

## SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN PIMENTÓN Y MAÍZ

Isbelia Reyes<sup>1</sup>, Luimar Alvarez<sup>1</sup>, Hind El-Ayoubi<sup>1</sup> y Alexis Valery<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se seleccionó un grupo de rizobacterias Gram negativas, provenientes de diferentes suelos rizosféricos y plantas del estado Táchira por su capacidad fijadora de N y/o disolvente de fosfatos inorgánicos. Mediante pruebas bioquímicas se caracterizaron ocho rizobacterias no-diazotróficas y 17 diazotróficas pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*. El efecto de las rizobacterias se evaluó en la germinación, crecimiento y asimilación de N y de P en el tejido vegetal de plantas de pimentón (*Capsicum annuum*) y maíz (*Zea mays*) en condiciones de umbráculo. El efecto de la bioinoculación de las cepas pre-seleccionadas se evaluó en la germinación de semillas de estos cultivos, encontrándose que algunas cepas bacterianas promovieron el porcentaje de germinación entre las que se destacaron, para las semillas de pimentón las cepas 17 y 20 que correspondieron a un *Azotobacter* y un bacilo Gram negativo, y para el maíz las cepas 1 y 23, otro bacilo Gram negativo y un *Azospirillum*, respectivamente. En condiciones de umbráculo la cepa 1 y el *Azospirillum* 23 incrementaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el % de N, y el *Azospirillum* 23 el % de P en el tejido foliar del maíz; mientras que en el pimentón la mayoría de las cepas evaluadas incrementaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el porcentaje de N. En la discusión se enfatiza el proceso de selección de potenciales bioinoculantes y algunas consideraciones biológicas relativas a la interacción planta-microorganismo.

**Palabras clave adicionales:** *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, bioinoculantes

### ABSTRACT

#### Selection and evaluation of growth promoting rhizobacteria on pepper and maize

A group of Gram negative rhizobacteria able to fix atmospheric nitrogen and to solubilize inorganic phosphate was chosen from different plant rhizospheric soils of Táchira State. Eight non-diazotrophic and seventeen diazotrophic rhizobacteria belonging to the genus *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Rhizobium* were characterized using biochemical tests. The effect of these rhizobacteria was evaluated on the germination, growth and N and P uptake of pepper (*Capsicum annuum*) and maize (*Zea mays*) in greenhouse conditions. The bioinoculation effect of pre-selected strains was evaluated on seedling germination. It was found that strains 17 and 20, an *Azotobacter* sp. and a Gram negative rod, respectively, promoted pepper germination; while the strains 1 and 23, another Gram negative rod and an *Azospirillum*, respectively, promoted maize germination. In greenhouse conditions the strain 1 and *Azospirillum* 23 increased significantly ( $P \leq 0.05$ ) the N uptake, and *Azospirillum* 23 the P uptake in maize aerial tissue; while most of the evaluated strains increased significantly ( $P \leq 0.05$ ) N uptake in pepper. Discussion is centered on the selection of potential bioinoculants and some biological considerations related to the plant-microbe interaction.

**Additional key words:** *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, bioinoculants

### INTRODUCCIÓN

Actualmente es de gran interés restaurar la microflora del suelo mediante estrategias que permitan mejorarlo en relación a la productividad agrícola y de una manera no contaminante. Sin embargo, la forma más común de incorporar nutrientes al suelo ha sido, en las últimas décadas, en forma de fertilizantes químicos. El uso indiscriminado de estos insumos inorgánicos ha

alterado significativamente los constituyentes orgánicos y vivos del suelo, y con ello su equilibrio ecológico, modificando principalmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema. Barea et al. (2005) señalan que la disponibilidad de nutrientes en el suelo a través de las interacciones biológicas beneficiosas (sinérgicas) entre los diversos componentes que promuevan los procesos ecológicos, debe ser comprendida y

---

Recibido: Marzo 26, 2007

Aceptado: Febrero 11, 2008

<sup>1</sup> Decanato de Investigación, Universidad Nacional Experimental del Táchira. Apdo. 5001. San Cristóbal. Venezuela.  
e-mail: isreyes@unet.edu.ve

manejada en la explotación sostenible de los suelos.

En general, los microorganismos desarrollan actividades relacionadas con los procesos de descomposición y mineralización de complejos orgánicos y la traslocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan la movilización de los nutrientes en el ecosistema suelo-planta. Se plantea que el uso constante de agroquímicos en la agricultura ha motivado a mejorar la comprensión de las actividades cooperativas que se establecen en el suelo entre la microbiota y las plantas; y que si bien la microfauna también afecta el crecimiento de las plantas y las cadenas tróficas del suelo, los microorganismos deben entenderse como asociaciones microbianas que interactúan entre sí (Barea et al., 2005).

El suelo es un hábitat complejo donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos, estando muchas de estas poblaciones asociadas a las raíces de las plantas en la zona rizosférica (Reyes et al., 2006). En los microambientes de esta zona están asentadas poblaciones microbianas asociadas a la presencia de los exudados radicales y que participan en la formación de los microagregados rizosféricos ricos en metabolitos microbianos principalmente del tipo aminoácidos y polisacáridos (Caesar-TonThat et al., 2007). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (RPCP) son bacterias benéficas que se presentan como una alternativa a los fertilizantes químicos y plaguicidas (Kloepper y Beauchamp, 1992). Estas poblaciones microbianas rizosféricas son capaces de ejercer efectos específicos sobre el crecimiento vegetal como la producción de fitohormonas, disolución y mineralización de los fosfatos, fijación asimbiótica del nitrógeno atmosférico y producción de sideróforos y antibióticos (Vessey, 2003).

