

Evaluación del potencial enzimático de microorganismos endófitos aislados de *Vachellia farnesiana* (Huizache)

Briseida Margarita Lazcano-Lara^a, Gustavo Saucedo-Martínez^a, Julio Silva-Mendoza^{a*}

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Universidad s/n, Ciudad universitaria, C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, México.

*e-mail de autor responsable: jsilvamd@uanl.edu.mx

Briseida Margarita Lazcano-Lara: <https://orcid.org/0009-0006-2455-2741>

Gustavo Saucedo-Martínez: <https://orcid.org/0009-0004-3009-5765>

Julio Silva-Mendoza: <https://orcid.org/0000-0001-8236-0680>

Recibido 30 de septiembre 2025, Aceptado 10 octubre 2025

Resumen

La simbiosis planta-microorganismo constituye una fuente importante de compuestos bioactivos con aplicaciones biotecnológicas. En este estudio se evaluó el potencial enzimático de bacterias y hongos endófitos aislados de *Vachellia farnesiana* (huizache), una especie nativa de regiones semiáridas de México. Se analizaron nueve bacterias y nueve hongos en medios selectivos para determinar la producción de amilasas, celulasas, lipasas, proteasas, quitinasas y la capacidad de fijación de nitrógeno. En bacterias, se observó crecimiento en los medios de proteasas (aislados 4 y 9), amilasas (aislado 5) y lipasas (aislados 5, 6, 7, 8 y 9). En hongos, el crecimiento se presentó en lipasas (aislados 3, 4 y 9), amilasas (aislados 1, 3, 4 y 9) y celulasas (aislados 2, 4, 7 y 8). Las bacterias mostraron crecimiento en Caldo libre de nitrógeno, sugiriendo posible fijación intracelular de nitrógeno. La ausencia de halos de hidrólisis en la mayoría de los medios indica que las enzimas podrían ser intracelulares o poco secretadas bajo las condiciones probadas. Los resultados evidencian la presencia de microorganismos endófitos con actividades enzimáticas diversas y potencial biotecnológico para su aprovechamiento en las industrias agroalimentaria, farmacéutica y ambiental.

Palabras clave: microorganismos endófitos; *Vachellia farnesiana*; enzimas hidrolíticas; bacterias; hongos.

Abstract

The plant-microorganism symbiosis represents a significant source of bioactive compounds with biotechnological applications. This study evaluated the enzymatic potential of bacterial and fungal endophytes isolated from *Vachellia farnesiana* (huizache), a native species from semiarid regions of Mexico. Nine bacterial and nine fungal isolates were analyzed in selective media to determine the production of amylases, cellulases, lipases, proteases, chitinases, and nitrogen fixation capacity. Bacterial growth was observed in protease medium (isolates 4 and 9), amylase (isolate 5), and lipase media (isolates 5, 6, 7, 8, and 9). Fungal growth occurred in lipase (isolates 3, 4, and 9), amylase (isolates 1, 3, 4, and 9), and cellulase media (isolates 2, 4, 7, and 8). Bacteria showed growth in nitrogen-free broth, suggesting a potential nitrogen fixation capability. The absence of hydrolysis halos in most media indicates that enzymes may be mainly intracellular or weakly secreted under the tested conditions. These results reveal the presence of endophytic microorganisms with diverse enzymatic activities and biotechnological potential for use in agri-food, pharmaceutical, and environmental industries.

Keywords: endophytic microorganisms; *Vachellia farnesiana*; hydrolytic enzymes; bacteria; fungi.

1. Introducción

Los microorganismos endófitos, tanto bacterias como hongos, son aquellos que habitan los tejidos internos de las plantas sin causar daño visible al hospedero [1]. Estas asociaciones simbióticas confieren beneficios recíprocos: los microorganismos obtienen compuestos orgánicos, agua y protección frente a condiciones externas, mientras que las plantas reciben ventajas fisiológicas como una mayor resistencia al estrés biótico y abiótico, incremento en la absorción de nutrientes y producción de metabolitos bioactivos [2-5].

