

# **AISLADOS BACTERIANOS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* L. VARIEDAD INCA-LP-5) TIENEN CAPACIDAD PARA SOLUBILIZAR FOSFATOS, PRODUCIR COMPUESTOS INDÓLICOS E INFLUYEN EN PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO DEL ARROZ**

Iriam Salazar Gutiérrez<sup>1</sup>, Ingrid Gonzáles Lemes<sup>2</sup>, Loiret FG<sup>1</sup> y Eduardo Ortega Delgado<sup>1</sup>

1. *Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, [iriam@fq.uh.cu](mailto:iriam@fq.uh.cu)*

2. *Instituto de Fruticultura Tropical, Cuba*

**Palabras claves:** rizobacterias, endófitos, arroz

## **1. Introducción.**

La aplicación de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal en cultivos de importancia agrícola es una alternativa viable, sobretodo en países con una agricultura subdesarrollada, que carecen de fertilizantes (Dalla-Santa *et al.*, 2004); constituyen una vía ecológica que permite la obtención de mayores rendimientos y la conservación del medio ambiente. Los efectos beneficiosos de los aislados bacterianos del arroz en el crecimiento y desarrollo de las plantas son atribuidos a su capacidad de solubilizar fosfatos fijar nitrógeno atmosférico y la estimulación en el crecimiento de tejidos vegetales por la producción de fitohormonas, entre otras vías. Nuestro país es un gran consumidor de arroz por lo que necesita elevar las producciones agrícolas para suplir la demanda nacional sin comprometer el medio ambiente. Una de las vías para llevar a cabo esta tarea es el empleo de productos que fomenten los rendimientos de este cereal como es el caso de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. En el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología perteneciente a la Universidad de La Habana, se cuenta con un cepario de 60 aislados bacterianos de plantas de arroz (*Oryza sativa* L., variedad INCA Lp-5). Hay un total de 24 aislados de la rizósfera y 36 de tejidos internos de las plantas (posibles endófitos). El muestreo para la obtención de estos aislados se realizó en julio del 2009 en la estación experimental "Los Palacios" ubicada en este municipio de la provincia Pinar del Río y perteneciente al Instituto de Ciencias Agrícolas. Dado los anteriores antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Cuantificar la capacidad de solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos en medio sólido y líquido.
2. Determinar cuantitativamente la capacidad de producir compuestos indólicos de los aislados bacterianos.
3. Evaluar la influencia de la inoculación de semillas de *Oryza sativa* L. INCA Lp-5 con aislados seleccionados sobre el proceso de germinación semillas y crecimiento de las raíces.

## **2. Materiales y métodos.**

### **Aislados empleados.**

En los estudios desarrollados en esta tesis, se utilizaron 60 aislados bacterianos de plantas de arroz (*Oryza sativa* L., variedad INCA Lp-5). Un total de 24 aislados pertenecen a la rizósfera y 36 son aislamientos de tejidos internos de las plantas (posibles endófitos). El muestreo se realizó en julio del 2009 en la estación experimental "Los Palacios" ubicada en este municipio de la provincia Pinar del Río y perteneciente al Instituto de Ciencias Agrícolas.

### **Determinación de la capacidad de los aislados para solubilizar una fuente de fosfato inorgánico in vitro.**

- **Solubilización en medio sólido.**

La capacidad solubilizadora de los aislados se determinó según la metodología descrita por Nautiyal *et al.*, (2002).

- **Solubilización en medio líquido.**

La determinación cuantitativa de la solubilización de fosfato se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Nautiyal (1999).

#### **Evaluación cuantitativa de la capacidad de producción de compuestos indólicos.**

La evaluación cuantitativa de producción de compuestos indólicos por parte de los aislados de arroz (*Oryza sativa* L., variedad Lp-5) se llevó a cabo según el método de Selvakumar et al. (2008), modificado. El estudio se realizó en medio con Trp y sin Trp.

#### **Caracterización de los aislados.**

Se realizaron las siguientes pruebas a tres aislados seleccionados de cada zona de aislamiento (vástago: V-7, V-14, V-15 y rizósfera: Ri-10, Ri-18, Ri-23):

- Morfología y características tintorales.
- Motilidad.
- Catalasa.
- Voges-Proskauer.
- Rojo de metilo.
- Utilización de Citrato.
- Nitrato reductasa.
- Hidrólisis de la gelatina.
- Hidrólisis del almidón.
- Hidrólisis de la urea.
- Actividad celulolítica.
- Descarboxilación de aminoácidos.
- Desaminación de la Fenilalanina.
- Utilización del oxígeno.
- Crecimiento en medio triple azúcar-hierro.

