

Ensayo de investigación

Evaluación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de suelos salinos en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Recibido: 24-06-2020 Aceptado: 30-04-2021 (Artículo Arbitrado)

Resumen

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) poseen la capacidad de interactuar con las plantas mediante diferentes mecanismos de acción, entre los que se destacan la producción de fitohormonas, fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos y agentes antagonistas de biocontrol de fitopatógenos. Con el objetivo de caracterizar los microorganismos presentes en un suelo salino, en el presente trabajo se identificaron mediante secuenciación del gen rRNA 16S seis bacterias: *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia* sp. *Bacillus megaterium* y *Serratia marcescens*, las cuales mostraron capacidad de solubilizar fosfato de calcio, producción de auxinas, además de mostrar actividad antagonista *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*. En bioensayo en condiciones de invernadero *B. megaterium* y *Burkholderia* sp. incrementaron el peso fresco de la parte aérea y radicular, así como la altura de plantas de jitomate. El uso de estos microorganismos resulta promisorio en el cultivo de *Solanum lycopersicum* en suelos en condiciones de baja fertilidad y salinidad elevada.

Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) possess the ability to interact with plants through different mechanisms of action, among which the production of phytohormones, biological nitrogen fixation, phosphate solubilization and antagonistic agents of phytopathogens. In order to characterize the microorganisms present in a saline soil, in the present work, six bacteria were identified by sequencing of the rRNA 16S gene: *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia* sp. *Bacillus megaterium* and *Serratia marcescens*, which showed capacity to solubilize calcium phosphate, production of auxins, in addition to showing antagonistic activity *in vitro* against *Fusarium oxysporum*. In a bioassay under greenhouse conditions *B. megaterium* and *Burkholderia* sp. increased the fresh weight of the aerial and root parts as well as the height of tomato plants. The use of these microorganisms is promising for *Solanum lycopersicum* cultivation in conditions of low fertility and high salinity.

Résumé

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RPCV) ont la capacité d'interagir avec les plantes à travers différents mécanismes d'action, parmi lesquels la production de phytohormones, la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates et les agents antagonistes pour la lutte biologique contre les phytopathogènes se distinguent. Afin de caractériser les microorganismes présents dans un sol salin, dans le présent travail six bactéries ont été identifiées par séquençage du gène de l'ARNr 16S: *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia* sp. *Bacillus megaterium* et *Serratia marcescens*, qui ont montré la capacité de solubiliser le phosphate de calcium, la production d'auxines, en plus de montrer une activité antagoniste *in vitro* contre *Fusarium oxysporum*. Lors d'un essai biologique dans des conditions de serre, *B. megaterium* et *Burkholderia* sp. augmenté le poids frais des parties aériennes et racinaires, ainsi que la hauteur des plants de tomates. L'utilisation de ces micro-organismes est prometteuse dans la culture de *Solanum lycopersicum* dans des sols dans des conditions de faible fertilité et de forte salinité.

María C. Rodríguez Lemus¹
Rigoberto Lozada del Ángel¹
Irma G. López Muraira¹
Juan Florencio Gómez Leyva^{1*}

Palabras clave: Antagonismos, fosfato, PGPR, rizobacterias.

Keywords: Antagonisms PGPR, phosphate, rhizobacteria

Mots-clés: Antagonismes, phosphate, PGPR, rhizobactéries

Introducción

La salinización es la acumulación de sales solubles en el suelo asociadas a sistemas de riego que van aportando sales o bien de forma natural cuando se trata de suelos bajos con planicies que periódicamente son inundados con lluvias de temporal y que al evaporarse se van acumulando las sales; o cuando el nivel de las aguas subterráneas es poco profundo y el agua que asciende por capilaridad contiene sales disueltas. La sal dominante en estos suelos por lo general es cloruro de sodio (NaCl), por lo que también se le nombra suelo salino-sódico. Al converger estos dos

¹Instituto Tecnológico de Tlajomulco
Tecnológico Nacional de México

Correspondencia:
*jfgleyva@hotmail.com

elementos se incrementa la presión osmótica del agua contenida en el suelo, impidiendo el aprovechamiento de los nutrientes por las raíces, ocasionando un desbalance nutricional en las plantas. La calidad del agua y del suelo para la agricultura influye directamente en el rendimiento de los cultivos. La salinización altera las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y por lo tanto su fertilidad (Zhou et al., 2013).

