

Caracterización parcial fenotípica y del 16S rDNA de bacterias promotoras para el desarrollo vegetal

Monsalvo-Reyes Alejandro Cruz*, Sánchez José Roberto, Molina-González María Graciela.

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av de Los Barrios No. 1.
Col Los Reyes Iztacala. Tlalnepantla. Edo de Méx. CP. 54090

* Autor para correspondencia: reyesac2001@gmail.com

Recibido:

08/mayo/2018

Aceptado:

01/agosto/2018

Palabras clave:

BPCV, 16s rDNA, colección de cultivos bacterianos

Keywords:

BPCV, 16s rDNA, colección de cultivos bacterianos

RESUMEN

Los microorganismos de suelo guardan una relación estrecha con las plantas, en particular las bacterias pueden auxiliar de manera simbiótica o no. El estudio de las bacterias promotoras en el crecimiento vegetal es limitado por lo que este trabajo pretende contribuir en el conocimiento de algunas características fenotípicas y genotípicas de cepas bacterianas para el desarrollo vegetal. Se solicitaron dos cepas bacterianas criopreservadas de la Colección de Cultivos Bacterianos de FES-Iztacala UNAM para su análisis. Se realizó activación de las cepas, análisis fenotípico; morfología colonial, tinción de Gram, caracterización bioquímica: Oxidación-Fermentación, Catalasa, Oxidasa e Indol, amplificación y secuenciación de la región 16S rDNA para análisis de BLAST en GenBank. Adicionalmente se usó como referencia DNA genómico de las cepas AAA1, SRA1 y RRJ1 caracterizadas por morfología y bioquímica previamente e identificadas como *Pseudomonas sp.* La cepa RH8530 fue identificada como *Rhizobium tropici* por pruebas tradicionales y similitud de 80% con *Sinorhizobium meliloti*. El análisis molecular determinó en dos DNA genómico de las cepas de referencia inconsistencia en su caracterización.

ABSTRACT

The soil microorganisms are closely related to the plants, in particular the bacteria can help in a symbiotic manner or not. The study of the promoter bacteria in plant growth is limited so this work aims to contribute to the knowledge of some phenotypic and genotypic characteristics of bacterial strains for plant development. Two cryopreserved bacterial strains were requested from the Bacterial Culture Collection of FES-Iztacala UNAM for analysis. Activation of the strains was performed, phenotypic analysis; Colonial morphology, Gram stain, biochemical characterization: Oxidation-Fermentation, Catalase, Oxidase and Indole, amplification and sequencing of the 16S rDNA region for BLAST analysis in GenBank. Additionally, DNA genomic of strains AAA1, SRA1 and RRJ1 characterized by morphology and biochemistry previously identified as *Pseudomonas sp.* Strain RH8530 was identified as *Rhizobium tropici* by traditional tests and similarity and 80% with *Sinorhizobium meliloti*. The molecular analysis determined in two DNA genomic strains of reference inconsistency in its characterization.

Introducción

Las plantas son una parte vital de la biodiversidad, es un recurso esencial del planeta de suma importancia económica, cultural, alimenticia y medicinal, a nivel mundial, debido a esto han tenido un desarrollo antropocéntrico, (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2009). Las plantas despliegan una gran variedad de interacciones con organismos de los suelos (bacterias, hongos, protistas y animales), abarcan toda la gama de posibilidades ecológicas (competitivo, explotador, neutral, comensales, mutualistas). A lo largo de la ciencia vegetal moderna, la mayoría de los estudios de interacción se han centrado sobre el atenuante de los efectos patogénicos como la herbívora e infección (Strange y Scott, 2005; Zhang et al., 2013), o atenuando las condiciones de estrés abiótico (Yaish et al., 2016; Meena et al., 2017). También ha habido un interés que data de mucho tiempo atrás, el de caracterizar las interacciones ecológicas positivas que promueven el crecimiento de las plantas.