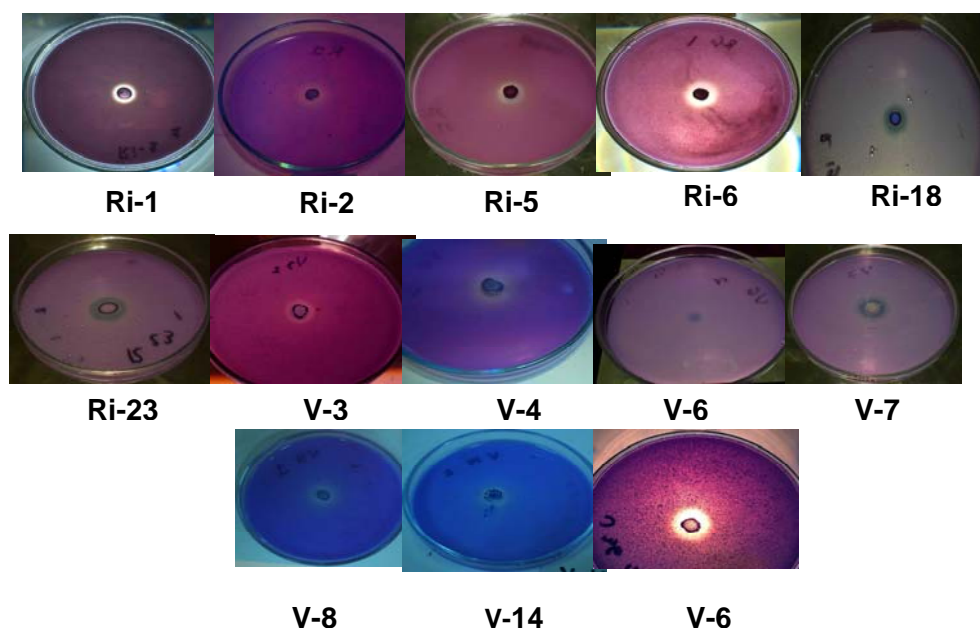
#### **Influencia de la inoculación de aislados de interés en la germinación de semillas y en parámetros del crecimiento de plántulas de 14 días.**

Para determinar la influencia de la inoculación de cepas en el crecimiento vegetal de plántulas de arroz (variedad INCA Lp-5), se seleccionaron tres aislados por cada zona de aislamiento (vástago: V-7, V-14, V-15 y rizósfera: Ri-10, Ri-18, Ri-23). Se desinfectaron 800 semillas de arroz variedad INCA Lp-5 con una solución de  $\text{HgCl}_2$  al 0.2 % con la cual se inundaron las semillas en placas petri estériles durante 1 min. Se desechó la solución y se enjuagaron las semillas seis veces con agua destilada estéril. Por cada aislado, se colocaron 25 semillas desinfectadas por placa petri estéril; un total de 200 semillas (ocho placas petri). A las placas se les añadió 13 mL de Solución Buffer de Fosfatos (PBS según su siglas en inglés) y 2 mL de la suspensión bacteriana del aislado de manera tal que las células quedaran a una DO de 0.5. Las placas controles tenían solo 15 mL de solución PBS. Las semillas se pusieron a germinar durante 14 días. En el último día se contó el número de raíces, se midió la longitud total de raíces y la longitud del tallo.

### **3. Resultados y Discusión**

#### **Determinación de la capacidad de los aislados para solubilizar fosfatos in vitro.**

La solubilización de fosfatos de los 60 aislados bacterianos en medio sólido se determinó mediante el crecimiento de los mismos en placas con medio NBRI-P y bromofenol azul. Sólo siete aislados bacterianos del vástago y seis de la rizósfera presentaron halos de solubilización, mientras que el resto de los aislados del vástago y de la rizosfera no presentaron formación del halo de solubilización de fósforo (**Fig. 1**). Los diámetros de los halos de solubilización en el vástago oscilaron entre 0,27 cm y 0,83 cm y los de los rizosféricos entre 0,27 cm y 1,0 cm (**Tabla 1**).



**Figura 1:** Fotografías de los halos de solubilización de fosfato producidos por 13 aislados de vástago y rizosfera de arroz (variedad INCA Lp-5). Los aislados crecieron en medio NBRI-P durante cinco días a 30 °C.