Los microorganismos del suelo son parte primordial en los ecosistemas forestales, muchos de los cuales tienen el potencial de influir significativamente en el crecimiento de las plantas al establecer una relación de simbiosis. Estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) o comúnmente conocidas como PGPR (por sus siglas en inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) fueron definidas por Kloepper y Schroth en 1978. Las BPCV ayudan a mejorar el crecimiento y la nutrición de las plantas, el patrón de crecimiento de las raíces y la respuesta a los factores de estrés externo, incluida la producción de sustancias químicas que promueven el crecimiento (Kloepper, 1991). Alrededor del 2-5% de las bacterias de la rizósfera son BPCV (Antoun y Prevost, 2006). Las BPCV son las herramientas potenciales para una agricultura sostenible y una tendencia para el futuro. Uno de los mecanismos por los cuales las bacterias se adsorben a las partículas del suelo es mediante intercambio iónico.

Las plantas participan constantemente en interacciones con un amplio grupo de BPCV, que colonizan la rizósfera y proporcionan múltiples beneficios en la agricultura al mejorar la productividad de los cultivos, el contenido de nutrientes y suprimir el crecimiento de patógenos. El desarrollo de interacciones beneficiosas entre plantas y microbios basadas en datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabólicos tanto de BPCV como del huésped conducirá a inoculantes microbianos optimizados para mejorar el rendimiento del cultivo y el contenido de nutrientes. Las BPCV son promovidas como una tecnología verde que reducirá el uso de fertilizantes químicos mejorando así la salud del suelo.

Ciertas cepas de bacteria del suelo del género *Xanthomonas* sp y *Pseudomonas* sp como *Pseudomonas fluorescens* presentan actividad antifúngica incrementando el crecimiento de las plantas al producir compuestos que inhibe el crecimiento de pató-

genos o secretando metabolitos o “factores de crecimiento” que aumentan directamente el desarrollo de las plantas (Kennedy, 2019).

Estas bacterias que mejoran el crecimiento de las plantas se producen naturalmente en los suelos, pero no siempre en cantidades lo suficientemente altas como para tener un efecto importante; se dice que un suelo es naturalmente fértil cuando los organismos de este, están liberando nutrientes inorgánicos de las reservas orgánicas a una velocidad suficiente para sostener el rápido crecimiento de las plantas (Goswami et al., 2016). Actualmente los agricultores realizan inoculación de semillas con bacterias antifúngicas, como *P. fluorescens*, para garantizar que las bacterias reduzcan los fitopatógenos del sistema radicular en los cultivos (Kennedy, 2019). El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar bacterias promotoras de crecimiento vegetal, presentes en un suelo salino y su aplicación en el desarrollo del cultivo de jitomate en condiciones de invernadero.

Desarrollo

Las muestras de suelo para el aislamiento de los microorganismos se tomaron en el predio El Llano ubicado entre las coordenadas 20° 17' 83" y 20° 17' 87" latitud norte y entre 103° 51' 44" y 103° 51' 60" en el estado de Jalisco. Los análisis físicos y químicos se realizaron de acuerdo la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.

De la muestra de suelo, se realizaron diluciones decimales seriadas (de 10^1 a 10^{-8}) inoculando a los medios de cultivo en cajas de Petri con 500 μ L, conteniendo Agar Nutritivo (Difco™) a 37°C durante 48 horas, una vez obtenidas las bacterias aisladas y purificadas se sometieron a prueba de tinción de Gram y tolerancia de salinidad en medio Luria Bertani (LB) con diferentes concentraciones de NaCl 5, 10 y 15%. Para la prueba de solubilización de fosfato inorgánico se utilizó el medio SRS (Sundara, Rao, Sinha) Carillo et al. (2015). A partir de las colonias aisladas anteriormente, se realizó una siembra medio SRS que contiene sales de fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ al 2% y se mantiene a 37 °C por 72 h, hasta formar un halo transparente alrededor de la colonia, indicando la solubilización del fosfato tricálcico. Para estas colonias solubilizadoras se calculó el índice de solubilización como: (IS) = diámetro del halo (mm)/diámetro de la colonia (mm).

Caracterización molecular de las bacterias

La amplificación parcial de la región del gen 16S rRNA mediante PCR se realizó en un termociclador SelectCycler de la marca Select Bioproducts. Se utilizaron los cebadores universales 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', MLB 16R 5'-GGC TGC TGG CAC GTA GTT AG-3' (Kullen et al., 2000) a 1 pmol, en una reacción de 25 µL que contienen 100 ng de DNA, 0.2 mM de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerasa, 2 mM de MgCl₂ y Tris HCl 10 mM pH 8.0. Las condiciones para la reacción fueron; una desnaturalización inicial por 3 minutos a 94 °C, seguido de una desnaturalización por 1 minuto a 94 °C, alineamiento por 1 minuto a 56 °C y extensión por 1 minuto a 72 °C con 35 ciclos y una elongación final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, utilizando como agente intercalante bromuro de etidio y un marcador molecular HyperLadder 100 bp. La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones de Zymoclean Gel DNA Recovery kit (Zymo Research Co.). Los productos purificados fueron secuenciados por el método de terminadores fluorescentes. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del NCBI, optimizando para las secuencias altamente similares.