En general, la competencia por nutrientes genera en la rizósfera interacciones microbianas acordes al metabolismo de la planta debido a la liberación de sustancias difusantes, secreciones, lisados, gases y mucílagos (Benizri et al., 2001). Así mismo, el establecimiento de poblaciones competitivas de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas depende principalmente de aspectos puntuales como la colonización rizosférica de la planta, dada por la liberación de

sus exudados radicales, y la capacidad de respuesta genética y quimioatrayente del microorganismo hacia la rizósfera (Bacilio-Jiménez et al., 2003).

Hoy en día, los biofertilizantes son considerados como un componente del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal en la planta hospedera (Vessey, 2003). En pruebas experimentales y de campo el efecto de los biofertilizantes ha sido reconocido como una forma de manejo sostenible de los agroecosistemas (Dobbelaere et al., 2003; Lucy et al., 2004); sin embargo, el éxito de la utilización de estos biopreparados reside en el estudio de cepas compatibles y muchas veces específicas a un cultivo y las condiciones ecológicas del suelo.

Cultivos como los cereales y las hortalizas son recursos de gran importancia económica en las regiones del estado Táchira. El manejo inapropiado de los suelos en pendiente y la continua degradación de los mismos por los efectos climáticos y edáficos, la baja disponibilidad de N y de P, principalmente, y los problemas de contaminación de los suelos, aguas y alimentos por el uso excesivo de agroquímicos exigen la gestión agrícola en términos de sostenibilidad. Por lo tanto, la evaluación de microorganismos promotores del crecimiento de plantas, entre ellos bacterias fijadoras de N y/o con capacidad disolvente de fosfatos inorgánicos representa una opción para el manejo sostenible de estos agroecosistemas. De allí la necesidad de realizar aislamientos en los suelos y cultivos de interés para el estado Táchira y seleccionarlos como bioinoculantes en relación a su efecto en la producción vegetal. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue seleccionar, a partir del ceparium del Laboratorio de Biofertilizantes de la Universidad Nacional Experimental del Táchira, rizobacterias con potencial promotor del crecimiento y estado nutricional de plantas cultivables, utilizando como cultivos indicadores al pimentón y maíz, bajo condiciones de laboratorio y umbráculo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen del material microbiológico

Se utilizaron 24 aislamientos bacterianos previamente obtenidos de la rizósfera de *Brachiaria decumbens*, *B. humidicola*, *Phaseolus vulgaris* y *Theobroma cacao*, entre las plantas de interés agropecuario y *Ageratum* sp., *Iresine herbotit*, *Piptadenia* sp. y *Bacharis* sp. entre las plantas silvestres, todas ellas provenientes de diferentes localidades del estado Táchira; y un aislamiento bacteriano obtenido del interior de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Todas estas bacterias fueron aisladas por su capacidad para disolver fosfatos de calcio y/o fijar nitrógeno en forma asimbiótica, y las mismas se encuentran depositadas en el ceparium del Laboratorio de Biofertilizantes de la Universidad Nacional Experimental del Táchira.

### Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las rizobacterias

Las bacterias se caracterizaron físicamente mediante la observación al microscopio con la prueba de Gram, la motilidad en gota pendiente, la presencia de cápsula con la tinción negativa y la presencia de volutina con azul de metileno diluido. Se utilizaron como pruebas fisiológicas para diferenciar los géneros diazotróficos *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Azospirillum*, el crecimiento de *Azotobacter* en el medio de manita (Holt y Krieg, 1994), el de *Rhizobium* en los medios de ELMARC, agar glucosa peptona púrpura de bromocresol (GPA) y agar extracto de levadura manitol azul de bromotimol (ELMABAT) (Ferrara, 1993), y el de *Azospirillum* en el medio Nfb-glucosa (Döbereiner et al., 1999), buscando caracterizar la obtención de estos tres géneros según Holt y Krieg (1994) y Holt et al. (2000).

Las pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización posterior de cada uno de los aislamientos fueron: la actividad de la catalasa utilizando el peróxido de hidrógeno como sustrato, la tolerancia salina evaluándose según el crecimiento en medio de cultivo líquido al 2, 3 y 5% de NaCl (Holt y Krieg, 1994), la disolución de fosfatos utilizándose los medios MM (medio mínimo, de Reyes et al., 1999), manita, ELMARC y Nfb-glucosa, sustituyendo la fuente soluble de fosfato por HA (hidroxiapatita), fosfatos de hierro

(FePO<sub>4</sub>) y de aluminio (AlPO<sub>4</sub>), según fuese el caso. Para esto, se sembró en el medio sólido 5 µL del inóculo en fase de crecimiento exponencial y se observó, a partir de las 24 h durante 5 días, la presencia de crecimiento y/o formación de un halo de disolución de los fosfatos. Todas estas pruebas permitieron realizar una primera pre-selección de las diferentes cepas bacterianas con potencial promotor del crecimiento vegetal.

### Preparación de los inóculos bacterianos

Las cepas utilizadas como inóculos se mantuvieron activas mediante la siembra en los medios de cultivo sólidos y específicos favorables para sus respectivos crecimientos, como se indicó en la sección precedente, según fueran cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* o *Azotobacter*. Para la producción del inóculo, cada cepa se sembró en fiolas de 50 mL con 30 mL del MM líquido excepto *Azospirillum*, el cual se cultivó en el medio líquido Nfb, por triplicado y un testigo sin inocular. Todas las manipulaciones se efectuaron en la cámara de siembra y las fiolas inoculadas se llevaron a un agitador a 100 rpm y temperatura ambiente hasta observar el crecimiento bacteriano. En condiciones de esterilidad se extrajeron de cada fiola 5 mL del inóculo para medir el crecimiento bacteriano por espectrometría (Perkin Elmer Lambda 2, Fiass 300) a 560 nm y obtener una concentración final del inóculo entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>.

