

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a diferentes tipos de estrés

Biological response of *Azospirillum* spp. to different types of stress

Carlos Alberto Sangoquiza Caiza¹, Yosvel Viera Tamayo² y Carlos Fernando Yáñez Guzmán³

¹ Universidad Técnica de Cotopaxi. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Especialidad Ingeniería Agronómica. Cotopaxi, Ecuador, CP 050101

² Universidad de Granma. Facultad de Ciencias Agrícolas, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Carretera a Manzanillo, km 17½, Bayamo, Granma, Cuba, CP 85100

³ Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP- Programa de Maíz. Sector Cutuglagua, Km 1½, Mejía, Pichincha, Ecuador, CP 17053

E-mail: ci2801@hotmail.com, yvierat@udg.co.cu, cayanez@hotmail.com

RESUMEN

Azospirillum es una de las rizobacterias de vida libre más estudiada en la actualidad y de gran interés agrícola debido a su capacidad de fijar nitrógeno biológico y producir fitohormonas. La presente investigación tuvo como objetivo la respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a diferentes tipos de estrés. Para ello se realizó la caracterización micro y macro morfológica de los aislados y su respuesta biológica frente a estrés de temperatura, pH, salinidad. Los resultados revelaron que los aislados (C2, C3 y C4) de *Azospirillum* spp. crecen en mayor abundancia a temperaturas entre 28-38 °C, a pH entre 7-8. Los aislados C2 y C3 mostraron un buen crecimiento hasta 3,5 % (m/v) de NaCl, mientras que la cepa C4 fue menos tolerante. Estos resultados poseen aplicabilidad biotecnológica, y son de gran importancia en el momento de definir y controlar las condiciones de producción masiva de *Azospirillum* spp. para futuras formulaciones como biofertilizante en diversos cultivos de interés en Ecuador.

Palabras clave: biofertilizante, diazotróficas, fitohormonas, rizobacterias

ABSTRACT

Azospirillum is one of the most studied free-living rhizobacteria currently of great agricultural interest because of its ability to bind biological nitrogen and produce phytohormones. The present research aimed at the biological response of *Azospirillum* spp. facing different types of stress. For this purpose, the micro and macro morphological characterization of *Azospirillum* spp. And its biological response to stress temperature, pH, salinity. The results revealed that the isolates (C2, C3 and C4) of *Azospirillum* spp. Grow in greater abundance at temperatures between 28-38 °C and pH between 7-8. The C2 and C3 isolates showed good growth up to 3.5 % (m / v) NaCl, whereas the C4 strain was less tolerant. These results have biotechnological applicability and are of great importance when defining and controlling the mass production conditions of *Azospirillum* spp. for future formulations as biofertilizer in several crops of interest in Ecuador.

Keywords: biofertilizer, diazotrophic, phytohormones, rhizobacteria

INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema complejo que alberga una gran cantidad y variedad de especies vegetales, animales y de microorganismos. Estos organismos establecen relaciones entre sí en formas variables y complejas que contribuyen también a generar las características propias de cada suelo mediante la modificación de las fases (sólida, líquida y gaseosa) del mismo (Nogales, 2005).

En los últimos años se han desarrollado estrategias alternativas para reemplazar los fertilizantes a través del uso de microorganismos benéficos que han demostrado cumplir funciones que mantienen el equilibrio del suelo y apoyan el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos, entre ellos está la solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno (Corrales et al., 2014).

El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) para la formulación de biofertilizantes se ha convertido en una de las tecnologías limpias más promisorias para el desarrollo de la agricultura sostenible (Bashan et al., 2013). Entre las BPCV que más se destacan se encuentran las del género *Azospirillum*, que tiene la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, producir citoquininas, giberelinas e indoles, reducir nitratos lo cual admite ser utilizado como biofertilizante del cual se podrá obtener un producto agrícola de calidad y sin generar consecuencias al ambiente (Fibach-Paldi et al., 2012).

