark conditions after 2 days. The inhibition index (I) was expressed as the percentage of PU inhibition in the presence of the antagonistic strain using the formula:

$$I = [(C - T)/C] \times 100$$

Where:

I: Inhibition Index (%)

C: growth of the phytopathogenic agent in absence of the antagonistic strain (mm)

T: growth of the phytopathogenic agent in presence of the antagonistic strain (mm).

#### 2.3.2. *Detached leaf bioassays*

This bioassay was carried out modifying the method described by Guo *et al.* (2015). For this purpose, young cucumber leaves were cut and collected from seedlings after one month from emergence. Inside an empty and sterile Petri dish, the detached cucumber leaves were completely immersed for 10 seconds in 20 mL of the cyanobacterial extracts (0.1 mg mL<sup>-1</sup>). After immersion, the leaves were

placed inside Petri dishes with sterile filter paper moistened with 4 mL of sterile distilled water. Then, a mycelial plug (approximately 5 mm in diameter) from active growing margins of a 2-day old PDA culture of PU, was placed in the center of each cucumber leaf. Negative control leaves were immersed in sterile distilled water with a plug of PDA without mycelium. Petri dishes were sealed and incubated at  $25 \pm 1$  °C for 6 days under dark conditions. The diameter of the infected area of each leaf were measured at 2, 4 and 6 days after incubation. Disease rating was expressed as leaf lesion diameter (mm) regarding lesion observed in negative control leaves non-previously treated with the cyanobacterial extracts. Five replicates were prepared for each foliar treatment.

## **2.4. In planta bioassays**

### *2.4.1. Cucumber seed bioimmersion protocol*

Cucumber seeds were washed with sterile distilled water 3 times before being subjected to the immersion bioassays. Then, they were immersed for one hour in 10 mL volume containing a semi-solid matrix constituted by 0.5% sodium alginate combined with the sonicated microbial extracts selected on the basis of previous experiments at  $0.1 \text{ mg DM mL}^{-1}$ . Thirty replicates were prepared for each seed *biopriming* treatment.

### *2.4.2. Substrate infestation with a zoospore suspension of *Pythium ultimum**

A stock culture of PU was subcultured onto 15 Pea agar medium plates (Tello *et al.*, 1991). Each plate was inoculated with a 4 mm diameter plug of mycelium taken from the edge of an actively growing culture on PDA. Cultures were incubated at 25 °C for one week in the darkness.

After incubation, mycelium from each plate was cut in two halves and one half was placed in other empty sterile Petri dish. Both halves were rinsed with sterile distilled water, and then incubated in the same conditions previously described. Release of zoospores was favored by thermal shock. Thereby, cultures were maintained at 4 °C for one hour, followed by another hour at room temperature. Finally, the culture surface was scraped with a sterile spatula. In order to remove

the culture debris, the resultant zoospore solution was then filtered through a sterile cheesecloth layer. Zoospore concentration was determined by Neubauer chamber count and then diluted to a suspension of  $10^5$  zoospore  $\text{mL}^{-1}$ .

Pots filled with sterilized substrate (mix peat:vermiculite at 3:1 ratio) were infected at the rate of  $10^5$  zoospore / pot and covered with cling film to maintain the humidity conditions for one week until the seeds were sown.

#### 2.4.3. *Protective and phytostimulant effect of cyanobacteria extracts towards damping-off caused by Pythium ultimum in cucumber seeds after biopriming*

The most effective cyanobacterial extracts selected from preliminary experiments were *in vivo* assayed to determine their potential as plant growth promoters of seedlings and for their protective effect against PU in *bioprime*d cucumber seeds. A randomized experimental design was established consisting of pretreated cucumber seeds as previously described in section 2.4.1. Pretreated seeds were sown into infected substrate with PU as described in section 2.4.2. Seeds immersed in sterile distilled water and germinated in uninfected soil were used as negative control. Plants were kept in a climatic chamber (EQUITEC Mod. ERIS 615) at a temperature of  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  and a 12 h photoperiod.

After 10 days from sowing, *damping-off* was evaluated by measuring percentage of germination in the different experimental blocks respecting to control seeds submerged in sterile distilled water. *Damping-off* was considered when the seed did not germinate or when it died just after the emergence. On the other hand, phytostimulant effect was evaluated 28 days after sowing, as previously described by Santoro *et al.* (2011). Thereby, the following parameters were measured to evaluate the plant vigor: stem and root length (cm), stem diameter (mm), fresh weight (g) and ratio root/stem.

## 2.5. Statistical analyses

Data obtained were subjected to statistical analysis using Statgraphics Centurion XVII. A multifactorial analysis of variance (ANOVA) and a multiple comparison test (Fisher's Least Significant Difference) were performed to compare mean values

for different levels of repetition ( $P < 0.05$ ). A linkage between groups was used as a grouping method for the variables analyzed *in vitro*. The interval measured in this case was the nearest Euclidean distance squared.

### 3. Results and Discussion

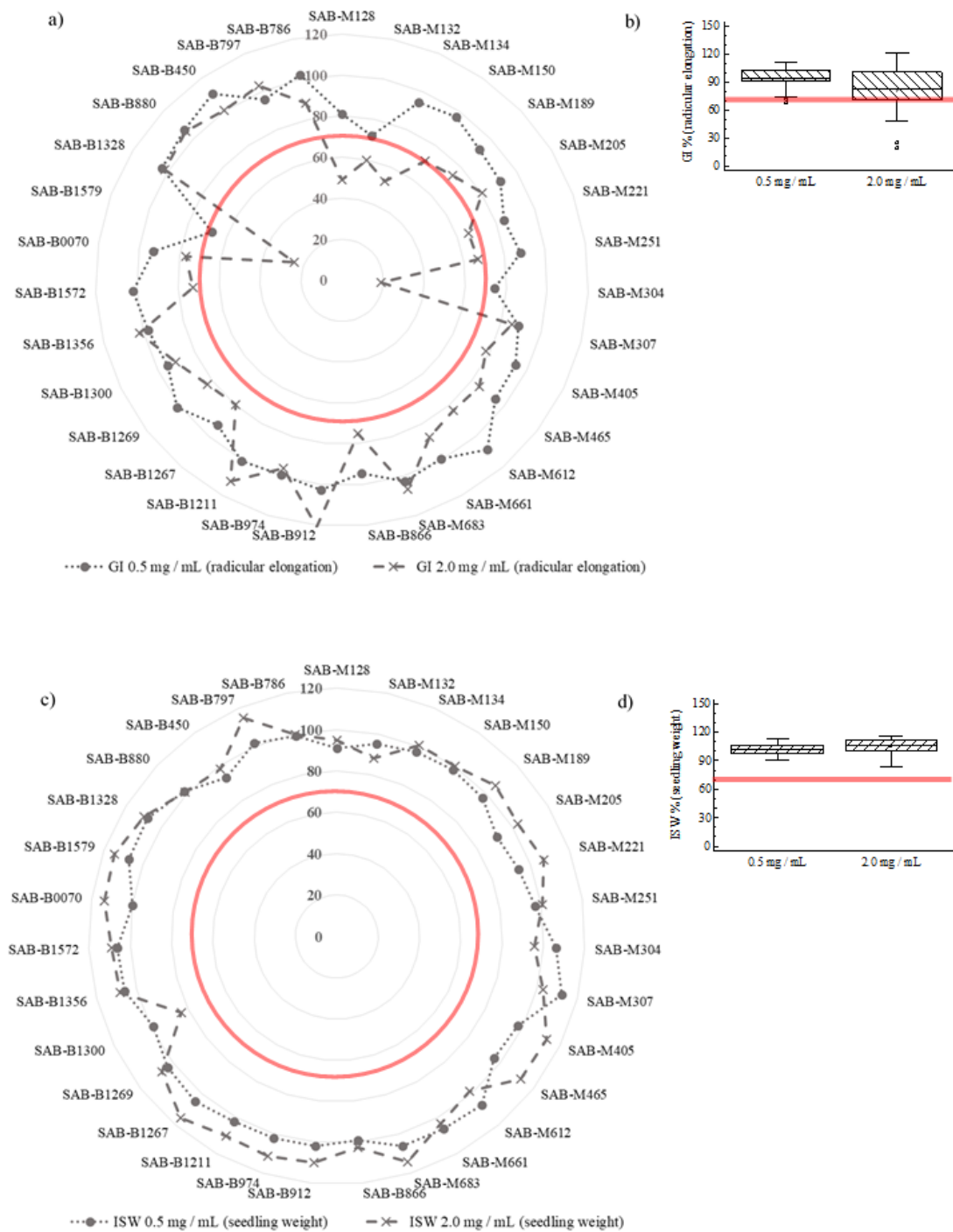
#### 3.1. Growth-promoting effect on germination index (GI) and increase in seedling weight (ISW)

A collection of 31 cyanobacteria was evaluated to study the phytotoxic or phytostimulant effect *in vitro* from cyanobacterial extracts applied in watercress seeds (Fig. 1). For that purpose, two determinations were carried out. On the one hand, Germination Indexes (GI) based on the percentage of germination of watercress seeds and the radicle elongation (Figs. 1a,b), were calculated. On the other hand, Increase of Seedling Weight (ISW), based on the percentage of germination of seeds and the fresh weight of the radicles after emergence was also estimated (Figs. 1c,d).

Regarding Germination Index, those strains which turned around or exceeded 100% GI were considered as potential phytostimulant agents. When aqueous extracts were applied at the concentration of  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , strains SAB-M128, SAB-M612, SAB-M683, SAB-B912, SAB-B1211, SAB-B1269, SAB-B1572, SAB-B1328, SAB-B880, SAB-B450 and SAB-B786 stood out as potential plant growth promoter cyanobacteria (Fig. 1a). Some of the mentioned strains also showed a phytostimulant effect at a higher concentration ( $2.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ); this was the case of the strains SAB-M683, SAB-B912, SAB-B1211, SAB-B1328 and SAB-B880. It should be noted that GI values passed 120% when the extracts from the strains SAB-B912 and SAB-B1211 were applied at  $2.0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Contrary to what was stated above, SAB-M304 and SAB-B1579 were especially phytotoxic, producing values below 25% of germination index (Fig. 1a).

The distribution of the results here obtained revealed a slightly negative trend as the concentration of the extracts applied in this test was increased (Fig. 1b). In fact, based on the box and whisker diagram shown in Figure 1b, near of 100% of the cyanobacteria extracts applied at  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  were positioned in GI values between





**Figure 1.** Biostimulant or Phytotoxic effect derived from extracts of cyanobacteria sonicated by bioassays in watercress seeds: a-c) Mean of Germination Index (GI%) and Increase of Seedling Weight (ISW%) produced by each cyanobacterial extracts at two different concentrations (0.5 and 2.0 mg mL<sup>-1</sup>); b-d) Box and Whisker Plots showing central tendency and dispersion of GI and ISW at two different concentrations (0.5 and 2.0 mg mL<sup>-1</sup>). 100 watercress seeds were used for each of the bioassays carried out; red line indicates the GI (%) and ISW (%) value below which the extracts were considered phytotoxic.

70-115%, showing an average value of GI higher than 90%. In contrast, the results derived from the extracts applied at 2.0 mg mL<sup>-1</sup> followed a more scattered distribution. In this sense, 75% of the strains showed a GI between 70-120%. Remaining 25% belonged to potentially phytotoxic extracts, showing a GI range between 25-70% (Fig. 1b).

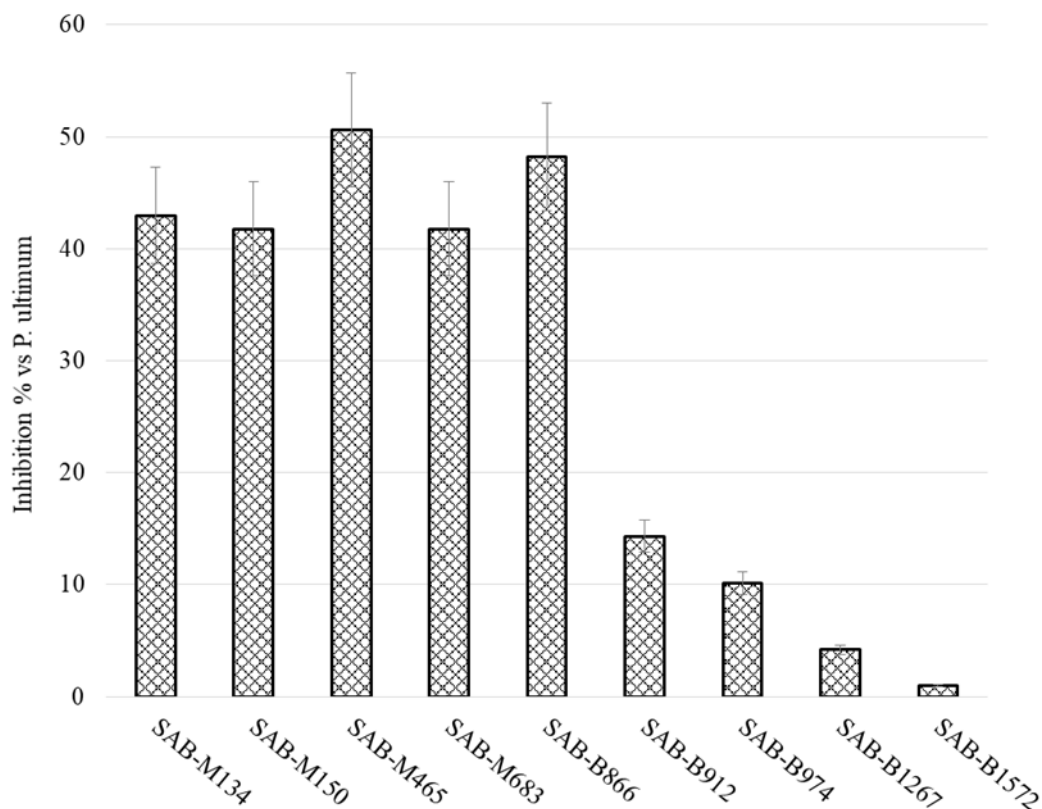
Regarding the weight increase of the germinated radicles (ISW), similarly to what has been considered for GI, strains that were around or exceeded 100% in this parameter were considered potentially phytostimulant, provided they were not phytotoxic with respect to root lengthening. As seen in Figures 1c and 1d, the distribution of the data was very homogeneous with respect to the application of both concentrations of extract. The dispersion of the ISW data was somewhat less in the case of extracts applied at 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, ranging from 90-115%, while it was somewhat greater when the extracts were applied at 2 mg mL<sup>-1</sup> (Fig. 1d). The average mean ISW was above 100% in both cases, showing a null phytotoxic effect of the strains for this parameter. In fact, most of the strains produced an increase of the ISW parameter in relation to the control (distilled water), especially when they were applied at 2.0 mg.mL<sup>-1</sup>. However, no significant differences could be established between the two applied concentrations.

### 3.2. Antagonistic cyanobacteria against the *in vitro* growth of *Pythium ultimum*

In this work, the entire collection of cyanobacterial extracts was analyzed to study its ability to inhibit the *in vitro* mycelial growth of the phytopathogenic oomycete *Pythium ultimum*, a causative agent of *damping-off* in cucumber seedbeds. A first set of tests was performed using the previously described dual culture protocol (see section 2.3.1.).

Approximately one third of all the cyanobacterial extracts, suggested some capability to delay the growth of the phytopathogenic oomycete (Fig. 2), although four of them induced small inhibition zones (% Inhibition < 14).-However, contrary to the aforementioned, five cyanobacterial extracts exhibited a remarkable inhibitory effect against PU growth, which varied from 40 to 50% inhibition (Fig. 2). The maximum inhibition recorded in this work corresponded to the strain SAB-M465, which managed to reduce the mycelial growth of PU more than 50%. For

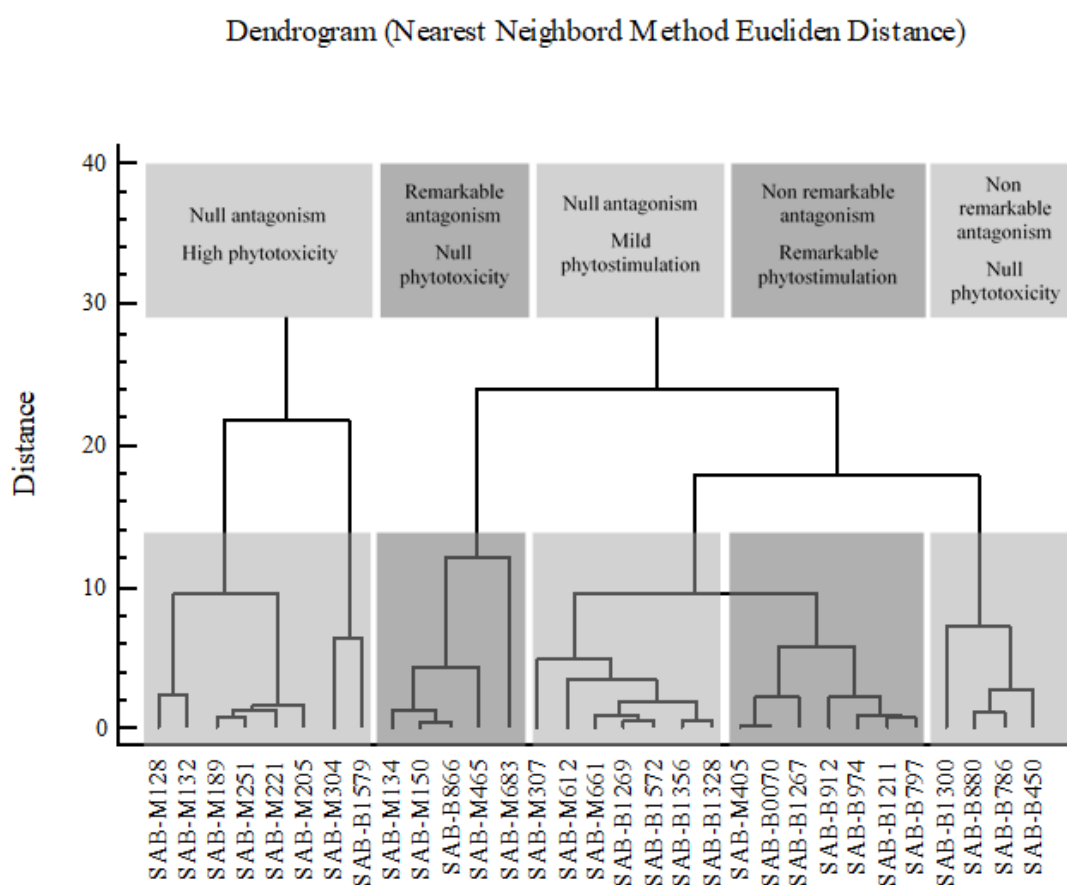
this reason, SAB-M465 was selected as the most potent antagonist strain to be further evaluated in detached leaf and *in planta* bioassays against PU (see sections 3.3. and 3.4.).



**Figure 2.** Inhibition Index (I%) derived from the application of sonicated extracts of cyanobacteria against the *in vitro* growth of *Pythium ultimum*. The figure shows the mean of 4 replicates for each measure of the Inhibition Index. Vertical bars represent standard error values.

Thus, taking into account the three parameters studied *in vitro* with the complete collection of cyanobacteria (GI, ISW and I), a cluster analysis was carried out to classify all the strains studied into affinity groups (Fig. 3). Since the scale on which the different data sets were measured was the same (%), the distances calculated in the dendrogram were comparable. After analysis, five categories were observed, which helped to establish interesting relationships among the 31 strains analyzed. In fact, there was an exact coincidence in the cluster formed by the 5 antagonistic strains considered most significant against PU (Fig. 2). So, SAB-M134, SAB-M150, SAB-M465, SAB-M683 and SAB-B866 were categorized as a single group (“Remarkable antagonism” and “Null phytotoxicity”). Likewise, the 4 strains previously described with slight suppressive capacity (Fig. 2) appeared grouped, most of them, SAB-B912, SAB-B974 and SAB-B1267, in a cluster categorized as

“Non remarkable antagonism”, but “Remarkable phytostimulaton”, while the strain with the smallest antagonistic effect (SAB-B1572), was grouped in a cluster with the strains showing “Null antagonism” and “Mild phytostimulation”. The remaining two clusters corresponded to strains classified radically opposite from each other with respect to their level of phytotoxicity. Those strains showing “High phytotoxicity” were placed to the left of the dendrogram, while those strains with “Null phytotoxicity” were located to the right of the dendrogram (Fig. 3). Nonetheless, both groups agreed on their lack of antagonistic ability against the phytopathogenic oomycete. These results (Fig. 3) showed a potential relationship between the ability to combat plant pathogens and phytotoxicity (or lack of it).



**Figure 3.** Dendrogram of the euclidean distance by the nearest neighbor method: clustering *in vitro* variables: Germination Index (GI%), Increase of Seedling Weight (ISW%) and Inhibition Index (I%).

### **3.3. Detached-leaf bioassay for evaluating resistance to *Pythium ultimum* after treatment with cyanobacterial extracts**

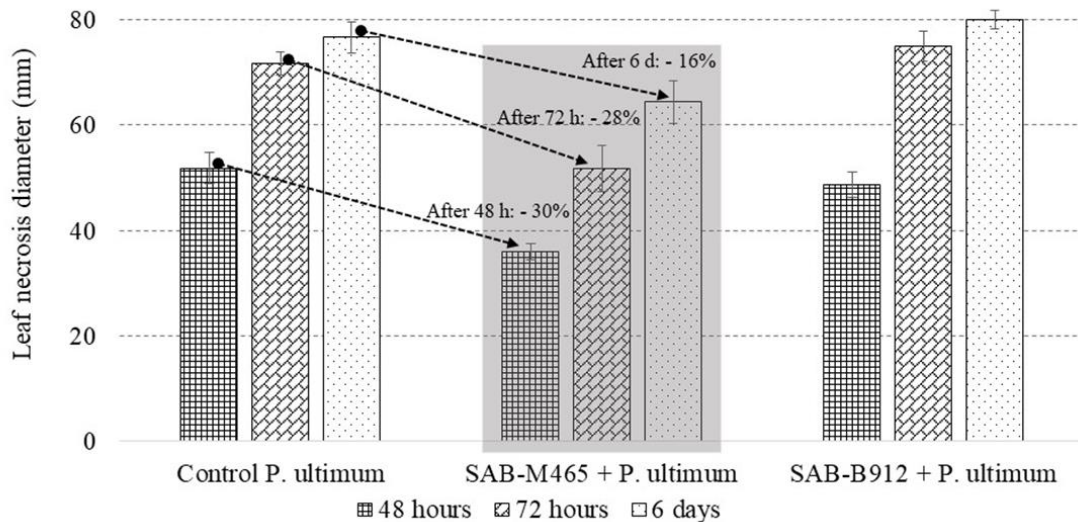
As mentioned in the previous section (3.2.), the mechanisms to combat plant diseases involve both direct inhibition of the pathogen and activation of plant defense systems (Arora *et al.*, 2013). Taking both premises into account, the strain SAB-M465 was selected as the most effective biopesticidal strain, while SAB-B912 was the best biostimulant strain on the basis of results previously described (sections 3.1. and 3.2.). Accordingly, Figure 4 shows the results derived from the detached-leaf bioassay for evaluating resistance to PU after treatment with both cyanobacterial extracts.

The main objective of this experiment was to develop a rapid and effective bioassay to evaluate the potential of the two selected cyanobacteria to inhibit or control PU growth (Fig. 4). For this, freshly cut cucumber leaves were used, so that they remained living and turgid until the appearance of possible symptoms.

Figure 4 shows the results derived from the bioassay conducted on cucumber detached leaves infected with PU and previously treated with the cyanobacterial extracts SAB-M465 and SAB-B912. The bioassay was monitored at 2, 3 and 6 days from the start of the experiment. Both treatments were intended to evaluate the preventive effect of the selected strains against the development of a leaf injury by the pathogenic oomycete. In parallel, negative controls were prepared from distilled water and both cyanobacterial extracts (without PU). As expected, no signs of infection were observed at 48 h, 72 h and six days after inoculation in negative controls.

The effects of inoculating the detached cucumber leaves with the pathogen resulted in a clearly defined decay that rapidly spread to the entire leaf within a few days. In fact, 48 h after inoculation with PU, the lesion reached approximately 51 mm diameter on the inoculated control leaf (Fig. 4). At this sampling time, the development of necrotic damage was superior in the control with respect to both pretreatments. It should be noted that in the case of strain SAB-M465, the presence of the cyanobacteria extract inhibited the growth of PU more significantly. The foliar lesion only grew about 36 mm diameter (SAB-M465) while it reached 48 mm

diameter after the treatment with the strain SAB-B912. Both values supposed an inhibition rate around 30 and 10 %, respectively.



**Figure 4.** Detached-leaf bioassay showing the lesion diameter (mm) caused by *Pythium ultimum* on cucumber leaves pretreated with sonicated cyanobacterial extracts. Lesion diameter evolution was recorded at 2, 3 and 6 days after the beginning of the bioassay. Five replicates were measured for each dual culture. The figure shows the mean of 5 replicates for each measure of the diameter lesion. Vertical bars represent standard error values.

After 72 h, the diameter of the foliar lesions increased considerably in all the cases. In fact, a foliar area higher than 70 mm diameter was affected by PU in the control leaves exclusively inoculated with PU. Similar results were observed in the leaves previously inoculated with strain SAB-B912. Nevertheless, the foliar lesion in the leaves pretreated by SAB-M465 were notably smaller than those regarding control samples. In this case, the diameter of the foliar lesions was around 50 mm, which meant an inhibition rate close to 30% with respect to the control.

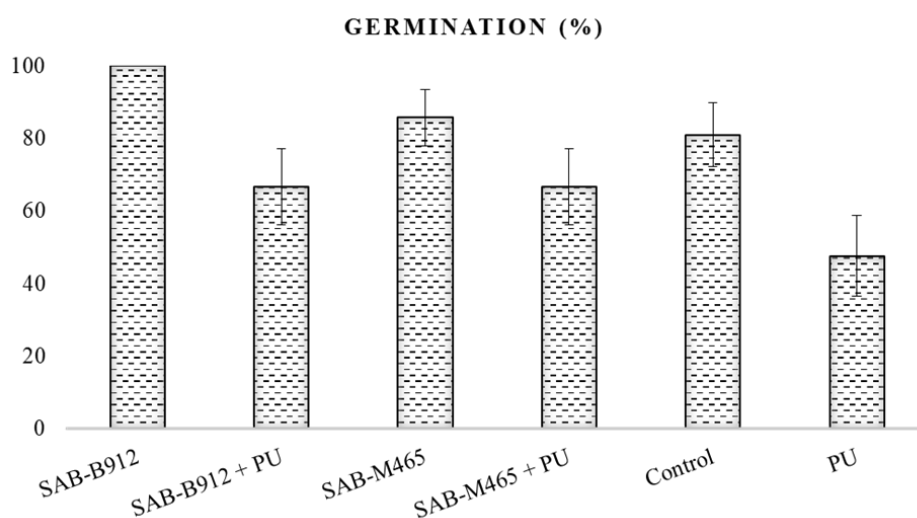
Finally, after 6 days of incubation, both cucumber leaves used as control and those subjected to pretreatment with SAB-B912, presented similar results to those obtained at 72 h, reaching foliar lesions almost 80 mm in diameter. This fact could mean that SAB-B912 did not strictly inhibit the foliar necrotic damage, but it occurred more slowly at the beginning of the bioassay (48 h). Leaf injury caused by PU also continued progressing even in those leaves pretreated with SAB-M465. However, even after 6 days, an inhibition rate against the pathogenic oomycete was observed above 15%, in relation with that detected in control samples.

Summarizing, the development of foliar lesions caused by the oomycete *P. ultimum* was diminished (*in vitro*) in the presence of the extract SAB-M465 at different sampling times. This makes the SAB-M465 cyanobacterium a powerful Biological Control Agent (BCA), which was later applied *in vivo*. On the other hand, the discreet effect of strain SAB-B912 during the earliest phase of the detached leaf bioassay was decisive in deciding to continue working with this strain in subsequent bioassays carried out *in planta*.

### 3.4. Early phytostimulation and plant protection against *damping-off* caused by *Pythium ultimum* by seed *biopriming* with cyanobacterial extracts

In order to examine the *in vivo* potential as plant growth promoters, microbial extracts from the strains SAB-B912 (eminently biostimulant) and SAB-M465 (eminently biopesticide) were applied on cucumber seeds (cultivar Ashley) susceptible to *damping-off*.

Figure 5 shows the results relative to Germination (%) of the bioimmersed cucumber seeds after 10 days from sowing in seed trays composed of 77 seedling cavities each. The determination of this parameter could help to evaluate the *damping-off* effect after PU inoculation of the different experimental blocks.



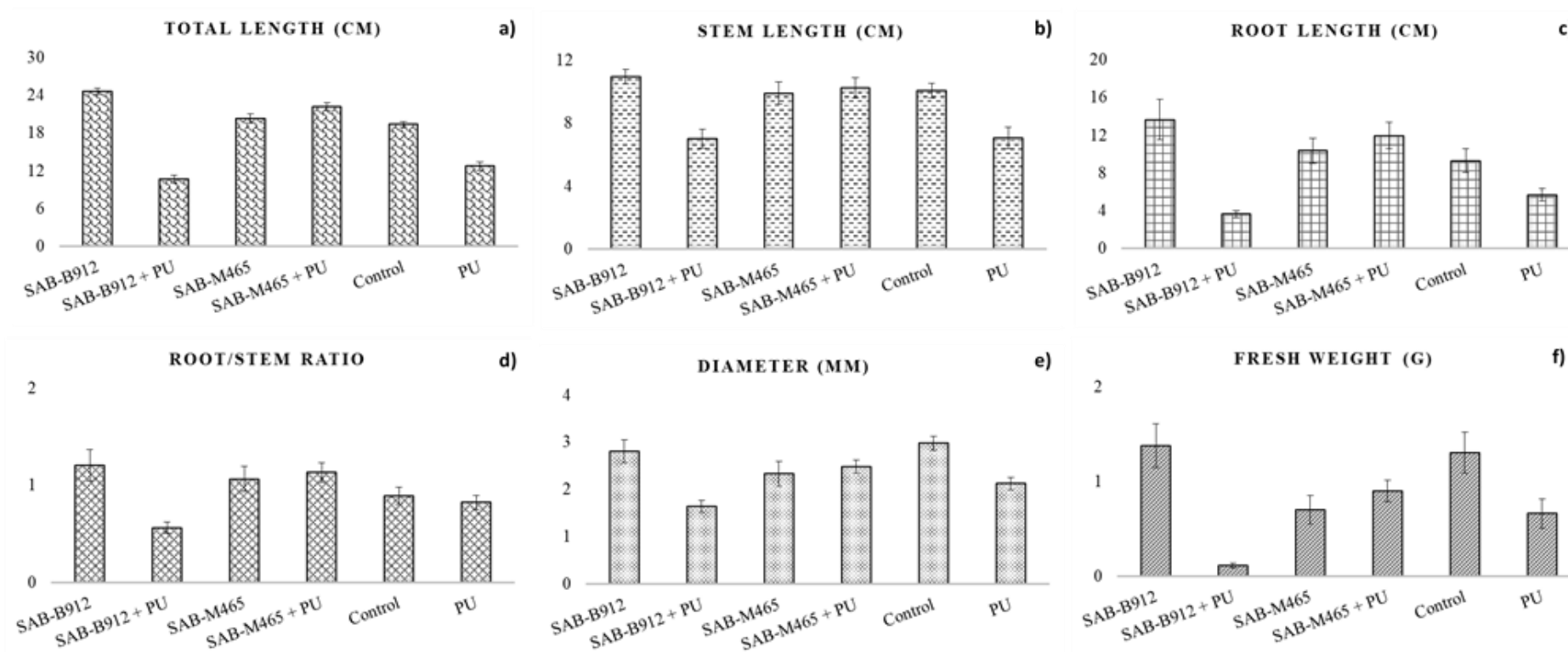
**Figure 5.** Germination percentage (with or without pathogen pressure) of cucumber seeds bioprimed with sonicated extracts from *Tolypothrix* sp. SAB-M465 and *Anabaena* sp. SAB-B912. Control: non bioprimed seeds which had been sown into non infected substrate; PU: non bioprimed seeds which had been sown into infected substrate. Germination % was calculated from bioassays carried out with 30 replicates. Vertical bars represent standard error values.