**Tabla 1.** Tamaño de los halos de solubilización de fosfatos de los aislados después de cinco días de cultivo a 30 °C en medio NBRI-P; n =3

Aislados	Media
V-3	0,47 ± 0,06
V-4	0,40 ± 0,10
V-6	0,27 ± 0,06
V-7	0,5 ± 0,00
V-8	0,50 ± 0,17
V-14	0,57 ± 0,12
V-36	0,83 ± 0,15
Ri-1	0,4 ± 0,00
Ri-2	0,5 ± 0,00
Ri-5	0,27 ± 0,12
Ri-6	0,60 ± 0,00
Ri-18	0,65 ± 0,21
Ri-23	1,0 ± 0,00

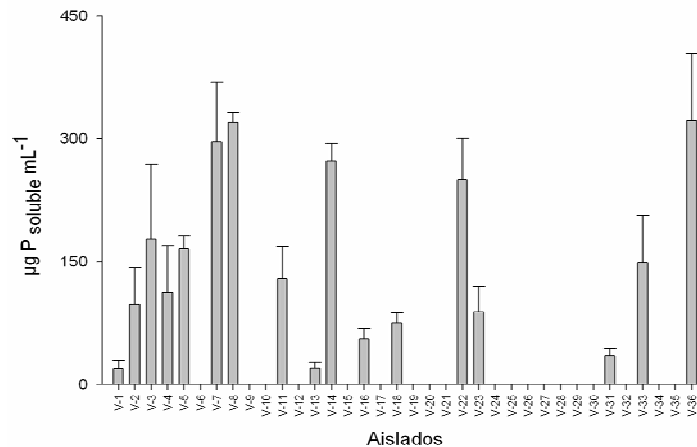
Estos valores se encuentran dentro del rango de los informados por Caballero-Mellado *et al.* (2007) para aislados rizosféricos de tomate, pertenecientes al género *Bulkholderia* (0,15 cm y 0,97cm). Asimismo los valores de los halos de solubilización de los aislados del vástago (0,27cm y 0,83 cm) fueron superiores a los informados por Cordero *et al.*, (2008) para el endófito de la caña de azúcar *Pantoea* sp. (0,6 cm al cabo de siete días de crecimiento).

También existen estudios con aislados rizosféricos de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* cuyos halos de solubilización obtenidos fueron entre 0,2 cm y 0,7 cm (Nautiyal, 1999), encontrándose por debajo de los resultantes en nuestro trabajo. Este método no es muy fiable, según plantean algunos autores, dado que varios aislados que no producen halo de solubilización en medio sólido, sí manifiestan un nivel de solubilización de fosfato mineral en medio líquido (Nautiyal, 1999). Esto quedó evidenciado en nuestros resultados donde de los 36 aislados bacterianos del vástago, sólo 16 solubilizaron fosfato en medio NBRI-P líquido (**Fig. 2**); mientras que en medio sólido sólo presentaron halo de solubilización siete de ellos (**Tabla 1**). Con respecto a los 24 aislados rizosféricos, sólo seis presentaron halo de solubilización en medio sólido (**Tabla 1**) y sin embargo diecisiete solubilizaron fosfato en medio NBRI-P líquido (**Fig. 3**). Estos resultados diferentes en cuanto a la solubilización de fosfatos en medio sólido y líquido pueden deberse a la difusión diferencial de los ácidos orgánicos en medio sólido y en medio líquido. La presencia de microorganismos rizosféricos con esta capacidad fisiológica es un hecho que se ha venido informando reiterativamente (Hariprasad y Niranjana, 2009). La asociación entre los aislados de rizosfera presentados en este estudio y las plantas de arroz pudiera constituir una ventaja ecológica si existiese una baja disponibilidad de fósforo soluble en el suelo, situación que se manifiesta con bastante frecuencia en la actualidad. Sin embargo, la presencia de

posibles endófitos con capacidad solubilizadora de fosfato es un aspecto informado de manera poco frecuente en la literatura científica. Tal es el caso del diazótrofo endófito de la caña de azúcar *Pantoea* sp. que alcanzó valores de 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$  al tercer día de cultivo