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), o conocidas como "plant growth-promoting bacteria (PGPB)", son un grupo de diferentes especies bacterianas que pueden incrementar el crecimiento y

la productividad vegetal (Torriente, 2010). Favorecen el crecimiento vegetal de manera directa: fijación de nitrógeno atmosférico, producción y síntesis de sideróforos, solubilización de minerales, síntesis de fitohormonas (auxinas, citocininas y giberelinas), síntesis de la enzima ACC desaminasa e indirecta: biocontrol de fitopatógenos, producción de antibióticos, reducción de hierro, resistencia sistémica inducida, y enzimas líticas de pared celular (Olanrewaju et al., 2017)

El número de publicaciones asociadas con microorganismos promotores del crecimiento de plantas ha tenido un aumento exponencial (Finkel et al., 2017), en particular, sobre los géneros bacterianos *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Azoarcus*, *Achromobacter*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum* (Babalola, 2010; Pérez-Montaña et al., 2014; Turan et al., 2016), todas fijadoras de nitrógeno simbióticas y las principales bacterias no simbióticas estudiadas son *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, y *Klebsiella* sp.

Otros géneros bacterianos estudiados por su importancia para solubilizar compuestos de fosfato inorgánico (fosfato mineral), tales como fosfato di y tricalcio de fosfato, hidroxapatita y fosfato de roca, son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*,

Agrobacterium, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* and *Erwinia* (Rodríguez et al., 2006). Cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* están considerados entre los solubilizadores de fosfato más potente (Banerjee et al., 2010). Sin embargo, los trabajos de investigación enfocados a las BPCV se han basado principalmente en el reconocimiento de las características de interacción con las plantas, siendo necesario estudios en sus características bioquímicas, genéticas y fisiológicas de las BPCV lo que redundaría en un manejo integral incluyendo la posibilidad de manipulación genética de cepas "óptimas", esto de acuerdo con lo reportado por Olanrewaju et al., (2017).

En relación a lo anterior el establecimiento de colecciones de cultivos bacterianos es la clave para explorar el potencial biológico de las BPCV. Por lo tanto, el presente trabajo pretende contribuir al conocimiento sobre las características fenotípicas y por biología molecular a partir de secuencias del 16S rDNA de dos cepas depositadas para resguardo y tres DNA genómicos usados de referencia, aislados y caracterizadas morfológicamente y bioquímicamente previamente por el grupo de investigación de la Colección de Cultivos Bacterianos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CCBIZTA) e identificados presuntivamente como *Pseudomonas* sp, con posibles efectos promotores para el desarrollo vegetal (BPCV).

Metodología

Se utilizaron las cepas bacterianas RT, Az y el DNA genómico de referencia aislado de estudios previos correspondientes a cepas bacterianas SRA1, AAA1 y RRJ1, clave interna de la Colección de Cultivos Bacterianos (CCBIZTA) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Activación de las bacterias

Las bacterias almacenadas a -20 °C, se activaron en medio YT completo (0.05g de triptona, 0.3 g de extracto de levadura, 0.1g de Cloruro de Calcio y 1% de agar para 100 mL de medio) y medio Ashby 2 (sacarosa 0.5g, Manitol 0.5g, Fosfato de Potasio dibásico, 0.1g, Sulfato de Magnesio 0.02g, Sulfato de Hierro II heptahidratado 5 mg, Cloruro de Sodio 0.02 g, Cloruro de Calcio 0.02 g y 1.5 g de Agar-Agar para 100 mL de medio para *R. tropici* y *A. vinelandii*, respectivamente. Después de 48 h de incubación a 30°C se revisaron las características fenotípicas, según Ruiz (2016) y se realizó la caracterización por la secuencia parcial del 16S rDNA (Molina et al., 2014).

Se utilizaron las características fenotípicas de primera entrada:

- Gram: Es considerada como una técnica diferencial clasificando a las bacterias de acuerdo a la composición de su pared.
- Oxidación-Fermentación: Permite diferenciar el tipo de metabolismo.
- Catalasa: Indica la presencia de catalasas, cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua.
- Oxidasa: Determina si la bacteria produce citocromo.
- Indol: Permite medir la degradación de Triptófano presente en el cultivo bacteriano.