As observed in Figure 5, seed blocks not subjected to the infectious pressure of PU, registered higher germination percentages than those sown in soil infected with PU (about 50%). It should be noted that the seed blocks subjected to pre-treatment with cyanobacterial extracts exhibited germination percentages even higher than control (about 80%), reaching values near of 90 and 100% in the case of SAB-M465 and SAB-B912, respectively. Once again, SAB-B912 was able to promote the seed emergence stage as it was demonstrated in sections 3.1. Beyond what is described above, when pretreated cucumber seeds were sown in soil previously inoculated with PU, a decrease in the percentage of germination was generally observed, but always lower than detected from the PU infected control block. Thereby, data support a relevant cushioning effect on seeds treated with both cyanobacterial extracts, since the germination percentage (near 70%) exceeded the germination percentage registered from the seed block sown in soil infected with PU without cyanobacterial pretreatment (less than 50%). In view of the results observed in Figure 5, the treatment of cucumber seeds with extracts of cyanobacteria resulted in a significant reduction in *damping-off* (about 36%) in relation to what was observed in the untreated control infected with PU (Fig. 5).

In addition, once the sprouted seeds reached the seedling stage, different parameters associated with plant growth were evaluated to achieve a better understanding of the interaction among each cyanobacterial extract, cucumber seedling and PU, in the case of blocks previously infected with the pathogen oomycete (Fig. 6).

In view of the results observed in Figure 6, the phytostimulatory effect of the applied cyanobacterial extracts in relation to the untreated control block was evident (Fig. 6 a, b, c, d). Such effect was more notable in the case of the extract obtained from the strain SAB-B912, thanks to which the stem and root length of the pretreated plant blocks increased as consequently did, plant total length (Fig. 6 a, b, c). Biostimulant effect was even more significant when root/stem ratio was calculated. Thus, both pretreatments (SAB-M465 and SAB-B912) showed a significant increasing on this parameter regarding to that detected in control plants (Fig. 6d).





**Figure 6.** Measurement of plant growth parameters from cucumber seedlings previously bioprimered with sonicated extracts from *Tolypothrix* sp. SAB-M465 and *Anabaena* sp. SAB-B912. a-f) Total length (cm), stem length (cm), root length (cm), root/stem ratio, stem diameter (mm) and fresh weight (g) are represented. Mean of 30 replicates was used in each case. Vertical bars represent standard error values.

Therefore, plant promoting impact was remarkable when plant size (stem and root length) was considered but such effect was not observed in terms of thickness and fresh weight of the seedlings (Fig. 6e, f). Regarding these parameters, the plants treated with SAB-B912 were not different from the controls (without pretreatment), while the block treated with SAB-M465 were even thinner and showed a lower fresh weight than that shown by the control plants (Fig. 6e, f).

As indicated at the beginning of this section, the *biopriming*-based bioassay had two objectives: (i) to determine the capacity of cyanobacterial extracts to promote plant development during the early stages of plant growth and (ii) to verify the cushioning effect of both strains on PU-infected substrates. In this sense, the observation of the suppressive effect of *damping-off* in *bioprimered* seeds with the SAB-M465 extract was surprising. Stem and root length related data were greater in the case of blocks pretreated with SAB-M465, thus controlling the negative effect of the pathogen oomycete in relation to the size of the plant (Fig. 6a, b,c,d). Such results improved even to those observed in plants not infected with PU. Additionally, the above cited cushioning effect was also detected when stem diameter and plant fresh weight were considered (Fig. 6e, f). Contrary to what was indicated in the case of SAB-M465, plants pretreated with SAB-B912 extracts could not control the pressure of the pathogen present in the infected substrate, giving rise to small plants in which the root system was clearly affected (Fig. 6a-f).

#### 4. Discussion

Numerous investigations support the preventive effect that various biological control agents exert on the development of *damping-off*, avoiding the colonization of plant tissues (seed and roots) by pathogens (Georgakopoulos *et al.*, 2002; Elshahawy and El-Mohamedy, 2019). However, prevention through seed pretreatment has traditionally been carried out through the use of bacteria and fungi as control agents (Schoebitz *et al.*, 2013; Mahmood *et al.*, 2016; O'Callaghan, 2016), while the participation of cyanobacteria in this type of protocol is still preliminary.

Numerous investigations have confirmed the positive effect of the application of cyanobacterial extracts at low concentration (Dmytryk *et al.*, 2014; Aghofack-

Nguemezi *et al.*, 2015; Godlewska *et al.*, 2019). Godlewska *et al.* (2019) demonstrated the stimulating effect of extracts of *Spirulina platensis* on seed germination. Although all concentrations positively influenced radicle length, the data was less surprising at higher extract concentrations.

According to Zucconi *et al.* (1981), GI above 70-80% indicates absence of phytotoxicity, while around or above 100% are indicative values for plant-growth promoting. GI and ISW describe the phytotoxicity or phytostimulant phenomenon from a point of view that integrates both relative germination percentage and relative root growth, with respect to its length and weight, respectively (Zucconi *et al.*, 1981; Emino and Warman, 2004). On the basis of the results here described, the combination of both parameters is a more sensitive indicator of phytotoxicity than the simple calculation of germination percentage. This is observed, despite, or precisely due to the contrast of results found when all the data collected were available. Thereby, while GI verified that the elongation of the radicle is lower as the concentration of the cyanobacterial extracts increased, ISW revealed to be less sensitive to that factor. In this sense, several authors pointed out the great differences observed during the growth of the roots in seeds exposed to the presence of moderately phytotoxic metabolites, but somehow influenced the development of the radicle (Emino and Warman, 2004; Varnero *et al.*, 2007). In the present work, it has been shown that all cyanobacterial extracts influenced (in general) positively the fresh weight of watercress after germination what confirms literature data (Mógor *et al.*, 2018; Godlewska *et al.*, 2019).

Several species of cyanobacteria, known primarily for their role as nitrogen supplements in fields, are also currently considered as potential biocontrol agents. Many of them exhibit antagonistic effect against plant pathogens such as bacteria, fungi and nematodes, mainly as a result of the production of a variety of biologically active compounds (Prasanna *et al.*, 2008; Prasanna *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2013; Natarajan *et al.*, 2013). The biocontrol efficacy of these agents is most likely related to numerous mechanisms of action that include production of antibiotics (Prasanna *et al.*, 2009) and other antimicrobial substances such as hydrolytic enzymes, biocidal compounds such as benzoic and majusculoic acids, or bioactive molecules like siderophores or phytohormones (Natarajan *et al.*, 2012; Singh, 2014).

Several cyanobacterial compounds are involved in the biological control of diseases that affect vegetable crops. This is the case of several antibiotics that contain chlorine in the case of *Scytonema* spp., majusculamide in the case of *Anabaena laxa* or benzoic acid from *Calothrix* spp. (Natarajan *et al.*, 2012; Singh, 2014). In many cases, they improve the immunity of plants by causing the activity of plant defense enzymes (Prasanna *et al.*, 2008). Thus, chitosanase and endoglucanase-type enzymes in various strains of *Anabaena* spp. and *Calothrix* spp. seem to show some similarity with other enzymes of fungal and bacterial origin (Gupta *et al.*, 2013; Natarajan *et al.*, 2013).

Previous studies, related to the antagonistic effect against different phytopathogens associated with *damping-off* disease, yielded up low susceptibility of PU after being confronted with strains considered as biocontrol agents (Jurado *et al.*, 2019). Sánchez-San Fulgencio *et al.* (2018) reported the insignificant inhibitory effect of some compost microorganisms against PU, compared to the effect observed against other fungi or oomycetes responsible for *damping-off*. However, significant antagonistic activity against vascular pathogens has been attributed to cyanobacterial extracts. Some strains identified as *Nostoc muscorum* have been shown to be effective against the growth of *Candida albicans* and *Sclerotinia sclerotiorum*, thanks to the production of bioactive compounds (Stratmann *et al.*, 1994; Zulpa *et al.*, 2003). Furthermore, some strains of *Nostoc* spp. have been considered capable of inhibiting fungi *damping-off* producers, such as *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium alboatrum* and *Phytophthora cinnamomi*, thanks to the action of microbial methanolic extracts (Biondi *et al.*, 2004). In addition to *Nostoc* spp., other cyanobacteria such as *Anabaena* spp. and *Scytonema* spp. showed antifungal activity against *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, *Pythium* spp. and *Rhizoctonia solani* (Kim and Kim, 2008; Yadav *et al.*, 2018). Manjunath *et al.* (2010) evaluated biocontrol potential of filtered extracts of *Calothrix* spp., finding them effective for the control of *damping-off* and other plant diseases. Likewise, Dukare *et al.* (2011) revealed the utility of inoculating compost with the cyanobacterium *Anabaena oscillarioides* to provoke resistance against phytopathogenic fungi that cause *damping-off* in tomato plants. More in detail, some authors revealed the high efficiency of the cyanobacterial culture filtrates,

such as those from *Spirulina platensis* and *Nostoc muscorum*, in suppressing the mycelial growth diameter of several phytopathogenic fungi. This antifungal activity was attributed to the presence of bioactive substances that are, phenolic compounds, proteolytic enzymes and high levels of indol-acetic acid (IAA) (Tantawy, 2011; Prasanna *et al.*, 2013).

Detached leaf bioassays have been previously used as a quick and easy method to assess the virulence of different fungal pathogens causing foliar plant diseases (Pettitt *et al.*, 2011; Cowley *et al.*, 2012) and, therefore, they can be used to detect potential Biological Control Agents (BCAs) (Saxena and Pandey, 2002). This methodology has proven to be very useful for evaluating the antagonistic capacity of various BCAs against molds and oomycetes, despite the fact that the rapid and invasive mycelial growth of both fungal groups could interfere *a priori* with the optimal development of this type of bioassay (Park *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2015, 2016).

Based on previous work, it is known that several strains of *Anabaena* and *Calothrix* exerted activity against species of *Pythium*, *Fusarium* and *Rhizoctonia* (Prasanna *et al.* 2008; Manjunath *et al.* 2010). Among all the compounds synthesized by cyanobacteria, chitosanase homologues, endoglucanase and benzoic acid were detected, and their presence was correlated to the activity against phytopathogenic fungi and oomycetes (Gupta *et al.* 2010, 2011; Prasanna *et al.* 2010). Chitosanase enzymes selectively decompose chitosan and chitin by hydrolysis of the  $\beta$ -(1,4)-glycosidic bonds that link N-acetyl glucosamine residues of chitin. This bioactivity could be partly responsible for the inhibition of PU growth in the detached-leaf bioassay.

Although the use of bioassays of detached parts of plants has been widely used in plant pathology, some authors have reported that there could be limitations derived from the possible deterioration of the plant tissue before the bioassay be successfully completed (Pettitt *et al.*, 2011). However, in this work, this drawback was not observed, given the speed with which the leaf lesion developed in the cucumber detached leaf due to PU inoculation.

Attia *et al.* (2016) stood out that controlling or inhibiting the development of diseases due to plant pathogens was involved in direct suppression, through the

secretion of allelochemicals or secondary metabolites, or indirectly, through the induction of systemic resistance, by producing phytohormone like substances, or eliciting the antioxidant and pathogenesis related machinery of the plant (activity of  $\beta$ -(1,3)-endoglucanase, chitinase, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase or phenylalanine ammonia lyase) (Gayathri *et al.*, 2015). All this, although useful to enhance protection against plant pathogens, would not always lead to direct benefits for plant growth and development. However, in view of the results obtained, one might suspect that the seed treatment with cyanobacterial extracts before sowing can play an important role in increasing crop productivity, since it improves seed quality and germination capacity (Singh *et al.*, 2015). The effect of such treatments in the early stages of plant development could be related to better nutrient absorption, the presence of protective substances and growth regulators. In the present study, cucumber seeds were treated with cyanobacterial extracts that could serve as a source of new biochemically active natural compounds. A clear example of this is described in the work of Mógor *et al.* (2018), where the increase of the fresh biomass of cucumber and lettuce was attributed to the cytokinin-like activity of *Spirulina* extracts.

Traditionally, other different methods are known to apply beneficial microorganisms as a protection measure against phytopathogenic agents. Some examples are foliar application by spraying, direct inoculation in the rhizospheric environment or as part of some type of organic amendment (compost) (Mahmood *et al.*, 2016). However, the strategy applied in this work, *biopriming*, consists of immersing the seeds in a microbial extract for a set time, in order to achieve a lasting and effective primer that ensures plant physiological changes inside the seed just before the emergence of the radicle and plumule. This technique has been shown to improve germination and seedling status, ensuring later the proper growth and yield of crops (Anitha *et al.*, 2013).

In this work, the cyanobacterial extracts were applied in a semi-solid matrix made of sodium alginate to ease the colonization on the seed coat. Multiple possibilities have been highlighted regarding the use of polysaccharides such as sodium alginate, carboxymethyl cellulose or xanthan gum, among others (Angelopoulou *et al.*, 2014; O'Callaghan, 2016). In this sense, alginate has been considered one of the most widely used options in semi-solid microbial

formulations showing an improved ability of microorganisms to colonize plant roots without reducing the cell viability (Schoebitz *et al.*, 2013).

Cyanobacterial extracts could act not only as antifungal agents directly, but also improving the antagonistic capacity of other biological control agents in the rhizospheric environment (fungi, bacteria or yeasts), thanks to the production of bioactive substances that also stimulate microbial activity (El-Mougy and Abdel-Kader, 2013). Therefore, the suppression of *damping-off* through the action of biocontrol agents occurs as a consequence of the interactions occurring among soilborne pathogen, plant and beneficial microbial community (Singh and Sachan, 2013). Though this fact could affect the protective capabilities of the biological control agent and modify the results observed *in vitro* (Errakhi *et al.*, 2007), an effectiveness of up to 35% in the protection of cucumber seedlings against PU has been demonstrated in this work by the preventive protocol described as *biopriming*. Such results are quite promising in relation to the design of biological control strategies based on the use of cyanobacterial extracts.

## 5. Conclusions

The strain SAB-M465 has positioned itself as an excellent control agent against the *damping-off* caused by *P. ultimum* in cucumber cultures. This effect has been shown in early stages of plant development, such as pre and post- emergence, thanks to a promising *biopriming*-based protocol intended to be a preventive seed treatment. Parallel to the cushioning effect of the disease, this strain showed a slight stimulating effect on root development, which could be related to the strengthening of the plant to counteract *P. ultimum* damage. Contrary to what was observed in the case of SAB-M465, SAB-B912 showed a clear growth promoting effect in the early stages of plant development, but it failed to decrease the damage caused to cucumber seedlings grown on PU-infected substrate. This fact coincided in part with what observed in *in vitro* tests.

In view of the results above described, protocols applied in this work aimed at the preliminary characterization of the cyanobacterial collection were very useful for predicting phytotoxic, phytostimulating and biopesticidal capacities. Likewise, the use of the *biopriming* strategy in cucumber seeds was successful as a preventive

treatment of *damping-off* caused by *P. ultimum*, as well as to apply extracts derived from cyanobacteria capable of promoting plant development in pre- and post-emergence phases. Therefore, seed *biopriming* strategy based on cyanobacterial extracts could be considered a promising environmentally sustainable and non-phytotoxic alternative, aimed at the preventive treatment of seeds against fungi and phytopathogenic oomycetes producing *damping-off* in seedbeds.

## 6. Acknowledgements

This research was funded by SABANA Project (Grant No. 727874) from the EU Horizon 2020. The authors of this work appreciate the help provided by professors F.G. Acien (SABANA project coordinator), V. Ordög and J.L. Gómez-Pinchetti, with respect to obtaining the collection of cyanobacteria used in this work.

## 7. Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126766>

The following are the Supplementary data to this article:

Supplementary Table S1



**Table S1.** Collection of cyanobacteria studied in this work: code, origin and scientific name.

Code	Isolated from	Scientific name
SAB-B0912	Seawater	
SAB-B1572	Seawater	<i>Anabaena sp.</i>
SAB-M307	Freshwater	
SAB-B0797	Seawater	
SAB-M405	Freshwater	<i>Calothrix sp.</i>
SAB-B1269	Seawater	<i>Cyanobacteria sp.</i>
SAB-B0866	Seawater	<i>Dolichospermum sp.</i>
SAB-B0070	Seawater	<i>Gloeocapsa sp.</i>
SAB-B1211	Seawater	
SAB-B1267	Seawater	<i>Leptolyngbya sp.</i>
SAB-B0450	Seawater	
SAB-B1328	Seawater	<i>Lyngbya sp.</i>
SAB-B1356	Seawater	<i>Nodularia sp.</i>
SAB-B1300	Seawater	
SAB-B0786	Seawater	
SAB-M132	Freshwater	
SAB-M150	Freshwater	
SAB-M189	Freshwater	<i>Nostoc sp.</i>
SAB-M251	Freshwater	
SAB-M612	Freshwater	
SAB-M661	Freshwater	
SAB-M683	Freshwater	
SAB-B0880	Seawater	<i>Phormidium sp.</i>
SAB-B1579	Seawater	<i>Synechococcus sp.</i>
SAB-M205	Freshwater	
SAB-M465	Freshwater	<i>Tolypothrix sp.</i>
SAB-B0974	Seawater	
SAB-M304	Freshwater	
SAB-M128	Freshwater	<i>Trichormus sp.</i>
SAB-M134	Freshwater	
SAB-M221	Freshwater	

## 8. References

- Abbasi, P.A., Lazarovits, G., 2006. Seed Treatment with Phosphonate (AG3) Suppresses *Pythium damping-off* of cucumber seedlings. *Plant Dis.* 90, 459-464. <http://doi.org/10.1094/PD-90-0459>.
- Aghofack-Nguemezi, J., Schinzoumka, P.A., Tatchago, V., 2015. Effects of extracts or powder of *Jatropha curcas* and *Spirulina platensis* on the growth and development of tomato plant. *J. Appl. Biosci.* 90, 8413–8420. <http://doi.org/10.4314/jab.v90i1.2>.

- ARG, 2021. Andalusian Regional Government. Synthesis of the protected horticultural campaign in Almería. Campaign 2019-20. Council of Agriculture, Livestock, Fisheries and Sustainable Development, Andalusian Regional Government. <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&table=12030&element=2986695>.
- Angelopoulou, D.J., Naska, E.J., Paplomatas, E.J., Tjamos, S.E., 2014. Biological control agents (BCAs) of *verticillium* wilt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. *Plant Pathol.* 63 (5), 1062-1069. <http://doi.org/10.1111/ppa.12198>.
- Anitha, D., Vijaya, T., Reddy, N.V., Venkateswarlu, N., Pragathi, D., Mouli, K.C., 2013. Microbial endophytes and their potential for improved bioremediation and biotransformation: a review. *Indo Am. J. Pharm. Res.* 3, 6408-17.
- Arora, N.K., Tewari, S., Singh, R., 2013. Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs. In: Arora, N.K. (Ed.). *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, New Delhi, pp. 411-449. [http://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4\\_16](http://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_16).
- Attia, M.S., El-Monem M.A. Sharaf, A., Zayed, A.S., 2016. Protective action of some bio-pesticides against early blight disease caused by *Alternaria Solani* in tomato plant. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 4 (11), 2348-7968.
- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodolfi, L., Smith, G.D., Tredici, M.R., 2004. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. Environ. Biotechnol.* 70, 3313-3320. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3313-3320.2004>.
- Bourguet, D., Guillemaud, T., 2016. The hidden and external costs of pesticide use. In: Lichtfouse, E. (ed.). *Sustain. Agric. Rev.* 19. Springer International Publishing, Cham, pp 35-120. [http://doi:10.1007/978-3-319-26777-7\\_2](http://doi:10.1007/978-3-319-26777-7_2).
- Carisse, O., Bernier, J., Benhamou, N., 2003. Selection of biological agents from composts for control of *damping-off* of cucumber caused by *Pythium ultimum*. *Can. J. Plant Pathol.* 25, 258-267. <http://doi:10.1080/07060660309507078>.
- Cowley, R.B., Lockett, D.J., Harper, J.D.I., Ash, G.J., 2012. Development of a reliable and rapid detached leaf assay to detect resistance to the fungal disease phomopsis leaf blight, caused by *Diaporthe toxica*, in *Lupinus albus*. *Can. J. Plant Pathol.* 34 (3), 401-409. <http://doi.org/10.1080/07060661.2012.705327>.
- Dmytryk, A., Rójk, E., Wilk, R., Chojnacka, K., 2014. Innovative bioformulations for seed treatment. Preliminary assessment of functional properties in the initial plant growth phase. *Przem. Chem.* 93(6), 959-963.
- Dukare, A.S., Prasanna, R., Chandra Dubey, S., Nain, L., Chaudhary, V., Singh, R., Saxena, A.K., 2011. Evaluating novel microbe amended composts as biocontrol agents in tomato. *Crop Prot.* 30 (4), 436-442. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.12.017>.
- El-Mougy, N.S., Abdel-Kader, M.M., 2013. Effect of commercial cyanobacteria products on the growth and antagonistic ability of some bioagents under laboratory conditions. *J. Pathol.* 838329. 11 pp. <http://doi.org/10.1155/2013/838329>.

- Elshahawy, I.E., El-Mohamedy, R.S., 2019. Biological control of *Pythium damping-off* and root-rot diseases of tomato using *Trichoderma* isolates employed alone or in combination. *J. Plant Pathol.* 101, 597-608. <http://doi.org/10.1007/s42161-019-00248-z>.
- Emino, E., Warman, P., 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Sci. Util.* 12 (4), 342-348. <http://doi.org/10.1080/1065657X.2004.10702203>.
- Errakhi, R., Bouton, F., Lebrihi, A., Barakate, M., 2007. Evidence of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for *damping-off* disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1503–9. <http://doi.org/10.1007/s11274-007-9394-7>.
- Gayathri, M., Kumar, P.S., Prabha, A.M.L., Muralitharan, G., 2015. *In vitro* regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothece* sp. MBDU 515. *Algal Res.* 7, 100–105. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.009>.
- Georgakopoulos, D.G., Fiddaman, P., Leifert, C., Malathrakis, N.E., 2002. Biological control of cucumber and sugar beet *damping-off* caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1078–1086. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01658.x>.
- Godlewska, K., Michalak, I., Pacyga, P., Basladyńska, S., Chojnacka, K., 2019. Potential applications of cyanobacteria: *Spirulina platensis* filtrates and homogenates in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35 (80). <http://doi.org/10.1007/s11274-019-2653-6>.
- Guo, Y.H., Olsen, R.T., Kramer, M., Pooler, M., 2015. Effective bioassays for evaluating boxwood blight susceptibility using detached stem inoculations. *HortScience.* 50, 268-271. <http://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.2.268>.
- Guo, Y., Olsen, R.T., Kramer, M., Pooler, M., 2016. Use of mycelium and detached leaves in bioassays for assessing resistance to boxwood blight. *Plant Dis.* 100, 1622–1626. <http://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0016-RE>.
- Gupta, V., Prasanna, R., Natrajan, C., Srivastava, A.K., Sharma, J., 2010. Identification, characterization and regulation of a novel antifungal chitosanase gene (cho) in *Anabaena* sp. *Appl. Environ. Microb.* 76, 2769-2777. <http://doi.org/10.1128/AEM.02673-09>.
- Gupta, V., Natarajan, C., Kumar, K., Prasanna, R., 2011. Identification and characterization of endoglucanases for fungicidal activity in *Anabaena laxa*. *J. Appl. Phycol.* 23, 73-81. <http://doi.org/10.1007/s10811-010-9539-1>.
- Gupta, V., Ratha, S.K., Sood, A., Chaudhary, V., Prasanna, R., 2013. New insight into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges. *Algal Res.* 2 (2), 79–97. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.006>.
- Harris, D., Rashid, A., Miraj, G., 2008. On-farm seed priming with zinc in chickpea and wheat in Pakistan. *Plant soil.* 306, 3-10. <http://doi.org/10.1007/s11104-007-9465-4>.
- Hegab, M.M., Khodary, S.E.A., Hammouda, O., Ghareib, H.R., 2008. Autotoxicity of chard and its allelopathic potentiality on germination and some metabolic activities

- associated with growth of wheat seedlings. *Afr. J. Biotech.* 7, 884-892. <http://doi.org/10.5897/AJB07.919>.
- Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2019. Bioprospecting from plant waste composting: Actinobacteria against phytopathogens producing *damping-off*. *Biotechnol. Rep.* 23, e00354. <http://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00354>.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J.D., Judelson, H.S., Ali, G.S., et al., 2015. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 16(4), 413-34. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>.
- Kim, J., Kim, J.D., 2008. Inhibitory effect of algal extracts on mycelia growth of the tomato-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycobiol.* 36, 242–248. <http://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.4.242>.
- Lamichhane, J.R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., Messéan, A., 2016. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Dis.* 100, 10–24. <http://doi:10.1094/PDIS-05-15-0574-FE>.
- Lamichhane, J.R., Dürr, C., Schwanck, A.A., Robin, M.H., Sarthou, J.P., Cellier, V., Messéan, A., Aubertot, J.N., 2017. Integrated management of *damping-off* diseases. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 37, 10. <http://doi.org/10.1007/s13593-017-0417-y>.
- Landa, B., Hervás, A., Bettiol, W., Jiménez-Díaz, R.M., 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasitica.* 25 (4), 305–318.
- Li, L., Ma, J., Ibekwe, A.M., Wang, Q., Yang, C., 2016. Cucumber rhizosphere microbial community response to biocontrol agent *Bacillus subtilis* B068150. *Agriculture.* 6, 1-15. <http://doi.org/10.3390/agriculture6010002>.
- Liu, B., Wei, H., Shen, W. et al., 2020. Long-term effect of non-irrigation and irrigation on soil *Pythium*, *Fusarium*, and *Rhizoctonia* communities and their relation with seed-rot, root-rot, and *damping-off* of soybean. *Eur J Plant Pathol* 158, 297–314. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02059-w>.
- Mahmood, A., Turgay, O., Farooq, M., Hayat, R., 2016. Seed *biopriming* with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw112. <http://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>.
- Manjunath, M., Prasanna, R., Nain, L., Dureja, P., Singh, R., Kumar, A., Jaggi, S., Kaushik, B.D., 2010. Biocontrol potential of cyanobacterial metabolites against *damping-off* disease caused by *Pythium aphanidermatum* in solanaceous vegetables. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 43 (7), 666–677. <http://doi.org/10.1080/03235400802075815>.
- Mógor, Á.F., Ördög, V., Lima, G.P.P., Molnár, Z., Mógor, G., 2018. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *J. Appl. Phycol.* 30, 453–460. <http://doi.org/10.1007/s10811-017-1242-z>.
- Natarajan, C., Prasanna, R., Gupta, V., Dureja, P., Nain, L., 2012. Characterization of the fungicidal activity of *Calothrix elenkinii* using chemical methods and microscopy. *Appl. Biochem. Microbiol.* 48 (1), 51–57. <http://doi.org/10.1134/S0003683812010115>.

- Natarajan, C., Gupta, V., Kumar, K., Prasanna, R., 2013. Molecular characterization of a fungicidal endoglucanase from the cyanobacterium *Calothrix elenkinii*. *Biochem. Genet.* 51 (9), 766–779. <http://doi.org/10.1007/s10528-013-9605-x>.
- O’Callaghan, M., 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (13), 5729–5746. <http://doi.org/10.1007/s00253-016-7590-9>.
- Park, D.S., Saylor, R.J., Hong, Y.G., Nam, M.H., Yang, Y., 2008. A method for inoculation and evaluation of rice sheath blight disease. *Plant Dis.* 92, 25-29. <http://doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0025>.
- Pettitt, T.R., Wainwright, M.F., Wakeham, A.J., White, J.G., 2011. A simple detached leaf assay provides rapid and inexpensive determination of pathogenicity of *Pythium* isolates to ‘all year round’ (AYR) chrysanthemum roots. *Plant Pathol.* 60 (5), 946–56. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02451.x>.
- Prasanna, R., Nain, L., Tripathi, R., Gupta, V., Chaudhary, V., Middha, S., Joshi, M., Ancha, R., Kaushik, B.D., 2008. Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria – possible role of hydrolytic enzymes. *J. Basic Microbiol.* 48 (3), 186–194. <http://doi.org/10.1002/jobm.200700199>.
- Prasanna, R., Nain, L., Ancha, R., Shrikrishna, J., Joshi, M., Kaushik, B.D., 2009. Rhizosphere dynamics of inoculated cyanobacteria and their growth- promoting role in rice crop. *Egypt J. Biol.* 11, 26–36.
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., Nain, L., 2010. Modulation of IAA production in cyanobacteria by tryptophan and light. *Polish J. Microbiol.* 59 (2), 99–105.
- Prasanna, R., Chaudhary, V., Gupta, V., Babu, S., Kumar, A., Singh, R., Singh, Y., S., Nain, L., 2013. Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 136, 337-353. <http://doi.org/10.1007/s10658-013-0167-x>.
- Prasanna, R., Bidyarani, N., Babu, S., Hossain, F., Shivay, Y.S., Nain, L., Moral, M.T., 2015. Cyanobacterial inoculation elicits plant defense response and enhanced Zn mobilization in maize hybrids. *Cogent Food Agric.* 1 (1), 998507. <http://doi.org/10.1080/23311932.2014.998507>.
- Rodríguez, A.A., Stella, A.A., Storni, M.M., Zulpa, G., Zaccaro, M.C., 2006. Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in *Oryza sativa* L. *Saline System.* 2, 7. <http://doi.org/10.1186/1746-1448-2-7>.
- Saadatnia, H., Riahi, H., 2009. Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant Soil Environ.* 55, 207–212. <http://doi.org/10.17221/384-pse>.
- Sánchez-San Fulgencio, N., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M.M., López-González, J.A., Moreno, J., 2018. Biotic aspects involved in the control of *damping-off* producing agents: The role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste. *Biol. Control.* 124, 82-91. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.015>.
- Santoro, M.V., Zygadlo, J., Giordano, W., Banchio, E., 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in

- peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiol. Bioch.* 49, 1177–1182. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.016>.
- Saxena, S., Pandey, A.K., 2002. Evaluation of an indigenous isolate of *Alternaria alternata* (LC# 508) for use as a mycoherbicide for *Lantana camara* L. *Crop Prot.* 21 (1), 71–73. [http://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00042-4](http://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00042-4).
- Schoebitz, M., López, M.D., Roldán, A., 2013. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 751–765. <http://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>.
- Singh, R., Sachan, N.S., 2013. Review on biological control of soil borne fungi in vegetable crops. *Hort. Flora Res. Spectr.* 2(1), 72–76.
- Singh, J.S., 2014. Cyanobacteria: a vital bio-agent in eco-restoration of degraded Lands and sustainable agriculture. *Climate Change Environ. Sustain.* 2, 133–137.
- Singh, R.P., Prasad, P.V.V., Reddy, K.R., 2015. Climate change: implications for stakeholders in genetic resources and seed sector. *Adv. Agron.* 129, 117–180.
- Soleimani, A., Ahmadikhah, A., Soleimani, S., 2009. Performance of different greenhouse cucumber cultivars (*Cucumis sativus* L.) in southern Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 4077–4083.
- Stratmann, K., Moore, R.E., Bonjouklian, R., Deeter, J.B., Patterson, G.M.L., Shaffer, S., Smith, C.D., Smitka, T.A., 1994. Welwitindolinones, unusual alkaloids from the blue-green algae *Hapalosiphon welwitschii* and *Westiella intricata*. Relationship to fischerindoles and hapalinodoles. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 9935–9942. <http://doi.org/10.1021/ja00101a015>.
- Tantawy, S.T.A., 2011. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. *J. Food Agric. Environ.* 9 (1), 663–666.
- Tello, J.C., Varés, F., Lacasa, A., 1991. En: *Manual de Laboratorio. Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos Fitopatógenos*. M.A.P.A., Madrid, 485 pp.
- Varnero, M., Rojas, C., Orellana, R., 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Revista de ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal.* 7 (1), 28–37.
- Yadav, S., Rai, R., Shrivastava, A.K., Singh, P.K., Sen, S., Chatterjee, A., Rai, S., Singh, S., Rai, L.C. 2018. Cyanobacterial biodiversity and biotechnology: a promising approach for crop improvement. In: R Prasad, S.S. Gill, N. Tuteja, (Eds.), *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*, Elsevier, pp. 195–219. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00009-8>.
- Zucconi, F., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle.* 22 (2), 54–57.
- Zulpa, G., Zaccaro, M.C., Boccazzi, F., Parada, J.L., Storni, M., 2003. Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on “wood blue stain” fungi. *Biol. Control.* 27, 345–348. [http://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00015-X](http://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00015-X).



**Artículo 3**

## ARTÍCULO 3

### **Application of sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae for the mitigation of bacterial canker in tomato seedlings**

A.J. Toribio, M.M. Jurado, F. Suárez-Estrella \*, J.A. López-González,  
M.R. Martínez-Gallardo, M.J. López

Publicado en Journal of Applied Phycology.

<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02599-6>.