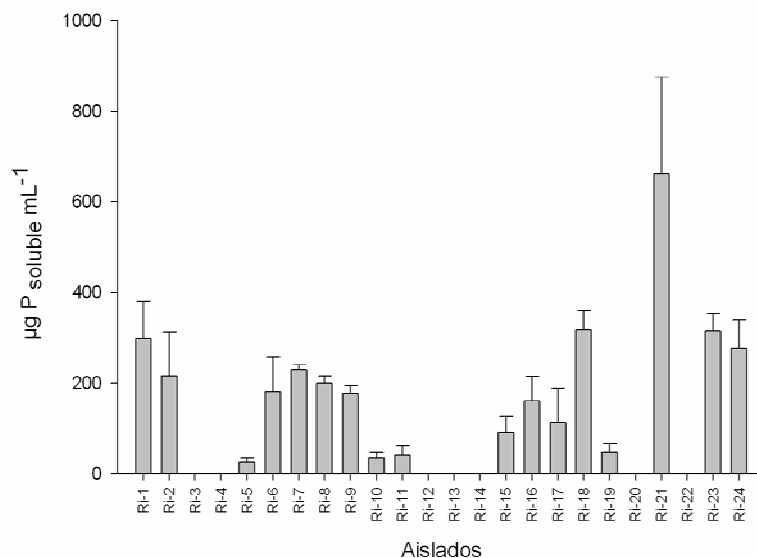
(Cordero *et al.*,

2008 ). Igualmente Verma *et al.* (2001) informaron de la presencia de los diazótrofos endófitos del arroz *Pantoea* spp. y *Pseudomonas* spp. con capacidad solubilizadora de fosfatos. Nuestros resultados al respecto pueden indicar que los aislados del vástago que solubilizan fosfatos hayan pertenecido a la rizosfera de la planta y penetrado a los tejidos internos a través de la raíz. Prueba de este hecho ha sido el mantenimiento del fenotipo solubilizador aun siendo posibles endófitos. Los aislados bacterianos V-7, V-14, Ri-18 y Ri-23, a los que se les realizaron pruebas bioquímicas para su caracterización, resultaron ser bacterias Gram negativas (**Tabla 2**) y presentaron altos valores de solubilización de fosfatos. Debido a que la producción de ácidos orgánicos por los microorganismos es considerada el mecanismo fundamental de la solubilización del fosfato mineral, esta vía podría estarse manifestando en estas bacterias.

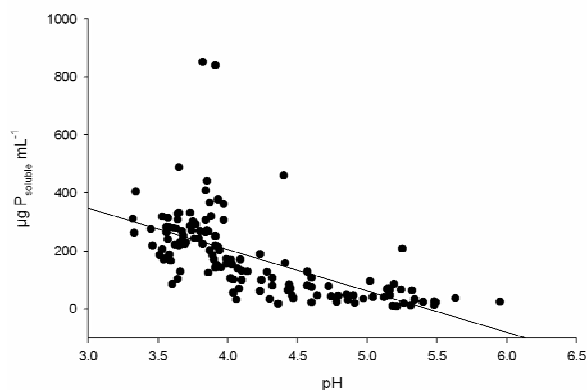


**Figura 2:** Concentración de fósforo solubilizado por los aislados bacterianos del vástago de plantas de arroz variedad INCA Lp-5. Los microorganismos crecieron en medio NBRI-P líquido durante tres días y 40 rpm a temperatura ambiente. Barras verticales indican desviación estándar. Diferencias significativas para  $p < 0.001$ . ANOVA Unifactorial;  $n=3$ .

Goldstein (1995) planteó que la oxidación periplásmica directa de glucosa a ácido glucónico, y a menudo ácido 2-cetoglucónico, conforma la base metabólica de este proceso en algunas bacterias Gram-negativas. El valor de la correlación realizada ( $r=-0.63$ ) (**Fig. 4**) entre el pH y la concentración de P solubilizado indica un posible mecanismo de solubilización de fosfatos de estos aislados del arroz, mediante la producción de ácidos.



**Figura 3:** Concentración de fósforo solubilizado por aislados bacterianos de la rizosfera de plantas de arroz variedad INCA Lp-5. Los microorganismos crecieron en medio NBRI-P líquido durante tres días y 40 rpm a temperatura ambiente. Barras verticales indican desviación estándar. Diferencias 1. ANOVA Unifactorial;



**Figura 4:** Relación entre la concentración de fósforo solubilizado y el pH, de los aislados del vástago y la rizosfera cultivadas en medio NBRI-P en agitación, 40rpm a 30° C;  $r=-0.63$ ;  $n=3$ .

#### Evaluación cuantitativa de la capacidad de producción de compuestos indólicos por aislados microbianos de tallo y rizósfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L., var INCA Lp-5).