A través de mecanismos de acción directos e indirectos, estas bacterias pueden permitir una reducción significativa en el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos. Entre los géneros de rizobacterias más utilizados como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) se encuentran, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Castellano et al., 2015)

Con el fin de potenciar la actividad microbiana de los biofertilizantes es necesario definir los parámetros de crecimiento celular de las cepas que los conforman. Por lo tanto, esta investigación tuvo como objetivo evaluar fenotípicamente tres cepas de *Azospirillum* desde el punto de vista macro y micro morfológico y su respuesta biológica frente al estrés de temperatura, pH, salinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro de Estudios

de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma, Cuba. El trabajo estuvo orientado a evaluar la respuesta biológica de los aislados de *Azospirillum* spp. frente a diferentes tipos de estrés. Para ello se tomaron aislados liofilizados C2, C3 y C4 de *Azospirillum*, donde se realizó la reactivación, colocando 1000 micro litros (μL) de peptona al 1 % y sembrándolas en cajas Petri con medio de cultivo Acido Málico Rojo Congo, las cuales fueron incubadas a una temperatura de 30 °C por 7 días.

Los aislados de *Azospirillum* spp. se obtuvieron a partir de aislamientos de suelo rizosférico del cultivo de maíz en su fenología V7. El muestreo se realizó en diferentes puntos del terreno de cada localidad, con la ayuda de un barreno, se tomó aproximadamente 3 kg de suelo a una profundidad de 15 cm, de las principales provincias maiceras del Ecuador: Azuay, Cañar, Bolívar, Tungurahua, Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha, Imbabura, Carchi. Las mismas que fueron ingresadas al Laboratorio del Programa de Maíz perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), donde se realizaron los trabajos de aislamiento, purificación, identificación, liofilización y trabajos de inoculación en condiciones controladas de invernadero y campo, encontrando resultados significativos para los aislados C2, C3 y C4. Por tal razón se utilizaron para este trabajo de investigación los aislados liofilizados de las provincias descritas en la Tabla 1.

Caracterización fenotípica de los aislados de *Azospirillum* spp.

La caracterización fenotípica de los aislados incluyeron la caracterización macromorfológica, micromorfológica y ecológica de las mismas. Para ello se inocularon 50 μl del cultivo de cada uno de los aislados en 30 ml de medio Caldo Ácido Succínico, estas fueron colocadas en un agitador orbital a 150 rpm y 28 ± 2 °C, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 1 000 a una $\lambda=540$ nm (correspondiente a 10^9 UFC*mL).

Caracterización cultural de aislados de *Azospirillum* spp.

La caracterización cultural de los aislados microbianos se basó en la observación de las células al microscopio estereoscópico. La

Tabla 1. Códigos y procedencia de los aislados de *Azospirillum* spp. utilizados en la investigación

| Código | Provincia | Cantón | Parroquia | Barrio | Altitud m.s.n.m. |
|--------|------------|----------|--------------|-------------|------------------|
| C2 | Bolívar | Guaranda | Veintimilla | Laguacoto 2 | 2617 |
| C3 | Tungurahua | Pillaro | Emilio Terán | Capulicito | 2599 |
| C4 | Chimborazo | Alausí | Sibambe | Guñin | 2311 |

caracterización se realizó a colonias crecidas en medio Agar Ácido Succínico Rojo Congo a 32 ± 1 °C durante 48 h. Los aspectos para su caracterización incluyeron las formas de las colonias, de los bordes, elevación, color, apariencia.

Caracterización morfológica de aislados de *Azospirillum* spp.

La caracterización morfológica comenzó con la observación microscópica de las células, con el método de tinción de Gram. La caracterización de las células se realizó tomando en cuenta los aspectos tales como: forma, tamaño, respuesta a la tinción, presencia o no de endospora bacteriana.

Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a estrés por temperatura

El estrés por temperatura se realizó induciendo a los aislados a diferentes temperaturas comprendidas entre (18, 28, 38 y 48 ± 2 °C), Para ello se empleó placas Petri con 20 ml de Agar Ácido Succínico Rojo Congo, en estas se inocularon 50 µl de inóculo de cada uno de los aislados. Las placas se colocaron en incubadoras por cinco días, excepto para la temperatura de 18 °C que se incubaron en un cuarto frío. Pasado el tiempo de incubación se realizó la lectura de las mismas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a estrés por pH inicial

El estrés por pH se realizó induciendo los aislados a diferentes escalas de pH. Para ello se preparó Caldo Ácido Succínico a diferentes pH (5, 6, 7, 8 y 9), el pH se ajustó con una solución de ácido clorhídrico al 0,1 % (v/v) y una solución de hidróxido de sodio a 4 mol L⁻¹.

El medio Caldo Ácido Succínico se distribuyó en relación de 30 ml por Erlenmeyer, donde se inocularon 50 µl de cultivo de cada uno de los aislados los cuales se colocaron en un agitador

orbital a 150 rpm e incubaron a 28 ± 2 °C durante 36 h. Transcurrido este tiempo se realizó la determinación de la D.O. a una $\lambda=540$ nm. Las lecturas se realizaron por triplicado.

Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a estrés por salinidad

El estrés por salinidad se realizó induciendo a los aislados a diferentes porcentajes de cloruro de sodio (NaCl). Para eso fue preparado el medio Caldo Ácido Succínico con diferentes porcentajes de NaCl (1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 y 5) m/v. El Caldo fue distribuido en relación de 30 ml por erlenmeyer, donde se inocularon 50 µl de cultivo de cada uno de los aislados los cuales fueron colocados en un agitador orbital a 150 rpm e incubaron a 28 ± 2 °C durante 36 h. Transcurrido este tiempo se realizó la determinación de la D.O. en un espectrofotómetro a 540 nm. Las lecturas se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fenotípica de aislados de *Azospirillum* spp.

Los resultados de esta variable nos indican que los tres aislados (C2, C3 y C4) respondieron negativo a la tinción de Gram (-), las colonias presentaron una forma ovoide con paredes gruesas, de color rojo. En cuanto al crecimiento de los en el medio de cultivo Agar Rojo Congo incubadas a 38 ± 2 °C, se observó que los aislado presentaron colonias planas y brillantes, con forma circular y bordes enteros, elevadas en los bordes y deprimidas en el centro.

Estos resultados concuerdan con lo señalado por (Okon *et al.*, 1976), quien señala que el género *Azospirillum*, pertenecen al grupo de bacterias Gram (-), con forma celular de bacilos ligeramente curvados, presentan un diámetro de 1,0 µm x 2,1-3,8 µm. Poseen movilidad en espiral debido a la presencia de flagelos y contienen cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato

(PHB), hasta el 50 % del peso seco celular. A nivel morfológico, el género *Azospirillum* presentan la característica de que sus colonias, poseen una forma circular ovoide con paredes gruesas similares a quistes; superficie: rugosa y brillante, de bordes ondulados; consistencia: cremosa y adquieren una coloración rojo oscuro o escarlata por absorción del colorante Rojo Congo (Krieg y Döbereiner, 1984).

Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a estrés por temperatura

Como se puede apreciar en la Tabla 2, los aislados (C2, C3 y C4) de *Azospirillum* crecieron con mayor abundancia a temperaturas comprendidas entre los 28 y 38 °C a los cinco días de incubación. Estos resultados son interesantes dado que aunque las cepas fueron aisladas de zonas geográficas con clima frío (Bolívar, Tungurahua, y Chimborazo), los mejores resultados se obtuvieron a temperaturas cálidas Díaz et al. (2013), manifiesta que temperaturas cercanas a los 20 °C disminuyen el crecimiento de *A. brasilense*, favorecen la formación de estructuras y sustancias de protección y la disminución del metabolismo basal, que garantizan el mantenimiento del microorganismo, pero no su crecimiento, no así para temperaturas superiores. Estudios realizados por Perdomo (2015) manifiesta que la temperatura influyó significativamente ($p < 0,05$) en la viabilidad de *A. brasilense* cuyo crecimiento abundante se obtuvo a los 30 °C.

Estudios realizados por Díaz et al. (2013) en varios experimentos que incluyeron temperaturas superiores, manifiesta que bajas temperatura (entre los 22 y 25 °C) no resultan satisfactorias para el crecimiento de la bacteria diazotróficas, pero en este intervalo las elevadas concentraciones salinas tienen mayor influencia, no así para temperaturas superiores. Estos resultados son similares a los obtenidos por Caballero-Mellado (2002), quien manifiesta que temperaturas cercanas a los 20 °C disminuyen el crecimiento del *A. brasilense*, favorecen la formación de estructuras y sustancias

de protección y la disminución del metabolismo basal, que garantizan el mantenimiento del microorganismo pero no su crecimiento.

Para la mayoría de los *Azospirillum* la temperatura óptima a la que crecen es de 32 a 36 °C, excepto para *A. largimobile* que se desarrolla a los 28 °C y *A. halopraeferens* (41 °C). La modificación de la temperatura en la cual las bacterias se encuentran en el medio de cultivo influye negativamente en su crecimiento. Si la temperatura de incubación no es el adecuado, puede disminuir o hasta impedir la formación de un metabolito determinado (Cortez, 2012).