**Resumen:** Las microalgas y las cianobacterias podrían desempeñar un papel importante en la protección de los cultivos, ya que producen sustancias bioactivas que promueven el crecimiento de las plantas y/o activan los mecanismos de resistencia de las mismas. El presente estudio se centra en el control del cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate mediante el uso de extractos sonicados de cianobacterias y microalgas pertenecientes a los géneros *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp, *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Para el desarrollo de este estudio, en primer lugar, se comprobó la capacidad de 8 cepas para inhibir el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*, así como para producir citoquininas y ácido salicílico. Para descartar aquellas cepas más fitotóxicas, se estimó también el índice de germinación en semillas de berro. En esta primera fase se seleccionaron las cepas *Scenedesmus-677* y *Leptolyngbya-1267* en función de su capacidad pesticida y fitoestimulante *in vitro*. Los bioensayos posteriores en plántulas de tomate mostraron que la aplicación radicular de *Scenedesmus-677* podría estar más dirigida al control de la enfermedad causada por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, mientras que la aplicación foliar y radicular de *Leptolyngbya-1267* parece estar más relacionada con el fortalecimiento de la planta por la vía del ácido salicílico. Estos resultados preliminares podrían servir de base para una caracterización más profunda del efecto biopesticida y bioestimulante de ambas cepas, así como para revelar los beneficios derivados de la combinación de ambas capacidades.

**Palabras clave:** Cianobacterias; microalgas; biopesticida; bioestimulante; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; fitohormonas



**Application of sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae for the mitigation of bacterial canker in tomato seedlings**

A.J. Toribio, M.M. Jurado, F. Suárez-Estrella \*, J.A. López-González, M.R. Martínez-Gallardo, M.J. López

Department of Biology and Geology, CITE II-B, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, ceiA3, CIAIMBITAL, 04120 Almería, Spain

\*Corresponding author: Phone: 00 34 950 015 891; Fax: 00 34 950 015 476; E-mail: [fsuarez@ual.es](mailto:fsuarez@ual.es) (F. Suárez-Estrella)

**Abstract**

Microalgae and cyanobacteria could play an important role in crop protection, since they produce bioactive substances that promote plant growth and/or trigger the plant resistance mechanisms. The present study focuses on the control of bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato plants by using sonicated extracts from cyanobacteria and microalgae belonging to the genera *Leptolyngbya* sp., *Nostoc* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. For the development of this study, 8 strains were firstly tested for their capacity to inhibit the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* *in vitro*, as well as to produce cytokinins and salicylic acid. In order to discard those more phytotoxic strains, the Germination Index was also estimated in watercress seeds. *Scenedesmus*-677 and *Leptolyngbya*-1267 strains were selected in this first phase based on their pesticide and phytostimulant capacity *in vitro*. Subsequent bioassays on tomato seedlings showed that root application of *Scenedesmus*-677 could be more aimed at controlling the disease caused by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, while foliar and root application of *Leptolyngbya*-1267 seems to be more related to the strengthening of the plant through the salicylic acid route. These preliminary results could serve as the basis for a deeper characterization of the biopesticidal and biostimulant effect of both strains, as well as to reveal the benefits derived from the combination of both capacities.

**Keywords:** Cyanobacteria; microalgae; biopesticide; biostimulant; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; phytohormones

## 1. Introduction

Plant diseases are an important threat to many agricultural and horticultural crops. However, the indiscriminate use of pesticides and synthetic fertilizers during decades has caused serious problems to human and animal health and the environment. These include the reduction of soil fertility, the increase in the solubility of toxic heavy metals, and the development of new pathogens that devastate crops and cause enormous economic losses worldwide (Kumar and Verma 2013; Raymaekers et al. 2020). Considering that the use of soil fumigants is being restricted in Europe and other areas of the world, alternative methods for plant pathogen control are needed (Termorshuizen *et al.*, 2006).

In this last scenario, the damages caused by the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, responsible for the bacterial canker in tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), should be highlighted. The main host of economic importance for that pathogen is tomato but natural infection has also been reported on *Capsicum annuum* (Latin et al. 1995). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* is an aerobic, non-motile, Gram-positive, non-sporing, curved rod, that is internationally considered a quarantine organism worldwide distributed (EPPO 2016). Infection of the plant by this bacterium occurs by the entry of the pathogen through natural openings or wounds in roots, stems, and leaves (Nandi et al. 2018). The symptoms described so far are variable and influenced by plant age, cultivar type and environmental factors. In the field, the first symptom is desiccation of the edge of the leaflets. The plant slowly desiccates, with or without exhibiting wilting (Gleason et al., 1991). Under greenhouse conditions, the first symptom is a reversible wilting of leaves during hot weather, later becoming irreversible. The whole plant then desiccates. Leaves may show white interveinal areas, turning brown and necrotic generally before wilt symptoms appear (Gitaitis et al. 1991). Unilateral wilting or withering of leaflets on one side of the leaf, and bird's eye-spot lesions on the fruit surface are the outstanding features for diagnosis of tomato bacterial canker. In advanced infection, vascular discoloration is seen as brown streaks on the stem and petiole. Once it is detected, chemical control is practically impossible. Moreover, there are no hybrids or tomato cultivars with acceptable genetic resistance on the market against *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis*. This could be due to the genetic complexity and the genomic

instability of this microorganism, the micro-evolutionary changes in the host-pathogen system, as well as the emergence of highly resistant biotypes derived from the continued use of large amounts of chemical pesticides (Khaliluev and Shpakovski 2013). Therefore, prevention is the most effective control of bacterial canker, based on the reduction of the inoculum and the use of healthy seeds and seedlings (De León et al. 2011; EFSA 2014).

Biological control of plant diseases is the suppression of plant pathogens populations by living organisms (Heimpel and Mills 2017; Lenteren et al. 2018). In this sense, biological control constitutes an excellent alternative or complement to agrochemicals for disease management, since it aims to reduce the density or activity of the pathogen causing the disease, by enhancing one or several autochthonous biological antagonists, or by introducing or inoculating strains previously described as biological control agents. In addition, these agents can provide an extra benefit for the plant, improving growth and development and even inducing resistance mechanisms in the plant itself (Köhl et al. 2019).

Regarding bacterial canker of tomato, several Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) having antagonistic activities towards *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* have been isolated and studied (Deng et al. 2015; Aksoy et al. 2017). Thereby, seed treatments with both *Pseudomonas* and *Bacillus* strains improved the tomato plants quality and notably decreased the bacterial canker incidence in field studies (Umesha 2006; Kasselaki et al. 2011).

Today, manufacturers and researchers have paid special attention to the biotechnological applications of microalgae and cyanobacteria. The great diversity and plasticity of these microorganisms make them a magnificent source of high-value bioactive compounds. In recent years, cyanobacteria and microalgae have attained great importance due to the fact that they have not only been classified as beneficial bio-agents based on their capability to produce biomass for bio-fuels, food supplements, and bio-fertilizers for safe agriculture, but also for their role in regulating plant productivity (Sing et al., 2016). Among the most interesting applications of algae and cyanobacteria are their antimicrobial properties, their fertilizer capacity, and their use as food preservatives (Mendiola et al. 2007; Alsenani et al. 2021). These type of microorganisms not only do not compete

negatively with the microbiota associated with the plant-soil system, but also potentially favor the beneficial activity attributed especially to the rhizo-microbiota, in addition to improving soil fertility, seed germination, plant growth, nutritional value, and crop yield (Renuka et al. 2018). Some bioactive compounds produced by them are represented by siderophores, alkaloids, amides, fatty acids and indoles, or antifungal, antiviral and antibacterial substances such as lipopeptides and polyketides (Singh et al. 2017; Meena et al. 2017).

The control of plant pathogens through the application of commercial products based on microalgae and cyanobacteria is still in a very preliminary stage (Singh et al. 2016). However, the potential of these microorganisms denote the interest of researchers in continuing to deepen this path. Photosynthetic microbes have the advantage of being organisms with minimal nutritional requirements and rapid growth rates (Herrero and Flores 2008). Along with having a multitude of adaptations to extreme situations, especially in the case of cyanobacteria, that allow them to be competitive against high temperatures, UV radiation, dryness, and saline and water stress (Singh et al. 2010). In fact, this metabolic plasticity has made it possible to find them in most soils and to maintain a high level of diversity and abundance in different ecosystems, including agro-ecosystems (Araujo et al. 2018).

Nevertheless, the formulation and subsequent inoculation of these agents will depend on various aspects. For instance, the microbial state (live microorganism or metabolic extract; fresh or dry biomass), mode of application (aerial, root, seed), as well as the moment in which is applied. In this last case, a preventive method could be used prior to the presence of the pathogen, or curative, after the outbreak of the infection (Han et al. 2012; Palaniyandi et al. 2013).

Several cyanobacterial strains of *Oscillatoria* spp., *Anabaena* spp., *Nostoc* spp., *Nodularia* spp., and *Calothrix* spp., isolated from different soils are known as antifungal agents against plant pathogens such as *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea*, or *Rhizopus stolonifer* (Kim 2006). Exo-metabolites from cyanobacteria *Nodularia harveyana* and *Nostoc insulare* show antibacterial and antifungal activities (Volk and Furkert 2006). Extracellular diterpenoids of *Nostoc commune* also exhibit antibacterial properties (Jaki et al. 2000). Moreover, microalgae possess molecules that can act as biopesticides, thus protecting the plant against pathogens,

mainly fungi or bacteria. Specifically, the production of antibiotics and siderophores from *Chlorella* and *Scenedesmus* and other marine or freshwater microalgae has been previously described (Mendiola et al. 2007; Alsenani et al. 2021; Lee et al. 2020). However, though the use of ultrasound for the control of cyanobacterial and microalgal blooms has been widely studied, the application of sonicated extracts for phytostimulation and plant disease control is a novel topic for which only very recent references are available. In this sense, recent studies have shown that the inoculation of some cyanobacterial extracts from *Calothrix* sp., *Nostoc* spp. or *Trichormus* sp. significantly brought about beneficial changes in cucumber seedlings as well as the control of some plant pathogens (Toribio et al., 2020, 2021).

Based on the above, the main aim of this study was to evaluate the potential bioprotective and biostimulant effect of a collection of sonicated extracts from 5 microalgae and 3 cyanobacteria against the pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (tomato canker) in tomato seedlings. Both effects were evaluated by using *in vitro* and *in vivo* methods and considering different forms of plant treatment (root irrigation and foliar spray). This study will lay the foundations for future research on the use of cyanobacteria and microalgae as important agro-biotechnological tools, not only for their recognized biofertilizing capacity, but also for the management of devastating phytopathogenic bacteria.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Microorganisms

#### 2.1.1 Phytopathogenic agent

A lyophilized sample of the strain *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CECT 790 was supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain) and then reconstituted in Nutrient Agar plates (NA, CM0003, Oxoid Ltd. UK) and kept in slant at 4 °C.

#### 2.1.2 Collection of cyanobacteria and microalgae and getting extracts

Five microalgae, *Chlorella* sp.-1, *Chlorella* sp.-361, *Chlorella* sp.-519, *Chlorella* sp.-568 and *Scenedesmus* sp.-677 and three cyanobacteria, *Nostoc* sp.-150, *Nostoc* sp.-251 and *Leptolyngbya* sp.-1267 were provided as lyophilized

biomass from the international centres of Mosonmagyaróvár Algal culture collection (MACC, Mosonmagyaróvár, Hungary) and the Spanish Bank of Algae (SBA, Gran Canaria, Spain) (from now on, to facilitate the description of the results and the interpretation of the Figures, the microbial strains will be referenced as *Chlorella*-1, *Chlorella*-361, *Chlorella*-519, *Chlorella* -568, *Scenedesmus*-677, *Nostoc*-150, *Nostoc*-251 and *Leptolyngbya*-1267). For extract preparation, a stock solution was prepared by suspending 100 mg of lyophilized biomass (LB) from each cyanobacterium and microalgae strain in 1 mL of sterile distilled water. The solution was subjected to a sonication process at 40% amplitude for 3 min (Branson Digital Sonifier SFX 150). The extracts were centrifuged at 4,000 g for 5 min and the supernatants were kept in a cold chamber at 4 °C until use. Following the recommendations published by some authors (Navarro-López et al. 2020; Carneiro et al. 2021; Masojídek et al. 2021), the stock extracts were subsequently diluted in sterile distilled water at 25, 10, 2, 0.5 and 0.1 mg mL<sup>-1</sup> depending on the bioassays to be performed.

## 2.2 *In vitro* bioassays

### 2.2.1 *Antibacterial activity against Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

Once the cyanobacteria and microalgae biomass were sonicated and diluted to 10 mg mL<sup>-1</sup>, their biological activities were tested against *C. michiganensis subsp. michiganensis* by a well diffusion assay following the protocol described by Suárez-Estrella et al. (2019). First, 2% water agar (WA) plates were prepared. Over the solidified agar, four 8 mm diameter steel cylinders were placed equidistant from the edge of the Petri dish. A second layer of NA was added on the WA plates. Once NA had solidified the cylinders were removed. A 48 h old *C. michiganensis subsp. michiganensis* culture prepared in 5 mL of Nutrient Broth (NB, CM0001 Oxoid Ltd. UK) and incubated at 30 ± 1 °C under dark conditions, was spread over the surface of the double layer of culture medium with a sterile swab previously soaked in the bacterial culture. The wells were filled with 70 µL of the different extracts. Four replicates were considered for each extract-*C. michiganensis subsp. michiganensis* combination, each corresponding to one well of the same Petri dish.

A Petri dish inoculated only with the phytopathogenic bacterium and confronted with distilled water inside the wells was considered as a negative control of the assay. The whole experiment was repeated twice. Finally, inhibition of *in vitro* growth of *C. michiganensis subsp. michiganensis* was measured after incubating the plates at  $30 \pm 1$  °C under dark conditions for 48 h. The inhibition index (I) was expressed as the percentage of *C. michiganensis subsp. michiganensis* growth inhibition in the presence of the antagonistic strain using the following formula:

$$I = 100 - [G - (D - 8) / 90] \times 100$$

Where:

I: Inhibition Index (%)

G: growth of the phytopathogenic agent in absence of the antagonistic extract (in this case it would be 90 mm, since the bioassays were carried out in 90 mm petri dishes).

D: diameter of growth inhibition around the wells in presence of antagonistic extracts (mm).

### 2.2.2 *Determination of salicylic acid (SA) and cytokinins (CKs) in sonicated extracts*

Sonicated, centrifuged and filtered extracts of cyanobacteria and microalgae for quantification of SA and CKs were used at the concentration of 100 mg LB mL<sup>-1</sup> and 25 mg LB mL<sup>-1</sup>, respectively. The quantification of both phytohormones was carried out by immunodiagnostic tests according to the supplier's instructions (Plant Cytokinin CYT ELISA Kit, MyBiosource ref. MBS269996; Plant Salicylic acid SA ELISA Kit, MyBiosource ref. MBS9314138). The absorbance of the samples was measured at a wavelength of 450 nm, in a Thermo Scientific Multiskan FC spectrophotometer and three replicates were taken into account for the analysis of the results. SA content was expressed in µg mL<sup>-1</sup>, while CKs was expressed in ng mL<sup>-1</sup>.

### 2.2.3 *Effect of sonicated extracts on germination of watercress seeds*

The bioassay to evaluate the stimulating effect of extracts on watercress seed germination was previously described by Zucconi et al. (1981). Promotion effect was tested on four replicates of 25 seeds for each cyanobacterial and microalgae

extract prepared at 2 and 0.5 mg LB mL<sup>-1</sup>. To calculate Germination Index (GI), percentage of seed germination and elongation of the radicle (mm) were taken into account, based on the following formula:

$$GI = (Ge\% * REe) / (Gdw\% * REDw) * 100$$

Where:

GI: Germination Index (%)

Ge%: percentage of germinated seeds in presence of extract

Gdw%: percentage of germinated seeds in presence of distilled water

REe: mean of radicle elongation (mm) in presence of extract

REDw: mean of radicle elongation (mm) in presence of distilled water

### **2.3 *In planta* bioassays: Treatment of tomato seedlings with sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae**

#### *2.3.1 Protective effect of the cyanobacteria and microalgae extracts by foliar and vascular application towards *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seedlings*

The most effective cyanobacterial and microalgae extracts selected from preliminary experiments (*in vitro*), were *in vivo* assayed by foliar and root application to evaluate the preventive effect towards *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. For this purpose, a sterile substrate mixture was initially prepared (peat:vermiculite at 3:1 ratio). The substrate was spread out on seedling trays with 77 alveolus and then regularly irrigated. A tomato seed (*Solanum lycopersicum* var. San Pedro) was sown in each alveolus and germinated for three weeks (up to two true leaves) at 25 °C, 60% humidity and a 12-hour photoperiod in a climate control chamber (ERIS 615 HR, EQUITEC). Then, the extracts were prepared as described in the section of Material and Methods (“Collection of cyanobacteria and microalgae and getting extracts”), but in this case, only the 0.1 mg mL<sup>-1</sup> dilution was applied.



The root treatment was carried out by watering the substrate at the rhizosphere level of each seedling with 25 mL of the sonicated, centrifuged and filtered extract. In parallel but in different plant sets, the foliar treatment was carried out by spraying 1 mL of the extracts on the leaf surface of the seedling. Both treatments were carried out in random blocks. Three block of 30 seedlings each were evaluated per treatment. Blocks of 30 untreated plants (negative controls) were also evaluated in parallel.

### 2.3.2 Protocol for inoculation of tomato seedlings with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and monitoring of infection status

A *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* culture was incubated in 50 mL NB for 48 h, at 28 °C and shaking at 120 rpm. After incubation, 20 ml of the culture was centrifuged for 20 min at 2,800 x g, the supernatant was removed and the precipitate was washed twice with 5 mL of 0.9% NaCl. Finally, the pellet was washed with 5 mL of sterile distilled water and the cell density was adjusted to approximately  $10^5$  cfu mL<sup>-1</sup> by counting in a Neubauer chamber.

One week after foliar and root application with the sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae, tomato seedlings were artificially infected with the *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* inoculum. The inoculation method was adapted from that previously described by Fatmi and Schaad (2002). In this case, twenty micro-wounds were made in the stems of tomato seedlings at the level of the second or third true leaf using a sterile needle. Artificial infection of the plants was carried out with the help of a sterile swab soaked in about 500 µl of the previously prepared suspension of the phytopathogenic bacteria ( $10^5$  cfu mL<sup>-1</sup> of *Cmm*). A block of 30 plants not previously treated with any extract (positive controls) was also infected with *Cmm*. Another block of uninfected and untreated thirty plants was considered the negative control of the bioassay.

The typical symptoms of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* were periodically monitored during 3 weeks, taking into account the visual aspect of the infected plants. At twenty days post-infection, the level of affection of the plants was evaluated by applying a scale from 0 to 4, depending on the presence or absence of symptoms, being 0 = healthy plant, 1 = local lesions in the stem, 2 = mild wilting or decay, 3 = wilting and marginal necrosis on leaves and 4 = death plant. After

monitoring symptoms, stem portions from infected and negative control plants were surface-disinfected with ethanol for 5 seconds and rapidly flamed, macerated and plated on Yeast Dextrose Carbonate Agar (YDC: Yeast extract, 10 g; Glucose, 20 g; CaCO<sub>3</sub>, 20 g; Agar, 15 g; distilled water, 1000 mL) to confirm the presence of typical *C. michiganensis subsp. michiganensis* colonies. This protocol was used to establish the Infectivity Index, which was expressed as the percentage of plants from which the pathogen bacterium was detected on YDC agar medium.

### 2.3.3 Evaluation of foliar and root application of cyanobacterial and microalgae extracts on tomato seedlings

Blocks of plants not infected with *C. michiganensis subsp. michiganensis* but previously treated by foliar and vascular route with extracts of cyanobacteria and microalgae were evaluated. The objective in this case was to establish the capacity of these extracts to stimulate the development of tomato seedlings according to the different treatments. The phytostimulant effect was evaluated as previously described by Santoro et al. (2011). Thereby, the following parameters were measured to evaluate the plant vigor: stem and root length (cm), stem diameter (mm), fresh and dry weight (g), and root/stem ratio (R/S ratio).

## 2.4 Statistical analyses

The data obtained was subjected to statistical analysis using the Statgraphics Centurion XVII program. The normal distribution of the data was previously confirmed by means of Royston's test and the determination of the kurtosis index (Royston 1983; Svantesson and Wallace 2003). A dendrogram was used to examine the merging of hierarchical clusters (Schonlau 2004; Johnson and Wichern 2007). Thus, a linkage between groups was used as a grouping method for the variables analysed *in vitro*. The interval measured in this case was the Euclidean distance squared. In addition, *in vitro* variables were also correlated by calculating the Spearman correlation coefficient at  $P < 0.05$ . The selection of the best phytostimulant and biopesticide strains was finally carried out by applying a multivariate analysis of variance (ANOVA) and a Fisher multiple comparison test (least significant difference test) at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1 *In vitro* bioassays

##### 3.1.1 *Antibacterial activity against Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

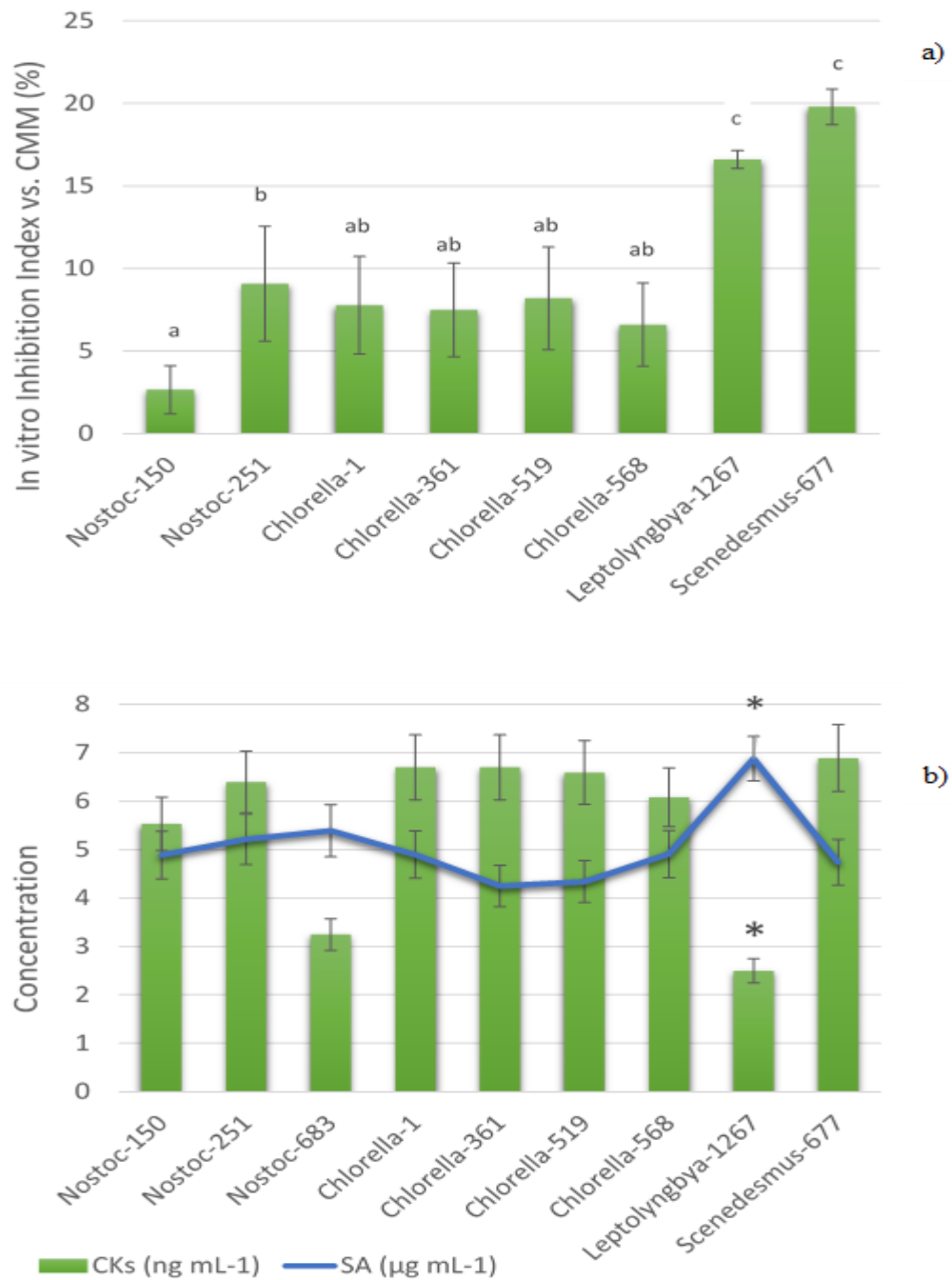
In this work, the effect of the sonicated microbial extracts from cyanobacteria and microalgae were *in vitro* analyzed against the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), the agent responsible for bacterial canker in tomato plants. A set of tests was performed using the previously described well diffusion assay (see section “Antibacterial activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*”).

Results obtained in this work suggested the capability of some of the tested strains to inhibit significantly the growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* *in vitro* (Fig. 1a), highlighting *Leptolyngbya*-1267, and *Scenedesmus*-677, which exhibited a remarkable inhibitory effect against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (17 and 20%, respectively) (Fig. 1a). On the contrary, a more discrete antagonistic effect was detected for the rest of the strains, being almost insignificant in the case of the *Nostoc*-150 (less than 3%). For this reason, *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677 were positioned as powerful candidates to be further evaluated *in planta* bioassays against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* infection.

##### 3.1.2 *Determination of salicylic acid (SA) and cytokinins (CKs) in sonicated extracts*

All the cyanobacteria and microalgae extracts of the collection studied in this work were tested for the production of CKs and SA. In the case of CKs, the values ranged between 5 and 7 ng mL<sup>-1</sup> in most of the extracts analyzed. However, the lowest significant value of CKs was shown in the extract from *Leptolyngbya*-1267 strain (3 ng mL<sup>-1</sup>) (Fig. 1b). The data related to the production of salicylic acid (SA) ranged between 5 and 7 µg mL<sup>-1</sup>. In this case, the values were significantly higher in the extract from *Leptolyngbya*-1267 (Fig. 1b). It should be noted that the SA / CK ratio in all the extracts analyzed was lower than 1000, except for the strain

*Leptolyngbya*-1267 whose SA / CK ratio was close to 3000 (SA concentration is expressed as  $\mu\text{g mL}^{-1}$  while for CK it is in  $\text{ng mL}^{-1}$ ).

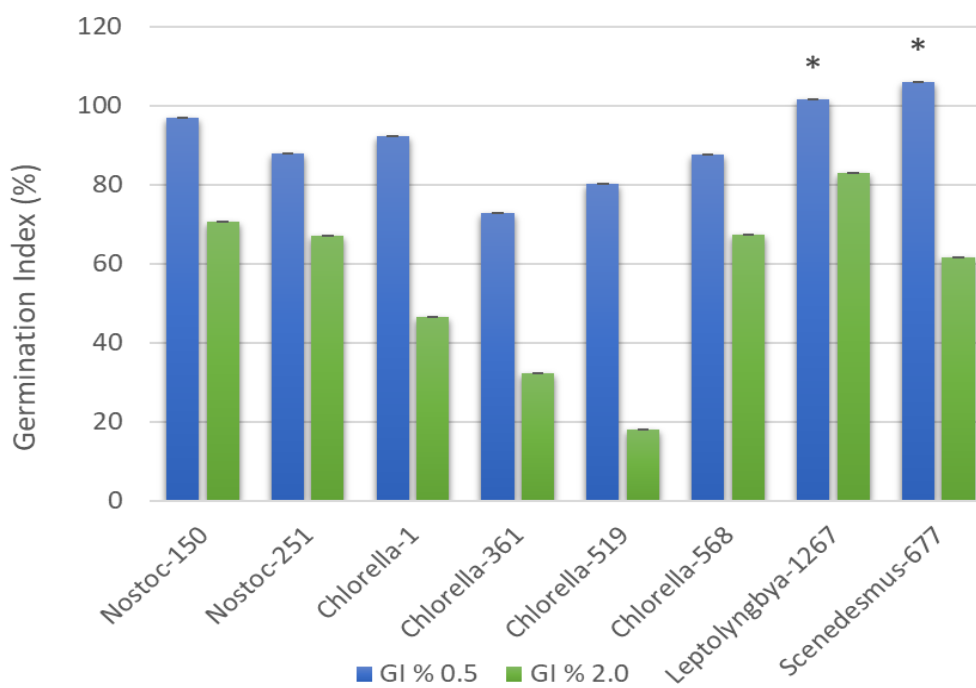


**Figure 1.** a) *In vitro* antagonistic effect of sonicated extracts of microalgae and cyanobacteria against the growth of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (CMM). Bars indicate standard error. The letters above the bars indicate different homogeneous groups with statistically significant differences (Fisher's LSD Test,  $P < 0.05$ ). b) Cytokinins (CKs,  $\text{ng mL}^{-1}$ ) and salicylic acid (SA,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) concentration in sonicated extracts of microalgae and cyanobacteria. Bars indicate standard error. Asterisks show different homogeneous groups with statistically significant differences (Fisher's LSD Test,  $P < 0.05$ ).

### 3.1.3 Effect of sonicated extracts on germination of watercress seeds

The sonicated extracts from the collection of cyanobacteria and microalgae were evaluated to determine their phytotoxic or phytostimulant effect by *in vitro* application on watercress seeds (Fig. 2).

According to Zucconi et al. (1981), a GI value above 70-80% indicates the absence of phytotoxicity, while a value close to or greater than 100% is indicative of a plant growth promoting effect. As shown on Figure 2, almost all extracts applied at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> were positioned at GI values between 80-110%, showing an average GI value higher than 90%. Still, it should be noted that the highest phytostimulant potential was shown by the extracts of the strains *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677 at a concentration of 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. In contrast, the results derived from the extracts applied at 2.0 mg mL<sup>-1</sup> showed an apparently negative effect. In this case, GI values ranged between 18-70%, corresponding to potentially phytotoxic extracts. Only the GI value from *Leptolyngbya*-1267 extract stayed out the range of phytotoxicity at a concentration of 2.0 mg mL<sup>-1</sup>.

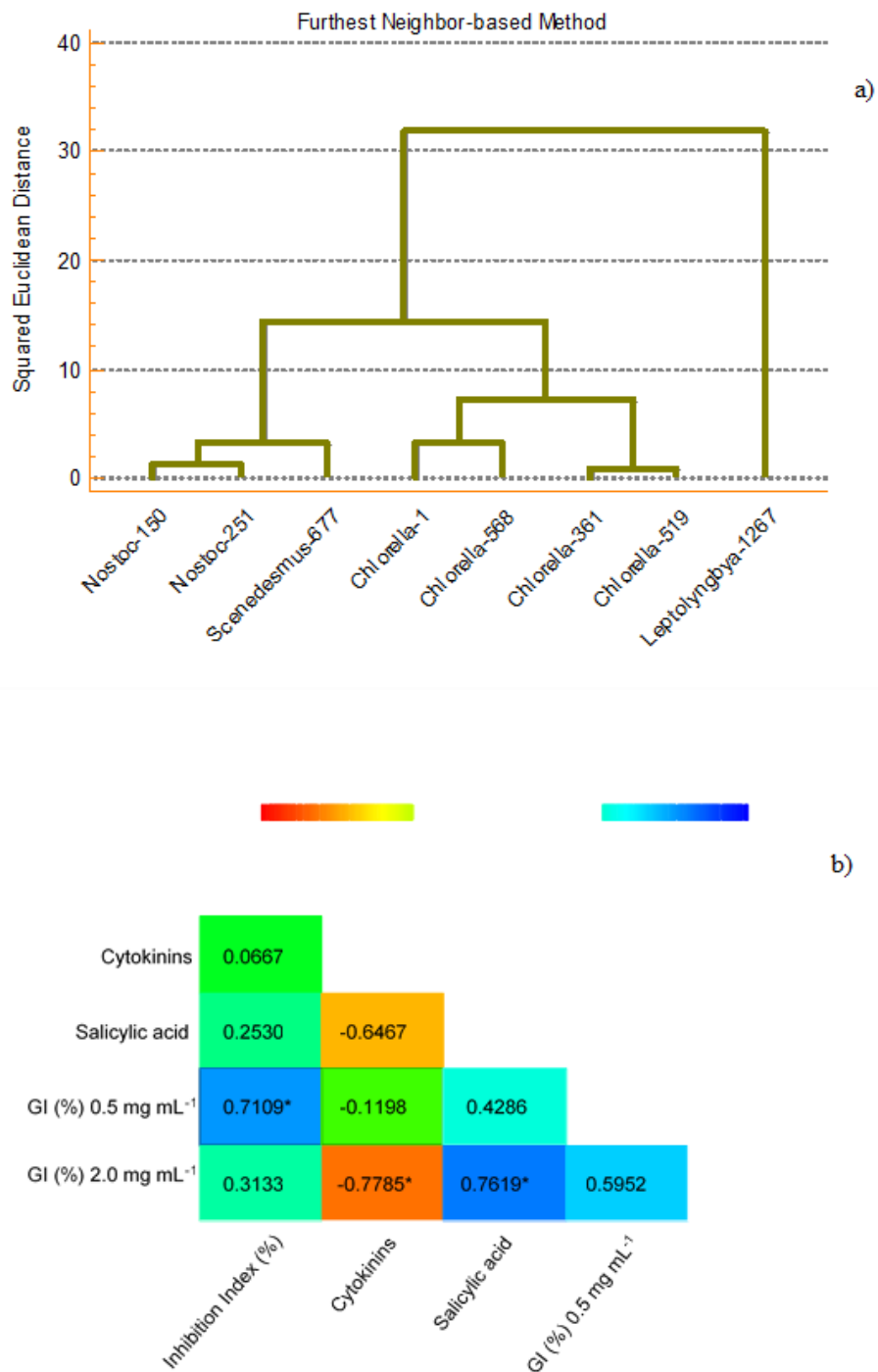


**Figure 2.** Effect of the application of sonicated extracts of microalgae and cyanobacteria on Germination Index (GI) in watercress seeds. GI % 0.5, extracts applied at a rate of 0.5 mg mL<sup>-1</sup>; GI % 2.0, extracts applied at a rate of 2.0 mg mL<sup>-1</sup>. Bars indicate standard error. Asterisks show the homogeneous groups with the highest statistically significant GI value (Fisher's LSD Test, P < 0.05).