Caracterización parcial del 16S rDNA

Obtención de DNA

Se extrajo el DNA de las cepas bacterianas, por medio del método AP, una asada de cada bacteria se mezcló en 750 µl de Buffer AP (Urea 7M, NaCl 0.35M, Tris Base 0.05M, EDTA 0.02M y Sarcosina 1%), se agito en un Vortex durante 30 min; la mezcla fue centrifugada durante 1 min a 12000 rpm, al sobrenadante se le adiciono fenol y cloroformo v/v para su posterior centrifugación durante 3 min a 12000 rpm (este paso se realizó 2 veces). Se tomo el sobrenadante y se adicionó v/v de isopropanol y 0.1 vol de acetato de amonio 10Mm, después de centrifugar a 12000 por 10 min, se realizó el lavado de la pastilla con 500 µl de etanol al 70% y finalmente se seco a temperatura ambiente. El DNA así obtenido se resuspendió con 50 µl de agua libre de nucleasas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción de PCR se emplearon 100 ng de DNA y los iniciadores FD 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y RD 5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'. Se utilizo Taq 2X Master Mix de AMPLICON siguiendo las indicaciones del fabricante y en donde cada reacción quedo a una concentración final: buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.4 mM dNTP's, 0.2 unidades/ uL Amplicon Taq DNA polimerasa y cada primers a 0.2 µM. El volumen final de la reacción fue de 25 µl, aforado con agua grado molecular. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca BIORAD modelo T100 y utilizando el programa de un minuto a 95°C, seguido de 40 ciclos compuestos por 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 51°C, un minuto con 10 segundos a 72°C y finalmente 8 minutos a 72°C. El DNA genómico y los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% con Buffer TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) y teñido con Midori Green Direct de NIPPON genetics, separado

a 80V durante 30 min y observados bajo luz ultravioleta (Poutou et al., 2005)

Secuenciación

Finalmente los productos de PCR con peso de 1,500 pb se secuenciaron por el método Sanger, usando la química BigDye Terminator versión 3.1 Sequencing Kit, movilidad soporte polímero DT3100pop7(BD)v3 con capilares de 50cm y un tiempo de electroforesis de secuencia: 2 h, 30 min, secuenciación automatizada equipo ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem HITACHI), laboratorio Bioquímica Molecular FES-Iztacala-UNAM. La secuencia obtenida se comparó realizando BLAST con secuencias de genomas en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Resultados y Discusión

Característica morfológica y bioquímicas de *R. tropici*

Las colecciones de cultivos bacterianos se construyen a partir de aislados de muestras de humano, animales y del ambiente. En el caso de las bacterias ambientales se han realizado trabajos sobre diversas áreas de estudio, una de ellas es el uso de microorganismos para promover el crecimiento vegetal o plantas (BPDV). Las investigaciones en su gran mayoría se enfocan en la asociación planta-bacteria en campo o invernaderos (Mwenda et al., 2018; 9. Kontopoulou et al., 2017; Igierton y Babalola, 2018). El conocimiento sobre características particulares de las bacterias *per se*, se logra obtener en el laboratorio.

En relación a lo anterior en este trabajo se utilizaron dos bacterias *Azotobacter vinelandii* y *Rhizobium tropici*, además de tres productos de extracción genómica, de origen bacteriano, uno de ellos pertenece a *Pseudomonas fluorescens* considerada como una BPDV. Las bacterias como los productos genómicos pertenecen a la Colección de Cultivos Bacterianos de la FES-Iztacala (CCBIZTA). Las bacterias de la colección se almacenan en congelación por lo que para cualquier prueba que se solicite realizar, es necesaria primero la activación. La cepa *A. vinelandii* (Az) no se pudo recuperar del congelado aun cuando se probaron varios medios de cultivo incluyendo uno específico para el género. Para la cepa correspondiente a *R. tropici* fue exitosa la activación, por lo que se procedió a la extracción genómica y caracterización fenotípica.

El cultivo de la cepa *Rt* tiene la morfología clásica de la colonias bacterianas; colonias pequeñas, blanquecinas y mucosas (Figura 1). Esta morfología colonial es similar a la cepa *R. tropici*, utilizada en la industria. El desarrollo

de colonias sobre la superficie de un agar, permite al microbiólogo identificar las bacterias debido a que cada especie y cepa bacteriana tiene una forma y aspectos característicos.