Se detectó producción de compuestos indólicos en 24 de los 36 aislados del vástago, analizados (**Fig. 5**). De los 24, 17 produjeron compuestos indólicos tanto en presencia como en ausencia de Trp (V-1 a V-9, V-11, V-13, V-14, V-16, V-18, V-25, V-30 y V-36), mientras que siete aislados lo hicieron solamente en presencia de Trp (V-10, V-22, V-31 a V-35).

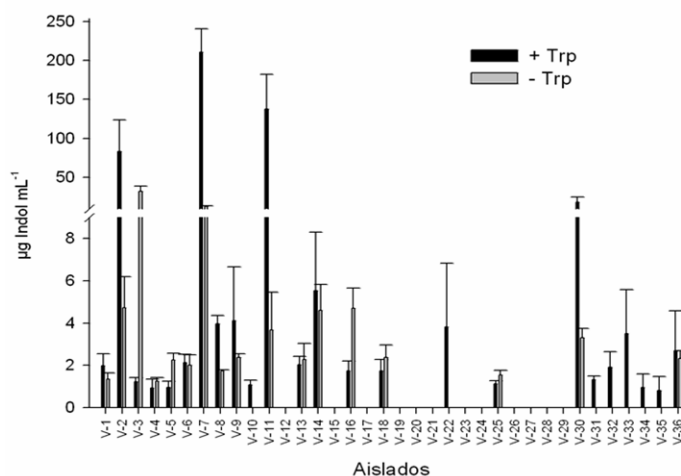
Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de compuestos indólicos producidas por todas las cepas, en presencia o ausencia de Trp en el medio de cultivo.

Así mismo

se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones de compuestos indólicos producidas entre cada cepa.

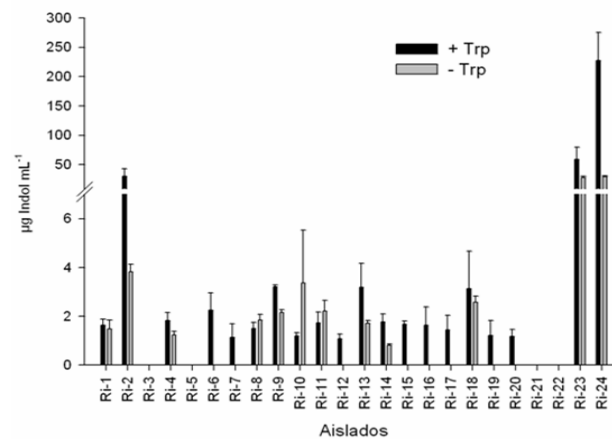
En 20 de los 24 aislados de la rizosfera de plantas de arroz variedad INCA Lp-5 se detectó y cuantificó la producción de compuestos indólicos (**Fig 6**). Todos los aislados crecieron en medio LB con Trp (5 mM) y sin Trp, durante dos días. De los 20 aislados que produjeron compuestos indólicos, 12 lo hicieron tanto en presencia como en ausencia de Trp (Ri-1, Ri-2, Ri-4, Ri-8, Ri-9, Ri-10, Ri-11, Ri-13, Ri-14, Ri-18, Ri-23 y Ri-24); siete aislados produjeron compuestos indólicos solo en presencia de Trp (Ri-6, Ri-7, Ri-15, Ri-16, Ri-17, Ri-19 y Ri-20); un aislado produjo compuestos indólicos en medio LB sin Trp (Ri-21).

Se encontraron diferencias significativas en la media de las concentraciones de compuestos indólicos producidas, en cuanto a la presencia y ausencia de Trp según la prueba ANOVA Unifactorial realizada. Las auxinas son compuestos indólicos derivados del aminoácido Trp (Marschner, 1988); Existe una vía independiente del Trp de producción de indol en bacterias (Prinsen *et al.* 1993). Como se evidenció en los resultados, la mayoría de los aislados de la rizosfera y del vástago de arroz produjeron compuestos indólicos tanto en presencia como en ausencia de Trp; aunque existen diferencias significativas en la producción de compuestos indólicos en cuanto a la presencia o no de este precursor, tanto para los aislados del vástago como para los de la rizosfera (**Fig. 5 y Fig. 6**). En el caso de los aislados rizosféricos, nuestros resultados oscilaron dentro del rango de los informados por otros autores como por ejemplo Sarwar y Kremer (1995) quienes trabajando con aislados rizosféricos del género *Enterobacter* y *Pseudomonas*, obtuvieron valores entre 2-11  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA. Sin embargo, en nuestro estudio se alcanzaron algunos valores que fueron superiores, hasta en un orden de magnitud, con respecto a los informados por varios autores. Esto pudiera ser contraproducente debido a que la exposición de las plantas a concentraciones de auxinas mayores que  $10^{-5}$  M pudieran inhibir el crecimiento de la raíz y del tallo (Taiz y Zeiger, 2002). No obstante se cuenta con una gran cantidad de aislados que producen compuestos indólicos por debajo de este valor, los que