### 3.1.4 Clustering and correlation analyses

A clustering analysis was performed based on all the parameters measured *in vitro*, which were Inhibition Index (%), phytohormone production (CKs and SA), and Germination Index (%) in watercress seeds at different extract concentrations. This analysis allowed to observe the grouping of the strains according to the biopesticidal and phytostimulant profile shown in each case. The Y axis in Figure 3a represents distance between groups. From this analysis, two large classification groups were established. On the one hand, a group formed by all the *Chlorella* strains could be observed, which corresponded to a medium-low level of inhibition against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fig. 1a), a SA / CK ratio lower than 1000 (Fig. 1b), and a notable degree of phytotoxicity on the germination when extracts were used at high concentrations (Fig. 2). This criterion also served to differentiate, in turn, two subgroups: one of them formed by those strains that were phytotoxic at the two concentrations tested (*Chlorella*-361 and *Chlorella*-519), and another one formed by those others that were phytotoxic only when applied at high concentrations (*Chlorella*-1 and *Chlorella*-568) (Fig. 3a). *Nostoc*-150, *Nostoc*-251 and *Scenedesmus*-677 clustered in another separated group, characterized by a high level of antagonism against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fig. 1a), a SA / CK ratio less than 1000 (Fig. 1b) and unremarkable germination indices, except in the case of *Scenedesmus*-677, when it was applied at a low extract concentration (Fig. 2). This last strain was selected for subsequent tests due to its special relevance as an antagonism agent against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* as well as for its ability to promote the seed germination *in vitro*. Finally, *Leptolyngbya*-1267 was grouped independently of the others (Fig. 3a). Considering the distance that separates this strain from the others in the dendrogram, it can be deduced that its biopesticidal and phytostimulant capacity makes it a strain with special potential to be used as a biological control agent. This strain shows a remarkable antagonistic power against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fig. 1a) and favors the germination of watercress seeds, without showing phytotoxicity problems (Fig. 2). Furthermore, the SA / CK ratio is around 3000, showing a significant level of SA production compared to the other strains tested (Fig. 1b). It should be noted that this substance is considered an important regulator of plant growth with great impact on the increase of the root system (Larqué-Saavedra et al. 2010), as well as on the

activation of the salicylic acid-dependent resistance pathway in plants (Chaturvedi and Shan 2007).



**Figure 3.** a) Hierarchical cluster analysis (Furthest Neighbor-based clustering Euclidean distance squared). The sonicated extracts are grouped into several clusters so that the members within any cluster are the most similar according to the results obtained *in vitro* (Inhibition Index, GI, CKs, SA). b) Spearman correlation analyses ( $P < 0.05$ ) from results obtained *in vitro* (Inhibition Index, GI, CKs, SA). Asterisks indicate statistically significant correlations at 95% confidence level.

Figure 3b shows a Spearman correlation analysis for all the parameters previously analyzed *in vitro*. It was possible to establish a very strong and significant negative relationship between the GI at 2 mg mL<sup>-1</sup> and the production of CKs ( $r = -0.7785$ ). However, the correlation between GI at 2 mg mL<sup>-1</sup> and SA production was significant and strongly positive ( $r = 0.7619$ ). Therefore, the importance of the SA / CK ratio in the analyzed extracts must be highlighted, since higher values of this parameter could lead to less toxicity of the extracts in the germination phase. On the other hand, a very interesting (but not significant) positive correlation was detected between the GI at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> and the value of the Inhibition Index against *Cmm* (Fig. 3b). This fact could be indirectly related to the high production of SA by *Leptolyngbya*-1267. However, this explanation is not sufficient to justify the notorious antagonistic effect against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in the case of *Scenedesmus*-677. *Scenedesmus* spp. appears to be a rich source of new antimicrobial substances. In fact, Marrez et al. (2019) reported the antimicrobial activity of several species of *Scenedesmus* against different pathogenic bacteria. Therefore, other bioactive metabolites are suspected to be responsible for the antagonistic activity in the case of the latter strain.

### **3.2 *In planta* bioassays: Treatment of tomato seedlings with sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae**

#### *3.2.1 Protective effect of the cyanobacteria and microalgae extracts by foliar and root application towards Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on tomato seedlings*

From the results described above, strains *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677 were selected as possible biological control agents against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. In order to evaluate its effectiveness *in planta*, a bioassay was developed based on two different preventive application protocols: foliar and root. One week after the treatment with the sonicated extracts, the tomato seedlings were artificially infected with *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. After a reasonable time to ensure the appearance of disease symptoms, approximately 3-4 weeks, the plant health condition was measured taking into account a score from 0 to 4 (see section 2.3.2 of Material and Methods). Based on the collected data, the

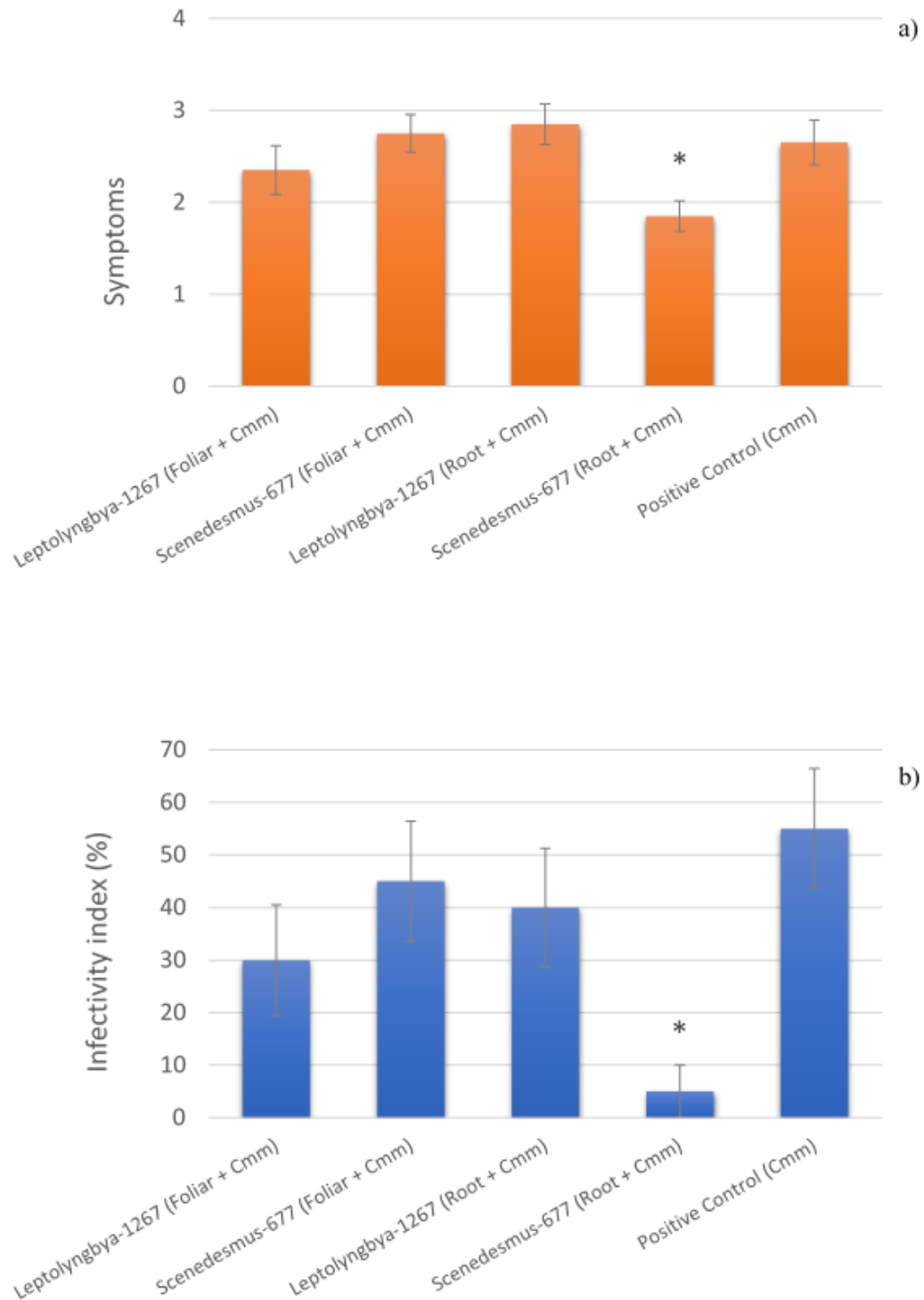


health condition in plants root pre-treated with *Scenedesmus-677* and then infected with *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* was less than 2, according to the scale mentioned above (Fig. 4a). This involved the appearance of very mild symptoms. On the contrary, the rest of preventive pretreatments did not cushion significantly the symptoms provoked by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* under the application conditions used in this work. Only the treatment with *Leptolyngbya-1267* via foliar achieved a weak mitigation of the most severe symptoms, showing a moderate yellowing of the plant. The seedlings destined for Positive Controls of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, had a health condition around 3, showing wilting and leaf marginal necrosis, as well as stem damage. Negative Controls (without pre-treatment nor *Cmm*) did not show typical symptoms of bacterial canker (data not shown).

On the other hand, Figure 4b shows the percentage of plants from which *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* was isolated. In this case, the percentage of infected plants was evaluated by means of a parameter named Infectivity Index (see section 2.3.2 of Material and Methods). Both strains chosen for the *in vivo* assay were able to reduce the Infectivity Index in the plant-blocks previously treated and infected with *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Nevertheless, only when *Leptolyngbya-1267* and *Scenedesmus-677* was applied by root and foliar way respectively, a significant decrease of Infectivity Index was detected (Fig. 4b). The most effective treatment corresponded to *Scenedesmus-677* via root, showing an Infectivity Index around 10% (approximately 90% lower than in the *Cmm*-infected control plant block). The next most important extract due to its biopesticidal effect was that of the *Leptolyngbya-1267* strain applied by foliar application, showing a decrease in infectivity of around 50%, compared to what was observed in the positive controls (Fig. 4b).

### 3.2.2 Evaluation of foliar and root application of cyanobacterial and microalgae extracts on tomato seedlings

In addition to the protective effect against the disease caused by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, a bioassay was developed to examine the *in vivo* biostimulant ability of extracts from the two previously selected microorganisms, *Leptolyngbya-1267* and *Scenedesmus-677*.



**Figure 4.** Protective effect of *Leptolyngbya-1267* and *Scenedesmus-677* by foliar and root application towards *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seedlings: a) Symptoms and b) Infectivity Index (%). Bars indicate standard error. Asterisks show different homogeneous groups with statistically significant differences (Fisher's LSD Test, P < 0.05).

As previously described, the foliar and root pretreatments were applied according to the protocol described in section 2.3.3. of Material and Methods. After

3 weeks from the application of both treatments, different parameters associated with the plant growth were evaluated.

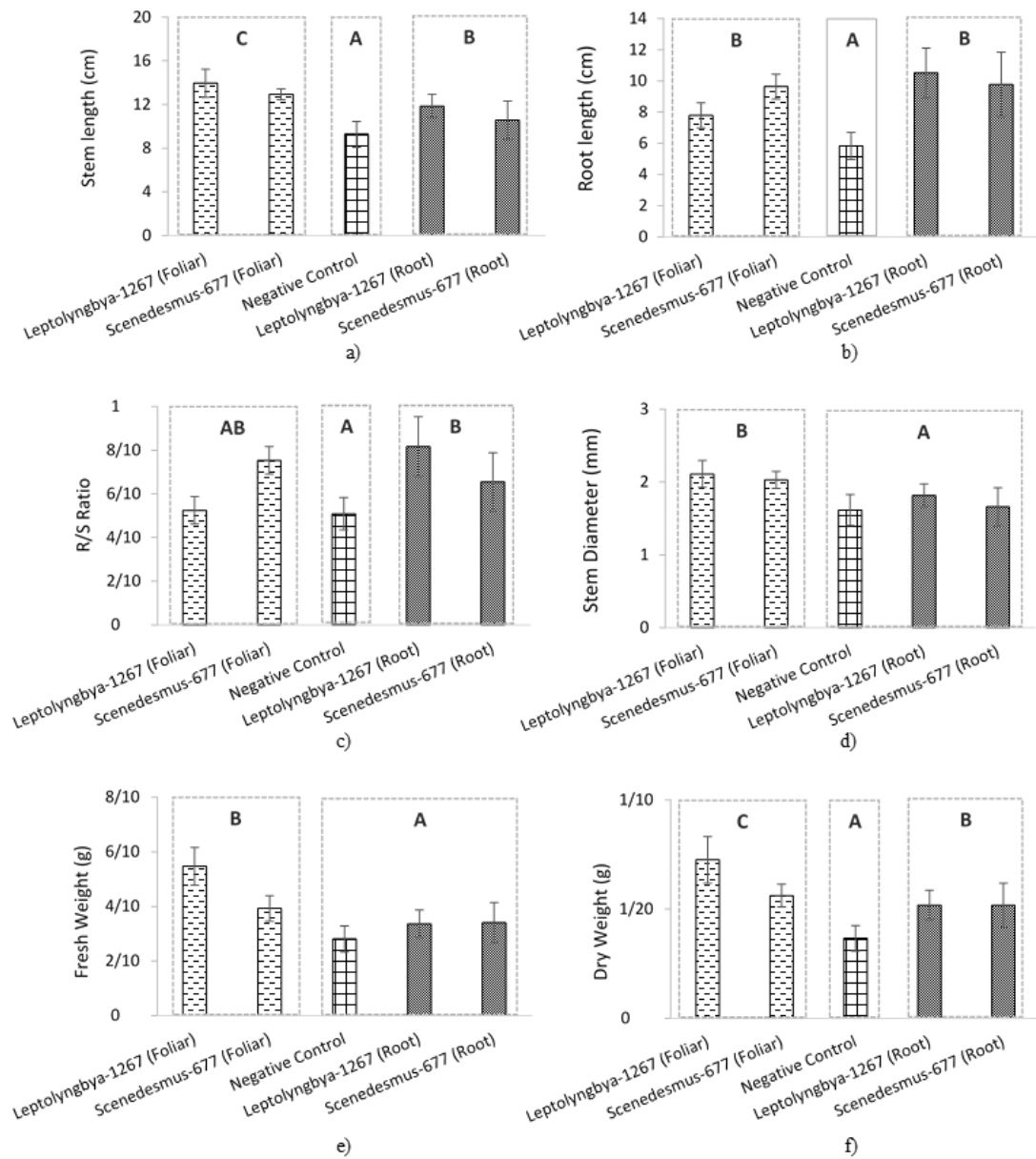
In general terms, both treatments improved the vegetative (aerial) growth of the plants as well as the development of the roots. Specifically, data related to plant size and aerial growth was noticeable when foliar treatment was applied from both microbial extracts. The data concerning length and diameter of the stem, and fresh and dry weight were significantly higher than those detected in the control plants when the foliar treatment was carried out with both extracts (Figs. 5a, d, e, f). In this case, *Leptolyngbya*-1267 extracts applied via foliar were better over the root application. On the other hand, regarding the development of the roots, no significant differences were globally detected between both treatments (foliar and root application). However, a higher root size was suspected in the case of root application, especially with *Leptolyngbya*-1267 extracts (Figs. 5b, c).

When looking at the data collected in Figure 5 as a whole, the relevant role of *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677 extracts in promoting plant growth becomes evident. In this sense, the foliar application of the extracts was positioned as the most effective biostimulant treatment to improve the development of the aerial part of the plant, while the root application was more efficient in improving the radicular development. Therefore, the plant growth-promoting effect seems to be closely related to the mode of application of the extracts. Nonetheless, there is no doubt that these are two promising strains with a marked biostimulant effect on tomato seedlings.

## 4. Discussion

### 4.1 *In vitro* bioassays

Antimicrobial compounds from cyanobacteria and microalgae are involved in the biological control of diseases that affect vegetable crops. This is the case of chlorine-containing antibiotics detected in *Scytonema* spp., majusculamide in *Anabaena laxa*, or benzoic acid in *Calothrix* spp. (Natarajan et al. 2012; Singh 2014). Moreover, in many cases, cyanobacteria enhance the defensive activities of plants by promoting the production of enzymes and other bioactive substances (Prasanna et al. 2008).



**Figure 5.** Plant growth promoting effect by foliar and root application of *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677 extracts. a) Stem length (cm); b) Root length (cm); c) R/S Ratio; d) Stem Diameter (mm); e) Fresh weight (g); f) Dry weight (g). Bars indicate standard error. The letters above the bars indicate different homogeneous groups with statistically significant differences (Fisher’s LSD Test,  $P < 0.05$ ).

In fact, some strains of *Anabaena* spp. and *Calothrix* spp. are associated with the production of chitinase and endoglucanase like-enzymes, showing similarity with other plant growth promoting microorganisms (El-Mougy and Abdel-Kader 2013; Gupta et al. 2013; Natarajan et al. 2013). On the other hand, green microalgae such as *Coccomyxa onubensis* (Navarro et al. 2017), *Tetraselmis suecica* (Austin et

al. 1992) and *Chlorella minutissima* (Katharios et al. 2005) are also reported to have antimicrobial properties. Thus, some extracts from microalgae also contain bioactive compounds such as polyphenols, tocopherols, carbohydrates, proteins, oils, and pigments with antimicrobial properties, which can be helpful in pathogen control against soil borne diseases (Michalak and Chojnacka 2015).

However, there is no relevant background that highlights the role of cyanobacteria and microalgae specifically against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* in tomato. Therefore, the results obtained in this work were surprising. These results suggest that some compounds derived from *Leptolyngbya-1267* and *Scenedesmus-677* could be considered a promising and sustainable alternative for the treatment of seeds, seedlings or soils against *C. michiganensis subsp. michiganensis*.

On the other hand, phytohormones play an important role in germination and plant growth. Many strains of microalgae and cyanobacteria are associated with the production of phytohormone-like substances (Gupta and Lata 1964; Stirk et al. 2002). Some of them are intracellularly produced, while others are excreted into the surrounding environment (Mazur et al. 2001; Sergeeva et al. 2002; Lu and Xu, 2015; Romanenko et al. 2015). Many reports have highlighted the use of phytohormones from microalgae and cyanobacteria for the *in vitro* plant regeneration, as well as for their use as plant growth-promoting substances in numerous crops (Hussain and Hasnain 2011; Jäger et al. 2010; Gayathri et al. 2015). Some of these studies have demonstrated the positive correlation between phytohormones produced by cyanobacteria and microalgae (cytokinin and auxin) and different plant growth parameters such as germination index, shoot length, root length, or seedling weight. Even more, an increase in the level of phytohormones around the rhizosphere has been attributed to the plant-cyanobacteria interaction or plant-microalgae interaction (Hussain and Hasnain 2011).

The phytohormones studied in this work have been selected not only for their important role in plant development, but also for their direct or indirect involvement and relevance in plant resistance induction processes. On the one hand, CKs affect different physiological processes such as morphogenesis, apical dominance, senescence of leaves, development of chloroplasts, and seed inactivity (Hwang et

al. 2012). Besides, CKs play a relevant role in the stimulation of the effector-triggered immune response and the signaling of salicylic acid (Igari et al. 2008). On the other side, nowadays SA molecule is considered a plant growth regulator, favoring the rooting process, increasing root length and area, as well as the foliar area and the stem diameter in tomato plants (Larqué-Saavedra et al. 2010). This molecule is also involved in the physiological response to pathogens by the activation of the Systemic Acquired Resistance (SAR) in plants (Chaturvedi and Shan 2007).

The characterization of the tested extracts based on their ability to promote germination or to produce some type of bioactive substances (such as CKs and SA) could indirectly provide indications of the mode of action that a given microbial extract exerts on the control of a specific pathogen or on plant growth at different development phases. Some authors have highlighted that controlling or inhibiting the development of diseases caused by phytopathogens is related to a phenomenon of direct suppression, through the secretion of allelochemicals or secondary metabolites, or indirectly, through the induction of systemic resistance in the plant. In this last case, it would be possible the production of substances similar to phytohormones, inducers or enzymes related to pathogenesis ( $\beta$ -1,3 endoglucanase, chitinases, catalases, peroxidases, polyphenol oxidases or phenylalanine ammonia lyase) (Gayathri et al. 2015; Attia et al. 2016).

Concerning the effect of sonicated extracts on germination of watercress seeds, results obtained in this work in general supported that the elongation of the radicle is lower when the concentration of the sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae increases. This agrees with results published by other authors that confirmed the positive effect of the application of cyanobacteria at low extract concentrations (Dmytryk et al. 2014; Aghofack-Nguemezi et al. 2015; Godlewska et al. 2019), as well as the phytotoxic effect of excessively high concentrations of seaweed extracts on seed germination (Kumar and Sahoo 2011; Hernández-Herrera et al. 2013). Some authors have shown that the immersion of seeds in extracts of cyanobacteria and microalgae can improve their quality, by stimulating the germination and root elongation (Kumar and Sahoo 2011; Hernández-Herrera et al. 2013; Ibrahim 2016; Barone et al. 2018). In this sense, the results described here

are promising in relation to the potential use of microalgae and cyanobacterial extracts in seed *biopriming* techniques.

#### **4.2 *In planta* bioassays**

Recent studies have shown the benefit of the inoculation of plants with phototrophic microorganisms, as promoters of plant growth (Ordög et al. 2004; Toribio et al. 2020). The results shown in this work confirm that certain strains of microalgae and cyanobacteria could be developed for use in the agro-biotechnology sector due to their enormous versatility to produce a wide range of metabolites involved in the protection and promotion of plant growth.

In view of the results observed in this work, the selection of strains carried out during the *in vitro* tests has been successful, since the biopesticidal effect detected *in vitro* against *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* has been also validated in tomato seedlings infected with the pathogenic bacteria (Figure 4). It should not be forgotten that the success of any biological control agent is a consequence of the interaction between the pathogen-plant and the rhizospheric microbial community (Weller et al. 2002; Moustaine et al. 2019). Therefore, it is not always possible to successfully reproduce the biopesticidal effect *in vitro* in other bioassays more in line with the reality of a pathological system.

Some authors argue that the use of this type of microorganisms as biofertilizers fundamentally affects the water regulation mechanisms of plants, contributing to the increase of chlorophyll in the leaves, delaying aging, improving seed germination, and benefiting the plant-soil system (Hegazi et al. 2010). Other authors directly relate the previously described biostimulant effect with the bioprotective capacity of the extracts in pretreated plants with cyanobacteria and microalgae. The application with this type of extracts could cause an increase in the absorption of nutrients, the accumulation of plant defenses against biotic stresses and the improvement of the performance in the treated plants (Prasanna et al. 2013). Some of the improvements above described could be due to the presence of some amino acids such as tryptophan and arginine in such extracts, which is associated with a significant increase in the plant growth and yield. It should be noted that both amino acids are the metabolic precursors of key phytohormones which are

indispensable in the growth processes that lead to the formation of roots, stem, leaves, flowers, and fruits (Colla and Rouphael 2015). Moreover, the ability to produce polysaccharides attributed to microalgae could contribute to their enormous potential to be used as biostimulating agents, since such compounds have been shown to improve plant growth in *Solanaceae* crops (Elarroussi et al. 2016).

Despite the satisfactory results obtained in this work, it will be necessary to proceed with caution, given the lack of previous studies on the control of bacterial canker through the application of cyanobacteria and microalgae. Therefore, the *in vivo* efficacy of the selected extracts against the disease caused by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, as well as their effect on seed germination and seedling growth, should be analyzed in depth.

## 5. Conclusions

In view of the results obtained, it can be concluded that the application of cyanobacteria and microalgae to protect tomato crops from bacterial cankers provoked by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* could be of great agronomic interest. The biopesticidal effect demonstrated by the *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677 strains could be closely related to their ability to promote plant growth as well as root development of tomato plants. According to the most relevant results, the root application of *Scenedesmus*-677 could be more aimed at controlling the disease, while the foliar and root application of *Leptolyngbya*-1267 seems more related to the strengthening of the plant and therefore, with an improvement in the plant defensive response. These results, although preliminary, will serve as a basis for further characterization of the sonicated extracts of *Leptolyngbya*-1267 and *Scenedesmus*-677, as well as for improving the extraction of bioactive substances from these samples and optimizing the protocols applied for biosafety and phytostimulation of tomato crop.



## 6. Acknowledgements

The authors of this work appreciate the help provided by professors F.G. Acien (SABANA project coordinator), V. Ordög and J.L. Gómez-Pinchetti, with respect to obtaining the collection of cyanobacteria used in this work.

## 7. References

- Aghofack-Nguemezi J, Schinzoumka PA, Tatchago V (2015) Effects of extracts or powder of *Jatropha curcas* and *Spirulina platensis* on the growth and development of tomato plant. *J Appl Biosci* 90:8413–8420. <https://doi.org/10.4314/jab.v90i1.2>
- Aksoy H, Kaya Y, Ozturk M, Secgin Z, Onder H, Okumus A (2017) *Pseudomonas putida* induced response in phenolic profile of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Biol Control* 105:6–12. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.001>
- Alsenani F, Tupally KR, Chua ET, Eltanahy E, Alsufyani H, Parekh HS, Schenk PM (2020) Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharm J* 28 (12):1834–1841. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.11.010>
- Araujo D, Hernández R, Vanegas J (2018) Cyanobacteria inoculation effect on interest commercial crops in semi-arid zones of La Guajira – Colombia. *Rev Colomb Investig Agroindustriales* 5 (1):20-31. <https://doi.org/10.23850/24220582.889>
- Attia MS, El-Monem MA, Sharaf A, Zayed AS (2016) Protective action of some bio-pesticides against early blight disease caused by *Alternaria Solani* in tomato plant. *Int J Innov Res Sci Eng Technol* 4 (11):2348-7968.
- Austin B, Baudet E, Stobie M (1992) Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J Fish Dis* 15:55-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00636.x>
- Barone V, Baglieri A, Stevanato P, Broccanello C, Bertoldo G, Bertaggia M, Cagnin M, Pizzeghello D, Moliterni VMC, Mandolino G, Fornasier F, Squartini A, Nardi S, Concheri G (2018) Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J Appl Phycol* 30:1061–1071. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1283-3>
- Carneiro M, Ranglová K, Lakatos GE, Câmara Manoel JA, Grivalský T, Kozhan DM, et al. (2021) Growth and bioactivity of two chlorophyte (*Chlorella* and *Scenedesmus*) strains co-cultured outdoors in two different thin-layer units using municipal wastewater as a nutrient source. *Algal Res* 56:102299. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102299>

- Chaturvedi R, Shah J (2007) Salicylic acid in plant disease resistance. In: Hayat S, Ahmad A (ed) Salicylic Acid - A plant hormone. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 335-370
- Colla G, Roupael, Y (2015) Biostimulants in horticulture. *Sci Hortic* 196:39-48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.044>
- De León L, Siverio F, López MM, Rodríguez A (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seed are still the goal. *Plant Dis* 95:1328–1338.
- Deng P, Wang X, Baird SM, Lu SE (2015) Complete genome of *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2, a soil bacterium with antibacterial activity against bacterial canker pathogen of tomato. *Stand Genomic Sci* 10:117. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0106-x>
- Dmytryk A, Rój E, Wilk R, Chojnacka K (2014) Innovative bioformulations for seed treatment. Preliminary assessment of functional properties in the initial plant growth phase. *Przem Chem* 93 (6):959–963.
- EFSA Panel on Plant Health (2014) Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA J.* 12:3721. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3721>
- Elarroussi H, Elmernissia N, Benhimaa R, El Kadmiria IM, Bendaou N, Smouni A, Wahbya I (2016) Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. *J Algal Biomass Utiln* 7 (4):55-63.
- El-Mougy NS, Abdel-Kader MM (2013) Effect of commercial cyanobacteria products on the growth and antagonistic ability of some bioagents under laboratory conditions. *J Pathol* 838329. 11 pp. <https://doi.org/10.1155/2013/838329>
- EPPO (2016) European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bull* 46:202-225. <https://doi.org/10.1111/epp.12302>
- Fatmi M, Schaad NW (2002) Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol* 51:149–154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00675.x>
- Gayathri M, Kumar PS, Prabha AML, Muralitharan G (2015) *In vitro* regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothece* sp. *MBDU* 515. *Algal Res* 7:100–105. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.009>
- Gitaitis RD, Beaver RW, Voloudakis AE (1991) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis* 75(8):834-838. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0834>
- Gleason ML, Braun EJ, Carlton WM, Peterson RH (1991) Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81(12):1519-1523. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1519>

- Godlewska K, Michalak I, Pacyga P, Basladynska S, Chojnacka K (2019) Potential applications of cyanobacteria: *Spirulina platensis* filtrates and homogenates in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 35 (80). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2653-6>
- Gupta AB, Lata K (1964) Effect of algal growth hormones on the germination of paddy sedes. *Hydrobiologia* 24:430–434.
- Gupta V, Ratha SK, Sood A, Chaudhary V, Prasanna R (2013) New insight into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges. *Algal Res* 2 (2):79–97. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.006>
- Han SH, Kang BR, Lee JH, Kim HJ, Park JY, Kim JJ, Kim YC (2012) Isolation and characterization of oligotrophic bacteria possessing induced systemic disease resistance against plant pathogens. *Plant Pathol J* 28 (1):68-74. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2011.0218>
- Hegazi AZ, Mostafa SSM, Ahmed HMI (2010) Influence of different cyanobacterial application methods on growth and seed production of common bean under various levels of mineral nitrogen fertilization. *Nat Sci* 8 (11):183–194.
- Heimpel GE, Mills NJ (2017) *Biological control: ecology and applications*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hernández-Herrera RM, Santacruz-Ruvalcaba F, Ruíz-López MA, Norrie J, Hernández-Carmona G (2013) Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *J Appl Phycol* 26 (1):619-628. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0078-4>
- Herrero A, Flores E (2008) *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. 1st edn. Caister Academic Press, Norfolk.
- Hussain A, Hasnain S (2011) Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:85-92. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0833-3>
- Hwang I, Sheen J, Müller B (2012) Cytokinin signaling networks. *Annu Rev Plant Biol* 63:353–380. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105503>
- Ibrahim WM (2016) Potential impact of marine algal extracts on the growth and metabolic activities of salinity stressed wheat seedlings. *J Appl Sci* 16(8):388-394. <https://doi.org/10.3923/jas.2016.388.394>
- Igari K, Endo S, Hibara K, Aida M, Sakakibara H, Kawasaki T, Tasaka M (2008) Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway in Arabidopsis. *Plant J* 55:14–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X>
- Jäger K, Bartók T, Ördög V, Barnabás B (2010) Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *S Afr J Bot* 76:511-516. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.009>
- Jaki B, Orjala J, Heilmann J, Linden A, Vogler B, Sticher O (2000) Novel extracellular diterpenoids with biological activity from the cyanobacterium