Determinación de compuestos indólicos

La detección y cuantificación de ácido indolacético (AIA) se realizó según la reacción colorimétrica de Salkowski (Glickmann, y Deessaux. 1995). Cada cepa fue cultivada en 5 ml de caldo nutritivo por 24 h, de donde se tomaron 0.6 mL para inocularlos en 5 mL de caldo Tripticasa de Soya suplementado con triptófano al 1%. Después se incubaron a 30 °C, por 7 días, en agitación constante a 150 rpm. Para llevar a cabo la cuantificación, se tomó 1 ml de bacteria, llevado a centrifuga durante 5 minutos a 1400 rpm y se tomaron 150 µL del sobrenadante agregándole 100 µL del reactivo de Salkowski; (200 µL de cloruro de Hierro al 0.5 M más 10 mL de ácido perclórico al 35%; la mezcla fue homogeneizada y llevada a baño maría a 65 °C durante 5 minutos). Las muestras se incubaron 30 minutos para su posterior lectura a 530 nm. Para calcular la cantidad de indólicos producida por cada aislamiento, se empleó la curva de calibración de ácido indolacético de 1 a 30 µg mL⁻¹.

Pruebas de antagonismo contra *Fusarium oxysporum*

Se utilizó la técnica de enfrentamiento en cultivo dual, para lo cual cada rizobacteria se sembró en uno de los cuatro extremos de una caja de petri con medio papa dextrosa agar (PDA), ocupando aproximadamente un cuarto del área total y se incubó a 30 °C por 72 h. A continuación, un fragmento (1 cm² de diámetro) del hongo *F. oxysporum* se depositó en el centro de las cajas de petri a una distancia de 3 cm respecto a las rizobacterias. Después de 5 días de incubación a 30 °C, se midió el radio de la colonia del hongo y de la placa testigo sin bacterias. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula (1).

$$\%inhibición = \frac{RP - RB}{RP} \times 100 \quad (1)$$

Donde *RP* es el radio del patógeno solo y *RB* es el radio del patógeno en presencia de la bacteria.

Discusión y análisis de resultados

En relación a las características de textura del suelo obtenidas mediante el procedimiento de Bouyoucos, los porcentajes de limo, arena y arcilla corresponden, a un suelo franco arcilloso (Cr), con una conductividad eléctrica (CE) de 4.12 dS/m y pH de 10.5 relación 1:5, que corresponde a un suelo salino-sódico, mientras que el porcentaje de materia orgánica fue bajo con el 1.5%.

Identificación y tolerancia de las cepas a NaCl

Los resultados obtenidos en la tolerancia a las concentraciones de NaCl, mostraron que los 40 aislados crecieron de manera óptima en el medio LB (Luria-Bertani) adicionado con 5% de NaCl (0.85 M), mientras que el 75% creció en una concentración de NaCl al 10% (1.7 M), de acuerdo con la clasificación de Donn Kushner, estos aislados entran dentro de la categoría de halófilos moderados y solo el 10% creció en una concentración del 15% de NaCl (2.56 M) por lo que se consideran microorganismos halotolerantes. El producto esperado de 500 pb de la región 16S del RNA ribosomal bacteriano, fue secuenciado arrojando un 99% y 100% de homología, *Bacillus megaterium* y *Serratia marcescens* mientras que para *Pseudomonas* sp. *Burkholderia* sp fue de un 99% y un 90% para *Bacillus* sp.

Tabla 1. Aislados identificados molecularmente mediante secuenciación del gen 16S del RNAr y sus índices de solubilización de fósforo inorgánico, producción de auxinas y porcentaje de inhibición *in vitro* contra *F. oxysporum*.

Bacteria identificada	Solubilización de P (IS)*	Concentración de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inhibición de <i>F. oxysporum</i> (%)
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.4	24.06 \pm 0.5	44
<i>Bacillus megaterium</i>	2.1	28.20 \pm 1.2	48
<i>Burkholderia sp.</i>	0	29.81 \pm 0.7	32
<i>Serratia marcescens</i>	4.66	28.28 \pm 2.1	72
<i>Bacillus sp.</i>	2.5	31.69 \pm 2.7	46
<i>Bacillus sp.</i>	1.6	24.81 \pm 0.9	40

Fuente: Elaboración propia.