En años recientes, los endófitos han adquirido relevancia en biotecnología por su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios y enzimas extracelulares de interés industrial. Entre ellas destacan las enzimas hidrolíticas como amilasas, celulasas, quitinasas, lipasas y proteasas, capaces de degradar polisacáridos, proteínas y lípidos complejos. Estas enzimas tienen aplicaciones amplias en la industria farmacéutica, alimentaria, agrícola y ambiental, participando en procesos como la biorremediación, la obtención de biocombustibles y la producción de aditivos industriales [4, 6-8]. En particular, los hongos endófitos constituyen una fuente promisoriosa de enzimas hidrolíticas debido a su naturaleza filamentosa, su elevada secreción extracelular y su capacidad de penetrar

matrices vegetales [9, 10]. Por su parte, las bacterias endófitas presentan una alta adaptabilidad metabólica y contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno, la promoción del crecimiento vegetal y el reciclaje de nutrientes en los ecosistemas [11–13].

El cribado cualitativo en placas, mediante técnicas como tinciones con Lugol, rojo Congo o azul de bromotimol, representa un método rápido para la detección preliminar de actividad enzimática, aunque su sensibilidad puede verse limitada en cepas con baja secreción o enzimas intracelulares [14–16]. Asimismo, medios selectivos como los caldos libres de nitrógeno (NFB) permiten la evaluación preliminar de la fijación de nitrógeno en bacterias endófitas, aunque se requiere la confirmación mediante métodos complementarios como el ensayo de reducción de acetileno o la cuantificación de ^{15}N (isótopo estable del nitrógeno) [17].

En este contexto, aunque diversos estudios han documentado la presencia de microorganismos endófitos con actividad enzimática en distintas especies vegetales, la información sobre el potencial enzimático comparativo de bacterias y hongos endófitos asociados a *Vachellia farnesiana* es aún limitada [18, 19]. Considerando la adaptación de esta leguminosa a ambientes semiáridos y su capacidad para albergar comunidades microbianas funcionalmente diversas, el análisis de sus endófitos representa una oportunidad para identificar microorganismos con capacidades metabólicas de interés biotecnológico. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar cualitativamente el potencial enzimático de bacterias y hongos endófitos aislados de hojas sanas de *Vachellia farnesiana* mediante su crecimiento en medios selectivos para enzimas hidrolíticas, así como comparar los patrones de actividad entre ambos grupos microbianos, con el fin de identificar cepas promisorias que puedan ser consideradas en futuros estudios cuantitativos, de caracterización molecular y de aplicación en procesos agrícolas, industriales y ambientales.

2. Metodología

2.1 Reactivos y materiales

Los reactivos empleados fueron grado analítico y adquiridos a través de Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ). Los medios de cultivo deshidratados fueron marca BD Bioxon y los carbohidratos utilizados como fuentes de carbono fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos y soluciones se prepararon siguiendo las especificaciones del fabricante y protocolos estandarizados reportados en la literatura.

2.2. Evaluación del potencial enzimático

Los nueve aislados bacterianos y nueve aislados fúngicos previamente obtenidos fueron evaluados mediante ensayos cualitativos en placa para detectar la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (tres repeticiones

independientes) para cada aislado.

Los medios diferenciales para la evaluación de la actividad enzimática contenían 1% (p/v) del sustrato correspondiente, agar bacteriológico al 1.5% y la siguiente solución mineral (g/L): KH_2PO_4 (1.4), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3) y CaCl_2 (0.3). Tras la esterilización, los medios se vertieron en cajas Petri estériles y se inocularon por estría en tercios de placa.

Para la evaluación presuntiva de fijación biológica de nitrógeno se empleó medio semisólido libre de nitrógeno con azul de bromotimol (NFB) con agar al 0.7%, preparado en tubos estériles. La inoculación se realizó con cultivos frescos (18–24 h de crecimiento). Las placas y tubos se incubaron a 28–30 °C durante 3–7 días, dependiendo del microorganismo y del ensayo.

2.3 Ensayos específicos y criterios de evaluación

La detección de actividad enzimática se realizó mediante ensayos diferenciales en placa, descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Ensayos diferenciales empleados para la evaluación de enzimas hidrolíticas en microorganismos endófitos aislados de *Vachellia farnesiana*.