### Desinfección e inoculación de las semillas

Las semillas se lavaron con agua corriente para eliminar los productos químicos de la certificación de las semillas y diez veces con agua destilada desionizada estéril para eliminar las trazas residuales de los mismos. Luego se desinfectaron por inmersión en etanol al 80% durante tres minutos y se lavaron cinco veces consecutivas con agua destilada y desionizada estéril. Seguidamente, se les agregó hipoclorito de sodio al 5,25 % por 15 minutos y se lavaron diez veces consecutivas con agua destilada desionizada estéril; por último, se les dejó escurrir en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar (Telstar, mod. BioIIB).

Las semillas desinfectadas se inocularon utilizando alginato de sodio como adherente (Viveganandan y Jauhri, 2000), para lo cual se preparó una solución de alginato de 2 % y se

agregaron 5 mL de la misma a una fiola 25 mL conteniendo el inóculo a una concentración entre 107 y 108 células·mL<sup>-1</sup>. La suspensión se homogeneizó con la ayuda de un vortex y se colocaron dentro de la fiola 100 semillas previamente desinfectadas. Todo se llevó a un agitador durante una hora. Por último, se transportó el material biológico inoculado a una cámara de flujo laminar dejándose escurrir las fiolas a través de un colador de gasa médica estéril, hasta obtener un secado de las semillas a la temperatura ambiente.

### **Efecto de las bacterias con potencial promotor del crecimiento en la germinación de semillas de pimentón y maíz**

Las rizobacterias seleccionadas con criterios bioquímicos fueron evaluadas en la germinación de semillas de pimentón (*Capsicum annuum*) de la variedad Cacique y en semillas de maíz (*Zea mays*) de la variedad Himeca 3005. Para esto se procedió a la inoculación bacteriana y siembra de 100 semillas por cepa, y 100 semillas para el testigo respectivo no inoculado, utilizando cápsulas de Petri con agar agua al 8 %. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, excepto los del maíz por no disponer de suficiente material biológico. Las semillas se mantuvieron en condiciones de oscuridad y se contaron diariamente hasta que se obtuvo el máximo de semillas germinadas. Esta etapa permitió realizar una segunda pre-selección de las diferentes cepas bacterianas con potencial promotor del crecimiento en pimentón y/o maíz.

### **Bioinoculación del pimentón y maíz en condiciones de umbráculo**

Para los ensayos en umbráculo se escogieron siete cepas bacterianas: tres con el mejor efecto en la germinación de las semillas de cada especie vegetal, pimentón o maíz, y las restantes de mediana a baja germinación. El suelo utilizado fue recolectado en la Unidad Académica de la UNET “La Primavera”. El análisis del suelo indicó que el mismo es de textura franca, con 2,21% de materia orgánica, pH 5,57, 12 mg·kg<sup>-1</sup> de P, 86 mg·kg<sup>-1</sup> de K, 1490 mg·kg<sup>-1</sup> de Ca y 133 mg·kg<sup>-1</sup> de Mg; y para los microelementos, 22 mg·kg<sup>-1</sup> de Mn, 8 mg·kg<sup>-1</sup> de Zn, 12 mg·kg<sup>-1</sup> de Fe y 1 mg·kg<sup>-1</sup> de Cu.

Las semillas inoculadas de pimentón y de maíz

se llevaron a germinación en condiciones de laboratorio en cápsulas de Petri y luego se transplantaron a macetas utilizando el mismo suelo no estéril de la Unidad Académica de “La Primavera”. A los 21 días y con una altura de 3 cm y cuatro o cinco hojas verdaderas, las plántulas de pimentón se transplantaron en bolsas de polietileno con 5 kg de suelo, el cual fue manipulado preservando su estructura física, por lo cual se le consideró como un microcosmos. Después del trasplante, se realizó una segunda inoculación de bacterias en forma líquida para asegurar los tratamientos. Para el maíz se colocaron cuatro semillas inoculadas por microcosmos de 5 kg de suelo, después de germinadas y con plántulas de escasos 5 cm de altura se realizó un raleo dejando una planta por bolsa con características similares según fuese su tratamiento.

La fertilización se realizó, en ambos cultivos, cada tres días con una solución nutritiva de Hoagland a un cuarto de fortaleza, pero sin N ni P, hasta la cosecha. El riego se realizó en forma diaria. Por último, para el pimentón se cosechó el ensayo a las nueve semanas después del trasplante, y el maíz a las seis semanas.

Para evaluar la evolución de los diferentes tratamientos en los cultivos de pimentón y maíz se monitoreó la altura, el número de hojas y el número de botones florales, según fuese el caso. En las cosechas respectivas del material vegetal se separaron las partes aéreas de las plantas para la determinación del peso seco. El material aéreo se colocó en bolsas de papel rotuladas, secadas y previamente pesadas en una balanza analítica, y llevado a una estufa con circulación de aire forzado a 70 °C durante 72 horas para la determinación del peso seco. Una vez secas y pesadas las muestras se molieron en un molino de acero inoxidable (IKA-Werke), se les determinó el contenido de nitrógeno en el tejido foliar por el método micro-Kjeldhal y el de fósforo por colorimetría con el método del molibdato de amonio (Jones, 2001). Ambos experimentos se realizaron utilizando un diseño experimental completamente al azar, con ocho tratamientos: siete cepas bacterianas y un control no inoculado; cada tratamiento se realizó por quintuplicado. Las unidades experimentales fueron 40 microcosmos para cada cultivo. Los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza luego de

comprobar el supuesto de homogeneidad de la varianza. La comparación entre las medias se realizó utilizando la prueba de la menor diferencia significativa (LSD). Este análisis estadístico se hizo utilizando el programa SAS, versión 8.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Herramientas bioquímicas para la pre-selección de rizobacterias promotoras del crecimiento