- Nostoc commune*. J Nat Prod 63 (3):339–343. <https://doi.org/10.1021/np9903090>
- Johnson RA, Wichern DW (2007) Applied Multivariate Analysis, 6th ed, NJ: Pearson Prentice Hall. pp 794.
- Kasselaki AM, Goumas D, Tamm L, Fuchs J, Cooper J, Leifert C (2011) Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). NJAS – Wageningen J Life Sci 58:145–147. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2011.07.001>
- Katharios P, Papadakis IE, Prapas A, Dermon AC, Ampatzis K, Divanach P (2005) Mortality control of viral encephalopathy and retinopathy in 0+ grouper *Epinephelus marginatus* after prolonged bath in dense *Chlorella minutissima* culture. Bull Eur Assoc Fish Pathol 25:28-31.
- Khaliluev MR, Shpakovskii GV (2013) Genetic engineering strategies for enhancing tomato resistance to fungal and bacterial pathogens. Russ J Plant Physiol 60 (6):721-732. <https://doi.org/10.1134/S1021443713050087>
- Kim JD (2006) Screening of cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy soil for antifungal activity against plant pathogenic fungi. Mycobiology 34 (3):138-142. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2006.34.3.138>
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ (2019) Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Front Plant Sci 10:845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kumar G, Sahoo D (2011) Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. J Appl Phycol 23 (2):251-255. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9660-9>
- Kumar K, Verma PK (2013) Plant pathogen interactions: crop improvement under adverse conditions. In: Tuteja N, Gill SS (ed) Plant acclimation to environmental stress, Springer, New York, pp 433-459
- Larqué-Saavedra A, Martín-Mex R, Nexticapan-Garcéz Á, Vergara-Yoisura S, Gutiérrez-Rendón M (2010) Effect of salicylic acid on the growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. Rev Chapingo Ser Hortic 16(3):183-187.
- Latin R, Tikhonova I, Rane K (1995) First report of bacterial canker of pepper in Indiana. Plant Dis 79(8):860. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.7.810C>
- Lee SY, Khoiroh I, Vo DVN, Kumar PS, Show PL (2020) Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. Environ Chem Lett <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01088-5>
- Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl 63:39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Lu Y, Xu J (2015) Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology. Trends Plant Sci 20:273–282. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>

- Marrez DA, Naguib MM, Sultan YY, Higazy AM (2019) Antimicrobial and anticancer activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. *Heliyon* 5:e01404. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01404>
- Masojídek J, Ranglová K, Rearte TA, Celis Plá PSM, Torzillo G, Silva Benavides AM, et al. (2021) Changes in photosynthesis, growth and biomass composition in outdoor *Chlorella* g120 culture during the metabolic shift from heterotrophic to phototrophic cultivation regime. *Algal Res.* 56:102303. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102303>
- Mazur H, Konop A, Synak R (2001) Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J Appl Phycol* 13:35-42. <https://doi.org/10.1023/A:1008199409953>
- Meena M, Swapnil P, Zehra A, Aamir M, Dubey MK, Goutam J, Upadhyay RS (2017) Beneficial microbes for disease suppression and plant growth promotion. In: Singh DP, Singh HB, Prabha R (ed) *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*, Springer Nature, Singapore, pp 395-432
- Mendiola JA, Torres CF, Toré A, Martín-Álvarez PJ, Santoyo S, Arredondo BO, Señoráns FJ, Cifuentes A, Ibáñez E (2007) Use of supercritical CO<sub>2</sub> to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content. *Eur Food Res Technol* 224 (4):505–510. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0353-6>
- Michalak I, Chojnacka K (2015) Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng Life Sci* 15 (2):160-176. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>
- Moustaine M, El Kahkahi R, Benbouazza A, Benkirane R, El Hassan A (2019) Potential of biological treatments for control of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* spp *michiganensis* in Morocco. *Eurasia J Bio Sci* 13:1481-1488.
- Nandi M, MacDonald J, Liu P, Weselowski B, Yuan ZC (2018) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Mol Plant Pathol* 19 (8):2036-2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>
- Natarajan C, Prasanna R, Gupta V, Dureja P, Nain L (2012) Characterization of the fungicidal activity of *Calothrix elenkinii* using chemical methods and microscopy. *Appl Biochem Microbiol* 48 (1):51–57. <https://doi.org/10.1134/S0003683812010115>
- Natarajan C, Gupta V, Kumar K, Prasanna R (2013) Molecular characterization of a fungicidal endoglucanase from the cyanobacterium *Calothrix elenkinii*. *Biochem Genet* 51 (9):766–779. <https://doi.org/10.1007/s10528-013-9605-x>
- Navarro F, Forján E, Vázquez M, Toimil A, Montero Z, Ruíz-Domínguez MdC, Garbayo I, Castaño MÁ, Vílchez C, Vega JM (2017) Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycol Res* 65 (1):38-43. <https://doi.org/10.1111/pre.12158>

- Navarro-López E, Ruíz-Nieto A, Ferreira A, Acién FG, Gouveia L (2020) Biostimulant potential of *Scenedesmus obliquus* grown in brewery wastewater. *Molecules* 25:664. <https://doi.org/10.3390/molecules25030664>
- Ördög V, Stirk W A, Lenobel R, Bancířová M, Strnad M, Van Staden J, Szigeti J, Németh L (2004) Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary. *J Appl Phycol* 16 (4):309-314. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047789.34883.aa>
- Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang L, Suh JW (2013) Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:9621-9636. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5206-1>
- Prasanna R, Nain L, Tripathi R, Gupta V, Chaudhary V, Middha S, Joshi M, Ancha R, Kaushik BD (2008) Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria – possible role of hydrolytic enzymes. *J Basic Microbiol* 48 (3):186–194. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700199>
- Prasanna R, Chaudhary V, Gupta V, Babu S, Kumar A, Singh R, Singh YS, Nain L (2013) Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. *Eur J Plant Pathol* 136:337-353. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0167-x>
- Raymaekers K, Ponet L, Holtappels D, Berckmans B, Cammue BPA (2020) Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – a review. *Biol Control* 144. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>
- Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, Singh P, Bux F (2018) Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol Adv* 36:1255-1273. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.004>
- Romanenko EA, Kosakovskaya IV, Romanenko PA (2015) Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt I. auxins, abscisic acid, ethylene. *Int J Algae* 17 (3):275-289. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v17.i3.80>
- Royston JP (1983) Some Techniques for assessing multivariate normality based on the Shapiro-Wilk W. *Appl Stat* 32 (2):121-133. <https://doi.org/10.2307/2347291>
- Schonlau M (2004) Visualizing non-hierarchical and hierarchical cluster analyses with clustergrams. *Computational Statistics* 19:95–111. <https://doi.org/10.1007/BF02915278>
- Svantesson T, Wallace J (2003) Tests for assessing multivariate normality and the covariance structure of mimo data. In *Acoustics, Speech, and Signal Processing. Proceedings. (ICASSP'03). 2003 IEEE International Conference on* 4:656-659. <https://doi.org/10.1109/ICASSP.2003.1202728>
- Santoro MV, Zygadlo J, Giordano W, Banchio E (2011) Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiol Bioch* 49:1177–1182. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.016>

- Sergeeva E, Liaimer A, Bergman B (2002) Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215:229-238. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0749-x>
- Singh SP, Häder DP, Sinha RP (2010) Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Res Rev* 9 (2):79-90. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.05.004>
- Singh JS (2014) Cyanobacteria: a vital bio-agent in eco-restoration of degraded Lands and sustainable agriculture. *Climate Change Environ Sustain* 2:133–137.
- Singh JS, Kumar A, Rai AN, Singh DP (2016) Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front Microbiol* 7:529. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00529>
- Singh RS, Walia AK, Khattar JS, Singh, DP, Kennedy JF (2017) Cyanobacterial lectins characteristics and their role as antiviral agents. *Int J Biol Macromol* 102:475-496. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.041>
- Stirk WA, Ördög V, Van SJ, Jäger K (2002) Cytokinins and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J Appl Phycol* 14:215-221. <https://doi.org/10.1023/A:1019928425569>
- Suárez-Estrella F, Arcos-Nievas MA, López MJ, Vargas-García MC, Moreno J (2013) Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biol Control* 67(3):509-515. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.10.008>
- Suárez-Estrella F, Jurado MM, López MJ, López-González JA, Moreno J (2019) Role of bacteria isolated from a plant waste-based compost producing bioactive substances in the control of bacterial spot syndrome caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biocatal Agric Biotechnol* 20:101198. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101198>
- Termorshuizen AJ, van Rijn E, Alabouvette C, Lagerlöf J, Paplomatas EJ, Rämert B, Ryckeboer J, Steinberg C, Zmora-Nahum S (2006) Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biol Biochem* 38(8):2461-2477. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.03.002>
- Toribio AJ, Suárez-Estrella F, Jurado MM, López MJ, López-González JA, Moreno J (2020) Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. *Biotechnol Rep* 26: e00449. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00449>
- Toribio AJ, Jurado MM, Suárez-Estrella F, López MJ, López-González JA, Moreno J (2021) Seed *biopriming* with cyanobacterial extracts as an eco-friendly strategy to control damping off caused by *Pythium ultimum* in seedbeds. *Microbiol Res* 248:126766. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126766>
- Umesha S (2006) Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Prot* 25:375-381. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.06.005>

- Volk RB, Furkert FH (2006) Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiol Res* 161 (2):180-186. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.005>
- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 40:309–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010>
- Zucconi F, Pera A, Forte M, De Bertoldi M (1981) Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22 (2):54-57.





**Artículo 4**

## ARTÍCULO 4

### **Design and validation of cyanobacteria-rhizobacteria consortia for tomato seedlings growth promotion**

A.J. Toribio, F. Suárez-Estrella, M.M. Jurado\*, J.A. López-González, M.R. Martínez-Gallardo, M.J. López.

Enviado a Journal of Biotechnology (2021).

**Resumen:** El uso de rizobacterias para minimizar los insumos químicos en la agricultura puede proporcionar grandes beneficios en términos de suministro de nitrógeno, supresión de enfermedades de las plantas o producción de vitaminas y fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas. En este sentido, las cianobacterias son una parte importante de la microbiota presente en la rizosfera. Su capacidad para realizar la fotosíntesis, fijar el nitrógeno, sintetizar sustancias que estimulan la rizogénesis y el crecimiento aéreo de la planta, o actuar como agentes de control biológico, les confieren un enorme valor como promotoras del crecimiento vegetal. A su vez, la fotosíntesis producida por las cianobacterias puede suponer un aporte extra de carbono del que pueden beneficiarse el resto de bacterias heterótrofas presentes en la rizosfera.

En base a las consideraciones anteriores, el presente estudio se centró en el establecimiento *in vitro* de consorcios utilizando bacterias heterótrofas y cianobacterias aisladas de diversa procedencia (agua dulce, agua de mar, suelo y compost) y en la determinación de su eficacia en el desarrollo de plántulas de tomate. La colección microbiana estaba compuesta por 3 cianobacterias (*Nostoc*-M612, *Dolichospermum*-B866 y SJ2-cianobacteria no identificada) y dos bacterias heterótrofas solubilizadoras de fosfato y potasio (*Pseudomonas putida*-BIO175 y *Pantoea cyripedii*-BIO175). Para determinar la compatibilidad entre los microorganismos seleccionados y su eficacia, se realizaron diferentes bloques experimentales para su comparación en cultivos axénicos o consorcios por parejas. Los consorcios se prepararon en medio de cultivo BG-11 y se incubaron durante 14 días a 25 °C, 55% de humedad y un fotoperiodo de 12 horas. Tras la incubación, se

realizaron recuentos microbianos en medio sólido BG11 y APHA. Los consorcios más compatibles se obtuvieron cuando se combinaron las cianobacterias *Dolichospermum*-B866 y SJ2 con cualquiera de las dos bacterias heterótrofas. Por el contrario, los consorcios que contenían *Nostoc*-M612 no mostraron buenos resultados en términos de recuento microbiano.

En cuanto a los bioensayos realizados en planta a partir de los diferentes bloques experimentales, éstos revelaron un efecto estimulante sobre el crecimiento de las plántulas de tomate. Este efecto fue más notable en los consorcios formados por las bacterias heterótrofas y la cepa *Dolichospermum*-B866, en comparación con el observado en el tratamiento con las cepas en cultivos axénicos. A la vista de los resultados, se puede concluir que la formulación artificial de consorcios microbianos a base de diferentes grupos de rizobacterias puede tener efectos sinérgicos positivos sobre el crecimiento de las plantas, lo que tiene un enorme interés agrobiotecnológico.

**Palabras clave:** Cianobacterias; rizobacterias; consorcio; bioestimulante

## **Design and validation of cyanobacteria-rhizobacteria consortia for tomato seedlings growth promotion**

A.J. Toribio, F. Suárez-Estrella, M.M. Jurado\*, J.A. López-González, M.R. Martínez-Gallardo, M.J. López.

Department of Biology and Geology, CITE II-B, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, ceiA3, CIAIMBITAL, 04120 Almería, Spain

\*Corresponding author: [mjr956@ual.es](mailto:mjr956@ual.es)

### **Abstract**

The use of rhizobacteria to minimize chemical inputs in agriculture can provide great benefits in terms of nitrogen supply, suppression of plant diseases, or production of vitamins and phytohormones that stimulate the plant growth. In this sense, cyanobacteria are an important part of the microbiota present at the rhizosphere. Their ability to photosynthesize, fix nitrogen, synthesize substances that stimulate rhizogenesis and the plant aerial growth, or act as biological control agents, give them an enormous value as plant growth promoters. In turn, the photosynthesis produced by cyanobacteria can suppose an extra supply of carbon from which the rest of the heterotrophic bacteria present in the rhizosphere can benefit.

Based on the above considerations, the present study focused on the *in vitro* establishment of consortia using heterotrophic bacteria and cyanobacteria isolated from diverse origin (freshwater, sea water, soil and compost) and the determination of its effectiveness in the development of tomato seedlings. Microbial collection was composed of 3 cyanobacteria (*Nostoc*-M612, *Dolichospermum*-B866 and SJ2- unidentified cyanobacterium) and two phosphate and potassium solubilizing heterotrophic bacteria (*Pseudomonas putida*-BIO175 and *Pantoea cyripedii*-BIO175). In order to determine the compatibility between the selected microorganisms and their effectivity, different experimental blocks were performed for comparison in axenic cultures or consortia in pairs. The consortia were prepared in BG-11 culture medium and incubated for 14 days at 25 °C, 55% humidity and a 12-hour photoperiod. After incubation, microbial counts were made in solid

medium BG11 and APHA. The most compatible consortia were obtained when the cyanobacteria *Dolichospermum*-B866 and SJ2 were combined with any of the two heterotrophic bacteria. In contrast, the consortia containing *Nostoc*-M612 did not show good results in terms of microbial count.

Regarding the bioassays carried out *in planta* from the different experimental blocks, those revealed a stimulating effect on the growth of tomato seedlings. This effect was more noticeable on the consortia formed by the heterotrophic bacteria and the *Dolichospermum*-B866 strain, compared to that observed from the treatment with the strains in axenic cultures. In view of the results, it can be concluded that the artificial formulation of microbial consortia based on different groups of rhizobacteria can have positive synergistic effects on plant growth, which is of enormous agro-biotechnological interest.

**Keywords:** Cyanobacteria; rhizobacteria; consortium; biostimulant

**Highlights**

- *In vitro* establishment of consortia between rhizobacteria and cyanobacteria
- Increased population of rhizobacteria in consortium with cyanobacteria
- Beneficial effects in tomato seedlings after application of microbial consortia
- Microbial consortia as a potential strategy for environmental sustainability

## 1. Introduction

Plants are extensively colonized by a range of beneficial microorganisms with a role as plant growth promoters and biopesticides (Brader et al., 2014; Vurokonda et al., 2018). These microorganisms are involved in a set of interactions known to affect plant health and soil quality. They also are wrapped up in activities that ensure the stability and productivity of both agricultural systems and natural ecosystems. Previous studies have demonstrated that certain cooperative microbial activities can be exploited, such as those that affect plant growth and production by an environmentally friendly way (Barea et al., 2005). Because of current public concerns about the side-effects of agrochemicals, there is an increasing interest for improving the understanding of collaborative activities among rhizosphere microbial populations and how these might be applied to agriculture (Barea et al., 2004; Lucy et al., 2004). The use of microorganisms in agriculture (particularly, plant growth promoting rhizobacteria - PGPR -, which efficiently colonize the roots of plants and confer tolerance against several abiotic and biotic stresses (Prasad et al., 2015) is currently a booming activity. Some of these microorganisms also stand out for their ability to fix nitrogen in a symbiotic or asymbiotic way, decompose organic waste, detoxify pesticides, suppress plant diseases, provide nutrients to the soil, and produce bioactive compounds such as vitamins and phytohormones that stimulate plant growth (Terry et al., 2005).

The search for new strategies for the promotion of plant growth is essential to ensure a safe and sustainable production of vegetables for human consumption (Mógor et al., 2018). In recent years, the use of associations of microorganisms (consortia) in the field of agrobiotechnology, showing synergistic and more beneficial effects than those applied independently, is being promoted (Subashchandrabose et al., 2011; Zope et al., 2019). A consortium is defined as several species or populations of microorganisms that function in a coordinated and complementary manner so that production, growth and nutrient cycling are improved over what a single species or population can achieve alone under similar environmental conditions (Paerl et al., 2000). Consortia are model biological systems for understanding the structural and functional requirements of life in extreme environments (Paerl et al. 2000; Perera et al., 2018). In fact, the

establishment of these associations could increase the chances of microbial survival (Pankratova et al., 2004).

Algae and bacteria have coexisted since the early stages of evolution, influencing ecosystems very varied. Several studies have shown that algae and bacteria synergistically affect each other's physiology and metabolism. Hence, there is an urgent need to understand the interactions between autotroph-heterotroph microorganisms and integrate this knowledge for agro-biotechnological use (Ramanan et al., 2016).

The cyanobacteria are an indispensable biological component of soil microbiota. Many of them are considered plant growth promoting agents since they are capable to synthesize physiologically active substances stimulating root formation through nitrogen fixation, nutrient mobilization and carbon sequestration in higher plants (Rana et al., 2012; Prasanna et al., 2013; Babu et al., 2015). In turn, bacteria of agronomic interest, support photoautotrophic growth of the partners by providing carbon dioxide and other stimulatory means. *Pseudomonas putida* is an excellent root colonizer of agronomic relevant crops and it has proven to be effective by improving plant growth and inducing the systemic resistance of plants in response to certain foliar pathogens (Meliani et al., 2017). In addition, this species stands out for its high capacity to solubilize mineral and organic phosphorus (Kumar et al., 2016). By exerting these multiple mechanisms, *P. putida* is considered an excellent candidate to the establishment of consortia for agronomic purposes. On the other hand, previous studies have shown the ability of some strains of *Pantoea* spp. to solubilize phosphorus and make it more available for plant uptake (Fernández et al., 2008). However, despite the potential benefits of formulating microbial consortia from an agronomic point of view, the *in vitro* ability of cyanobacteria to establish long term or temporary relations with the most ordinary soil bacteria, has not been studied in depth (Bergman, 2002). In this sense, the evaluation of the compatibility and synergism of the microbial components of a consortium is essential to determine its potential use as an agro-biotechnological tool (Kumar et al., 2016; Yanti et al., 2021). Competition for resources, the cooperation for pollutant abatement, and the capacity to play as a biofertilizant or a phytostimulant product will determine the success of a consortium.



Therefore, based on the above considerations, the present study focused on the *in vitro* establishment, evaluation and compatibility study of several two-member consortia (cyanobacterial and heterotrophic rhizobacterial strains) and their subsequent application on tomato plants to estimate their phytostimulant properties at seedling scale.

## 2. Material and methods

### 2.1 Strain collection: heterotrophic rhizobacteria and cyanobacteria

In the role of heterotrophic rhizobacteria, two strains were selected from a collection belonging to the BIO175 group of the University of Almería (*Pseudomonas putida*-BIO175 and *Pantoea cyripedii*-BIO175), which stood out for their ability to stimulate plant growth and favor the solubilization of phosphorus and potassium *in vitro*, respectively (Table S1, Supplementary Material). Active pure cultures of both heterotrophic bacteria were kept on Standard Methods Agar (APHA) (ISO 4833:2003) (PanReac Applichem, 413799.1210) at 4 °C until use.

On the other hand, three cyanobacterial strains (*Nostoc* SAB-M612, *Dolichospermum* SAB-B866 and SJ2 (unidentified cyanobacteria) were selected in terms of their relevance as phytostimulant agents (Table S1, Supplementary Material). The origin of these strains was freshwater, seawater and soil, respectively. Before starting *in vitro* and *in vivo* assays, active pure cultures of cyanobacteria were kept on BG11 Agar (BG-11 Broth, SIGMA-ALDRICH ,73816) at 4 °C until use.

### 2.2 Establishment of consortia

#### 2.2.1 Preinoculum preparation and quantification

The preinoculum of each cyanobacterium was obtained by inoculating three previously isolated colonies on BG11 agar medium, in a tube with 10 mL of BG11 broth, and incubated in a phytotron (Equitec) for 14 days under the following conditions: 28 °C Temperature, 55% humidity, with a photoperiod of 18 h of light and 6 h of darkness, and luminous radiation of 700-1900 Lux. After the incubation time, 1 mL of the first culture (preinoculum) was distributed among 5 tubes, each

one with 10 mL of BG11 broth, and incubated for 7 days under the same conditions previously described. At the end of this time, independent cultures from each cyanobacterium were collected in sterile 100 mL plastic cups. Then, microscopic counts in a Neubauer chamber allowed a determination of the number of microbial cells by direct observation under the microscope. In parallel, a plate count was performed to determine the number of viable microorganisms in our liquid medium. To this end, tenfold serial dilutions in sterile saline solution were performed and 100  $\mu$ L volumes from dilutions were spread out over Petri plates with BG11 culture media. Counts were expressed as Colony Forming Units per milliliter (CFU mL<sup>-1</sup>).

In the case of the rhizobacteria, isolated colonies previously growing in APHA agar were used as preinoculum and inoculated in a 250 mL flask with 50 mL of Nutrient Broth. Cultures in this case were incubated at 30 °C, shaking at 120 rpm for 48 hours. Likewise, preliminary count of total cells carried out in the Neubauer chamber were followed by plate counts in APHA medium, to determine the number of viable microorganisms, expressed as Colony Forming Units per milliliter (CFU mL<sup>-1</sup>).

### *2.2.2 Experimental block design: establishment of consortia between cyanobacteria and heterotrophic rhizobacteria*

This phase of the work consisted of the establishment of consortia between cyanobacteria and heterotrophic rhizobacteria, in two different culture medium, BG11 Broth (BG-11 Broth, SIGMA-ADRIK, 73816) and Algae Broth (SIGMA-ALDRICH, 17124), both prepared in test tubes at a rate of 10 mL per tube. Twelve different experimental blocks (5 axenic cultures, 6 two-member consortia and 1 negative control), from now on treatments, were considered. All treatments were prepared in triplicates. Tubes were inoculated with 1 mL of each microorganism (10% cyanobacteria and 10% heterotrophic bacteria) at doses around 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. All the tubes were incubated in phytotron (Equitec) at 28 °C, photoperiod 18 h of light and 6 h of darkness and 55% humidity.

### *2.2.3 In vitro follow-up of consortia*

To evaluate the suitability of the different treatments and the behavior of the two-member consortia in comparison to axenic cultures, microbial counts on BG11 agar and APHA plates were evaluated by the serial dilution method at 24 hours, 5

days and 14 days after the establishment of the consortia. APHA plates were kept at 30 °C for three days to count CFU mL<sup>-1</sup> of heterotrophic bacteria, *Pseudomonas putida*-BIO175 (*P. putida*) and *Pantoea cypripedii*-BIO175 (*P. cypripedii*), while BG11 agar plates were kept at 28 °C for 14 days to count CFU mL<sup>-1</sup> of cyanobacteria.

## **2.3 In planta growth promotion**

### *2.3.1. Preparation of plant material and microbial inoculum*

After finishing the experiment concerning the consortia establishment *in vitro*, all the treatments evaluated in BG11 broth were used as pre-inoculum to initiate the next experimental phase *in vivo*.

Firstly, a sterile substrate mixture (peat:vermiculite, 3:1 ratio) was prepared, sterilized and spread in seedling trays. Thirty tomato seeds (*Solanum lycopersicum* San Pedro variety) were sown per treatment. Seeds were germinated during three weeks at 25 °C, 60% humidity and a photoperiod of 12 h light and 12 h dark.

Microbial inoculum from each experimental block previously cited (see section 2.2.2.) was prepared from 20 mL of a growing culture for 14 days in BG11 medium. Preinoculum was added to 250 mL flasks with 180 mL of BG11 broth (1:10 diluted pre-inoculum). Flasks were then incubated in phytotron (Equitec) for 7 days on equal terms described above. After incubation time, inoculum was diluted in tap water (1:10) before root application in tomato seedlings.

### *2.3.2 Inoculation and effects of the consortium in planta*

Three weeks after germination, seedling root was irrigated with 25 mL corresponding to each inoculum (microbial suspension). Five randomly placed blocks of six seedlings each were used. (a total of 30 repetitions per treatment). A second application was carried out 25 days after the first one in the same conditions. Two weeks after the second irrigation, the following plant growth parameters were measured: stem and root length (cm), stem diameter (mm), fresh and dry weight (g) and root/stem ratio (R/S ratio).

## 2.4 Statistical analyses

Data obtained were subjected to statistical analysis using Statgraphics Centurion XVII. A multifactorial analysis of variance (ANOVA) and a multiple comparison test (Fisher's Least Significant Difference) were performed to compare mean values for different levels of repetition ( $P < 0.05$ ). A linkage between groups was used as a grouping method for the variables analysed *in vitro*. The interval measured in this case was the nearest euclidean distance squared. Principal Component Analysis (PCA) was used for data reduction and to produce ordination plots. PCA data matrix for plant growth parameters was standardized based on covariances (an eigenvalue = 1 was selected). Finally, Pearson's correlation test was used to assess possible correlations between plant growth parameters respect to treatments with *P. putida* or *P. cypripedii* consortia about axenic cultures.  $P \leq 0.05$  was required to establish significant differences.

## 3. Results and discussion

### 3.1 *In vitro* establishment of consortia

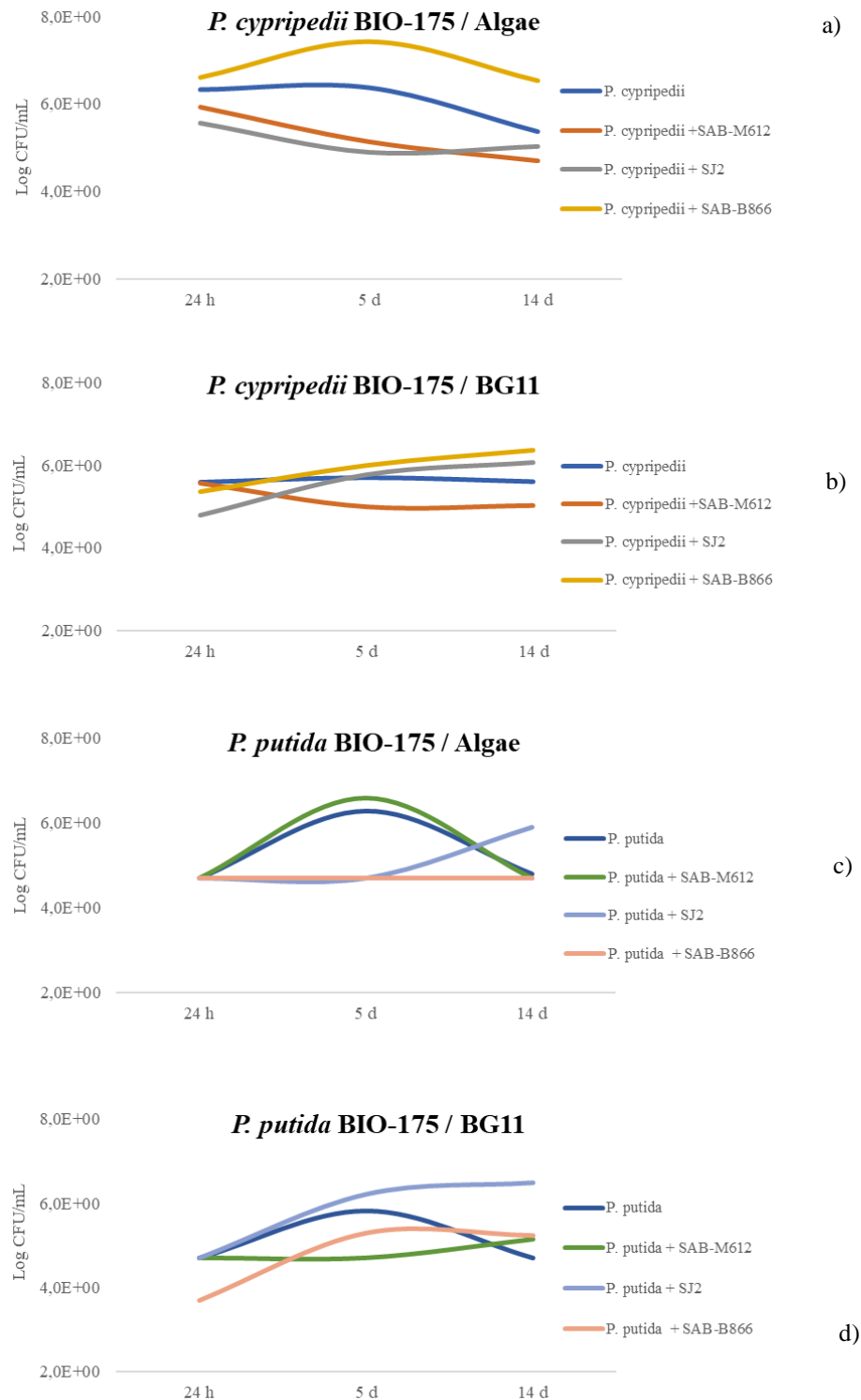
The 12 experimental blocks constituted in section 2.2.2, were monitored for 14 days to determine the *in vitro* behavior of the different microorganisms in axenic or consortium culture, established in BG11 broth and Algae media.

#### 3.1.1 *In vitro* monitoring of heterotrophic bacteria after establishment of consortia

First, the growth of the heterotrophic rhizobacteria *P. cypripedii* and *P. putida* was evaluated, both in axenic and combined culture with the 3 cyanobacteria (two-member consortia). The different experimental blocks (1-12), sampling time (24 hours, 5 and 14 days), culture media (Algae medium and BG11 broth) and replicates were the variability factors considered to analyze the results of *in vitro* consortia establishment.

Figure 1 shows microbial counts in APHA medium graphically represented as Log CFU mL<sup>-1</sup>. As shown in Figures 1a and 1b, growth of *P. cypripedii* did not significantly increase in axenic culture. However, this situation was reversed *in vitro* by combining it with SAB-B866 and SJ2, mainly after 5 days from the

consortia establishment. Results were variable with respect to cyanobacteria strain and culture medium.



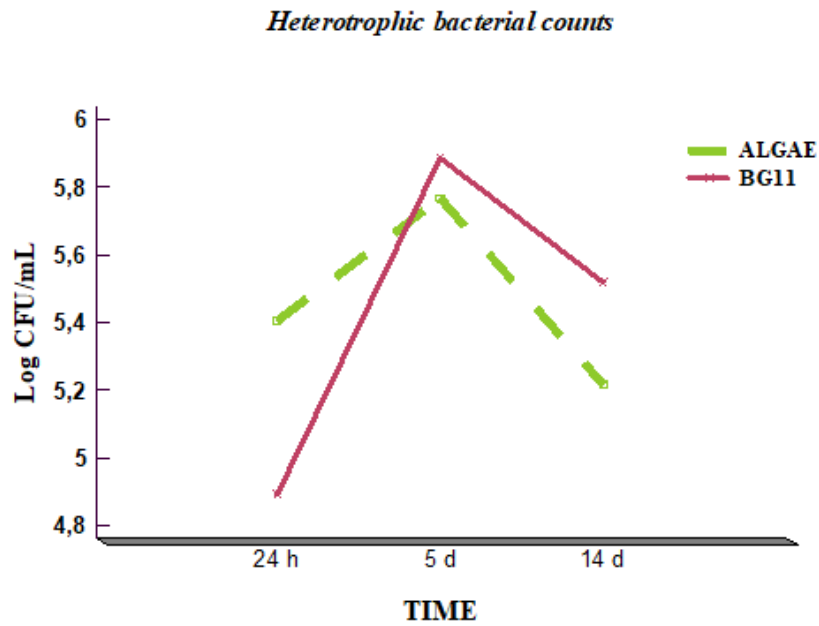
**Figure 1.** a) Heterotrophic bacteria counts, *P. cyripedii* (a, b) and *P. putida* (c, d) expressed in Log CFU/mL, in the experimental blocks corresponding to the BG11 and Algae culture media, at three time intervals: 24h, 5d, and 14d. All results are means (n=3 repetitions).