Las características de la morfología colonial se resumen en la Tabla 1, en esta misma se puede visualizar la morfología microscópica y características bioquímicas. *R. tropici* es un bacilo Gram negativo que fermenta la glucosa y lactosa, por tanto carecen de citrocomo oxidasa.

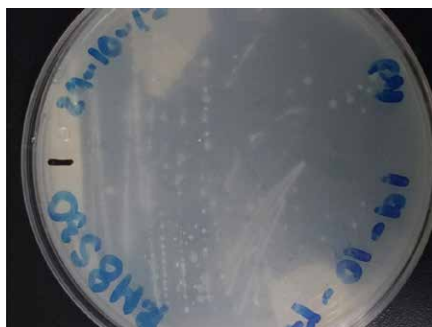


Figura 1. Cultivo de *Rhizobium tropici* en medio YB

Tabla 1. Características bioquímicas, morfología colonial y microscópica de *Rhizobium tropici*

Características de la colonia	
Morfología	Resultados
Forma	Circular
Borde	Liso
Elevación	Concava
Superficie	Lisa
Tamaño	Pequeño
Color	Blanquesino
Consistencia	Mucoide
Transmisión de la luz	Opaca
Reflexión de la luz	Mate
Aspecto	Seco
Morfología microscópica	Bacilo
Característica bioquímicas	
Prueba bioquímica	Resultados
Tinción de Gram	Negativa
Oxido/Fermentativo	Fementativo
Fementación de lactosa	Positiva
Oxidasa	Negativa
Catalasa	Positiva
Indol	Negativo

La evaluación presuntiva de una bacteria se basa en la morfología colonial, para ello se toma en cuenta las características: Elevación: Plana, bajo convexa, convexa

rugosa, crateriforme y convexa y cóncava, Bordes: liso, dentado, ondulado, lobulado, cremado, ciliado y ramosa (más común liso), Superficie: Lisa y Rugosa, Forma: Circular, ondulada y obulada, Tamaño: puntiforme, pequeña, mediana y grande, Transmisión de la luz: opaca o translúcida, Reflexión de la luz: Mate y Brillante, Aspecto: Húmedo y Seco, Consistencia: Butirosa (brillante, húmeda y translúcida), Mucoide (como moco), Vitrea (opaca, seco) y seca (si es dura), Pigmento: Color (rojas, verdes, etc.) y olor. La cepa RT, como se puede observar en la Figura 1 y la descripción en la Tabla 1, las características morfológicas y bioquímicas obtenidas coincidieron para la identificación de bacterias de su mismo género. Es preciso mencionar que pocos son los trabajos en los que se reporta minuciosamente las características de las colonias, uno de los más completos en este aspecto y que concuerda con las morfología colonial de la cepa RT, es el publicado por Cuadrado, Rubio y Santos (2009).

El reconocimiento de las características coloniales permitió seleccionar las pruebas bioquímicas adecuadas para determinar caracteres útiles en su identificación, que permite asegurar su ubicación taxonómica. Las características bioquímicas y microscópicas de las colonias de la cepa RT, permitieron identificar el género y demostrar que el cultivo es puro. Para reforzar la identificación se realizó el análisis de similitud correspondiente a la secuencia parcial del 16S rDNA.

PCR de la región 16S rDNA

Para evitar interferencia y por tanto errores en una reacción de PCR, es importante considerar entre otros aspectos la cadena molde de DNA. La pureza y concentración es importante en el proceso de amplificación (Bolívar et al., 2014). En este sentido el DNA genómico obtenido presentó una pureza en relación A_{260}/A_{280} $0.265/0.144= 1.84$ y una concentración de 265 ng/uL. Se puede visualizar en el gel el DNA genómico correspondiente a las muestras RT, SRA1, AAA1 y RRJ1 (Figura 2).

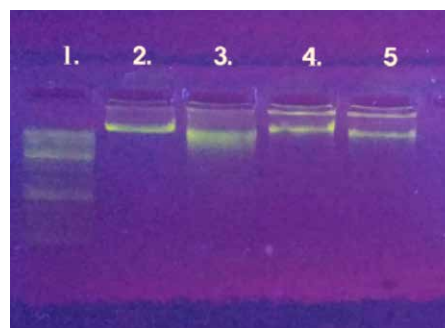


Figura 2. Electroforesis Agarosa 1%, Marcador de peso molecular: 1. MPM, y DNA genómico cepas carriles: 2.RT, 3.SRA1,4. AAA1 y 5. RRJ1.