De un grupo de 25 aislamientos bacterianos Gram-negativos, 8 fueron bacilos no diazotróficos y 17 bacterias diazotróficas, provenientes de diferentes plantas y localidades del estado Táchira (Cuadro 1). El primer parámetro que se consideró

para realizar una primera selección de los aislamientos fue su capacidad de fijar nitrógeno. De los aislamientos que crecieron en el medio de manita, sólo aquellos que presentaron cápsulas (aislamientos 9, 11, 17, 21, 22) se consideraron como bacterias del género *Azotobacter* (Cuadro 2), aunque hay especies de este género que no la presentan y deben identificarse por medio de otras pruebas. El género *Rhizobium* (aislamientos 24 y 25) fue confirmado por la formación de nódulos con *P. vulgaris*, y *Azospirillum* (aislamientos 3, 8, 12 y 23) por su crecimiento en el medio Nfb-glucosa y su condición microaerófila. Los aislamientos diazotróficos tienen la ventaja de ser bacterias no patogénicas que pueden aportar N al suelo y a la rizósfera de la planta.

**Cuadro 1.** Origen de los diferentes aislamientos utilizados como bioinoculantes

Aislamiento	Código	Localidad	Planta	Tipo de bacteria
1	B4Pd	U.A. <sup>a</sup> “La Primavera”	<i>Brachiaria decumbens</i>	Bacilo Gram-negativo
2	B1Pd	U.A. “La Primavera”	<i>B. decumbens</i>	Diazotrófica asimbiótica
3	Azos3Pd	U.A. “La Primavera”	<i>B. decumbens</i>	<i>Azospirillum</i> sp.
4	Bh6M	U.A. “La Morusca”	<i>B. humidicola</i>	Diazotrófica asimbiótica
5	Bd3M	U.A. “La Morusca”	<i>B. humidicola</i>	Diazotrófica asimbiótica
6	Bd1M	U.A. “La Morusca”	<i>B. humidicola</i>	Diazotrófica asimbiótica
7	Bh1M	U.A. “La Morusca”	<i>B. humidicola</i>	Diazotrófica asimbiótica
8	Bd5AM	U.A. “La Morusca”	<i>B. decumbens</i>	<i>Azospirillum</i> sp.
9	Bd3SR	U.A. “Santa Rosa”	<i>B. decumbens</i>	<i>Azotobacter</i> sp.
10	Bh2SR	U.A. “Santa Rosa”	<i>B. humidicola</i>	Diazotrófica asimbiótica
11	Azo8hSR	U.A. “Santa Rosa”	<i>B. humidicola</i>	<i>Azotobacter</i> sp.
12	Bd5ASR	U.A. “Santa Rosa”	<i>B. decumbens</i>	<i>Azospirillum</i> sp.
13	MF2	Minas <sup>b</sup> de “Monte Fresco”	<i>Ageratum</i> sp.	Bacilo Gram-negativo
14	B3	Parque Paramillo	Gramínea	Bacilo Gram-negativo
15	MF4	Minas de “Monte Fresco”	<i>Ageratum</i> sp.	Bacilo Gram-negativo
16	BC5	Cafetal de sombra	<i>Desmodium</i> sp.	Bacilo Gram-negativo
17	MF6a	Minas de “Monte Fresco”	<i>Iresine herbotit</i>	<i>Azotobacter</i> sp.
18	MU2	U.A. “La Primavera”	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Bacilo Gram-negativo
19	BC1	Sector Los Barros	<i>Piptadenia</i> sp.	Bacilo Gram-negativo
20	MF6b	Minas de “Monte Fresco”	<i>I. herbotit</i>	Bacilo Gram-negativo
21	C5	U.A. “La Morusca”	<i>Theobroma cacao</i>	<i>Azotobacter</i> sp.
22	MF 10a	Minas de “Monte Fresco”	<i>Bracharis</i> sp.	<i>Azotobacter</i> sp.
23	HM	U.A. “La Primavera”	<i>L. sativa</i>	<i>Azospirillum</i> (endófito)
24	H33	U.A. “La Primavera”	<i>L. sativa</i>	<i>Rhizobium</i> sp.
25	H45	U.A. “La Primavera”	<i>L. sativa</i>	<i>Rhizobium</i> sp.

<sup>a</sup>: U.A.: Unidad Académica de la Universidad Nacional Experimental del Táchira; <sup>b</sup>: Minas de Fosfatos en San Pedro del Río, estado Táchira

Las bacterias diazotróficas pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, han sido consideradas de importancia agrícola por su acción como RPCP al producir fitohormonas

como las auxinas, citocininas, giberelinas y la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC)-deaminasa, sustancias que favorecen el desarrollo del sistema radical y el crecimiento de

las plantas (Dobbelaere et al., 2003). Esto ocurre por un aumento de la división celular al alargar la raíz y promover la formación de pelos radicales, y en consecuencia, la resistencia al estrés osmótico por aumento de clorofila, K, Ca, azúcares solubles y contenido de proteínas (Kennedy et al., 2004).

Una característica de importancia secundaria como la motilidad (Cuadro 2) se encontró en 14 de los 25 aislamientos. Este fenotipo tiene importancia en la dispersión de la rizobacteria desde el suelo o punto de inoculación hacia el gradiente quimioatractivo de las semillas en el proceso de germinación y/o de los exudados radicales de la planta, asegurando la colonización de las raíces (Bacilio-Jiménez et al., 2003). Sin

embargo, otros autores señalan que la falta de motilidad puede ser favorable cuando se realizan inoculaciones en la semilla o raíz, pues se asegura su permanencia en el sitio de inoculación (van Veen y Heijnen, 1994). La capacidad de almacenamiento de polifosfatos inorgánicos o volutina se encontró en 15 aislamientos, este rasgo le permite a la bacteria asegurar su sobrevivencia al acumular en el citoplasma, como fuente de energía, gránulos de polifosfatos de aspecto cristalino impidiendo que el P sea fijado en el suelo (Beever y Burns, 1980). Sin embargo, en suelos pobres en fosfatos este tipo de bacterias pudiera competir por este elemento con la planta (Reyes et al., 2002).