**Figura 5:** Concentración de compuestos indólicos producidos por aislados bacterianos del vástago de plantas de arroz (variedad INCA Lp-5). Los microorganismos se cultivaron en medio LB suplido con Trp (5 mM) (+Trp) o sin la presencia de este aminoácido (-Trp). Barras verticales indican desviación estándar. Diferencias significativas en cuanto a la producción de indol en presencia y ausencia de Trp. ANOVA Unifactorial;  $p < 0.001$ ;  $n = 3$ .

podieran ser efectivos en la promoción del crecimiento vegetal, aspecto que debería valorarse en un experimento *in vivo*.



**Figura. 6:** Concentración de compuestos indólicos producidos por aislados bacterianos de la rizosfera de plantas de arroz (variedad INCA Lp-5). Los microorganismos se cultivaron en medio LB suplido con Trp (5 mM) o sin la presencia de este aminoácido. Barras verticales indican desviación estándar. Diferencias significativas en cuanto a la producción de indol en presencia y ausencia de Trp. ANOVA Unifactorial;  $p < 0.001$ ;  $n = 3$ .

### Caracterización de los aislados

Un grupo de seis microorganismos, del total de sesenta aislados de vástago y rizosfera de arroz, fueron sometidos a una serie de pruebas para su identificación parcial (**Tabla 2**). En esta Tabla se observan los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas realizadas a los seis aislados bacterianos escogidos para llevar a cabo su identificación parcial. La realización de tinciones permitió clasificar fenotípicamente a los aislados así como la ejecución de diferentes pruebas bioquímicas que aportaron información valiosa de los microorganismos en estudio; esto permitió su posible ubicación taxonómica en los diferentes géneros informados en la literatura. El aislado V-7 es una bacteria de morfología bacilar, Gram negativa y anaerobia facultativa, por lo que pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*. Este microorganismo arrojó un resultado positivo a la prueba de la catalasa, de la nitrato reductasa, la fermentación de sacarosa, descarboxilación de lisina y producción de Indol. Se obtuvo un resultado negativo en la prueba de la descarboxilación de la Arg y la desaminación de la Phe. Dado estas características, se sugiere a V-7 como un microorganismo del género *Klebsiella*. Las especies pertenecientes a este género responden de forma no uniforme a un grupo de pruebas bioquímicas como son la formación de gas producto a la fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa, la utilización de citrato, la hidrólisis de gelatina y urea, la producción de acetoina (intermediario de la fermentación butilén-glicólica) y de ácidos orgánicos (productos de una fermentación ácido mixta). A pesar de esta variabilidad de respuesta pensamos que hay criterios suficientes para incluir a V-7 como parte del género *Klebsiella*.

Los aislados V-15 y Ri-10 se ubicaron dentro del género *Bacillus* por ser microorganismos de morfología bacilar, Gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos. A pesar de no realizarse la prueba de la tinción de endosporas, los aislados se situaron dentro de los formadores de endosporas; la razón es que los microorganismos no formadores de endosporas, en contraposición con estos dos aislados, generalmente no son mótils, requieren de complejos orgánicos nutricionales para su crecimiento y carecen de la enzima catalasa. Dentro del género *Pseudomonas* se dispusieron a los aislados bacterianos V-14, Ri-18 y Ri-23, dado que son bacilos Gram negativos, aerobios estrictos, mótils y presentar la enzima catalasa. Además no requieren de complejos nutricionales para su crecimiento, no fermentan la glucosa, la sacarosa ni la lactosa. En este género las bacterias que son aerobias estrictas no presentan la enzima nitrato reductasa como es el caso de estos tres aislados. Los representantes de este género pueden variar en cuanto su respuesta a la hidrólisis del almidón y la gelatina además de la producción de compuestos indólicos, características que no los excluyen de la clasificación propuesta. Se ha informado por otros autores la presencia de microorganismos pertenecientes a estos tres géneros bacterianos asociados a plantas de arroz.