Ensayo	Sustrato (1% p/v)	Indicador / revelador	Criterio
Quitinasas	Quitina coloidal [20]	Rojo Congo	Halo claro tras tinción
Celulasas	CMC	Rojo Congo	Halo claro tras tinción
Amilasas	Almidón soluble	Lugol	Zona clara tras aplicación
Lipasas	Aceite vegetal	Rojo fenol	Cambio de color rojo a amarillo
Proteasas	Caseína	Rojo Congo	Halo claro tras tinción
Fijación de nitrógeno	Medio NFB	Observación directa	Crecimiento en medio sin nitrógeno

Abreviaturas: CMC = carboximetilcelulosa; NFB: Libre de nitrógeno con azul de bromotimol

Tras la incubación, se aplicaron los reactivos reveladores correspondientes. La presencia de un halo claro alrededor de la colonia fue considerada evidencia de actividad enzimática extracelular.

2.4 Clasificación semicuantitativa

La actividad enzimática se evaluó de manera semicuantitativa considerando el crecimiento y la intensidad del halo de hidrólisis. La clasificación se

estableció de la siguiente manera:

- (-) = sin crecimiento
- (+) = crecimiento débil o halo apenas visible (< 2 mm)
- (++) = halo moderado (2–5 mm)
- (+++) = halo amplio (5–10 mm)
- (++++) = halo muy amplio (> 10 mm)

Cuando se observó crecimiento sin formación evidente de halo, se interpretó como posible producción de enzimas intracelulares o secreción limitada bajo las condiciones experimentales evaluadas. El crecimiento en medio NFB se consideró como evidencia presuntiva de capacidad fijadora de nitrógeno, reconociendo que esta prueba requiere confirmación mediante métodos moleculares o ensayos cuantitativos complementarios.

3. Resultados y discusión

3.1. Actividad enzimática en bacterias endófitas

El análisis cualitativo de las nueve bacterias endófitas aisladas de *Vachellia farnesiana* mostró diferencias claras en su capacidad de crecimiento y expresión enzimática en los distintos medios selectivos evaluados (Tabla 2). No se observó crecimiento en los medios diseñados para la detección de quitinasas y celulasas, lo que sugiere la ausencia de estas actividades bajo las condiciones experimentales empleadas o bien una expresión limitada de enzimas extracelulares.

Tabla 2. Actividad enzimática cualitativa en bacterias endófitas aisladas de *Vachellia farnesiana*.

Bac.	QTN	CLL	AML	LPS	PRS	NFB
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)
5	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)
6	(-)	(-)	(-)	(+)	(++)	(-)
7	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
8	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)	(-)

Abreviaturas: QTN = Quitinasas; CLL = Celulasas; AML = Amilasas; LPS = Lipasas; PRS = Proteasas; NFB = Medio sin fuente nitrogenada; Bac. = Bacteria.

Símbolos: (-) = sin crecimiento; (+) = débil; (++) = moderado; (+++) = alto.

En el medio para amilasas, únicamente el aislado 5 presentó un crecimiento débil, sin la formación de un halo de hidrólisis evidente (Figura 1a). En contraste, el medio para lipasas permitió detectar crecimiento en cinco de los nueve aislados, destacando los aislados 8 y 9 por presentar una respuesta más intensa, lo que indica una mayor capacidad para la degradación de lípidos (Figura 1b). Este patrón sugiere que la actividad lipolítica podría ser una

característica común entre las bacterias endófitas asociadas a *V. farnesiana*, posiblemente relacionada con el aprovechamiento de compuestos lipídicos presentes en los tejidos vegetales [4].

En el medio de proteasas se observó crecimiento inicial en varios aislados; sin embargo, tras la aplicación del colorante rojo Congo, únicamente los aislados 4 y 9 presentaron halos de hidrólisis bien definidos y una coloración intensa, lo que indica una actividad proteolítica extracelular marcada (Figuras 1c y 1d). La ausencia de halos en el resto de los aislados podría atribuirse a una secreción limitada de enzimas o a una localización intracelular, fenómeno previamente reportado en bacterias endófitas (como *Enterobacter* y *Pseudomonas*) bajo condiciones estándar de cultivo [13].