**Cuadro 2.** Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos

Aislamiento	Cápsula	Motilidad	Volutina	Catalasa	Manita	HCl			Crecimiento		
						2%	3%	4%	3%		
1	-	-	+	-	+	+	+	-	HA	FePO <sub>4</sub>	AlPO <sub>4</sub>
2	-	-	+	-	+	-	-	-	+(2) <sup>b</sup>	+	+
3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
4	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
5	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
6	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
7	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	+	-	-	-	+(2)	+	+
9	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+	+	-	+(1)	+	+
11	+	+	-	+	+	+	+	+	+(2)	+	+
12	-	+	+	+	+	-	-	+	+(2)	+(1)	+
13	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
14	-	+	-	+	+	+	+	+	+(2)	+	+
15	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
16	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
17	+	+	-	+	+	+	+	+	+(1)	+	+
18	-	-	+	+	-	+	-	+	+(1)	+	+
19	-	-	-	+	+	-	-	-	+(1)	+	+
20	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
21	+	-	+	+	+	+	+	+	+(1)	+	+
22	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
23	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
24	-	+	-	+	-	+	+	+	+(1)	+	+
25	-	-	+	+	-	+	-	+	+(1)	+	+

Reacción negativa:-; reacción positiva: +; <sup>b</sup>: Halo ausente: -; halo con radio <1 mm después del borde de la colonia: (1); halo con radio >1 mm y < 3 mm después del borde de la colonia: (2)

Un total de 16 aislamientos resultaron ser positivos a la reacción de la catalasa (Cuadro 2), enzima que se consideró como un criterio de selección ya que las enzimas antioxidantes como

la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa y catalasa producidas por las células microbianas pueden neutralizar y controlar la formación de radicales libres, además de aumentar la tolerancia

al estrés oxidativo, lo que contribuye a la defensa de las plantas contra patógenos. Se ha reportado en remolacha que la inoculación con *Azotobacter chroococcum* aumentó la actividad de las enzimas SOD, peroxidasa y catalasa, y también aumentó el contenido de clorofila y carotenos en las hojas (Dobbelaere et al., 2003).

De acuerdo a la resistencia a concentraciones hipertónicas salinas, nueve aislamientos fueron halotolerantes y nueve halosensitivos (Cuadro 2). Algunos microorganismos como *Azospirillum brasilense* han demostrado reducir los efectos negativos ocasionados en el crecimiento de las plantas por el uso de aguas salinas para irrigación (Hamaoui et al., 2001). Igualmente se ha reportado que bacterias halotolerantes pueden estar implicadas en la liberación de minerales a partir de las rocas (Barea et al., 2005).

Un parámetro de importancia considerado para la selección de los aislamientos y su caracterización fue la disolución de los fosfatos inorgánicos relativamente insolubles. Se observó que tres aislamientos no presentaron crecimiento en el medio con HA, y 13 aislamientos disolvieron este tipo de fosfato de calcio (Cuadro 2), de los cuales cinco aislamientos presentaron halos de disolución con un radio mayor a 1 mm y ocho aislamientos con un radio menor a 1 mm, mientras que el resto de los aislamientos no mostraron una reacción visible de disolución de la HA. En la prueba con  $\text{FePO}_4$ , como única fuente de fósforo, sólo el aislamiento 11 mostró un pequeño halo visible de disolución, aunque el resto de los aislamientos sólo presentó crecimiento. Igualmente para el  $\text{AlPO}_4$ , los 25 aislamientos crecieron pero no mostraron visiblemente la disolución de este fosfato (Cuadro 2).

Un crecimiento positivo del microorganismo y la ausencia de un halo de disolución con la fuente del fosfato inorgánico puede interpretarse como una disolución leve ocasionada por la extrusión de protones al asimilarse el amonio del medio de cultivo dentro de la célula (Reyes et al., 1999). Este tipo de prueba *in vitro* es un buen indicio del potencial microbiano; sin embargo, el intercambio de señales químicas y la disponibilidad de factores bioquímicos para el crecimiento microbiano pudiera generar cambios en esta actividad al hallarse el microorganismo en la rizósfera. En este sentido, Goldstein et al. (1999) reportaron una relación mutualística entre *Helianthus agnus*

*jaegeri* y una rizobacteria que sólo expresó su fenotipo disolvente de fosfatos en presencia de los exudados radicales de la planta.

### Efecto promotor del crecimiento de las rizobacterias seleccionadas sobre la germinación de las semillas de pimentón y maíz

Las cepas bacterianas 1, 7, 11, 12, 13, 17, 20, 23, 24 y 25 fueron seleccionadas por ser principalmente bacterias diazotróficas y/o disolventes de fosfatos (Cuadro 2) presentando la mayor motilidad, producción de catalasa y/o acumulación de volutina. Las cepas bacterianas inoculadas ejercieron un efecto diferente en el porcentaje de germinación de las semillas de pimentón y de maíz. Las cepas 11, 17, 20, 23 y 25 incrementaron significativamente el porcentaje de germinación de las semillas de pimentón, mientras que la cepa 24 mostró el efecto más negativo, tanto para el pimentón como para el maíz, comparada con los resultados de los testigos no inoculados (Cuadro 3). Para el maíz, a falta de un respaldo estadístico, se consideró una respuesta positiva a la germinación incrementos del orden de 20 % por encima del testigo, por lo que sólo las cepas 1 y 23 ejercieron una tendencia positiva sobre este parámetro (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Efecto de la inoculación de rizobacterias en el porcentaje de germinación de las semillas de pimentón a los nueve días y de maíz a los cinco días