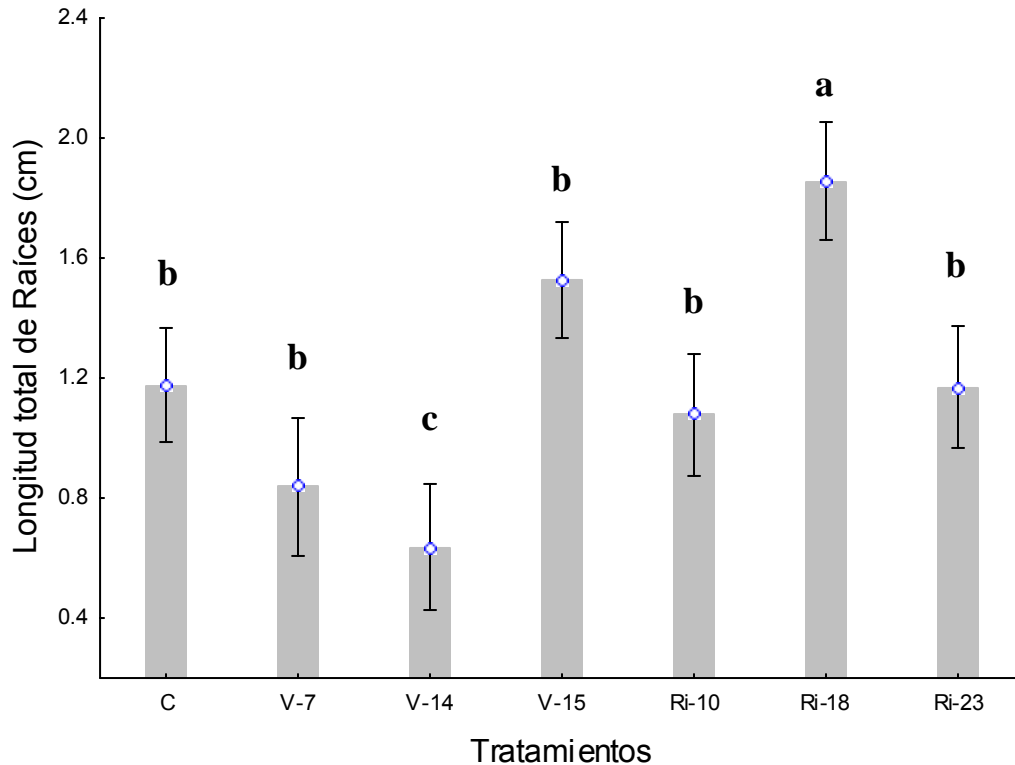
**Tabla 2.** Características morfológicas, motiles, tintoriales y bioquímicas de los aislados V-7, V-14, V-15, Ri-10, Ri-18 y Ri-23; af: anaerobio facultativo; ae: aerobio estricto; aem: aerobio estricto microaerófilo. Cada prueba con tres réplicas por aislado.

Pruebas	Aislados					
	V-7	V-14	V-15	Ri-10	Ri-18	Ri-23
Tinción de Gram	-	-	+	+	-	-
Morfología	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo
Motilidad (gota colgante)	+	+	+	+	+	+
Motilidad (tioglicolato)	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar MacConkey	-	-	+	+	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Rojo Metilo	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	+	-	-	-
Utilización de citrato	+	+	+	-	+	+
Nitrato reductasa	+	-	+	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	$\alpha$ y $\beta$ amilasa	-	-
Hidrólisis de urea	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	+	-	+	-	-	-
Actividad celulolítica	-	-	-	-	-	-
Utilización de oxígeno (tioglicolato)	af	ae	ae	af	ae	ae
Formación de gases	+	-	+	-	-	-
Fermentación de Glucosa, Lactosa, Sacarosa	+	-	+	+	-	-
Desaminación de la Phe	-	-	-	-	-	-
Descarboxilación de Lys	+	+	+	-	-	-
Descarboxilación de Arg	-	-	-	-	-	-



Como endófitos de esta gramínea se ha notificado a bacterias del género *Klebsiella* (Rosenblueth *et al.* 2004), *Bacillus* y *Pseudomonas* (Stolzfus *et al.*, 1997). Mientras que como rizosféricos se informó representantes de los géneros *Bacillus* (Thakuria *et al.*, 2004), y *Pseudomonas* (Thakuria *et al.*, 2004). A pesar de que no se ha realizado la identificación molecular de estos aislados, la ubicación llevada a cabo empleando pruebas morfológicas y bioquímicas indican la presencia de microorganismos que ya han sido informados como promotores del crecimiento vegetal. Esto constituye una expectativa en el desarrollo de otros estudios que permitan probar su eficacia como futuros inoculantes.