The lowest counts were recorded when *P. cypripedii* was cultured in combination with SAB-M612 in BG11 broth (Figure 1b). In general, *P. cypripedii* strain reduced its viable cell count in combined culture with SAB-M612 compared to axenic culture. This fact could be related to competitive interactions between both species.

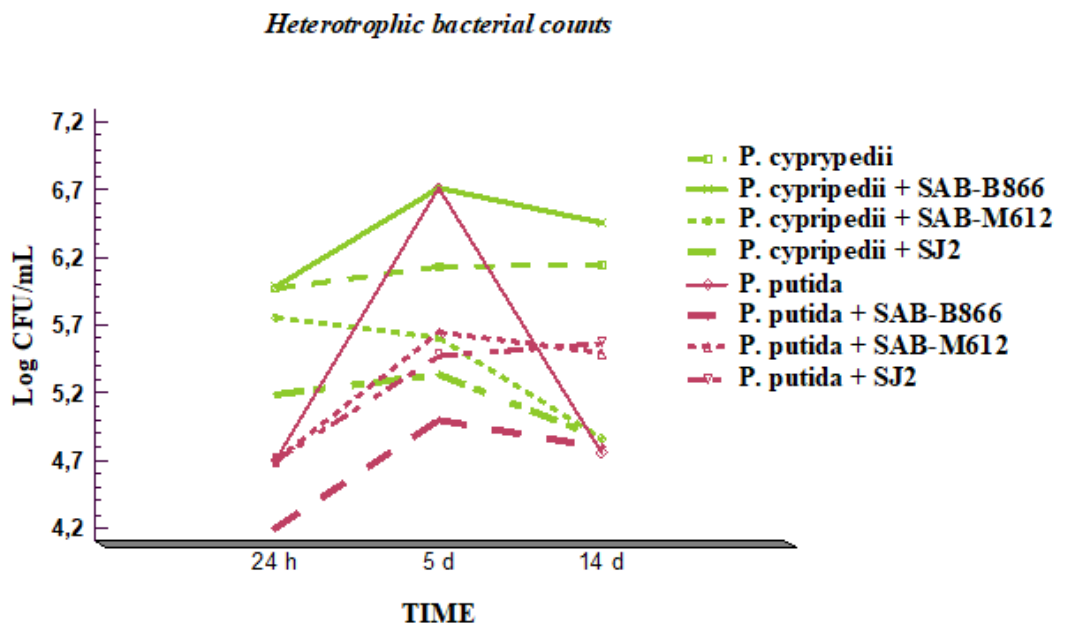
The behavior of *P. putida* was similar when it was cultured in both culture media under axenic conditions (Figures 1c and 1d), showing maximum count values at 5 days sampling. After this time, microbial count decreased probably due to nutrient limitation and cumulative stress (Nikel et al., 2016; Löwe et al., 2017). However, the *in vitro* growth of *P. putida* in consortia was dependent of the culture media and cyanobacterial strain. Thus, *P. putida* growth was notably improved in BG11 broth when it was cultured in combination with SAB-B866 and SJ2 (Figures 1c and 1d). On the other hand, consortia with SAB-M612 revealed higher counts in Algae medium than in BG11 broth between *P. putida* and high counts did not increased the *P. putida* growth. Only consortia established between SJ2 and *P. putida* stand up a more active growth of the heterotrophic bacteria respect to detected in axenic culture. Maybe the presence of SJ2 seem to have a stabilizing effect on *P. putida*, so that reliable growth in the co-culture was achieved. *P. putida* seem to be more suited for co-cultivation in a photosynthetic consortium as they have lower nutritional demands, as outlined in (Nikel et al., 2016; Löwe et al., 2017).

Figure 2 shows the results derived from the bacterial count ( $\text{Log CFU mL}^{-1}$ ) as a function of the interactions between the variables "Time x Culture Medium" and "Time x Block". In Figure 2a, a parallel behavior was observed in both culture media along the incubation time. The highest counts were detected globally at 5 days, and then dropped significantly after that time. In terms of the "Time x Block" interaction (Figure 2b), it could be confirmed that the highest counts were detected in the consortium formed by "*P. cypripedii* + SAB-B866", with respect to that observed in the control of the *P. cypripedii* strain in axenic culture. By comparison, *P. putida* counts peaked at 5 days of incubation in axenic culture, but then declined sharply. However, although with lower counts, the stationary phase of *P. putida* was maintained until 14 days, when it was cultured in in consortia with the cyanobacteria (Figure 2b).

a)



b)



**Figure 2.** Statistical analysis of the results derived from the heterotrophic bacterial counts: a) Bacterial count (Log CFU/mL) with respect to "Time x Culture medium" interaction and b) Bacterial count (Log CFU/mL) with respect to "Time x Block" interaction.

Microbial consortia are established in nature on the basis of metabolic relationships that are beneficial to the various parties involved, In view of the results derived from this first phase of the work, it is clear that, when formulating a mixed microbial inoculum, it is necessary to evaluate whether the optimal establishment of the consortium *in vitro* takes place, taking into account the compatibility of their members as well as the most suitable conditions for its cultivation (Fischer and Jofré, 2009). These results suggest that heterotrophic bacteria in co-culture with cyanobacteria could take advantage of several components secreted or released from the phototrophic organism. In addition, cyanobacteria could help maintain the aerobic environment of the consortium as well as being providers of organic carbon (Jiang et al., 2020).

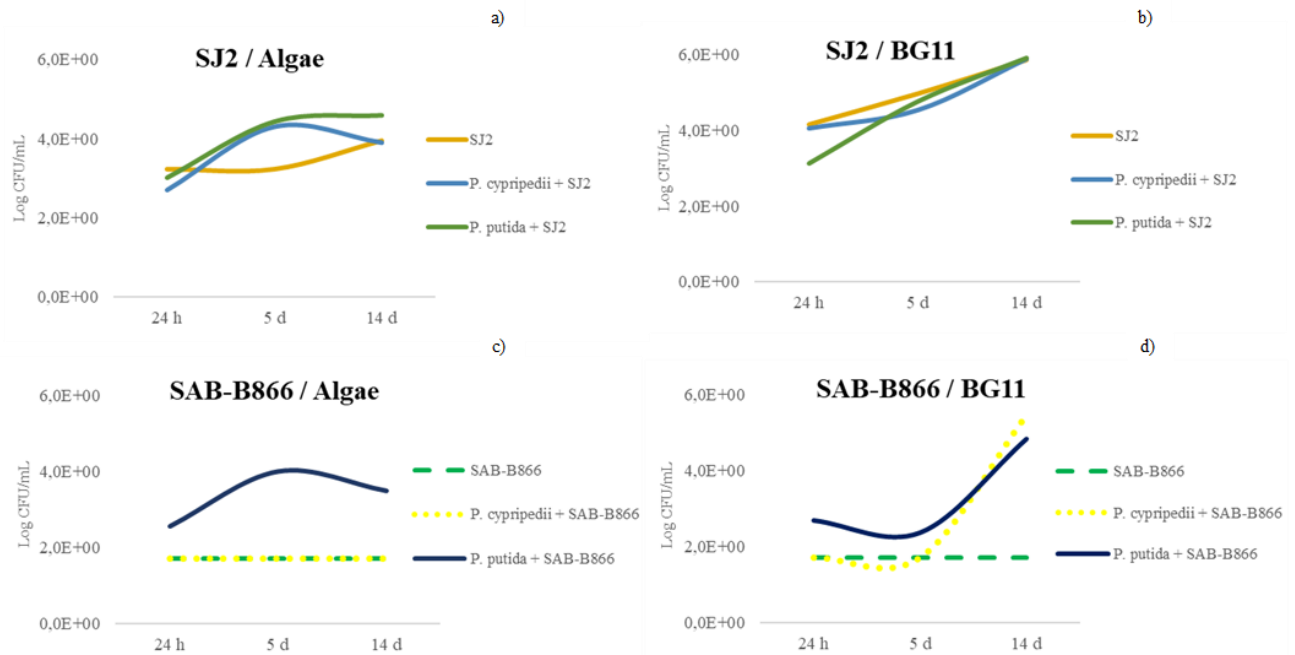
The different behaviors observed when combining phototrophs and heterotrophs strains in co-culture reveal that the symbiotic relationship depends on the specific species, which has been previously reported. Several authors suggested multiple factors that favor the relationships between consortia members: (i) accessible organic carbon provided by the phototroph to the heterotroph; (ii) similar desirable cultivation conditions for the partners and, finally, (iii) absence of toxic or lethal factors produced by one of the involved organisms (Jiang et al., 2020). Xue et al. (2017) showed that the supernatant of different strains of cyanobacteria belonging to the genus *Nostoc* spp. favored the axenic growth of fungi thanks to the presence of proteins and polysaccharides, which serve as energy and carbon supply for fungi. In the same line, previous research has demonstrated that the presence of heterotrophs can enhance the growth of phototrophs. Photoautotrophic members, cyanobacteria or eukaryotic algae, convert CO<sub>2</sub> into organic carbon for the heterotrophic growth of their microbial partner. Exchange of these metabolites can sustain the heterotrophs under conditions of absence of any organic carbon source. In turn, the heterotrophs provide additional CO<sub>2</sub>, protection against environmental factors and often a diverse array of secondary metabolites (Makkonen et al., 2007).

### 3.1.2 *In vitro* monitoring of cyanobacteria after establishment of consortia

Growth of cyanobacteria participating in the consortia with both heterotrophic bacteria was also evaluated. Figure 3 shows microbial counts (Log CFU mL<sup>-1</sup>) in BG11 broth and Algae media. SAB-M612 did not increase the number of CFU mL<sup>-1</sup> in axenic culture (results not shown). This allows understanding why in the



consortia established between SAB-M612 and the rhizobacteria, *P. cyripedii* and *P. putida*, a completely satisfactory behavior was not detected. Probably, the culture conditions were not optimal for the growth of the cyanobacteria, consequently affecting the growth of the rhizobacterial.



**Figure 3.** Cyanobacteria counts, SAB-M612 (a, b); SJ2 (c, d) and SAB-B866 (e, f) expressed in Log CFU/mL, in the experimental blocks corresponding to the BG11 and Algae culture media, at three time intervals: 24h, 5d, and 14d. All results are means (n=20 repetitions).

On the other hand, SJ2 showed the best behavior, both in axenic culture and consortia (Figures 3a and 3b). Counts of SJ2 in BG11 broth were in general higher than those observed in Algae medium. However, there was not difference among axenic and consortium culture when SJ2 was cultured in BG11 (Figure 3b). In contrast, the growth rate of SJ2 using Algae medium was faster in consortium (Figure 3a).

In turn, SAB-866 counts showed a remarkable increase in both culture media after the interaction with both heterotrophic bacteria (Figs. 3c and 3d). However, it should be noted that its association with *P. putida* favored the population increase in both culture media, while its growth in consortia with *P. cyripedii* was only favored in Algae medium.

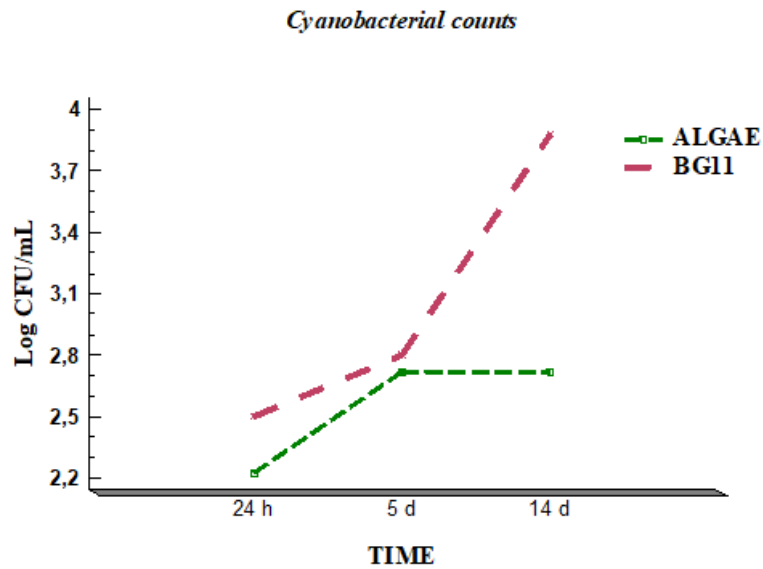
In view of the results obtained, heterotrophic bacteria could stimulate the cyanobacterial growth when they are members of the same consortia. In fact, it has been postulated, according to some authors, that cyanobacteria are dependent on other aerobic heterotrophic bacteria for their growth, which explains the difficulty of some of them to grow and maintain viability in axenic culture (Abed, 2010). The results derived from this work partly confirm this dependence, especially in the case of strain SAB-866, showing a population increase extremely dependent of culture media and accompanying partner.

Figure 4 shows the results derived from the cyanobacterial counts (Log CFU mL<sup>-1</sup>) as a function of the interactions between the different factors analyzed ("Time x Culture Medium" and "Time x Block"). During the first 5 days of the establishment of the consortia, the culture medium did not significantly affect the cyanobacterial counts obtained (Figure 4a). From that moment on, there was an increase in the cyanobacterial counts mainly in BG11 broth, with respect to those obtained in Algae medium. It was noticeable that the counts obtained for the cyanobacterium SAB-B866 in consortium with each heterotrophic bacteria were generally higher than those observed in axenic culture (Figure 4b). On the other hand, the consortium between the SJ2 and *P. putida* was not only compatible, but also implies an increase in the growth of the cyanobacterial partner. Regarding SAB-M612, satisfactory results were not reached in general terms, since no significant population increase was detected in any of the experimental blocks analyzed, as indicated above.

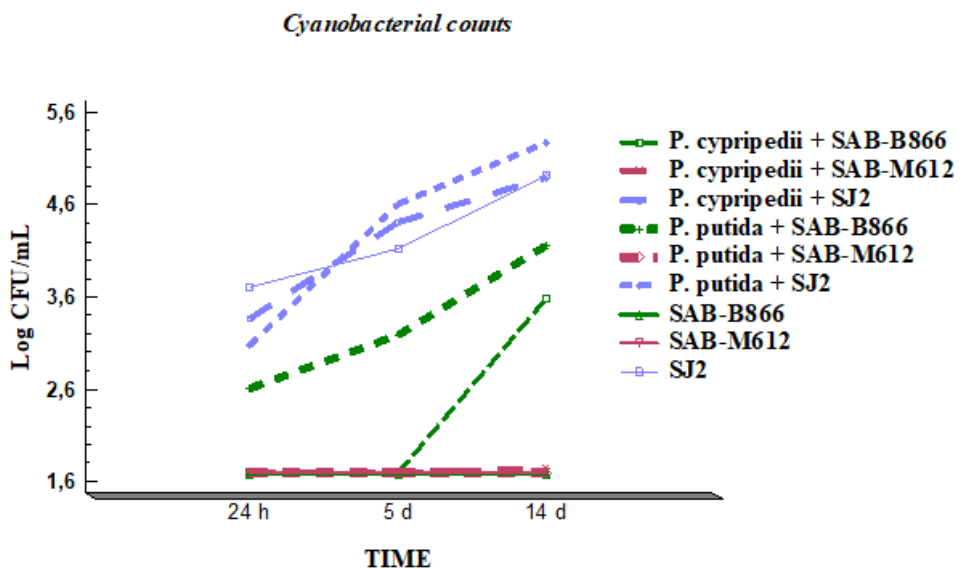
According to Hays et al. (2017), the growth of all heterotrophic species could stimulate the growth of cyanobacteria. However, some authors defend that a positive cooperation only are produced if both members show a lower cell density in axenic culture in comparison to detected in mixed culture. In this way, microbial cooperation would entail that the total number of cells in dual culture be higher than the sum of the monocultures (Mitri and Foster, 2013). In contrast, other combinations are characterized by mutual inhibition, with a decrease in cell numbers of both strains in comparison to checked in axenic culture. In view of the results described in this first part of the work, *P. putida* address to growth promotion of the cyanobacteria SJ2 and SAB-B866. *P. putida* is classified as a colonizer rhizobacteria of a wide range of plants. It can promote the plant growth through

nitrogen fixation, phosphate solubilization, or production of phytohormones, such as gibberellin and indol-3-acetic acid (Kang et al., 2014; Egamberdieva et al., 2015). Many of these properties could notably favor the growth of cyanobacterial member of the consortia.

a)



b)



**Figure 4.** Interaction analysis between variability factors: a) Cyanobacterial counts (Log CFU/mL) with respect to "Time x Culture medium" interaction and b) Cyanobacterial counts (Log CFU/mL) with respect to "Time x Block" interaction.

### 3.2 *In planta* growth promotion

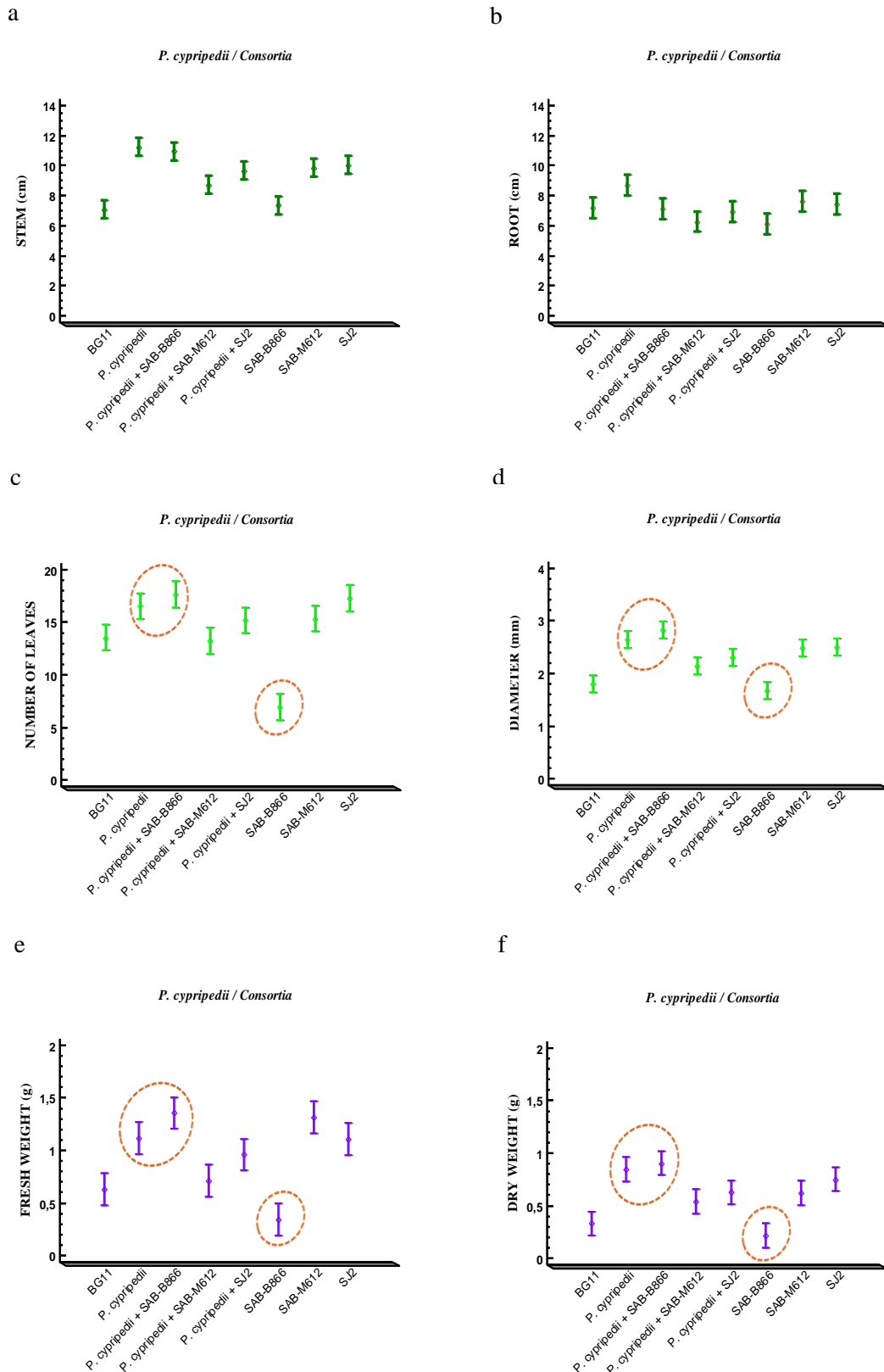
#### 3.2.1 Evaluation of the application of the different experimental blocks containing *Pantoea cypripedii* on tomato seedlings

The effect of the application of the different experimental blocks containing *P. cypripedii* was evaluated on tomato seedlings by determining seven basic growth parameters such as: stem and root length, leaf number, stem diameter, root:stem ratio, fresh and dry weight. The results of the *in vivo* assay are shown in Figure 5a-f. In general terms, treatment factor significantly affected growth parameters outperforming the negative control (BG11) in any of the parameters analyzed (except for the treatment with the cyanobacterium SAB-B0866 in axenic culture). It is worth mentioning the increase observed in leaf number (Fig. 5c), stem diameter (Fig. 5d) fresh and dry weight (Figs. 5e, 5f) when application of the consortia established between *P. cypripedii* and the cyanobacterium SAB-B866 (a modest but very noticeable increase in relation to the application of cyanobacteria in monoculture). Regarding stem and root length (Figs. 5a, 5b), none of the consortia exceeded the effect caused by *P. cypripedii* applied in pure culture.

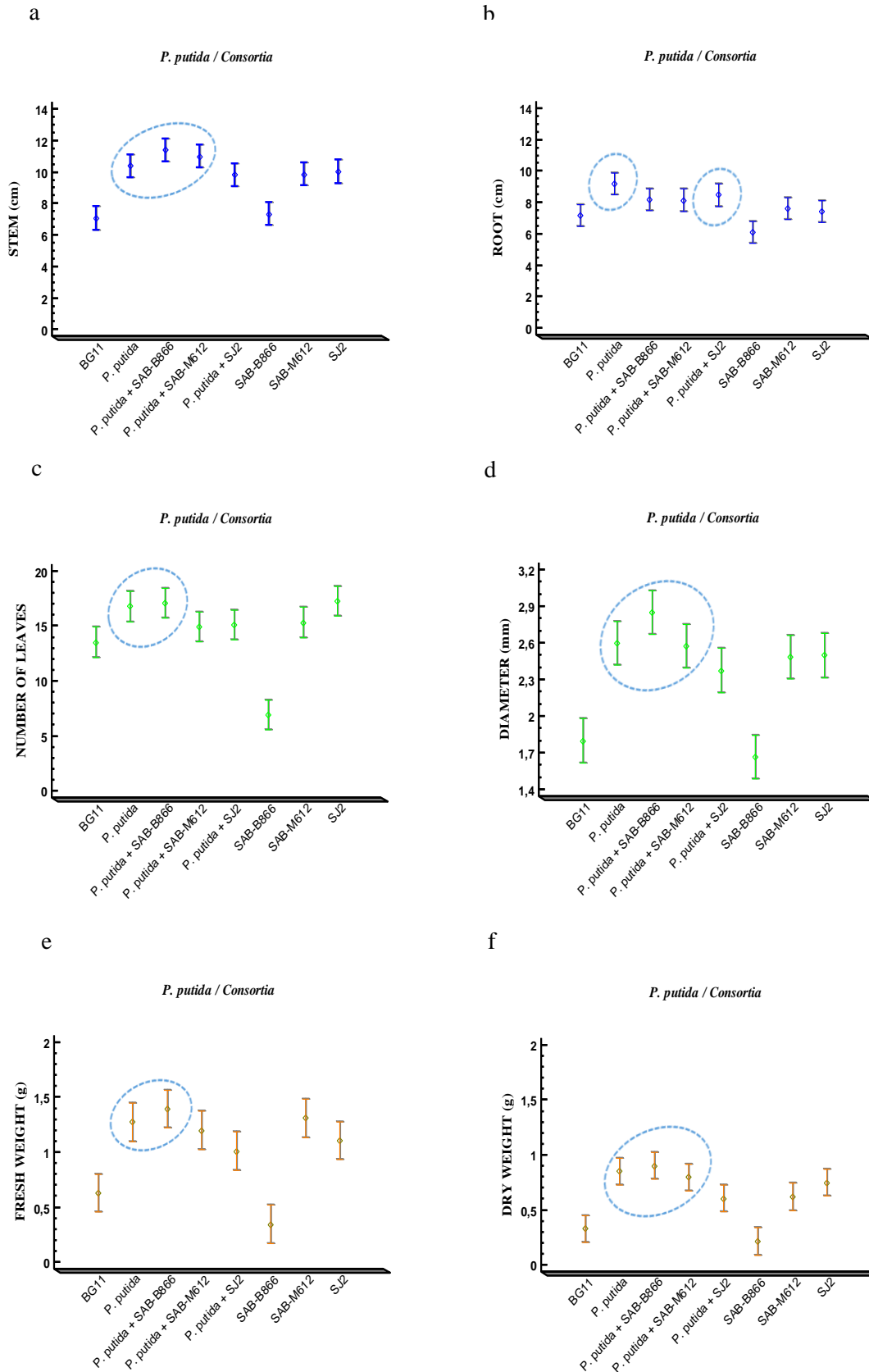
#### 3.2.2 Evaluation of the application of the different experimental blocks containing *Pseudomonas putida* on tomato seedlings

As indicated in Figure 6, interesting behavior was observed after the treatment with *P. putida* in consortium with the cyanobacteria SAB-B866. All growth parameters on tomato seedlings were increasing in relation to control plants (BG11), excepting for root length (Fig. 6b). On the other hand, consortium between *P. putida* and SAB-M612 showed also relevant results in relation to stem length, diameter and dry weight (Figs. 6a, 6d and 6f). However, the application of *P. putida* and SJ2 strains in consortia favored better root development in relation to detected when the cyanobacteria was applied in axenic culture (Fig. 6b).

Microbial inoculants are promising components of sustainable crop systems because of their capacity to promote plant growth, enhance nutrient availability and uptake, and support the health of plants (Adesemoye et al., 2009). Biofertilizers show no detrimental effects on crops. In addition, they could be applied directly to the soil, seeds, or foliar surface. They also increase the level of nutrients in plants and allow them to grow in a healthy environment (Hernández-Reyes et al., 2019).



**Figure 5.** Evaluation of the application of different experimental blocks *in vivo* containing *P. cypripedii*, on different plant growth parameters. a-f) Stem length (cm), root length (cm), number of leaves, stem diameter (mm), fresh weight (g) and dry weight (g) are represented. Mean of 20 replicates was used in each case. Vertical bars represent standard error values.



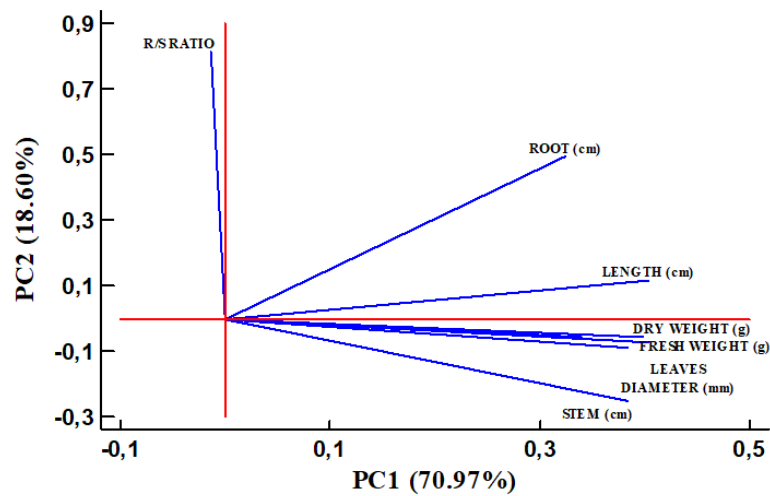
**Figure 6.** Evaluation of the application of different experimental blocks *in vivo* containing *P. putida*, on different plant growth parameters. a-f) Stem length (cm), root length (cm), number of leaves, stem diameter (mm), fresh weight (g) and dry weight (g) are represented. Mean of 20 replicates was used in each case. Vertical bars represent standard error values.

Our study has shown beneficial effects of some microbial consortia in relation to axenic cultures. The established consortia had shown a slight increase of the plant height, diameter and fresh weight of tomato. This may be due to the synergistic ability of the selected strains. According to Stockwell et al. (2010), microbial consortia may also improve their efficacy, reliability and consistency under different factors such as light intensity, pH, substrate and temperature (Quijano et al., 2017), as well as compatibility between associated strains (Behera et al., 2020). Earlier studies using cyanobacteria (Shariatmadari et al., 2013) revealed their significant role on *Solanaceae* and *Cucurbitaceae* crops in terms of root and stem length, leaf number, stem diameter, fresh and dry weight. According to Rai et al. (2019), microbial consortia contribute to plant development by either direct or indirect fixed-N transfer, improving soil quality and nutrient status, solubilizing inorganic phosphates, as well as producing hormones and vitamins. In addition, the ability to produce synergistic effects related to plant growth by combining different PGPMs (Plant Growth Promoting Microorganisms), beyond the effect observed after individual application, has been demonstrated (Shang and Liu, 2021; Pagnani et al., 2020).

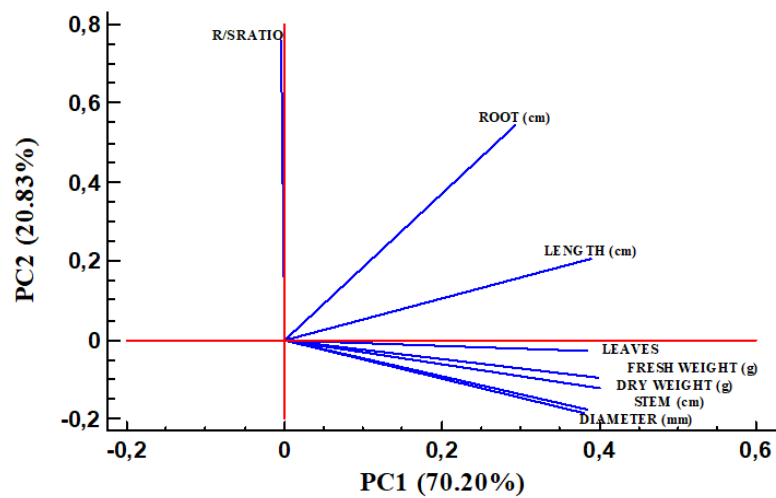
### 3.2.3 Statistical analyses of the results derived from *in vivo* bioassays

A Principal Component Analysis (PCA) was carried out in relation to the plant growth parameters analyzed in this work (Fig. 7), which were stem and root length, leaf number, stem diameter, root:stem ratio, fresh and dry weight. Establishing two principal components (PCs), the model explained more than 90% of the data variability, with the following contributions of each: PC1 70.97% and PC2 18.60%, when the seedlings were inoculated with the experimental blocks containing the rhizobacteria *P. putida* (Fig. 7a); PC1 70.20% and PC2 20.83%, when the seedlings were inoculated with the experimental blocks containing the rhizobacteria *P. cypripedii* (Fig. 7b). In both cases, PC1 was mainly associated with parameters of the vegetative part of the plant, while PC2 was directly associated with plant root development. Regarding PC1 showed a close positive associations with the variables concerning the aerial growth such as stem length, leaf number, fresh and dry weight and diameter, while PC2 component revealed a strong positive association with root:stem ratio and root length.

a)

*P. putida / Consortia**P. cypripedii / Consortia*

b)



**Figure 7.** Results of principal component analysis (PCA) based on measurement of plant growth parameters from tomato seedlings in relation with root application with generated experimental consortia containing *P. putida* (a) or *P. cypripedii* (b). All results are means (n=20 repetitions).

Figure 7 shows the greatest similarity in the behavior of tomato seedlings when treated with the experimental blocks including *P. putida* (Fig. 7a) or *P. cypripedii*



(Fig. 7b) (in axenic culture or in consortia with cyanobacteria). In general, data have proved that aerial growth stimulation occurs in general contrary to root development.

The relationship between cyanobacteria and bacteria is greatly dependent on the species and the environmental conditions. In the beneficial relationship, cyanobacteria enhance bacterial growth by providing photosynthetic oxygen and dissolved organic matter (Cooper and Smith, 2015). In turn, bacteria support photoautotrophic growth by providing carbon dioxide and other stimulatory means (Subashchandrabose et al., 2011). Actually, both partners can produce plant growth promote biomolecules (Prasanna et al., 2012; Kang et al., 2021). Recently, Horácio et al. (2020) evaluated the effects of co-inoculation with cyanobacteria and bacteria, getting an increase in nodulation, plant growth and production of the common bean, comparing with the untreated controls. This effect is indicative that N fertilization could be replaced by the use of previously selected microbial consortia.