Cepas	Pimentón (%) <sup>a</sup>	Maíz (%) <sup>b</sup>
Testigo	71 ef	56
1	74 cde	77
7	71 def	57
11	76 bcd	57
12	74 cde	67
13	74 cde	63
17	80 ab	54
20	78 abc	63
23	76 bcd	77
24	67 f	39
25	82 a	53

<sup>a</sup>. Valores con las mismas letras no presentan diferencias estadísticamente significativas a  $P \leq 0,05$  según la prueba de LSD. <sup>b</sup>. No se realizaron réplicas. Resultado en base a 100 semillas

Las cepas que mostraron un incremento significativo cercano al 10% respecto al testigo no

inoculado en la germinación del pimentón fueron caracterizadas como un *Rhizobium* sp. (cepa 25) y un *Azotobacter* sp. (cepa 17); mientras que en el maíz, los incrementos en la germinación fueron dados por un bacilo Gram negativo no identificado (cepa 1) y *Azospirillum* sp. (cepa 23).

La evaluación de la germinación de las semillas de maíz y pimentón por las cepas seleccionadas permitió realizar una segunda selección de bioinóculos potenciales que ejercieran un efecto positivo en el crecimiento y en la asimilación de nutrientes de estas dos especies vegetales en condiciones de umbráculo. Es interesante resaltar que el efecto de la inoculación de las rizobacterias en la germinación de las semillas de pimentón y maíz se expresó en forma diferente: las cepas bacterianas que mejoraron la germinación del pimentón no fueron las que ejercieron la mejor tendencia sobre la germinación del maíz. Se ha reportado una sensibilidad específica de las semillas ante las diferentes sustancias inductoras producidas por las rizobacterias y sus concentraciones respectivas. Por ejemplo, dependiendo de las concentraciones usadas las lectinas producidas por *Azospirillum* spp. estimularon o inhibieron la tasa de germinación de semillas de trigo (Nikitina et al., 2004).

También se conoce que altas concentraciones de etileno o una alta sensibilidad de las semillas de *Arabidopsis* a esta hormona puede resultar en una inhibición de su germinación (Schaller y Kleber, 2002). Además, se ha encontrado en tomate que una bacteria en particular puede ejercer un efecto benéfico o detrimental en el crecimiento de la planta, dependiendo de la especie vegetal, de la concentración de la bacteria y de las condiciones de crecimiento (Belimov et al., 2007).

### **Selección de potenciales bioinoculantes en pimentón y maíz**

Se seleccionaron siete cepas bacterianas con potencial como bioinoculantes para cada cultivo, descartando tres cepas con negativo o bajo impacto en la germinación de las semillas de pimentón (cepas 1, 7 y 24) y de maíz (cepas 7, 20 y 24). Durante el crecimiento del pimentón se encontraron incrementos significativos ( $P \leq 0,05$ ) en la altura con todas las cepas inoculadas y en el

número de hojas con las cepas 11, 13, 20, 23 y 25; y similarmente, en medidas postcosecha como el largo de la raíz y peso seco radical con las cepas 17, 20 y 23, y 23, 20 y 25 respecto al testigo no inoculado (datos no mostrados).

Todos los bioinóculos aplicados al cultivo de pimentón incrementaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el peso seco, la concentración de N en el tejido y la cantidad de N extraído por la planta, respecto al testigo no inoculado, excepto la cepa 25 (Cuadro 4). Los resultados para P indicaron que la inoculación de las diferentes cepas ejerció una disminución significativa en el porcentaje de P del tejido aéreo de las plantas (Cuadro 4), mostrándose este elemento más crítico que el N, posiblemente debido a su inmovilización en la biomasa microbiana rizosférica y a la alta demanda por parte de las plantas inoculadas, lo que podría crear un efecto de dilución en el tejido foliar. Sin embargo, esta última justificación no explica completamente los resultados ya que, a diferencia del P, la concentración del N en todos los tratamientos se mantuvo significativamente superior a la del testigo no inoculado. Es importante resaltar que las plantas se cosecharon cuando el cultivo estaba en floración por lo que se sospecha que el P pudo haber sido trasladado desde el tejido vegetativo hasta la flor en los tratamientos con mayor número de botones florales (Cuadro 4), lo que explicaría la alta concentración de P en el tejido vegetativo del testigo, debido a una retardada y menor traslocación de P.

Los tratamientos 23, 11 y 20 mostraron entre 4 y 7 más botones florales que el testigo. Es de notar que los botones florales no se incluyeron en el peso seco aéreo, por lo que no se pudo cuantificar exactamente el P total extraído por la planta en la parte aérea, lo que habría permitido demostrar, probablemente, que la bacteria con carácter endofítico, el *Azospirillum* cepa 23, y la rizobacteria *Azotobacter* cepa 11, extrajeron la mayor cantidad de P del suelo.

De acuerdo a los resultados reportados por Naeem et al. (2002) para ají, la floración de 42 días con una fertilización de NPK de 30-60-30 se extendió a 52 días con 60-0-30, lo que indica la importancia del P en la floración. Entre los bioinóculos aplicados al pimentón en condiciones de umbráculo, el *Azospirillum* cepa 23, fue el que

mejor logró compensar las demandas de N y de P por parte de la planta, generando plantas

de mayor tamaño, robustas y con mayor número de botones florales.