Respuesta biológica de *Azospirillum* spp. frente a estrés por pH

La cepa C2 mostró una meseta entre los valores de D.O. obtenidos a pH=7 y pH=8, sin embargo, incrementó este valor para pH 9 (Figura 1). La cepa C3 mostró valores similares de D.O. desde 7 hasta 9. La cepa C4 indica que el pH 7 es el óptimo para el crecimiento de la misma. No obstante, el crecimiento a pH 8 y 9 no tomó valores de D.O. menores de 1 400. Estos resultados nos muestran un mayor crecimiento de estos aislados en el rango de pH entre 7 y 8, valores de D.O. superiores a uno, lo cual indica que hay más de 10^9 UFC mL⁻¹.

Los resultados obtenidos se corresponden con los referidos en la literatura cuando describe como valores óptimos para el crecimiento de *Azospirillum* pH entre 6 y 7,8. Estudios realizados por Perdomo (2015) manifiesta que la temperatura y el pH influyen significativamente en la viabilidad de *A. brasilense*. La mayor abundancia de aislados fueron obtenidos a los 30 °C, a un pH entre 6 a 7,8.

Según lo descrito por Aguilar (2015) la actividad nitrogenasa de las cepas endófitas se favorece cuando estas se cultivan a pH entre ácido y neutro (pH de 5 a 7), y se inhiben a pH 3 y 8. La mayor actividad nitrogenasa de estos organismos está asociada con el suelo rizosférico o con el interior de la raíz, presentando una variación estacional que en algunos casos

Tabla 2. Efecto *in vitro* de la temperatura en el crecimiento de los aislados de *Azospirillum* spp.

| Cepas | Temperatura °C | | | |
|-------|----------------|------|------|------|
| | 18°C | 28°C | 38°C | 48°C |
| C2 | + | +++ | +++ | ++ |
| C3 | ++ | +++ | +++ | +++ |
| C4 | + | +++ | +++ | +++ |

+++ Abundante, ++ abundancia moderada, +ausencia

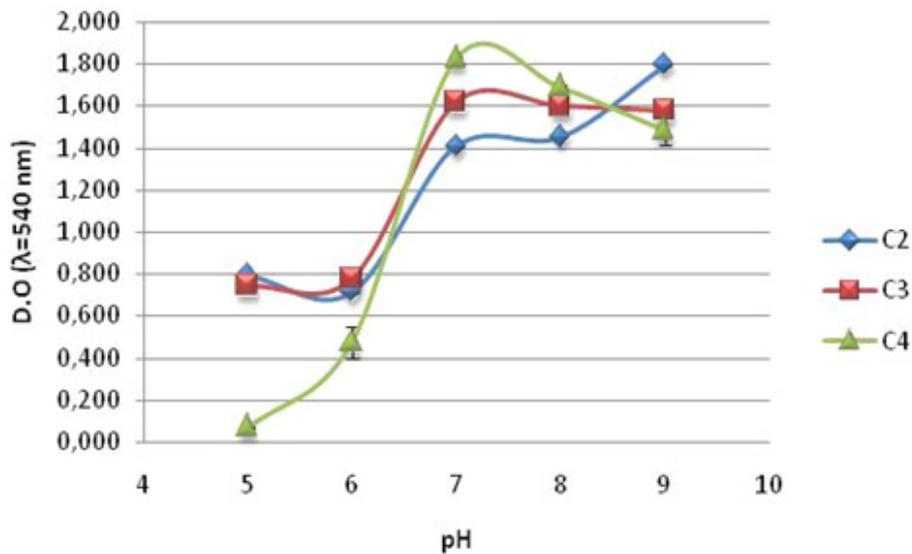


Figura 1. Efecto *in vitro* del pH en el crecimiento de los aislados

coinciden con la etapa reproductiva de la planta (Marquina *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que la estructura de las comunidades microbianas es influenciada por el pH y las condiciones nutricionales del suelo en experimentos a corto plazo, mientras que en ensayos de mayor duración, las especies vegetales ejercen un efecto altamente selectivo, debido a las cantidades y composición de los exudados radicales (Marschner *et al.*, 2004). Los valores de pH óptimo para el crecimiento de algunas especies del género *Azospirillum* son: *A. brasilense*: pH 6,0-7,8; *A. lipoferum*: pH 5,7-6,8; *A. amazonense*: pH 5,7-6,5; *A. halopraeferens*: pH 6,0-8,0; *A. doebereineriae*: pH 6,0-7,0 (Cortez, 2012).