On the other hand, the relationship among the variables *in vivo* evaluated was analyzed by a Pearson correlation analyses (Fig. S8, Supplementary material). Pearson R value oscillated between -1 and +1, as negative relationships between variables were represented in blue, while positive ones were indicated in red. Figure S8a shows all data referring to the experimental blocks containing *P. putida* and Figure S8b shows those data concerning to treatments with *P. cypripedii* blocks. As expected, the root:stem ratio correlated negatively with stem length measurement, while it correlated positively with root length. However, strong positive correlations were also established between stem length and other parameters related to aerial plant growth. This fact may be indicative that the treatments applied widely stimulated the size of the plant (vegetative growth).

The results derived from the *in vivo* evaluation of the different experimental blocks corroborated that observed in other previous works. Ibiene et al. (2012) analyzed the synergistic effect of different consortia formed by a combination of three rhizobacterial strains on tomato seedlings. They evaluated the total length and stem diameter in treated plants with the strains in pure culture or in consortia. The results obtained were very enlightening, since the use of consortia proved to be more successful than the application with the strains in axenic culture. Other more

recent studies, focused on the evaluation of germination rates, stem length and diameter, or dry weight, among others, have clearly shown the synergistic or additive effect of treatment with microbial consortia compared to the independent inoculation of the same microorganisms (Desai et al., 2020; Santoyo et al., 2021).

Since no production studies have been carried out, it is not possible to know how adult plants would have behaved after treatment with the different consortia; *a priori*, an increase in the aerial part of the plant (diameter, stem length, number of leaves) could be expected. On the other hand, the dosage of microorganisms used for the establishment of the consortia, or for seedling inoculation, was unique. Therefore, the search for the best possible combinations, the optimal *in vitro* or *in vivo* doses, or the most appropriate phenological stage to carry out the application of this type of "bioproducts" in an integrated manner, is part of future experimental designs.

#### 4. Conclusion

In this work, the positive behavior of some heterotrophic rhizobacteria in consortia with cyanobacteria from different source, show the enormous metabolic versatility and adaptability of this type of microorganisms. In view of the results obtained, the establishment of microbial two-member consortia (heterotrophic rhizobacteria and cyanobacteria) does not always occur successfully. This association depends in depth on the culture medium, incubation time and microbial components of the consortium. In this work, while SAB-B866 and SJ2 cyanobacteria showed a population increasing in presence of both rhizobacteria, the same did not occur with SAB-M612. As for the *in vivo* treatment, the consortia established between the cyanobacteria SAB-B0866 and the heterotrophic rhizobacteria *Pantoea cypripedii* and *Pseudomonas putida*, gave very satisfactory results compared to those obtained from treatment with the SAB-B0866 as independently. It should not be forgotten, on the other hand, that the success of a microbial consortium in relation to the observation of an increase in CFU mL<sup>-1</sup> *in vitro* does not directly imply that the subsequent application on the plant be satisfactory in terms of phytostimulation.

In short, the versatility and plasticity, as well as the robustness of the microbial communities involved in this type of consortia, describes the potential of these microbial communities to be applied as new agro-biotechnological strategies.

## 5. Acknowledgements

The authors of this work appreciate the help provided by professors F.G. Acien (SABANA project coordinator), V. Ordög and J.L. Gómez-Pinchetti, with respect to obtaining the collection of cyanobacteria used in this work.

## 6. Appendix A. Supplementary data

The following are the Supplementary data to this article:

Supplementary Table S1

Supplementary Figure S8

**Table S1.** Strain characterization as potential phytostimulant agents

Strain	Germination Index (%) <sup>1</sup>	Phosphate solubilization <sup>2</sup>	Potassium solubilization <sup>3</sup>	Salicylic acid producer <sup>4</sup>	Siderophore producer <sup>5</sup>	Stimulation of seedling growth
<i>Pseudomonas putida</i> -BIO175	80-90%	+	+	+	+	+
<i>Pantoea cypripedii</i> -BIO175	n.t.	+	+	n.t.	n.t.	+
<i>Nostoc</i> SAB-M612	> 100%	-	n.t.	+	-	+
<i>Dolichospermum</i> SAB-B866	90-100 %	-	-	-	-	+
SJ2 (unidentified cyanobacterium)	80-90%	-	-	n.t.	-	+

<sup>1</sup>Zucconi et al., 1981.

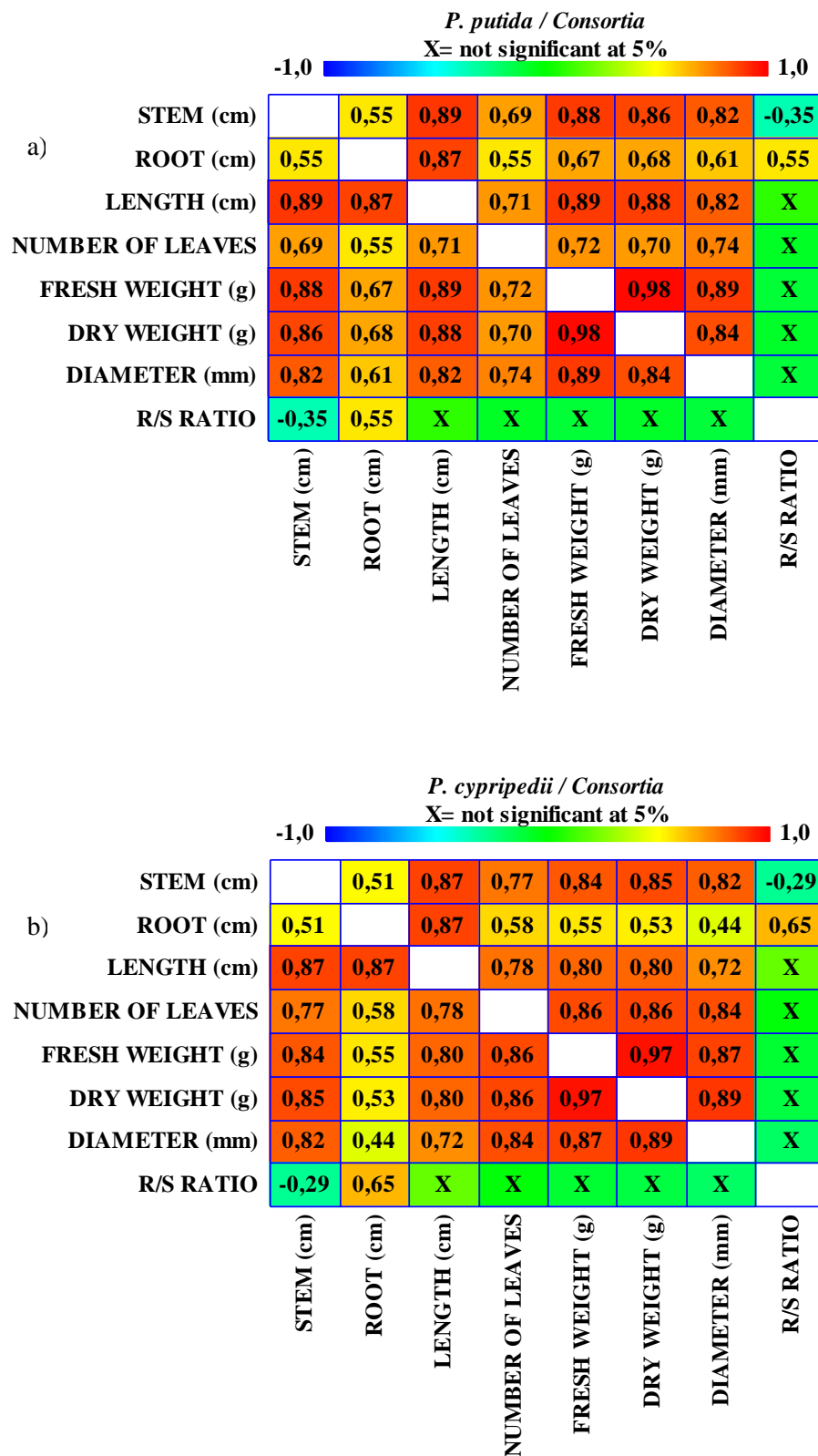
<sup>2</sup>Pikovskaya medium (Khan et al, 2007).

<sup>3</sup>Aleksandrow medium (Rajawat et al, 2016).

<sup>4</sup>Plant Salicylic acid SA ELISA Kit, MyBiosource MBS9314138.

<sup>5</sup>CAS medium (Schwyn and Neilands, 1987).

n.t.: non tested



**Figure S8.** Pearson correlation analyses of the results derived from *in vivo* bioassays at 95% confidence level, *P. putida* (a) and *P. cypripedii* (b) (Stem (cm), Root (cm), Number of leaves, Stem Diameter (mm), Fresh weight (g) and Dry weight (g)).

## 7. References

- Abed, R. M., 2010. Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. *Int. J. Environ. Bioremediat. Biodegrad.* 64 (1), 58-64.
- Adesemoye, A., Torbert, H., Kloepper, J., 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb. Ecol.* 58, 921– 929.
- Babu, S., Bidyarani, N., Chopra, P., Monga, D., Kumar, R., Radha, P., Kranthi, S., Adak, A., Saxena, A.K., 2015. Evaluating microbe-plant interactions and varietal differences for enhancing biocontrol efficacy in root rot challenged cotton crop *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 345-362.
- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., 2004. Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria, in: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., Hampp, R. (Eds.), *Plant surface microbiology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 351–371.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Aguilar, C.A., 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56 (417), 1761–1778.
- Behera, B., Das, T.K., Raj, R., Ghosh, S., Raza, M.B., Sen, S., 2020. Microbial consortia for sustaining productivity of non-legume crops: prospects and challenges. *Agric. Res.* 10, 1–14.
- Bergman, B., 2002. *Nostoc–Gunnera* symbiosis, in: Rai, A.N., Bergman, B., Rasmussen, U. (Eds.), *Cyanobacteria in Symbiosis*. Dordrecht, Kluwer, pp. 207–232.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., Sessitsch, A., 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 30–37.
- Cooper, M.B., Smith, A.G., 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 147–153.
- Desai, S., Bagyaraj, D.J., Ashwin, R., 2020. Inoculation with microbial consortium promotes growth of tomato and capsicum seedlings raised in pro trays. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 90 (1), 21-28.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Hashem, A., 2015. *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi. J. Biol. Sci.* 522, 773–779.
- Fernández, A.I., Villaverde, M., Nicolás, J.A., García-Gómez, A., Malo, J., 2008. *Pantoea dispersa*; rhizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR). In Congreso SEAE. Agricultura y Alimentación Ecológica. (VIII: 2008 16-20 sep.: Bullas).
- Fischer, S., Jofré, E., 2009. El futuro de los inoculantes: hacia el desarrollo de consorcios microbianos para una agricultura sustentable. Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz. INTA, Buenos Aires, pp. 66–7567.
- Hays, S.G., Yan, L.L.W., Silver, P.A., Ducat, D.C., 2017. Synthetic photosynthetic consortia define interactions leading to robustness and photoproduction. *J. Biol. Eng.* 11, 4.

- Hernández-Reyes, B.M., Rodríguez-Palacio, M.C., Castilla-Hernández, P., Sánchez-Robles, J., Vela-Correa, G., Schettino-Bermúdez, B., 2019. Uso potencial de cianobacterias como biofertilizante para el cultivo de maíz azul en la Ciudad de México. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 10 (1), 13-27.
- Horácio, E.H., Zucareli, C., Gavilanes, F.Z., Yunes, J.S., Sanzovo, A.W.D.S., Andrade, D.S., 2020. Co-inoculation of rhizobia, azospirilla and cyanobacteria for increasing common bean production. *Semina: Ciências Agrárias*. 41, 2015–2028.
- Ibiene, A.A., Agogbua, J.U., Okonko, I.O., Nwachi, G.N., 2012. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizer: Effect on growth of *Lycopersicon esculentus*. *J. Am. Sci.* 8 (2), 318-324.
- Jiang, C., Fan, Z., Li, Z., Niu, D., Li, Y., Zheng, M., Guo, J., 2020. *Bacillus cereus* AR156 triggers induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by suppressing miR472 and activating CNLs-mediated basal immunity in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* 21 (6), 854-870.
- Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., Khan, A.L., Kim, M.-J., Park, J.-M., Kim, B.-R., Shin, D.-H., Lee, I.-J., 2014. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 84, 115-124.
- Kang, Y., Kim, M., Shim, C., Bae, S., Jang, S., 2021. Potential of Algae–Bacteria Synergistic Effects on Vegetable Production. *Front. Plant Sci.* 12.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agron. Sustain. Dev.* 27(1), 29-43.
- Kumar, M., Mishra, S., Dixit, V., Kumar, M., Agarwal, L., Chauhan, P. S., Nautiyal, C. S., 2016. Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signal. Behav.* 11 (1), e1071004.
- Löwe, H., Hobmeier, K., Moos, M., Kremling, A., Pflüger-Grau, K., 2017. Photoautotrophic production of polyhydroxyalkanoates in a synthetic mixed culture of *Synechococcus elongatus* cscB and *Pseudomonas putida* cscAB. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–11.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 86, 1–25.
- Makkonen, S., Hurri, R.S.K., Hyvarinen, M., 2007. Differential responses of lichen symbionts to enhanced nitrogen and phosphorus availability: an experiment with *Cladonia stellaris*. *Ann. Bot.* 99, 877–884.
- Meliani, A., Bensoltane, A., Benidire, L., Oufdou, K., 2017. Plant growth-promotion and IAA secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Res. Rev. J. Bot. Sci.* 6 (2), 16-24.
- Mitri, S., Foster, K.R., 2013. The genotypic view of social interactions in microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 47, 247–73.

- Mógor, Á.F., Ördög, V., Lima G.P.P., Molnár, Z., Mógor, G., 2018. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *J. Appl. Phycol.* 30, 453–460.
- Nikel, P.I., Chavarría, M., Danchin, A., de Lorenzo, V., 2016. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a synthetic biology chassis for host-ing harsh biochemical reactions. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 34, 20–9.
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., Steppe, T.F., 2000. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ. Microbiol.* 2, 11-26.
- Pagnani, G., Galieni, A., Stagnari, F., Pellegrini, M., Del Gallo, M., Pisante, M., 2020. Open field inoculation with PGPR as a strategy to manage fertilization of ancient *Triticum* genotypes. *Biol. Fertil. Soils* 56 (1), 111-124.
- Pankratova, Je.M., Zyablykh, R.Ju., Kalinin, A.A., Kovin, A.L., Trefilova, L.V., 2004. Construction of the microbial culture on the base of bluegreen algae *Nostoc paludosum* Kiitz, *Algologia* 6 (4), 445– 458.
- Perera, I., Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., Megharaj, M., 2018. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: an underexplored microbiota. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7351–7363.
- Prasad, R., Kumar, M., Varma, A., 2015. Role of PGPR in soil fertility and plant health, in: Egamberdieva, D., Shrivastava, S., Varma, A. (Eds.), *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 247-260.
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., Shivay, Y. S., Nain, L., 2012. Influence of co-inoculation of bacteria- cyanobacteria on crop yield and C- N sequestration in soil under rice crop. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28 (3), 1223-1235.
- Prasanna, R., Babu, S., Rana, A., Kabi, S.R., Chaudhary, V., Gupta, V., Kumar, A., Shivay, Y.S., Nain, L., Pal, R.K., 2013. Evaluating the establishment and agronomic proficiency of cyanobacterial consortia as organic options in wheat-rice cropping sequence. *Exp. Agric.* 49 (3), 416-434.
- Quijano, G., Arcila, J.S., Buitrón, G., 2017. Microalgal-bacterial aggregates: applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 35 (6), 772-781.
- Rai, A.N., Singh, A.K., Syiem, M.B., 2019. Plant growth-promoting abilities in cyanobacteria, in: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (Eds.), *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Inc., pp. 459-476.
- Rajawat, M.V S., Singh, S., Tyagi, S.P., Saxena, A.K., 2016. A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria. *Pedosphere* 26(5), 768-773.
- Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M., Kim, H.S., 2016. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol. Adv.* 34, 14-29.
- Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y.S., Nain, L., 2012. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *Eur. J. Soil Biol.* 50, 118–126.

- Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F.I., Santos-Villalobos, S.D.L., Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R., 2021. Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agron.* 11(2), 219.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Anal. Biochem.* 160, 47–56.
- Shang, J., Liu, B., 2021. Application of a microbial consortium improves the growth of *Camellia sinensis* and influences the indigenous rhizosphere bacterial communities. *J. Appl. Microbiol.* 130, 2029–2040.
- Shariatmadari, Z., Riahi, H., Hashtroudi, M.S., Ghassempour, A., Aghashariatmadary, A., 2013. Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 59, 535–547.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D., Loper, J.E., 2010. Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1 applied as single strains and mixed inocula. *Phytopathology* 100, 1330-1339.
- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnol. Adv.* 29, 896-907.
- Terry, A., Leyva, A., Hernández, A., 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, VII (2), 47-54.
- Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D., Stefani, E., 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (4), 952.
- Xue, X.M., Yan, Y., Xiong, C., Raber, G., Francesconi, K., Pan, T., Ye, J., Zhu, Y.G., 2017. Arsenic biotransformation by a cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Environ. Pollut.* 228, 111-117.
- Yanti, Y., Hamid, H., Reflin 2021. Development of the PGPR and Cyanobacteria Consortium for Growth Promotion and Control *Ralstonia syzigii* subsp. *indonesiensis* of Tomato. *OP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 709 012085
- Zope, V. P., El-Enshasy, H. A., and Sayyed, R. Z. (2019). “Plant growth-promoting rhizobacteria: an overview in agricultural perspectives,” in *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management, Rhizobacteria in Biotic Stress Management*, Vol. II, ed. R. Z. Sayyed (Singapore: Springer), 345–361.
- Zucconi F, Pera A, Forte M, De Bertoldi M (1981) Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54–57.



DISCUSIÓN

## V. Discusión

Antes de discutir en profundidad los resultados del trabajo realizado, hay que tener en cuenta que las cianobacterias han destacado tradicionalmente por su papel como productores primarios en ambientes terrestres y acuáticos. Gracias a que son organismos fotosintéticos y muchas de ellas fijan nitrógeno atmosférico, se consideran importantes protagonistas de los ciclos biogeoquímicos, así como potenciales mitigadores del calentamiento global. Además, se las describe actualmente como un importante recurso energético para la obtención de biocombustibles, y son fuente de innumerables moléculas bioactivas que se aplican en distintos ámbitos de la agrobiotecnología, entre muchos otros. Es en este último punto, donde se ha centrado el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el Objetivo principal de este trabajo fue corroborar el papel que las cianobacterias desempeñan cuando son aplicadas en estadios tempranos del desarrollo vegetal, bien a modo de extractos puros, o bien en forma de consorcios activos junto a otras rizobacterias. El *screening* previo y exhaustivo llevado a cabo *in vitro* a partir de un grupo de cianobacterias procedente de ambientes acuáticos y terrestres, sirvió para seleccionar aquellas cuyo efecto promotor y fitoprotector del desarrollo vegetal fue más destacable. La validación de dichas capacidades pudo ser evaluada posteriormente *in vivo*, en distintos cultivos hortícolas, según la finalidad del ensayo, y frente a enfermedades tan devastadoras en agricultura intensiva como el chancro bacteriano provocado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, o el *damping-off* producido por el oomiceto *Pythium ultimum*.

De acuerdo con lo expuesto y con objeto de que la discusión de los resultados ilustre de forma clara y organizada los hitos más relevantes alcanzados en este proyecto de Tesis, se tratarán por separado las dos líneas de trabajo principalmente desarrolladas. Así, se discutirán en primer lugar los resultados más relacionados con el efecto biofertilizante y bioestimulante de las cianobacterias (Artículos 1 y 4), mientras que los resultados vinculados al efecto fitoprotector de la colección de cepas (Artículos 2 y 3), se tratarán en una segunda parte de la discusión.

## **V.1. Efecto biofertilizante y bioestimulante derivado de la aplicación de cianobacterias en estados tempranos del desarrollo vegetal**

Actualmente, biofertilizantes y bioestimulantes están ganando importancia en el ámbito de la agricultura sostenible, y se posicionan como una herramienta útil para mejorar la productividad de los cultivos de forma ecológica y económicamente viable, reduciendo así el efecto perjudicial derivado del uso abusivo de agroquímicos sintéticos (Singh et al., 2011). Entre los diversos tipos de bioproductos que se encuentran en el mercado, las formulaciones basadas en organismos fotosintéticos, incluidas microalgas y cianobacterias, contribuyen al mantenimiento de la fertilidad del suelo y a la mejora del rendimiento de los cultivos (Li et al., 2017).

El trabajo de investigación que se describe en esta Memoria de Tesis, se inició en primer lugar con la caracterización *in vitro* de una colección de cianobacterias, en relación a la capacidad de las mismas para promover el crecimiento vegetal en etapas tempranas del desarrollo. En este sentido, la selección de las mejores cepas se basó en la evaluación del efecto de los extractos sonicados de cianobacterias sobre la germinación de las semillas de berro, mediante el cálculo del Índice de Germinación (IG). Como factor de variabilidad adicional a la propia cepa, se tuvo en cuenta el efecto de distintas concentraciones de extracto. Aquellas cepas que dieron lugar a valores de IG superiores al 100% fueron consideradas como fitoestimulantes (Zucconi et al., 1981), mientras que aquellas que provocaron la disminución de este parámetro por debajo del 60% se consideraron fitotóxicas. El 70% de los extractos sonicados, preparados a una concentración de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , dio lugar a valores de IG en torno al 90- 110% (Figura 1, Artículo 1), lo que a veces se correspondió con valores de elongación de la radícula más elevados que lo observado en las muestras control, no sometidas a tratamiento. En ningún caso, los valores de IG fueron menores del 60%. Sin embargo, la dispersión de los resultados fue mayor en términos de fitotoxicidad y fitoestimulación cuando los extractos se aplicaron a concentraciones más altas ( $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), llegándose a alcanzar valores de IG fitotóxicos a partir del 25% de los extractos testados. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores que confirmaron el efecto positivo

de la aplicación de cianobacterias a bajas concentraciones de extracto (Dmytryk et al., 2014; Aghofack-Nguemezi et al., 2015; Godlewska et al., 2019), así como el efecto fitotóxico de concentraciones excesivamente altas de extractos de algas marinas sobre la germinación de las semillas (Kumar y Sahoo, 2011; Hernández-Herrera et al., 2013).

Otro rasgo importante de los biofertilizantes y bioestimulantes es que mejoran el rendimiento de los cultivos a través de la producción de determinadas enzimas capaces de incrementar la disponibilidad de determinados nutrientes esenciales para la planta, como es el caso del fósforo, el potasio o el hierro, o bien gracias a la síntesis de metabolitos de interés agronómico, como es el caso de las fitohormonas. En este trabajo de Tesis, el estudio de las cianobacterias de colección se amplió más allá de observar su carácter promotor de la germinación en semillas de berro, ya que además fueron caracterizadas en función de su capacidad para producir sideróforos, ácido salicílico y citoquininas, así como para solubilizar fosfatos.

En lo referente a los sideróforos, estos se definen como compuestos orgánicos producidos por microorganismos, implicados en el secuestro de hierro férrico en condiciones de deficiencia de hierro, haciéndolo más disponible para los microorganismos y las plantas (Ahmed y Holmström, 2014). En este trabajo, a partir de varios de los extractos analizados se pudo detectar la presencia de sideróforos, destacando el caso de los aislados identificados como *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Nodularia* sp., *Synechococcus* sp. y *Trichormus* sp. Algunos autores han descrito que varias especies de cianobacterias, *Anabaena flos-aquae* y *Anabaena cylindrica*, tienen la capacidad de producir sideróforos para quelar micronutrientes como el Fe o el Cu (Goldman et al., 1983), lo cual se encuentra en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otra parte, sólo dos de los extractos ensayados, procedentes de dos cepas identificadas como *Nostoc* spp. (Tabla 1, Artículo 1) fueron positivos respecto a la capacidad solubilizadora de fosfato. Desde mediados del siglo XX, se conoce la capacidad de ciertas cianobacterias para incorporar el fósforo disponible en el suelo a sus constituyentes celulares, y luego liberarlo gradualmente por exudación, autólisis o descomposición microbiana de las células muertas, pasando así a disposición de las raíces vegetales (Fuller y Roger, 1952). Otros autores han

descrito que las cianobacterias son capaces de almacenar cuerpos de polifosfato para superar periodos breves de escasez de fósforo. Estos gránulos de polifosfato son utilizados como una reserva intracelular de P y pueden acumularse en altos niveles en las células que fijan N<sub>2</sub> (McKnight y Morel, 1980). Más recientemente, también se ha sugerido que las cianobacterias pueden mejorar la biodisponibilidad del fósforo para las plantas, gracias a la solubilización y movilización de los fosfatos orgánicos insolubles presentes en el suelo, con la ayuda de enzimas fosfatasas (Tang et al., 1997).

En cuanto a la producción de sustancias bioactivas del tipo de las fitohormonas, las estudiadas en este trabajo de Tesis han sido seleccionadas no sólo por su importante papel regulador del crecimiento vegetal, sino también por su implicación directa o indirecta en los procesos de inducción de resistencia de las plantas. Por un lado, las citoquininas (CKs) afectan a diferentes procesos fisiológicos como la morfogénesis, la dominancia apical, la senescencia de las hojas, el desarrollo de cloroplastos y la inactividad de las semillas (Hwang et al., 2012). Además, las CKs juegan un papel relevante en la estimulación de la respuesta inmune desencadenada por la ruta de señalización del ácido salicílico (Igari et al., 2008).

Por su parte, el ácido salicílico (AS), considerado un regulador del crecimiento vegetal, favorece el proceso de enraizamiento, aumentando la longitud y área de las raíces, así como el área foliar y el diámetro del tallo en plantas de tomate (Larqué-Saavedra et al., 2010). Esta molécula también está implicada en la respuesta fisiológica defensiva frente a patógenos mediante la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Chaturvedi y Shah, 2007).

En este trabajo de investigación, varios extractos procedentes de la colección de cianobacterias destacaron por el nivel detectado de AS y CKs (Tabla 1, Artículo 1), coincidiendo con los resultados descritos por otros autores, en relación a la producción de citoquininas por parte de aislados de los géneros *Arthronema* y *Calothrix*, o de auxinas por parte de *Oscillatoria* y *Chlorogloea* (Parveen y Pandey, 2011). Las cianobacterias, por tanto, desempeñan un papel importante como agentes productores de fitohormonas, lo que las convierte en interesantes herramientas agro-biotecnológicas (Stirk et al., 2002). En algunos casos, la

producción de fitohormonas se localiza intracelularmente mientras que en otros se excreta al entorno circundante (Mazur et al., 2001; Romanenko et al., 2015). Cabe destacar, por otro lado, la fuerte relación positiva demostrada entre las fitohormonas producidas por cianobacterias (citoquininas y auxinas) y diferentes parámetros de crecimiento vegetal, como el Índice de Germinación, la longitud de los brotes y raíces, o el peso de las plántulas. Además, el aumento del nivel de fitohormonas en la rizosfera se ha podido atribuir, según algunos autores, a la interacción planta-cianobacterias (Hussain y Hasnain, 2011).

En definitiva, la caracterización de los extractos ensayados en base a su capacidad de promover la germinación o de producir algún tipo de sustancias bioactivas (como CKs, AS o sideróforos) podría servir para discernir el efecto que una determinada cianobacteria puede ejercer sobre el crecimiento de la planta en diferentes fases de desarrollo, o incluso sobre el control de un patógeno específico.

Algunos de los resultados derivados del trabajo realizado, ponen de manifiesto la existencia de una importante relación entre los datos de germinación y los niveles de ácido salicílico presentes en los extractos de cianobacterias (Figura 2, Artículo 1). También los niveles de CKs y sideróforos correlacionaron positivamente. Esto podría ser especialmente relevante durante la fase de germinación y elongación de la raíz. En cualquier caso, los resultados revelan que, si bien la influencia del ácido salicílico, citoquininas y sideróforos podría ser más relevante durante las primeras etapas del desarrollo de la planta, no ocurre lo mismo con la capacidad de solubilizar fosfato. Aunque este carácter, en concreto, se encontró más alejado en el dendrograma (Figura 2, Artículo 1), no se descarta su especial importancia durante fases más avanzadas del desarrollo vegetal.

Una vez seleccionadas las mejores cepas de cianobacterias en función de su potencial carácter biofertilizante y fitoestimulante (SAB-M912, SAB-M612, SAB-1211 y SAB-M683), los extractos correspondientes fueron aplicados en plántulas de pepino. Los resultados obtenidos revelaron un claro efecto promotor del crecimiento tras la aplicación de los extractos sonicados de las cepas, respecto a las plantas no tratadas. Es probable que el efecto promotor observado pudiera deberse entre otros factores, a la presencia de algunos aminoácidos como el triptófano y la arginina en dichos extractos, hecho que se asocia a un aumento significativo en el

crecimiento y el rendimiento de la planta. Hay que tener en cuenta que ambos aminoácidos son precursores metabólicos de fitohormonas indispensables en los procesos que regulan el desarrollo vegetal (Colla y Rouphael, 2015). Por otro lado, aunque no es un efecto especialmente atribuido a las cianobacterias, la presencia de determinados polisacáridos en los extractos podría contribuir a mejorar el crecimiento de las plantas (Elarroussi et al., 2016).

Desde hace décadas, numerosos trabajos han descrito los beneficios de la inoculación de plantas con microorganismos fototróficos, como promotores del crecimiento de las plantas (Ördög et al., 2004; 2021). Algunos autores sostienen que el uso de este tipo de microorganismos como biofertilizantes afecta fundamentalmente a los mecanismos de regulación del agua de las plantas, contribuyen al aumento de la clorofila en las hojas, retrasan el envejecimiento, mejoran la germinación de las semillas, y benefician el sistema planta-suelo (Hegazi et al., 2010). Otros autores han descrito que la aplicación de este tipo de extractos puede provocar no sólo un aumento de la absorción de nutrientes, sino también la activación de los mecanismos de defensa de las plantas contra el estrés biótico (Prasanna et al., 2008; 2013).

Una vez evaluados los beneficios de la aplicación de extractos puros de cianobacterias para la promoción del crecimiento vegetal, se pensó en la posibilidad de mejorar la eficacia de estos bioproductos mediante el diseño de inóculos mixtos a partir de las cepas de cianobacterias más prometedoras. Actualmente, en el ámbito de la agrobiotecnología se apuesta por la aplicación de consorcios constituidos por la combinación de dos o más microorganismos fotosintéticos (cianobacterias y microalgas) (Chittapun et al., 2017). En la misma línea, destacan también aquellos consorcios constituidos por cianobacterias y otras bacterias de interés agronómico (rizobacterias) que apoyan el crecimiento sus socios fotoautótrofos, de modo que la producción, el crecimiento y el ciclo de los nutrientes mejora, con respecto a lo que una sola especie o población puede lograr por sí sola en condiciones ambientales similares (Paerl et al., 2000).

Bajo esta nueva perspectiva, en este trabajo se llevó a cabo el diseño de consorcios entre las cepas de cianobacterias más destacadas por su efecto fitoestimulante (SAB-M612 y SAB-M866), y dos rizobacterias aportadas por el

grupo BIO-175 de la Universidad de Almería (*Pseudomonas putida*-BIO-175 y *Pantoea cypripedii*-BIO-175), con demostrada capacidad bioertilizante y fitoestimulante. El éxito del establecimiento de algunos de los consorcios diseñados dependió, en primer lugar, de la capacidad de ambos miembros para mantenerse viables en los cultivos a corto-medio plazo, hecho que fue muy dependiente de la pareja cianobacteria-rizobacteria, y de los medios de cultivo seleccionados.

La evaluación de los resultados derivados de la aplicación *in vivo* de los consorcios pre-establecidos *in vitro*, puso de manifiesto que el efecto combinado de ambos miembros del consorcio podía resultar más exitoso que la aplicación individual de cada cepa (Artículo 4). Este fenómeno ya ha sido observado previamente por otros autores, los cuales describen notables beneficios derivados de la aplicación de consorcios a base de rizobacterias sobre las tasas de germinación, medidas de la longitud y diámetro del tallo, o el peso de la planta (Ibiene et al., 2012; Desai et al., 2020; Santoyo et al., 2021). Lo más destacable de los consorcios artificiales diseñados en este trabajo de Tesis, es que pueden combinar los efectos beneficiosos de las típicas rizobacterias heterótrofas con las bondades de un organismo fotosintético, en este caso, las cianobacterias.

Dado que no se han realizado bioensayos que nos permitan evaluar parámetros de crecimiento o productividad en la fase de planta adulta, no es posible conocer cuál habría sido el efecto de los consorcios aplicados. No obstante, a la vista de los resultados observados en plántula, se pudo intuir un efecto positivo sobre el desarrollo aéreo de la planta (diámetro y longitud del tallo, número de hojas), aunque fue muy dependiente de la combinación entre miembros del consorcio. Hay que tener en cuenta, por otra parte, que el factor dosis, o cultivo vegetal seleccionado, puede ser determinante a la hora de obtener un efecto u otro.