**Cuadro 4.** Efecto de la inoculación de rizobacterias en el número de botones florales, peso seco aéreo y contenido de N y P del pimentón a los 63 días en condiciones de umbráculo

Tratamiento	Número de botones florales	Peso seco (g·planta <sup>-1</sup> )	% N	g N·planta <sup>-1</sup>	% P	g de P·planta <sup>-1</sup>
Testigo	10,7 d	2,40 d	3,22 c	0,08 c	0,60 a	0,014 ab
11	16,0 ab	4,69 ab	3,64 ab	0,18 ab	0,32 bc	0,015 ab
12	12,6 cd	3,50 c	4,03 a	0,14 b	0,38 bc	0,014 ab
13	12,1 d	3,63 bc	3,96 a	0,14 b	0,40 bc	0,016 ab
17	11,3 d	3,55 c	4,04 a	0,15 ab	0,44 b	0,019 a
20	14,3 bc	4,22 abc	3,88 a	0,16 ab	0,27 c	0,013 b
23	17,3 a	4,95 a	3,80 ab	0,19 a	0,34 bc	0,016 ab
25	12,7 cd	4,37 abc	3,38 bc	0,15 ab	0,36 bc	0,016 ab

Valores con letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de LSD para  $P \leq 0,05$

En el maíz, el análisis señaló diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en el porcentaje N y de P, y el P extraído por la planta respecto al testigo no inoculado. Los valores de peso seco oscilaron entre 6,04 y 7,70 g·planta<sup>-1</sup>; sin embargo, el porcentaje de N en el tejido aéreo mostró incrementos significativos ( $P \leq 0,05$ ) con la inoculación de las cepas 1, 23 y 25 señalando una variación entre 0,17 y 0,32 g de N asimilado por las plantas bajo los distintos tratamientos (Cuadro 5). Para el porcentaje de P y el P acumulado por las plantas de maíz, sólo el *Azospirillum* cepa 23 mostró los mayores valores entre todos los tratamientos (Cuadro 5). Estos resultados señalan que el *Azospirillum* cepa 23 es una bacteria capaz de incrementar la absorción de P, ejercer un efecto de mayor desarrollo y robustez en las plantas de maíz en relación al testigo no inoculado.

Es bien conocido que la fijación biológica del N es una actividad microbiana con un alto consumo de P al convertirlo en la energía utilizada para la reducción del N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>, lo que significa que en condiciones de limitación de P las bacterias diazotróficas podrían competir con la planta por este elemento. Sin embargo, los bioinóculos utilizados en este trabajo eran cepas diazotróficas disolventes de P inorgánico lo que permite inferir que estas rizobacterias podrían satisfacer las necesidades de P del cultivo del maíz durante las fases de crecimiento evaluadas, ya que ninguno de los tratamientos disminuyó significativamente la absorción del elemento en las plantas (Cuadro 5). A diferencia de las plantas de pimentón, las de maíz mostraron una demanda de P de aproximadamente 3,5 veces menos a los 45 días de crecimiento.

**Cuadro 5.** Efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en el peso seco aéreo y contenido de N y P del maíz a los 45 días en condiciones de umbráculo

Tratamiento	PS (g·planta <sup>-1</sup> )	% N	g N·planta <sup>-1</sup>	% P	g P·planta <sup>-1</sup>
Testigo	7,59 a	2,33 d	0,17 a	0,164 ab	0,013 ab
1	6,04 a	4,56 a	0,28 a	0,189 ab	0,012 b
11	7,13 a	2,94 cd	0,22 a	0,155 b	0,011 b
12	7,66 a	2,61 d	0,20 a	0,175 ab	0,014 ab
13	7,56 a	3,39 abcd	0,25 a	0,171 ab	0,013 ab
17	6,86 a	3,03 bcd	0,21 a	0,193 ab	0,013 ab
23	7,70 a	4,24 ab	0,32 a	0,217 a	0,017 a
25	6,46 a	4,08 abc	0,26 a	0,202 ab	0,013 ab

Valores con letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de LSD para  $P \leq 0,05$

En esta investigación, la fijación biológica del N y la disolución de fosfatos pueden atribuirse al

efecto directo de la inoculación de las cepas diazotróficas; sin embargo, se han reportado

efectos indirectos como en el caso del incremento de N por inoculación con cepas de *Rhizobium* en plantas no leguminosas, en las que la producción del AIA por parte de la bacteria incide en el desarrollo de raíces laterales y pelos radicales contribuyendo a una mejor eficiencia en la toma de N y otros nutrientes del suelo (Hafeez et al., 2004). Adicionalmente, otros efectos indirectos han sido señalados con la inoculación de microorganismos disolventes de fosfatos, al estimular éstos las poblaciones endógenas de este mismo grupo de microorganismos en el suelo (Reyes et al., 2002).

La inoculación de una especie bacteriana disolvente de fosfatos puede expresar el fenotipo de la disolución de P al aumentar la concentración de éste en el tejido vegetal, pero también puede promover el crecimiento al incrementar la producción de la planta. Por lo tanto, se considera que después de la inoculación con bacterias diazotróficas, éstas establecen múltiples interacciones con las poblaciones endógenas (Dobbelaere et al., 2003) lo que podría beneficiar la asimilación de nutrientes por parte de la planta.

Al evaluar el efecto de una rizobacteria en diferentes cultivos, la cepa *Pseudomonas putida* GR12-2 mostró diferencias en la estimulación del crecimiento de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Lucy et al., 2004). Asimismo, la inoculación de dos cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, cepas P31 y R1 que fueron seleccionadas por su habilidad para disolver el P, aumentaron la producción de la materia seca de la lechuga pero sin mostrar un efecto significativo en la asimilación de P, por lo que se considera que otros mecanismos como la producción de sideróforos y la producción del AIA estarían implicados; sin embargo, al inocular las mismas cepas en maíz se encontró un incremento de la concentración de P respecto al control no inoculado (Chabot et al., 1996).