Los amplicones corresponden al tamaño esperado de fragmentos de 1600 pb utilizando los primers RD y FD (Figuras 3). La muestra SRA1 se realizó por duplicado, aumentando la cantidad de DNA al doble, debido a que en la imagen de DNA genómico se observó degradación del producto genómico.

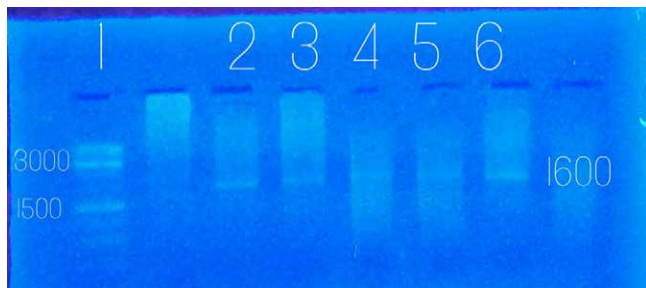


FIGURA 3. Productos de PCR correspondientes a 1600 pb cepas: RT (2), SRA1 (3), AAA1 (4), RRJ1 (5) y SRA1' (6); con los primers RD y FD correspondiente a la región 16S rDNA.

Las secuencias obtenidas se analizaron por similitud utilizando BLAST en la base de datos en el *Gen Bank*. Se obtuvieron secuencias con el 99% de identidad para *Pseudomonas azotoformans* en la muestra de referencia (SRA1) y *Pseudomonas fluorescens* para la muestra de referencia (AAA1). Las dos secuencias restantes presentaron una similitud del 80% de identidad con *Paracoccus* en la muestra de referencia (RRJ1), y *Sinorhizobium meliloti* para la cepa (RH8530). Sin embargo un valor por debajo del 90% valor indica que se trata de un organismo diferente (Tabla 2).

La cepa con clave SRA1 de acuerdo al análisis genético corresponde a *Pseudomonas azotoformans*. En 2016 Fang et al., determinaron que *P. azotoformans* es una bacteria que infecta a los granos de cereal, especialmente del arroz. Por lo tanto debido a esta característica no se trata de un organismo con posible uso en la aplicación para el crecimiento vegetal.

Tabla 2. Alineamientos de secuencias puras

Muestra	Primer	Pb	BLAS NCBI	Identidad (%)	CAPS	ID Secuencia
SRA1	FD	746	<i>Pseudomonas azotomorfans</i>	99	7/783	HF572854.1
AAA1	FD	865	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	2/876	MF838680.1
RRJ1	FD	101	<i>Paracoccus</i>	80	6/126	CP020447.1
RH8530	FD	609	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	80	24/636	EI256451.1

De acuerdo a Ruiz en 2016 la cepa bacteriana bajo la clave RRJ1 corresponde a *Bordetella parapertusis* pero en la secuenciación realizada para este trabajo se obtuvo solamente un 80% de similitud con el género *Paracoccus*, como se puede observar en la tabla el número de nucleóticos es muy pequeño por lo que sería conveniente repetir la PCR y secuencia.

La cepa AAA1 de acuerdo al análisis genético corresponde a *Pseudomonas fluorescens* con un 99% de identidad. En el trabajo elaborado por Pérez et. al en 2015, describen a *P. fluorescens* con capacidad de infectar tejidos vegetales debido a que posee el gen *rpoB*, el cual funciona como un controlador de patógenos natural en plantas inhibiendo o incrementando la resistencia a infecciones lo que permite ser clasificada como una BPCV. En otra investigación Ramanathan et. al. en 2002 concluyeron que tiene efectos

benéficos sobre cultivos, contribuyendo a la fijación de Nitrógeno, síntesis de fitohormonas y promoción del crecimiento de raíces; así protección contra el crecimiento de hongos en la planta como *Magnaporthe grisea*. Otros estudios en 2014 realizado por Dey et. al y Dell' Amico et. al en 2008, citados por Hayat et al 2010 encontraron que *P. fluorescens* produce sideroforos y ácido acético-3 indol, promueve la nodulación y producción en cacahuate, y protege a las plantas de canola contra los efectos inhibitorios del calcio.