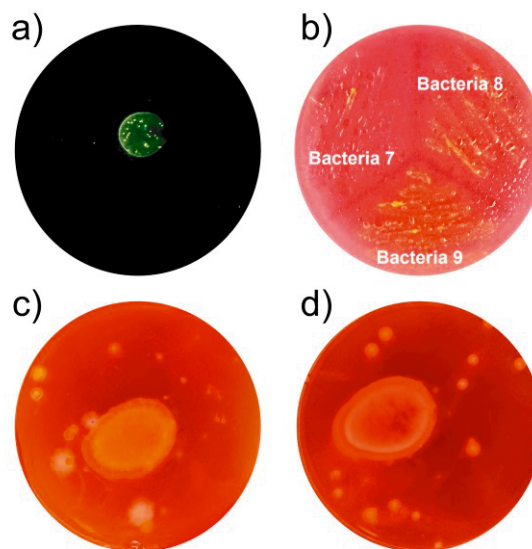


Figura 1. Actividad enzimática cualitativa en bacterias endófitas aisladas de *Vachellia farnesiana*. (a) Crecimiento en medio con almidón para la detección de amilasas; (b) crecimiento y cambio de color en medio para lipasas; (c–d) halos de hidrólisis en medio con caseína para la detección de proteasas.

Finalmente, en el medio semisólido libre de nitrógeno (NFB), el aislado 5 mostró un crecimiento débil sin el cambio de color característico del indicador de pH (Figura 2). Este comportamiento sugiere una posible capacidad de fijación intracelular de nitrógeno, aunque se trata de una prueba presuntiva que requiere confirmación mediante métodos complementarios, como la detección de genes funcionales o ensayos cuantitativos [21].

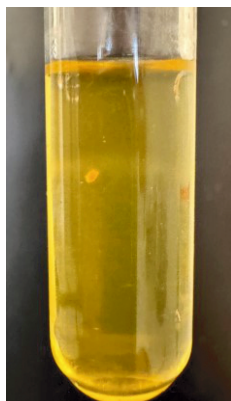


Figura 2. Crecimiento de bacterias endófitas aisladas de *Vachellia farnesiana* en medio semisólido libre de nitrógeno (NFB), como prueba presuntiva de fijación biológica de nitrógeno.

3.2. Actividad enzimática en hongos endófitos

En los hongos endófitos se observó una mayor diversidad de actividades enzimáticas en comparación con las bacterias, particularmente en los medios para amilasas, celulasas y lipasas (Tabla 3). No se detectó crecimiento en el medio para quitinasas, y la actividad proteolítica no fue evaluada en esta etapa del estudio, lo cual representa una limitación experimental que deberá considerarse en trabajos posteriores.

Tabla 3. Actividad enzimática cualitativa en hongos endófitos aislados de *Vachellia farnesiana*.

Hongo	QTN	CLL	AML	LPS
1	(-)	(-)	(++)	(-)
2	(-)	(++)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(++)	(+++)
4	(-)	(+++)	(+++)	(++++)
5	(-)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(+)	(-)	(-)
8	(-)	(+)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(++++)	(++++)

Abreviaturas: QTN = Quitinasas; CLL = Celulasas; AML = Amilasas; LPS = Lipasas.

Símbolos: (-) = sin crecimiento; (+) = débil; (++) = moderado; (+++) = alto; (++++) = muy alto.

Los aislados 4 y 9 destacaron por presentar una actividad lipolítica muy alta, evidenciada por halos de hidrólisis amplios y bien definidos (Figuras 3a y 3b). Asimismo, el aislado 9 mostró una actividad amilolítica sobresaliente, con un halo de hidrólisis de gran tamaño (Figura 3c), lo que indica una elevada capacidad para la degradación de almidón.