Los resultados del presente estudio poseen aplicabilidad biotecnológica y son de gran

importancia en el momento de definir y controlar las condiciones de producción masiva de biomasa de *A. brasilense* para futuras formulaciones como biofertilizante.

Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a estrés por salinidad

En la Figura 2 se presenta la respuesta de los aislados frente a diferentes porcentajes de cloruro de sodio. En esta se puede observar que los aislados C2 y C3 mostraron un crecimiento hasta 3,5 % de NaCl. A partir de esta concentración comenzó a disminuir el valor de D.O. hasta caer completamente en el medio de cultivo con un 5 % de NaCl. En cuanto al aislado C4 esta mostró un crecimiento hasta 2 % de (NaCl), a partir de esta concentración comenzó a disminuir el valor de D.O.

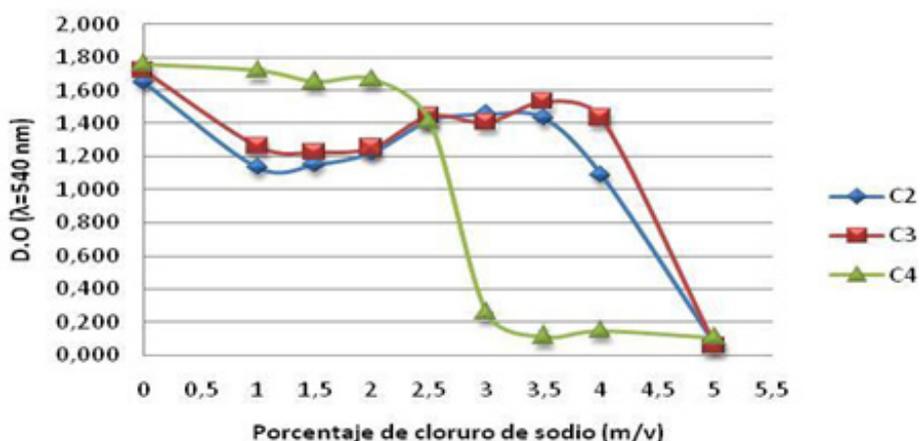


Figura 2. Efecto *in vitro* de la salinidad inducida por cloruro de sodio en el crecimiento de los aislados de *Azospirillum* spp.

Estos resultados indican que los aislados de *Azospirillum* son halófilos ya que crecieron en un rango de NaCl entre (2,5 y 3,5 %). Además, concuerdan con Larsen (1986) en estudios realizados sobre microorganismos halófilos y halotolerantes quien señala que las bacterias halotolerantes son un grupo capaz de crecer bien en medios que contienen un rango de NaCl entre (1 % - 33 %). Resultados que son corroborados por Ramadoss *et al.* (2013), en estudios realizados sobre la Mitigación del estrés salino en plántulas de trigo por bacterias halotolerantes aisladas de hábitats salinos, donde señalan que los aislados crecieron en rangos de 3 % al 18 % de NaCl por lo que entran en el grupo de bacterias halotolerantes. De igual manera observaron que el porcentaje de cepas tolerantes a sales disminuye cuando la salinidad aumenta, lo que se corresponde con un estudio realizado por Ramadoss *et al.* (2013) quien obtuvo que del total de cepas aisladas 92,8 %, 70 %, 32 % y 25 % crecieron en 5, 10, 15 y 20 % de NaCl respectivamente. Mientras que en este estudio el 15 %, 2,8 % y el 1,5 % de las cepas aisladas crecieron en 10, 15 y 18 % de NaCl correspondientemente. Asimismo, existen reportes que indican que las bacterias aisladas de ambientes salinos sobreviven más a las concentraciones inhibitorias de sal que las aisladas de suelos no salinos (Upadhyay *et al.*, 2009).

La salinidad afecta negativamente la actividad biológica, excepto a las bacterias halófilas. Por lo tanto, las bacterias tolerantes a sales que colonizan las raíces pueden sobrevivir en condiciones adversas del medioambiente y ayudar con sus propiedades benéficas (Yildirim *et al.*, 2008). Los aislados promotores del crecimiento vegetal pueden producir exopolisacáridos que unen los cationes incluyendo el Na⁺ (Siddikee *et al.*, 2011). La inoculación con estos aislados no solo disminuye la concentración de Na⁺ y Cl⁻, sino que inducen el incremento en N, P y K, de esta forma ayudan a reducir los efectos del estrés salino (Arora *et al.*, 2012).