*IS= Diámetro del halo (mm)/diámetro de la colonia (mm).

La auxina, el ácido indol-3-acético (AIA), es una fitohormona importante producida por varias cepas de BPCV y es conocido que el tratamiento de las rizobacterias productoras de AIA aumenta el crecimiento de las plantas. La planta bajo el tratamiento de AIA tiene raíces altamente desarrolladas, lo que a su vez le permite absorber mejor los nutrientes ayudando al crecimiento general de la planta. Alrededor del 80% de la microbiota bacteriana en la rizósfera produce AIA (Hayat et al., 2010). Tal como se aprecia con los microorganismos halófilos (ver la Tabla 1).

La actividad antagonista de las cepas aisladas de suelo salino ante el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* que afecta el cultivo de la alfalfa, se obtuvo que 31 de las 40 cepas confrontadas demostraron un efecto antagonista hacia el patógeno. Se observaron diferentes niveles en los porcentajes de inhibición (ver la Tabla 1).

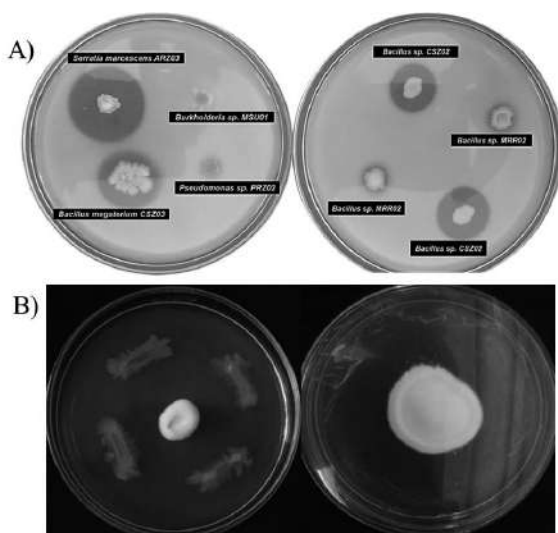


Figura 1. A) Actividad solubilizadora de Fosfato de calcio tricalcico de los aislamientos y B) actividad antagonica contra *F. oxysporum* de *Serratia marcescens*.

En la evaluación de la actividad fosfatasa en medio sólido con fosfato de calcio tricalcico se observó que cinco microorganismos formaron un halo transparente de solubilización de fosfato como se muestra en la Figura 1, de éstos se obtuvieron porcentajes de eficiencia en solubilización que fue de 1.1 a 4 (ver la Tabla 1) esta actividad es importante para incorporar el fosforo insoluble en forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

En la prueba de efectividad biológica realizada en el cultivo de jitomate en invernadero, se realizó la inoculación con cepas de bacterias aisladas, las cuales mostraron producción de AIA, y que participan en el desarrollo de raíces en las plantas, por lo que los microorganismos que producen estos compuestos promueven el crecimiento vegetal *Bacillus megaterium*, *Burkholderia sp.* *Serratia marcescens*, lo cual coincide con un desarrollo vigoroso respecto al control sin inocular en las mismas condiciones (ver la Figura 2).

En conclusión, se aislaron 40 cepas bacterianas a partir de suelos salinos y seis de las cepas promisorias fueron secuenciadas, las cuales mostraron acti-



Figura 2. Efecto de las bacterias halófilas en el crecimiento de jitomate a los 30 días en condiciones de invernadero.

vidad antagonica hacia el hongo fitopatogeno *Fusarium oxysporum*. Las bacterias se clasificaron como halofilos moderados con moderada produccion de acido indol acetico (AIA). Del total de las bacterias aisladas en su caracterizacion molecular se tuvo que el 96% presentaron morfologia bacilar Gram negativas. A partir de los resultados del presente trabajo, es posible formular un consorcio microbiano para promover el desarrollo de plántulas de jitomate en condiciones de suelo salino y baja fertilidad.

Conclusiones

Los microorganismos identificados como moderadamente halofilas, con actividad antagonica hacia el hongo fitopatogeno *Fusarium oxysporum*, solubilizacion de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y produccion de AIA, mostraron que al ser utilizados en la inoculacion de semillas de jitomate favorecen el crecimiento de la planta en comparacion con los testigos que no fueron inoculados. Estos microorganismos pueden crecer en suelos que presentan concentraciones de sales de hasta 2 M de NaCl, por lo que pueden llegar a ser de gran importancia su aplicacion en la produccion de cultivos establecidos en suelos con problemas de salinidad.