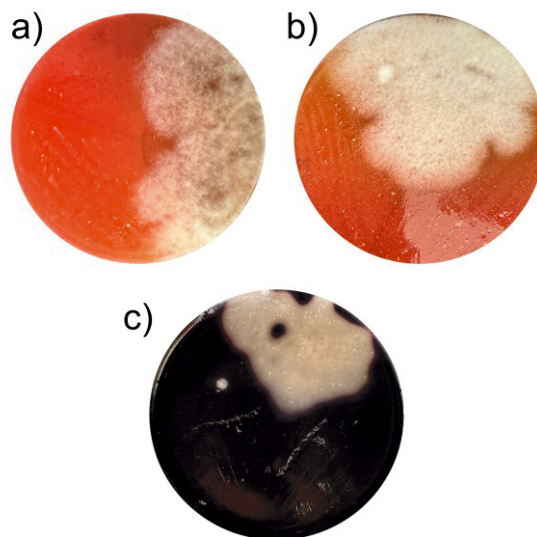


Figura 3. Actividad enzimática cualitativa en hongos endófitos aislados de *Vachellia farnesiana*. (a–b) Halos de hidrólisis en medio para lipasas; (c) halo de hidrólisis en medio con almidón para la detección de amilasas.

La variabilidad observada entre los aislados fúngicos sugiere diferencias en la expresión y secreción de enzimas extracelulares, posiblemente influenciadas por factores fisiológicos propios de cada cepa y por la naturaleza del sustrato. En general, los hongos endófitos mostraron una mayor capacidad para la degradación de polisacáridos complejos, lo que coincide con su naturaleza filamentosa y su papel ecológico dentro de los tejidos vegetales [11].

El análisis comparativo entre bacterias y hongos endófitos revela una posible complementariedad metabólica dentro de la microbiota asociada a *V. farnesiana*, donde los hongos podrían participar principalmente en la degradación de carbohidratos estructurales, mientras que las bacterias contribuirían a la descomposición de lípidos y proteínas. La combinación de ambos grupos representa una comunidad funcional que facilita la colonización y el reciclaje de nutrientes dentro del tejido vegetal. Estos hallazgos coinciden con reportes previos en otras especies de *Acacia*, donde las comunidades endófitas presentan funciones metabólicas complementarias adaptadas al hospedero [18].

El hecho de que no se observaran halos de hidrólisis amplios tras la aplicación de colorantes no implica ausencia de actividad. Diversos autores han documentado que las enzimas intracelulares pueden no difundirse en el agar, requiriendo ensayos cuantitativos en extractos celulares o condiciones de inducción específicas [22].

De manera comparativa, el 55% de las bacterias evaluadas mostraron actividad lipolítica y el 44% actividad proteolítica, mientras que únicamente el 11% presentó actividad amilolítica detectable. En contraste, los hongos evidenciaron mayor diversidad enzimática, con

44% de actividad celulolítica, 44% amilolítica y 33% lipolítica, destacando además una mayor intensidad en la formación de halos. Estos resultados respaldan la hipótesis de una posible complementariedad metabólica entre bacterias y hongos endófitos, donde los hongos podrían desempeñar un papel predominante en la degradación de polisacáridos estructurales, mientras que las bacterias contribuirían principalmente a la hidrólisis de lípidos y proteínas [18].

4. Conclusiones

Las bacterias y hongos endófitos aislados de *Vachellia farnesiana* mostraron una actividad enzimática cualitativa variable, destacando principalmente las actividades lipolítica y amilolítica. En las bacterias endófitas, la mayor frecuencia de crecimiento se observó en los medios para lipasas y proteasas, mientras que en los hongos endófitos se registró una mayor diversidad de actividades en amilasas, celulasas y lipasas.

La ausencia de halos de hidrólisis en varios de los ensayos sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, las enzimas podrían localizarse predominantemente de forma intracelular o presentar una secreción limitada. No obstante, los resultados evidencian que los endófitos asociados a *V. farnesiana* constituyen una fuente prometedora de microorganismos con potencial biotecnológico. Estudios futuros que incluyan ensayos cuantitativos, caracterización molecular y optimización de condiciones de cultivo permitirán profundizar en la aplicación de estas cepas en los sectores agrícola, industrial y ambiental.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la UANL por su apoyo a través del programa ProACTI (clave de proyecto: 6-BYQ-2025). GSM agradece a la SECIHTI por la beca otorgada (Número de CVU: 1231595).

Se agradece a Marianela Sarrelangue Martínez y Adriana Abigail Nuñez Campos por su apoyo técnico en la preparación de medios de cultivo, manejo de material y actividades de laboratorio durante etapas iniciales del trabajo.