En la actualidad diferentes géneros de bacterias promotoras del crecimiento vegetal bajo condiciones salinas, han sido estudiadas, tales como el caso de *Acinetobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Oceanobacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Sporosarcina*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Thalassobacillus*, *Terribacillus* y *Virgibacillus* (Lubna *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Los aislados (C2, C3, C4) de *Azospirillum* spp. presentaron características fenotípicas como células en forma ovoide con paredes gruesas, colonias planas y brillantes de gran tamaño, bordes enteros de color rojo intenso características típicas del género.

La temperatura y el pH influyeron significativamente en la viabilidad de *Azospirillum* spp. El crecimiento máximo se encontró a temperaturas comprendidas entre 28 – 38 °C, a un pH de 7,8. Estas muestran un buen crecimiento hasta 3,5 % (m/v) de cloruro de sodio. Los resultados del presente estudio poseen aplicabilidad biotecnológica, y son de gran importancia en el momento de definir y controlar las condiciones de producción masiva de *Azospirillum* spp. para futuras formulaciones como biofertilizante en diversos cultivos de interés en Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, M. B. 2015. Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres (Bachelor's thesis). Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador, 75 p.
- BASHAN, Y., BASHAN, L.E., PRABHU, S.R. & HERNÁNDEZ, J.P. 2013. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378 (1-2): 1-33.
- CABALLERO-MELLADO, J. 2002. El género *Azospirillum*. En: Romero, D. Microbios en línea. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, México.
- CASTELLANO, M. H., ESPINOSA, C. T., & FERNÁNDEZ, M. A. 2015. Uso de *Azospirillum* en la agricultura. *Revista Científica Agro ecosistemas*, 3 (1).
- CORRALES, L. C., ARÉVALO, Z. Y., & MORENO, V. E. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante

- en el desarrollo vegetal. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, 12 (21): 68-79.
- Cortez, M. E. 2012. Evaluación de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de *Azospirillum* sp. en plantas de maíz (*Zea Mays* L.). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador, 56 p.
- DÍAZ-SAEZ, Y., DÍAZ-de los RÍOS, M., ALBERTO-CASAS, M., NUÑEZ-CARABALLO, A. & MARTÍNEZ-MORA, M. 2013. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en presencia de disacáridos: sacarosa y lactosa. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47 (2).
- FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S. & OKON Y. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.*, 326: 99-108.
- KRIEG, N. y DÖBEREINER, J. 1984. Genus *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979. En: N. Krieg y J. Holt. *Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1, Williams & Wilkins Bergey's, Baltimore, USA. 94-104 pp.
- Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Reviews*, 39: 3-7.
- LUBNA, R., ASMA, I., FATHIA, M. & FAUZIA, Y. 2013. Salt-tolerant PGPR strain *Planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil. *Pakistan Journal of Botany*, 45 (6): 1955- 1962.
- MARQUINA, M. E., SKWIERINSKI, R. M., & BRICEÑO, B. E. 2002. Actividad reductora de acetileno de bacterias asociadas a las Glumifloras del páramo Loma Redonda, Mérida-Venezuela. *Revista Pittieria*, (31): 57-69.
- MARSCHNER, P., D. CROWLEY y C. HONG YANG. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil*, 261:199-208.
- NOGALES, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Revista Científica y Técnica de Ecología y medio ambiente: Ecosistemas*, 14 (2): 41-51.
- OKON, Y. ALBRECHT, S. y BURRIS, R. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 127: 1248-1254.
- PERDOMO, F., CAMELO-RUSINQUE, M., CRIOLLO-CAMPOS, P., & BONILLA-BUITRAGO, R. 2015. Efecto de la temperatura y el pH en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 aislada de pasto guinea. *Pastos y Forrajes*, 38 (3): 171-175.
- RAMADOSS, D., LAKKINENI, V. K., BOSE, P., ALI, S. & ANNAPURNA, K. 2013. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Plus*, 2 (1): 6.
- SIDDIKEE, M., GLICK, B., CHAUHAN, S., YIMA, W. & SAYIM, T. 2011. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1- aminocyclopropane-1 carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 427-34.
- UPADHYAY, S., SINGH, D. & SAIKIA, R. 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Current microbiology*, 59 (5): 489-496
- YILDIRIM, E., TURAN, M. & FIGEN, D. 2008. Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus Sativus*) by plant growth promoting rhizobacteria. *Roumanian Biotechnological Letters*, 13 (5): 3933-3943.