Bibliografía

- Ahemad, M., y Khan M. (2012). Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere*. 86: 945-950.
- Banik S. y Dey B. (1983). Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms. *Plant and Soil*. 69: 353-364.
- Bakul, R., Tory, C.; Shin, T, Seiji, T, Kai, X, Akio, M.; Hirohiko, H. y Masahiko, I. (2005). Defects in root development and gravity response in the *aem1* mutant of rice are associated with reduced auxin efflux. *Journal of Plant Physiology*. 162: 678-685.
- Carrillo, K., Colmenares, A. Ramirez, L., Moreno, L., Cárdenas, D. (2015). Caracterización de Actividades Promotoras del Crecimiento Vegetal por Rizobacterias y su Efecto en Cultivo de Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) en Colombia. *Rev.Fac.Nal. Agr.Medellín* 68(1): 7459-7470.
- Dashti N., Zhang F., Hynes R. y Smith D. (1997). Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* L.Merr) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant and Soil*. 33-41.
- Flórez, J., Leal G., Ardila L., Cárdenas D. (2107) Isolation and characterization of rhizobacteria associated with rice crops (*Oryza Sativa* L.) in Norte se Santander Colombia. *Agrociencia*. 51: 373-391.
- Glickmann, E and Y. Deessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkosky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria". *Soil Biology and Biochemistry*. 45: 631-640.
- Gyaneshwar P, Naresh G, Kumar L, Parekh J, Poole P (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. 245: 83-93.
- Guang-Can, T., Shu-tun T, Miao-Ying C, Guang-hui. (2008). Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*. 18(4): 515-523.
- Hayat, R. Ali S., Amara U., Khalid R. and Ahmed I., 2010. Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: A Review. *Annals of Microbiology*, 60(4): 579-598.
- Herrera R. (2013) Flora bacteriana asociada a cultivos de jitomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en el Estado de Puebla. Tesis de licenciatura, Escuela de Biología 85, BUAP, México.
- Hernández, A., Medina, A., Quiñones, M., Hofte, M., Heydrich, M. y Hernández, A. (2004) Strain identification of Burkholderia cepacia and Pseudomonas fluorescens associated to maize crop by polyphasic taxonomy. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2: 22-26.
- Klopper, W., Ran, L., Zablotowicz, R. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. 7(2).
- Kennedy, I. R. e Islam, N. (2001). The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 39-44.
- Kucey R. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal Soil Science*. 671-678.
- Kucey R, Jenzen H, Leggett M. (1989). Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron*. 42: 199-228.
- Kullen M. J., Sanozky-Dawes R. B., Crowell D. C., Klenhammer T. R. 2000; Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol*. 89: 511-516.
- Postma, J.; Montanari, M. y Van den B. (2003). Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. *Eur. J. Soil Biol*. 39: 157-163.

- Malik, K, Rakhshanda, B, Mehnaz, S, Rasul, G. y Mirza, M. (1997) Association of nitrogen-fixing plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil*. 194: 37-44.
- NCBI-National Center for Biotechnology Information. (s.f.) Base de datos Nucleotide BLAST. Recuperado el 20 de junio de 2020, de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- NOM-021-RECNAT-2000. Recuperado el 24 de junio de 2020 de, <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>.
- Rico, M. (2009) Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y *Actinomicetos* aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas alto andinas del Perú. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
- Rojas, M. y Caballero M. (2005) Caracterización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* aislado de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas en Cuba. Tesis de grado. Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Cuba.
- Romero, A.M., Correa, O. S., Moccia, S. and Rivas, J. G. (2003). Effect of *Azospirillum* mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology*. 832–838.
- Sahoo, R., M. Ansari, T. Dangar, S. Mohanty, and N. Tuteja. 2013. Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. *Protoplasma*. 251: 511-523.
- Sánchez, L., Corrales L.(2005) Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*. 3: 1-16.
- Torres-Rubio, M. G.; Valencia-Plata, S. A.; Bernal-Castillo, J. y Martínez-Nieto, P. (2000) Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 171-176.
- Thakuria, D, Talukdar N, Goswami, C., Hazarika, S, Boro, R. y Khan, M. (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*. 86: 978-985.
- Welbaum, G.; Sturz, A. V.; Dong, Z. y Nowak, J. (2004) Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci*. 23: 175-193.
- Yanni, Y. G. y Aust, J. (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. *Plant Physiol*. 28: 845-870.
- Zhou, D.; Lin, Z.; Liu, L.; Zimmermann, D. 2013. Assessing secondary soil salinization risk based on the PSR sustainability framework. *J. Environ. Manage*. 128(15): 642-654.