## **V.2. Efecto fitoprotector derivado de la aplicación de cianobacterias en estados tempranos del desarrollo vegetal**

Además de los beneficios generados en relación a la capacidad de las cianobacterias para promover el desarrollo vegetal, muchos son los trabajos en los que se describe el efecto fitoprotector de este grupo microbiano. Dicho efecto ha



sido demostrado frente a una gran variedad de patógenos de plantas, entre los que se incluyen bacterias, hongos y nemátodos, siendo el resultado de la producción de enzimas específicas o de otros compuestos de carácter biocida, como los ácidos benzoico y majusculónico (Prasanna et al., 2008; Gupta et al., 2013). El mecanismo de acción de estos compuestos antimicrobianos se basa en general en la alteración de la membrana citoplasmática o de las paredes celulares fúngicas y bacterianas, así como en la inhibición de la síntesis de proteínas, principalmente (Swain et al., 2017). Otras moléculas de tipo fitohormonas, activan los mecanismos de respuesta adquirida e inducida relacionados con la defensa de la planta (Natarajan et al., 2012; Singh, 2014). Así mismo, la propia capacidad de las cianobacterias de persistir y colonizar la rizosfera, se puede considerar un mecanismo indirecto de defensa que complementa a la liberación de enzimas hidrolíticas y de metabolitos antimicrobianos.

En atención a lo indicado anteriormente, son numerosas las investigaciones sobre control biológico, que avalan el efecto preventivo que ejercen las cianobacterias sobre el desarrollo de enfermedades vegetales. Siguiendo esta línea, y de acuerdo con los objetivos planteados, se abordó por un lado, el control del *damping-off* (Artículo 2), una de las enfermedades más extendidas en diversas especies de plantas (Kamoun et al., 2015), y que supone un grave problema a nivel de semillero. La enfermedad de *damping-off* es causada por una amplia variedad de hongos y oomicetos, entre los que destaca *Pythium ultimum* (PU). Los estudios revelan que el control biológico de esta enfermedad se ha realizado tradicionalmente mediante el uso de bacterias y hongos con capacidad supresiva (Schoebitz et al., 2013; Mahmood et al., 2016; O'Callaghan, 2016), mientras que la participación de las cianobacterias en este sentido, es aún bastante desconocida.

Se conocen diferentes métodos de aplicación preventiva de agentes de control biológico, entre los que cabe destacar la aplicación foliar mediante pulverización, la inoculación directa en el medio rizosférico, o formando parte de sustratos y enmiendas orgánica húmicas (Mahmood et al., 2016). Sin embargo, en el caso particular descrito en esta memoria de Tesis, se optó por una estrategia más novedosa denominada *biopriming*. El pretratamiento de las semillas mediante *biopriming*, consiste en sumergir las mismas en un extracto microbiano durante un tiempo determinado, con el fin de conseguir una imprimación duradera y eficaz a

corto plazo, justo en el momento de la emergencia de la radícula, así como en fases posteriores del desarrollo vegetal (Anitha et al., 2013).

Con el propósito de seleccionar los extractos de cianobacterias más apropiados para el control de *damping-off*, se tuvo en cuenta en primer lugar la ausencia de fitotoxicidad en bioensayos llevados a cabo con semillas de berro. Al igual que se describe en el apartado 5.1., se pudo verificar que la estimulación de la germinación y elongación de la radícula fue menor cuanto mayor era la concentración de los extractos de cianobacterias (Figuras 1a, b Artículo 2), mientras que, en general, concentraciones más bajas no mostraron fitotoxicidad. Dicho efecto se ha podido comprobar tras la aplicación de extractos de *Spirulina platensis* en semillas, observándose un efecto negativo a las concentraciones más elevadas de extracto (Dmytryk et al., 2014; Aghofack-Nguemezi et al., 2015; Godlewska et al., 2019).

Como segundo criterio importante para la selección de las cepas más efectivas frente a *P. ultimum*, se llevó a cabo un bioensayo en hoja cortada (detached-leaf bioassay). Dicho procedimiento es utilizado de forma rutinaria en patología vegetal como un método rápido y sencillo, útil para evaluar la capacidad antagonista de cultivos y extractos microbianos frente a hongos y oomicetos fitopatógenos (Pettitt et al., 2011; Cowley et al., 2012). Esta metodología ha demostrado ser muy útil para detectar agentes de control biológico *in vitro* (Saxena y Pandey, 2002). Se ha descrito en trabajos previos, que varias cepas de *Anabaena* y *Calothrix* ejercen actividad antagonista frente a especies de *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Prasanna et al., 2008; Manjunath et al., 2010). Entre los numerosos compuestos que producen las cianobacterias, los homólogos de las enzimas quitosanasas, endoglucanasas, así como del ácido benzoico, se han relacionado con la actividad frente a hongos fitopatógenos y oomicetos (Prasanna et al., 2010; Gupta et al., 2013; Natarajan et al., 2013). Según Attia et al. (2016), el control o inhibición del desarrollo de las enfermedades debidas a patógenos de plantas se debe a varios mecanismos. Por un lado, la supresión directa, a través de la secreción de aleloquímicos o metabolitos secundarios; por otro lado, la supresión indirecta, a través de la inducción de la resistencia vegetal por parte de algunas fitohormonas, o bien mediante la activación de la maquinaria enzimática de la planta en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico (actividad de  $\beta$ -(1,3)-endoglucanasa, quitinasa, catalasa, peroxidasa, polifenol oxidasa o fenilalanina amoníaco liasa)

(Gayathri et al., 2015). Esta bioactividad podría explicar, en parte, la inhibición del crecimiento de *P. ultimum* en los bioensayos sobre hoja cortada realizados en este trabajo (Figura 4, Artículo 2).

Los resultados obtenidos en el Artículo 2 presentado en esta Tesis, parecen corroborar la capacidad antagonista previamente descrita contra patógenos vasculares por parte de extractos de cianobacterias. El ejemplo más claro se muestra por parte de algunas cepas de *Nostoc* spp., capaces de inhibir a numerosos hongos y oomicetos productores de *damping-off*, como es el caso de *Fusarium oxysporum* (diversas formas especializadas), *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium alboatrum* y *Phytophthora cinnamomi*, gracias a la acción de extractos metanólicos microbianos (Biondi et al., 2004). Además de *Nostoc* spp., cianobacterias pertenecientes a los géneros *Anabaena* spp. y *Scytonema* spp., han mostrado actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani* según describen algunos autores (Kim y Kim, 2008; Yadav et al., 2018). Manjunath et al. (2010), por su parte, también describen la acción plaguicida de extractos filtrados de *Calothrix* spp., para el control del *damping-off* y de otras enfermedades de las plantas. Asimismo, Dukare et al. (2011) revelaron la utilidad de inocular el compost con la cianobacteria *Anabaena oscillarioides* para incrementar la resistencia frente a hongos fitopatógenos causantes de *damping off* en el cultivo de tomate. Al igual que en este trabajo de Tesis, algunos autores han revelado la eficacia de extractos filtrados *Spirulina platensis* y *Nostoc muscorum*, para inhibir *in vitro* el crecimiento micelial de varios hongos fitopatógenos. Esta actividad antifúngica se atribuyó a la presencia de compuestos fenólicos, enzimas proteolíticas y altos niveles de ácido indol-acético (IAA) (Tantawy, 2011; Prasanna et al., 2013).

El siguiente aspecto especialmente relevante tratado en el Artículo 2, está relacionado con la aplicación de extractos de cianobacterias en semillas de pepino mediante la técnica de *biopriming*, con el objeto de evaluar el efecto preventivo de dichos extractos frente a la enfermedad del *damping-off*. En el ámbito de la agrobiotecnología, se han descrito múltiples opciones en cuanto al uso de polisacáridos como el alginato de sodio, la carboximetilcelulosa o la goma xantana, entre otros (Angelopoulou et al., 2014; O'Callaghan, 2016). En este sentido, el alginato ha sido considerado una de las opciones más utilizadas en formulaciones

microbianas semisólidas, de forma que mejora la capacidad de los microorganismos para colonizar las raíces de las plantas sin reducir la viabilidad celular (Schoebitz et al., 2013). Bajo esta nueva perspectiva, con objeto de mejorar la fase de imprimado de las semillas, en este trabajo se optó por embeberlas en una matriz semisólida de alginato que contenía los extractos de cianobacterias.

A la vista de los resultados observados *in planta*, se obtuvo una eficacia de hasta el 35 % en la protección de las plántulas de pepino contra *P. ultimum* mediante el protocolo preventivo descrito como *biopriming* (Figuras 5 y 6, Artículo 2). El efecto positivo de dicho tratamiento durante las primeras etapas del desarrollo de la planta podría estar relacionado con una mejor absorción de nutrientes, con la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento, así como con otras sustancias “elicitoras” que activan los mecanismos de resistencia del vegetal. Algunos autores han descrito ampliamente los beneficios del *priming* de semillas antes de la siembra. Dichos beneficios se traducen en un notable aumento de la productividad de los cultivos, ya que mejora la calidad de las semillas y su capacidad de germinación (Singh et al., 2015). En el presente estudio, las semillas de pepino fueron tratadas con extractos de cianobacterias, lo que podría servir como un aporte extra de compuestos naturales bioquímicamente activos, y especialmente relevantes en la etapa de germinación y elongación radicular.

Hay que mencionar además, que los extractos de cianobacterias podrían actuar no sólo como agentes antifúngicos de forma directa, sino también mejorando o estimulando la capacidad antagónica de otros agentes de control biológico en el entorno rizosférico (hongos, bacterias o levaduras) (El-Mougy y Abdel-Kader, 2013). En este caso, la supresión del *damping off* mediante la acción de agentes de control biológico se produciría como consecuencia de las interacciones entre el patógeno, la planta y la comunidad microbiana beneficiosa que se encuentra en la rizosfera (Singh y Sachan, 2013).

En paralelo al control preventivo de *P. ultimum* mediante *biopriming*, se abordó el control de la enfermedad del cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en tomate (Artículo 3), mediante la aplicación foliar y vascular de extractos de cianobacterias previamente seleccionados *in vitro*. Numerosos compuestos bioactivos producidos por

cianobacterias y microalgas como polifenoles, tocoferoles, carbohidratos, proteínas, aceites y pigmentos con propiedades antimicrobianas, pueden ser útiles en el control de enfermedades transmitidas por el suelo (Michalak y Chojnacka, 2015). Algunos ejemplos de sustancias antimicrobianas cloradas se han descrito en *Scytonema* spp., o la majusculamida en el caso concreto de *Anabaena laxa*, o el ácido benzoico en el caso de *Calothrix* spp. (Natarajan et al., 2012; Singh, 2014). De igual manera, este tipo de compuestos bioactivos han sido descritos en algunas especies de microalgas como *Coccomyxa onubensis* (Navarro et al., 2017), *Tetraselmis suecica* (Austin et al., 1992), y *Chlorella minutissima* (Katharios et al., 2005). Sin embargo, no existen antecedentes relevantes que destaquen el papel antagonista de cianobacterias y microalgas contra el cancro bacteriano causado por Cmm en tomate. En el trabajo descrito en esta Tesis Doctoral (Artículo 3), se abordó en primer lugar la selección de extractos con efecto biopesticida *in vitro* contra la bacteria Cmm (Figura 1.a, Artículo 3), destacando el papel de *Leptolyngbya-1267* (cianobacteria) y *Scenedesmus-677* (microalga), quienes mostraron un notable efecto inhibitor frente a Cmm (17 y 20%, respectivamente). Por el contrario, se detectó un efecto antagónico más discreto por parte del resto de extractos, siendo casi insignificante en el caso de la *Nostoc-150* (menos del 3%). Por esta razón, *Leptolyngbya-1267* y *Scenedesmus-677* se posicionaron como potentes candidatos para ser evaluados posteriormente en bioensayos *in planta* contra la enfermedad causada por Cmm. A pesar de los resultados satisfactorios obtenidos en esta primera fase del trabajo, fue necesario proceder con cautela, dada la falta de estudios previos sobre el control del cancro bacteriano mediante la aplicación de este grupo de microorganismos.

En cuanto a los bioensayos realizados *in planta*, los métodos seleccionados para la aplicación de los extractos como medida de protección contra la bacteria fitopatógena Cmm, fueron aplicación foliar por pulverización y aplicación radicular. En base a los datos recogidos, el estado sanitario de las plantas pretratadas vía radicular con *Scenedesmus-677* y, posteriormente, infectadas con Cmm (Figura 4a, Artículo 3) fue relativamente bueno. Por otro lado, el tratamiento con *Leptolyngbya-1267* vía foliar, consiguió una débil mitigación de los síntomas más severos, mostrando un moderado amarilleo de la planta.

La aplicación de ambos extractos *in vivo* sirvió para reducir el Índice de Infektividad en los bloques de plantas previamente tratados y posteriormente infectados con Cmm. El tratamiento más efectivo correspondió a *Scenedesmus-677* por vía radicular, mostrando un Índice de Infektividad en torno al 10% (aproximadamente un 90% menor que en el bloque de plantas control infectadas por Cmm). El siguiente extracto más importante por su efecto biopesticida fue el de la cepa *Leptolyngbya-1267* aplicado por vía foliar, mostrando una disminución de la infectividad en torno al 45%, respecto a lo observado en los controles positivos (Figura 4b, Artículo 3).

A la vista de los resultados observados, la selección de extractos *in vitro* fue exitosa ya que el efecto biopesticida detectado frente a Cmm se pudo reproducir, en mayor o menor grado, en plántulas de tomate infectadas con la bacteria patógena. Adicionalmente, en términos generales, ambos tratamientos mejoraron el crecimiento vegetativo (aéreo) de las plantas, así como el desarrollo de las raíces. En concreto, los datos relativos a la longitud y el diámetro del tallo, peso fresco y seco fueron significativamente superiores a los detectados en las plantas control cuando se realizó el tratamiento foliar con ambos extractos (Figura 5, Artículo 3). Algunos autores relacionan directamente el efecto bioestimulante anteriormente descrito con la capacidad bioprotectora de los extractos cianobacterias, ya que la aplicación con este tipo de bioproductos podría provocar un aumento en la absorción de nutrientes, así como la acumulación de moléculas relacionadas con la defensa vegetal frente a estreses bióticos (Prasanna et al., 2013).

Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que algunos compuestos presentes en los extractos derivados de *Leptolyngbya-1267* y *Scenedesmus-677* podrían considerarse una alternativa prometedora y sostenible para el tratamiento de plántulas contra la enfermedad del cancro bacteriano (Cmm). No hay que olvidar, sin embargo, que el éxito de cualquier agente de control biológico se debe a la influencia de numerosos factores. Por un lado, hay que considerar las múltiples interacciones entre el patógeno, la planta y la comunidad microbiana rizosférica (Weller et al., 2002; Moustaine et al., 2019). Otros factores a tener en cuenta son por un lado, cuán persistentes son los efectos beneficiosos de los extractos tras llevar a cabo la aplicación foliar y radicular, o cual es el número de aplicaciones que podría considerarse más efectivo. El impacto del clima, las propiedades

químicas de los suelos, o los factores morfológicos de la planta, como el grosor de la cutícula y la permeabilidad de las hojas, pueden afectar también a la eficacia de los tratamientos (Fernández y Eichert, 2009; Ros et al., 2020).

En definitiva, gracias a la realización de este trabajo de Tesis, se ha podido confirmar que determinados extractos de cianobacterias pueden ejercer un efecto promotor del crecimiento vegetal, así como también suprimir o mitigar, en mayor o menor grado, el daño provocado por hongos y bacterias patógenas de plantas. En términos generales, los efectos observados pueden deberse a la síntesis de fitohormonas, o al aumento de la disponibilidad y absorción de nutrientes, en el caso de la fitopromoción, así como a la inhibición directa del patógeno, o a la inducción de los mecanismos de defensa vegetal, en el caso de la fitoprotección. Los resultados obtenidos sugieren, además, que las vías de aplicación pueden ser muy diversas, en función del efecto que se quiera conseguir (promoción o protección), así como en función del estado fenológico en el que se encuentre el cultivo diana (semilla, radícula, plántula o planta adulta).

Por tanto, los resultados obtenidos confirman que la utilización de cultivos y extractos procedentes de cianobacterias podría ser especialmente relevante en el sector de la agrobiotecnología. Dada su enorme versatilidad a la hora de producir una amplia gama de metabolitos implicados en la protección y promoción del crecimiento vegetal, las cianobacterias podrían ser utilizadas de forma dirigida y controlada, para el tratamiento de plagas y enfermedades de los cultivos, así como para optimizar el desarrollo vegetativo y radicular de las plantas, lo que estaría en perfecta sintonía con las prácticas agrícolas que definen el concepto actual de agricultura sostenible.

## Referencias

- Aghofack-Nguemezi, J., Schinzoumka, P.A., Tatchago, V. (2015). Effects of extracts or powder of *Jatropha curcas* and *Spirulina platensis* on the growth and development of tomato plant. *J. Appl. Biosci.* 90, 8413–8420.
- Ahmed, E., Holmström, S.J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications, *Microb. Biotechnol.* 7, 196–208.
- Angelopoulou, D.J., Naska, E.J., Paplomatas, E.J., Tjamos, S.E. (2014). Biological control agents (BCAs) of *verticillium* wilt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. *Plant Pathol.* 63 (5), 1062-1069.

- Anitha, D., Vijaya, T., Reddy, N.V., Venkateswarlu, N., Pragathi, D., Mouli, K.C. (2013). Microbial endophytes and their potential for improved bioremediation and biotransformation: a review. *Indo Am. J. Pharm. Res.* 3, 6408-17.
- Attia, M.S., El-Monem, M.A., Sharaf, A., Zayed, A.S. (2016). Protective action of some bio-pesticides against early blight disease caused by *Alternaria Solani* in tomato plant. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 4 (11), 2348-7968.
- Austin, B.; Baudet, E.; Stobie, M. (1992). Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J. Fish Dis.* 15, 55-61.
- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodolfi, L., Smith, G.D., Tredici, M.R. (2004). Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. Environ. Biotechnol.* 70, 3313–3320.
- Chaturvedi, R., Shah, J. (2007). Salicylic acid in plant disease resistance. In: Hayat, S., Ahmad, A. (Eds.), *Salicylic Acid - A plant hormone*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 335-370.
- Chittapun, S. Limbipichai, S., Amnuaysin, N., Boonkerd, R., M. Charoensook, M. (2017). Effects of using cyanobacteria and fertilizer on growth and yield of rice, Pathum Thani I: a pot experiment. *J. Appl. Phycol.* 10.1007/s10811-017-1138-y.
- Colla, G., Rouphael, Y. (2015). Biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 39-48.
- Cowley, R.B., Lockett, D.J., Harper, J.D.I., Ash, G.J. (2012). Development of a reliable and rapid detached leaf assay to detect resistance to the fungal disease phomopsis leaf blight, caused by *Diaporthe toxica*, in *Lupinus albus*. *Can. J. Plant Pathol.* 34 (3), 401-409.
- Desai, S., Bagyaraj, D.J., Ashwin, R. (2020). Inoculation with microbial consortium promotes growth of tomato and capsicum seedlings raised in pro trays. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 90 (1), 21-28.
- Dmytryk, A., Rój, E., Wilk, R., Chojnacka, K. (2014). Innovative bioformulations for seed treatment. Preliminary assessment of functional properties in the initial plant growth phase. *Przem. Chem.* 93(6), 959–963.
- Dukare, A.S., Prasanna, R., Chandra Dubey, S., Nain, L., Chaudhary, V., Singh, R., Saxena, A.K. (2011). Evaluating novel microbe amended composts as biocontrol agents in tomato. *Crop Prot.* 30 (4), 436–442.
- Elarroussi, H., Elmernissia, N., Benhimaa, R., El Kadmiria, I. M., Bendaou, N., Smouni, A., Wahbya, I. (2016). Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. *J. Algal Biomass Utln.* 7 (4), 55-63.
- El-Mougy, N.S., Abdel-Kader, M.M. (2013). Effect of commercial cyanobacteria products on the growth and antagonistic ability of some bioagents under laboratory conditions. *J. Pathol.* 838329, 11.
- Fernández, V., Eichert, T. (2009). Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 36-68.



- Fuller, W.H., Roger, R.N. (1952). Utilisation of the phosphorus of algal cells as measured by the Neubauer technique, *Soil Sci.* 74, 417–429.
- Gayathri, M., Kumar, P.S., Prabha, A.M.L., Muralitharan, G. (2015). *In vitro* regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothece* sp. MBDU 515. *Algal Res.* 7, 100–105.
- Godlewska, K., Michalak, I., Pacyga, P., Basladynska, S., Chojnacka, K. (2019). Potential applications of Cyanobacteria: *Spirulina platensis* filtrates and homogenates in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35 (80).
- Goldman, S., Lammers, P., Berman, M., Sanders-Loehr, J. (1983). Siderophore-mediated iron uptake in different strains of *Anabaena* sp. *J. Bacteriol.* 156 (1983) 1144–1150.
- Gupta, V., Ratha, S.K., Sood, A., Chaudhary, V., Prasanna, R. (2013). New insight into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. *Algal Res.* 2 (2), 79–97.
- Hegazi, A.Z., Mostafa, S.S.M., Ahmed, H.M.I. (2010). Influence of different cyanobacterial application methods on growth and seed production of common bean under various levels of mineral nitrogen fertilization. *Nat. Sci.* 8 (11), 183–194.
- Hernández-Herrera, R.M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruíz-López, M.A., Norrie, J., Hernández-Carmona, G. (2013). Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Appl. Phycol.* 26 (1), 619–628.
- Hussain, A., Hasnain, S. (2011). Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 85–92.
- Hwang, I., Sheen, J., Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 353–380.
- Ibiene, A.A., Agogbua, J.U., Okonko, I.O., Nwachi, G.N. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizer: Effect on growth of *Lycopersicon esculentus*. *J. Am. Sci.* 8 (2), 318–324.
- Igari, K., Endo, S., Hibara, K., Aida, M., Sakakibara, H., Kawasaki, T., Tasaka, M. (2008). Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 55, 14–27.
- Kamoun, S., Furzer, .O, Jones, J.D., Judelson, H.S., Ali, G.S., Dalio, R.J., Roy, S.G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X.R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B.M., Grünwald, N.J., Mukhtar, M.S., Tomé, D.F., Tör, M., Van Den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W.E., Lindqvist-Kreuzer, H., Meijer, H.J., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P.R., Govers, F. (2015). The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 16 (4), 413–34.

- Katharios, P.; Papadakis, I.E.; Prapas, A.; Dermon, A.C.; Ampatzis, K.; Divanach, P. (2005). Mortality control of viral encephalopathy and retinopathy in 0+ grouper *Epinephelus marginatus* after prolonged bath in dense *Chlorella minutissima* culture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 25, 28-31.
- Kim, J., Kim, J.D. (2008). Inhibitory effect of algal extracts on mycelia growth of the tomato-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycobiol.* 36, 242–248.
- Kumar, G., Sahoo, D. (2011). Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. *J. Appl. Phycol.* 23 (2), 251-255.
- Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex, R., Nexticapán-Garcéz, Á., Vergara-Yoisura, S., Gutiérrez-Rendón, M. (2010). Effect of salicylic acid on the growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 16(3), 183-187.
- Li, R., Tao, R., Ling, N., Chu, G. (2017). Chemical, organic and bio-fertilizer management practices effect on soil physicochemical property and antagonistic bacteria abundance of a cotton field: implications for soil biological quality. *Soil Tillage Res.* 167, 30–38.
- Mahmood, A., Turgay, O., Farooq, M., Hayat, R. (2016). Seed *biopriming* with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw112.
- Manjunath, M., Prasanna, R., Nain, L., Dureja, P., Singh, R., Kumar, A., Jaggi, S., Kaushik, B.D. (2010). Biocontrol potential of cyanobacterial metabolites against damping off disease caused by *Pythium aphanidermatum* in solanaceous vegetables. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 43 (7), 666–677.
- Mazur, H., Konop, A., Synak, R. (2001). Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 13, 35-42.
- McKnight, D.M., Morel, F.M. (1980). Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae, *Limnol. Oceanogr.* 25, 62–71.
- Michalak, I.; Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* 15 (2), 160-176.
- Moustaine, M.; El Kahkahi, R.; Benbouazza, A.; Benkirane, R.; El Hassan, A. (2019). Potential of biological treatments for control of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* spp *michiganensis* in Morocco. *Eurasia J. Bio. Sci.* 13, 1481-1488.
- Natarajan, C., Gupta, V., Kumar, K., Prasanna, R. (2013). Molecular characterization of a fungicidal endoglucanase from the cyanobacterium *Calothrix elenkinii*. *Biochem. Genet.* 51 (9), 766–779.
- Natarajan, C., Prasanna, R., Gupta, V., Dureja, P., Nain, L. (2012). Characterization of the fungicidal activity of *Calothrix elenkinii* using chemical methods and microscopy. *Appl. Biochem. Microbiol.* 48 (1), 51–57.
- Navarro, F.; Forján, E.; Vázquez, M.; Toimil, A.; Montero, Z.; Ruíz-Domínguez, M.d.C.; Garbayo, I.; Castaño, M.Á.; Vílchez, C.; Vega, J.M. (2017).

- Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycol. Res.* 65 (1), 38-43.
- O'Callaghan, M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (13), 5729–5746.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., Van Staden, J., Szigeti, J., Németh, L. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary. *J Appl. Phycol.* 16 (4), 309-314.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Takács, G., Pöthe, P., Illés, A., Bojtor, C., Széles, A., Tóth, B., van Staden, J., Nagy, J. (2021). Plant biostimulating effects of the cyanobacterium *Nostoc piscinale* on maize (*Zea mays L.*) in field experiments. *S. Afr. J. Bot.* 140,153–160.
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., Steppe, T.F. (2000). Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ. Microbiol.* 2, 11-26.
- Parveen, S., Pandey, V.D. (2011). Alkaline phosphatase activity in freshwater cyanobacteria, *Plant Arch.* 11, 827–830.
- Pettitt, T.R., Wainwright, M.F., Wakeham, A.J., White, J.G. (2011). A simple detached leaf assay provides rapid and inexpensive determination of pathogenicity of *Pythium* isolates to 'all year round' (AYR) chrysanthemum roots. *Plant Pathol.* 60 (5), 946–56.
- Prasanna, R., Chaudhary, V., Gupta, V., Babu, S., Kumar, A., Singh, R., Singh, Y.S., Nain, L. (2013). Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 136, 337-353.
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., Nain, L. (2010). Modulation of IAA production in cyanobacteria by tryptophan and light. *Polish J. Microbiol.* 59 (2), 99–105.
- Prasanna, R., Nain, L., Tripathi, R., Gupta, V., Chaudhary, V., Middha, S., Joshi, M., Ancha, R., Kaushik, B.D. (2008). Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria possible role of hydrolytic enzymes. *J. Basic Microbiol.* 48 (3), 186–194.
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P., Bux, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol. Adv.* 36, 1255-1273.
- Romanenko, E.A., Kosakovskaya, I.V., Romanenko, P.A. (2015). Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt I. auxins, abscisic acid, ethylene. *Int. J. Algae* 17 (3), 275-289.
- Ros, M., Almagro, M., Fernández, J.A., Egea-Gilabert, C., Faz, A., Pascual, J.A. (2020). Approaches for the discrimination of suppressive soils for *Pythium irregulare* disease. *Appl. Soil Ecol.* 14, 103439.

- Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F.I., Santos-Villalobos, S.D.L., Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R. (2021). Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agron.* 11(2), 219.
- Saxena, S., Pandey, A.K. (2002). Evaluation of an indigenous isolate of *Alternaria alternata* (LC# 508) for use as a mycoherbicide for *Lantana camara* L. *Crop Prot.* 2 (1), 71-73.
- Schoebitz, M., López, M.D., Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 751-765.
- Singh, J.S. (2014). Cyanobacteria: a vital bio-agent in eco-restoration of degraded Lands and sustainable agriculture. *Climate Change Environ. Sustain.* 2, 133–137.
- Singh, J.S., Pandey, V.C., Singh, D.P. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development, *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 339–353.
- Singh, R.P., Prasad, P.V.V., Reddy, K.R. (2015). Climate change: implications for stakeholders in genetic resources and seed sector. *Adv. Agron.* 129, 117–180.
- Singh, R., Sachan, N.S. (2013). Review on biological control of soil borne fungi in vegetable crops. *Hort. Flora Res. Spectr.* 2(1), 72–76.
- Stirk, W.A., Ördög, V., Van, S.J., Jäger, K. (2002). Cytokinins and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.* 14, 215-221.
- Swain, S.S., Paidasetty, S.K., Padhy, R.N. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomed. Pharmacother.* 90, 760-776.
- Tang, E.P.Y., Vincent, W.F., Proulx, D., Lessard, P., de la Noüe, J. (1997). Polar cyanobacteria versus green algae for tertiary waste-water treatment in cool climates. *J. Appl. Phycol.* 9, 371–381.
- Tantawy, S.T.A. (2011). Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. *J. Food Agric. Environ.* 9 (1), 663-666.
- Weller, D.M.; Raaijmakers, J.M.; Gardener, B.B.M.; Thomashow, L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309–348.
- Yadav, S., Rai, R., Shrivastava, A.K., Singh, P.K., Sen, S., Chatterjee, A., Rai, S., Singh, S., Rai, L.C. (2018). Cyanobacterial biodiversity and biotechnology: a promising approach for crop improvement. In: Prasad, R., Gill, S.S., Tuteja, N. (Eds.), *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*, Elsevier, pp. 195–219.
- Zucconi, F., Pera, A.; Forte, M.; De Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle.* 22 (2), 54-57.

**CONCLUSIONES**

## VI. Conclusiones

1- La aplicación de extractos sonicados de cianobacterias mediante el protocolo de enfrentamiento dual *in vitro*, junto con el cálculo del índice de germinación en semillas de berro, permitió la selección de extractos no fitotóxicos y potencialmente efectivos frente al crecimiento de agentes fitopatógenos de especial relevancia en agricultura intensiva.

2- El efecto fitotóxico o fitoestimulante derivado de la aplicación de extractos sonicados de cianobacterias, fue altamente dependiente de la concentración de los extractos. En general, se detectó una mayor fitotoxicidad en semillas a concentraciones de extracto cercanas a 2 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que aquellos preparados a concentraciones en torno 0,5 mg mL<sup>-1</sup> resultaron más beneficiosas en términos de germinación y elongación radicular.

3- La aplicación de extractos sonicados de cianobacterias mediante *biopriming* de semillas, puede considerarse una estrategia adecuada para promover el desarrollo vegetal en fases de pre y postemergencia, así como para prevenir el *damping-off* causado por el oomiceto *Pythium ultimum*. En este sentido, la cepa SAB-M465 (*Tolypothrix* sp.) se reveló como un excelente agente de control para la mitigación del *damping-off* causado por *P. ultimum* en plántulas de pepino. En paralelo, esta misma cepa mostró un ligero efecto estimulante sobre el desarrollo de las raíces, lo que podría estar relacionado con el fortalecimiento de la planta para contrarrestar los daños provocados por dicho agente fitopatógeno.

4- El control de los daños provocados por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plántulas de tomate mediante el uso de extractos sonicados dependió en gran medida del factor cepa, así como del método de aplicación *in vivo*. Así, el extracto procedente de la cepa SAB-M677 (*Scenedesmus* sp.) fue capaz de mitigar los daños producidos por la bacteria fitopatógena cuando fue aplicado vía vascular, mientras que la cepa SAB-B1267 (*Leptolyngbya* sp.) dio lugar a un efecto fitoprotector más discreto. En cualquier caso, ambos extractos mostraron un

marcado carácter fitoestimulante cuando se aplicaron tanto vía foliar como radicular, lo que podría derivar en una mejor respuesta defensiva de la planta.

5- El éxito del establecimiento de consorcios microbianos entre rizobacterias heterótrofas y cianobacterias dependió, en gran medida, del medio de cultivo utilizado, del tiempo de incubación y de los componentes microbianos del consorcio. Además, el éxito de dichos consorcios en términos de aumento poblacional *in vitro* no implicó necesariamente un efecto promotor tras ser aplicado en planta. No obstante, a pesar de la complejidad del diseño, los resultados derivados de la aplicación de los consorcios establecidos entre la cianobacteria SAB-B0866 (*Dolichospermum* sp.) y las rizobacterias heterótrofas *Pantoea cyripedii*-BIO175 y *Pseudomonas putida*-BIO175, fueron satisfactorios en términos de fitoestimulación.



Universidad de  
Almería