6. Referencias

1. Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
2. Watts, D., Palombo, E. A., Jaimes Castillo, A., & Zaferanloo, B. (2023). Endophytes in agriculture: Potential to improve yields and tolerances of agricultural crops. *Microorganisms*, 11(5), 1276. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051276>
3. Bhadra, F., Gupta, A., Vasundhara, M., & Reddy, M. S. (2022). Endophytic fungi: A potential source of industrial enzyme producers. *3 Biotech*, 12(4), 86. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03145-y>
4. Khan, T., Alzahrani, O. M., Sohail, M., Hasan, K. A., Gulzar, S., Rehman, A. U., Mahmoud, S. F., Alswat, A. S., & Abdel-Gawad, S. A. (2022). Enzyme profiling and identification of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Arthrocnemum macrostachyum*. *Microorganisms*, 10(11), 2112. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112112>
5. Dogan, G., & Taskin, B. (2021). Hydrolytic enzymes producing bacterial endophytes of some Poaceae plants. *Polish Journal of Microbiology*, 70(3), 297–304. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-026>
6. Usman, M. M., Idi, A., Aisami, A., & Maigari, F. U. (2023). A review on endophytic fungi: A natural source of industrial enzymes. *Asian Journal of Plant Biology*, 5(1), 7–11. <https://doi.org/10.54987/ajpb.v5i1.820>
7. Falade, A. O., Adewole, K. E., & Ekundayo, T. C. (2021). Aptitude of endophytic microbes for production of novel biocontrol agents and industrial enzymes towards agro-industrial sustainability. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-021-00146-3>
8. Kubayi, S., Makola, R. T., & Dithebe, K. (2025). Exploring the antimicrobial, antioxidant and extracellular enzymatic activities of culturable endophytic fungi isolated from the leaves of *Kirkia acuminata* Oliv. *Microorganisms*, 13(3), 692. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13030692>
9. Ali, M. A., et al. (2024). A review on mechanisms and prospects of endophytic bacteria for enzyme production. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31573>
10. Bogas, A. C., Cruz, F. P. N., Lacava, P. T., & Sousa, C. P. (2022). Endophytic fungi: An overview on biotechnological and agronomic potential. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 84, e258557. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>
11. Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
12. da Silva Pinto, L. F., Tavares, T. C. S., Cardenas-Alegria, O. V., Lobato, E. M. S. G., de Sousa, C. P., & Nunes, A. R. C. (2025). Endophytic bacteria with potential antimicrobial activity isolated from *Theobroma cacao* in the Brazilian Amazon. *Microorganisms*, 13(7), 1686. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071686>
13. Ntabo, R. M., Nyamache, A. K., Lwande, W., Kabii, J., & Nonoh, J. (2018). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates from selected mangrove plants in Kenya. *The Open Microbiology Journal*, 12(1), 354–363. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010354>
14. Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of

- microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
15. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., ... & Okon, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Plant and Soil*, 243(2), 119–129. <https://doi.org/10.1071/PP01074>
16. Meddeb-Mouelhi, F., Moisan, J. K., & Beauregard, M. (2014). A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 66, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.07.004>
17. Buisset, E., Soust, M., & Scott, P. T. (2025). The isolation of free-living nitrogen-fixing bacteria and the assessment of their potential to enhance plant growth in combination with a commercial biostimulant. *Microbiological Research*, 16, 69. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16030069>
18. White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., Elmore, M. T., Verma, S. K., Gond, S. K., & Kowalski, K. P. (2019). Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Management Science*, 75(10), 2558–2565. <https://doi.org/10.1002/ps.5527>
19. Sharma, P., & Kaushik, R. (2020). Endophytic microbes: Diversity and potential for crop improvement. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, 65–86. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_4
20. Shimahara, K., & Takiguchi, Y. (1988). Preparation of crustacean chitin. *Methods in Enzymology*, 161, 417–423. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61049-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61049-4)
21. Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2014). A comprehensive aligned nifH gene database: A multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. *Database*, 2014, bau001. <https://doi.org/10.1093/database/bau001>
22. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 135–152. <https://doi.org/10.1042/BA19990073>