En la presente investigación, la bacteria endófito *Azospirillum* 23 se presentó como una RPCP tanto en maíz como en pimentón, lo que la muestra como una bacteria con potencial bioinoculante en estos dos cultivos, a diferencia de las cepas 11, 12, 13 y 17 que actuaron como RPCP sólo en el pimentón. Estos resultados corroboran que cada rizobacteria expresa un metabolismo microbiano diferente de acuerdo a la relación bioquímica y ecológica que establece con

la planta, debido posiblemente a la calidad y cantidad de exudados encontrados en la rizósfera.

## CONCLUSIONES

La caracterización fisiológica y bioquímica de los aislamientos bacterianos permitió realizar una primera selección de aquellos con mayor potencial en la promoción del crecimiento vegetal.

En el pimentón, la inoculación aumentó la germinación y el peso seco con todas las cepas evaluadas y el porcentaje de N con la mayoría de ellas, mientras que todas las cepas indujeron una disminución del P foliar para el momento del muestreo (a las seis y nueve semanas para el maíz y pimentón, respectivamente). El maíz presentó una tendencia más selectiva que el pimentón en la germinación, y en la promoción del crecimiento se corroboró este efecto observándose los mejores resultados con *Azospirillum* 23.

Los bioinoculantes expresaron cierta especificidad respecto al cultivo, aunque algunas cepas fueron compatibles con ambos cultivos, como el caso de *Azospirillum* cepa 23.

Para la selección de bioinóculos debe considerarse el cultivo y las condiciones de fertilidad de los suelos donde se intenten aplicar.

## AGRADECIMIENTO

Al Decanato de Investigación de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET) por el otorgamiento de las subvenciones 02-002-60 y 02-003-04.

## LITERATURA CITADA

1. Bacilio-Jiménez, M., S. Aguilar-Flores, E. Ventura-Zapata, E. Pérez-Campos, E. Bouquelet y E. Zenteno. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil* 249: 271–277.
2. Barea, J.M., M.J. Pozo, R. Azcón y C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417): 1761-1778.
3. Beever, R.E. y D.J.W. Burns. 1980. Phosphorus

- uptake, storage and utilization by fungi. *Advances in Botanical Research* 8: 127-219.
4. Belimov, A.A., I.C. Dodd, V.I. Safronova, N. Hontzeas y W.J. Davies. 2007. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1485-1495.
  5. Benizri, E., E. Baudoin y A. Guckert. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574.
  6. Caesar-TonThat, T.C., A.J. Caesar, J.F. Gaskin, U.M. Sainju y W.J. Busscher. 2007. Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil *in vitro*. *Applied Soil Ecology* 36(1): 10-21.
  7. Chabot, R., H. Antoun y M.P. Cescas. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant and Soil* 184: 311-321.
  8. Dobbelaere, S., J. Vanderleyden y Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(2): 107-149.
  9. Döbereiner, J., V. de O. Andrade y V.L.D. Baldani. 1999. Protocolos para preparo de meios de cultura da embrapa agrobiologia. Seropedica: EMBRAPA Agrobiologia, dez. 38p. Documento 110. <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc> (consulta del 11/02/2008).
  10. Ferrara, C. 1993. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas México. 139 p.
  11. Goldstein, A.H., K. Braverman y N. Osorio. 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 295-300.
  12. Hafeez, F.Y., M.E. Safdar, A.U. Chaudhry y K.A. Malik. 2004. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44: 617-622.
  13. Hamaoui, B., J.M. Abbadi, S. Burdman, A. Rashid, S. Sarig y Y. Okon. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* 21: 553-560.
  14. Holt, J.G. y N.R. Krieg. 1994. Enrichment and isolation. *In: Methods for General and Molecular Biology*. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood y N.R. Krieg (eds.). ASM (American Society for Microbiology) Washington, DC. pp. 179-215.
  15. Holt, J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley y W. Stanley. 2000. *Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth edition. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore. 787 p.
  16. Jones, J.B. 2001. *Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
  17. Kennedy, I.R., A.T.M.A. Choudhury y M.L. Kecskés. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1229-1244.
  18. Kloepper, J. y Ch. Beauchamp. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 1219-1232.
  19. Lucy, M., E. Reed y Bernard R. Glick. 2004. Applications of free living growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86(1): 1-25.
  20. Naeem, N., I. Muhammad, J. Khan, G. Nabi, N. Muhammad y N. Badshah. 2002. Influence

- of various levels of nitrogen and phosphorus on the growth and yield of chili (*Capsicum annuum* L.). Asian Journal of Plant Sciences 1(5): 599-601.
21. Nikitina, V.E., N.V. Bogomolova, E.G. Ponomareva y O.I. Sokolov. 2004. Effect of *Azospirilla lectins* on germination capacity of seeds. Biology Bulletin 31(4): 354-357.
22. Reyes, I., L. Bernier, R. Simard, P. Tanguay y H. Antoun. 1999. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microbiology Ecology 28(3): 291-295.
23. Reyes, I., L. Bernier, y H. Antoun. 2002. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. Microbial Ecology 44(1): 39-48.
24. Reyes, I., A. Valery y Z. Valduz. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. Plant and Soil 287(1-2): 69-75.
25. Schaller, E. y J.J. Kleber. 2002. Ethylene. The Arabidopsis Book 12(1): 1-18.
26. van Veen, J.A. y C.E. Heijnen. 1994. The fate and activity of microorganisms introduced into soil. In: Soil Biota, Management in Sustainable Farming Systems. C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta y P.R. Grace (eds.). CSIRO Victoria, Australia. pp. 50-62.
27. Vessey, K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.
28. Viveganandan, G. y K.S. Jauhri. 2000. Growth and survival of phosphate-solubilizing bacteria in calcium alginate. Microbiological Research 155: 205-207.