**Inoculación de *Oryza sativa* L. var. INCA Lp-5 con aislados obtenidos de la rizosfera o vástago.**



**Figura 7:** Longitud total de las raíces de arroz (variedad INCA Lp-5) a los 14 días de crecimiento. Las semillas se dispusieron en placas petri con 10 mL de PBS + cultivo bacteriano. Barras verticales indican desviación estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas para  $p < 0.01$ . ANOVA unifactorial;  $n=25$ .

El efecto de la inoculación separada de los seis aislados en la longitud total de las raíces de las plántulas de arroz, arrojó diferencias significativas entre los microorganismos Ri-18 y V-14 con el resto de los aislados y entre sí (**Fig. 7**). Ambos microorganismos, ubicados dentro del género *Pseudomonas*, son productores de compuestos indólicos. Las diferencias encontradas entre estos dos aislados sobre la longitud total de la raíz (efecto estimulador por el aislado Ri-18 e inhibitorio por el aislado V-14), ya sea entre si y con resto al resto de los microorganismos evaluados, pueden deberse a los niveles de producción de la hormona del crecimiento vegetal ácido indol acético aunque otros factores pudieran estar influyendo; como un posible sinergismo entre fitohormonas producidas, inhibición o retardo del crecimiento debido a un aumento en la sensibilidad a la incubación en la oscuridad condición llevada a cabo en estos experimentos. La raíz presenta sensibilidad en cuanto a las concentraciones de las auxinas, por lo que su efecto varía en dependencia de las mismas. Las auxinas que controlan el crecimiento en longitud de la

raíz, pueden inducir la producción de etileno, un inhibidor del crecimiento de la raíz. A bajas concentraciones ( $10^{-10}$  a  $10^{-9}$  M) la auxina presenta un efecto estimulador en los segmentos de tejido en crecimiento dado que la síntesis de etileno queda bloqueada y así a una concentración mínima de la auxina estimular el crecimiento de las raíces, mientras que a concentraciones mayores que  $10^{-5}$  M es un potente inhibidor del crecimiento. El empleo de estos microorganismos puede ser una ventaja en su utilización como biofertilizantes. Debido a que la producción de fitohormonas promueve el desarrollo de la raíz y resulta en una mayor eficiencia en cuanto a la toma de agua y nutrientes, los efectos de la inoculación de los aislados en cultivos del arroz pudiera redundar en una elevación de los rendimientos agrícolas.

#### 4. Referencias.

- Caballero-Mellado et al. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation, Applied and Environmental Microbiology, 5308–5319, 2007.
- Cordero et al., La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares, Rev. Colomb. Biotecnol, 1: (X): 111-121, 2008.
- Dalla-Santa, et al. Azospirillum sp. Inoculation in wheat, barley and oat seeds greenhouse experiments, Brazilian Archives of Biology and Technology, 47: 843-850, 2004.
- Goldstein, A.H, Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria, Biol. Agric. Hortic., 12:185–93, 1995.
- Hariprasad, P. y S. R. Niranjana, Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato, Plant Soil, 316:13–24, 2009.
- Marschner, H., Mineral nutrition of higher plants, Second edition. Academic Press, London, 889 pp, 1998.
- Nautiyal, C.S:, An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, FEMS Microbiology Letters, 170: 265-270, 1999.
- Nautiyal, C.S et al., Composition for qualitative screening of phosphate solubilizing microorganisms and a qualitative method for screening microorganisms, United States Patent Application. 0172993, 2002.
- Prinsen, E., et al., *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway, Mol Plant–Microbe Interact, 6: 609–615, 1993.
- Rosenblueth, M., y E. Martinez, *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization, Arch. Microbiol., 181:337-344, 2004.
- Sarwar, M. et al., Tryptophan dependent biosynthesis of auxins in soil, Plant and Soil, 147: 207-215, 1992.
- Selvakumar, G. et al., Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas, World J Microbiol Biotechnol, 24:955–960, 2008.
- Stolzfus, J. R. et al., Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen, Plant Soil, 194: 25-36, 1997.
- Thakuria, D., et al., Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam, Current Science, 86 (7), 2004.
- Verma, S.C. et al., Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice, J Biotechnol, 91: 127–141, 2001.