La cepa RT perteneciente a la colección de cultivos bacterianos de la FES Iztacala, tiene la morfología clásica del género *Rhizobium*, al realizar el análisis genético y análisis por BLAST se obtuvo solamente una coincidencia de identidad del 80% con *Sinorhizobium meliloti*, este resulta indica que se trata de un organismo diferente. Sin embargo *S. meliloti* también es de gran importancia al ser

una BPCV de la familia *Fabaceae* en particular la alfalfa (Draghi et al., 2017; Santos et al., 2001).

Es importante resaltar que los productos obtenidos de PCR fueron de 1600pb, sin embargo al realizar la secuenciación no fue posible obtener las secuencias completas, las causas probables son debido a posible contaminación con proteínas o residuos fenólicos en la extracción de DNA, degradación de DNA, baja concentración del producto por efecto de la degradación. Es importante resaltar que en la secuenciación del gen que codifica para el rRNA 16S, utilizada para la ubicación taxonómica de bacterias, los criterios que se toman para determinar la identificación de una bacteria dependen del porcentaje de similitud de las secuencias depositadas en el GENBank al hacer el BLAST.

Se determina como especie taxonómica a aquellas bacterias que tengan una similitud $\geq 99\%$, el porcentaje esta entre 95-98% se asegura hasta el nivel de género y $< 95\%$, la ubicación taxonómica quedaba a nivel de familia. Debe de haber una identidad del 99% para ubicar especie y género del 90 al 98%. En el caso de *Pseudomonas fluorescens* AA1, se confirma la identificación. Las cepas bacterianas parcialmente caracterizadas expresaran genes con importancia para el desarrollo vegetal, por lo que al conocer su secuencia genómica se espera que estos coincidan con cepas ya conocidas de la NCBI.

Conclusiones

Con excepción de la cepa RRJ1, se confirma que las cepas utilizadas en este estudio y resguardadas en la Colección de Cultivos Bacterianos de FES Iztacala UNAM (CCBIZTA) son bacterias pertenecientes al grupo de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV).

El análisis molecular es una herramienta aprovechable para el estudio de la biología que permite realizar clasificaciones taxonómicas con una mayor certeza y fiabilidad en conjunto con las técnicas de la microbiología clásica. Así mismo el echo de contar con los cultivos bacterianos conservados en una colección, permite seguir trabajando en la caracterización de laboratorio y de campo de las bacterias con la consecuente ventaja de un mejor aprovechamiento.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el proyecto de investigación Caracterización polifásica de cepas bacterianas para establecer una colección de cultivos bacterianos, con clave numero FESI-DIP-PAPCA-2016-28.

Referencias

- Babalola O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultura importance. *Biotechnol Letter*, 32:1559-1570.
- Banerjee S., Palit R., Sengupta Ch., Standing S. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthobacter* sp. And *Bacillus* isolated from tomato rhizosphere. *AJCS*, 4(6):378-383.
- Bolivar A. M., Rojas A., García-Lugo P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol). *Avan Biomed*, 3(1): 25-33.
- Cuadrado B., Rubio G., Santos W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijo caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 38(1):78-104.
- Draghi W. O., del Papa M. F., Barsch A., Francisco L. M. J., Puhler A., Niehaus K., Lagares A. (2017). A metabolomic approach to characterize the acid-tolerance response in *Sinorhizobium meliloti*. *Metabolomics*. 13(6):6-10.
- Fang Y., Wu L., Qing C. G., and Zhong F. G. (2016). Complete genome sequence of *Pseudomonas azotoformans* S4, a potential biocontrol bacterium. *J Of Biotechnology*. 227: 25-26.
- Finkel O. M., Castrillo G., Herrera P. S., Salas G. I., Dangl L. J. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes, *Current Opinion in Plant Biology*, 38:155-163.
- Hayat R., Safdar A., Ummay A., Rabia K., Iftikhar A. (2010). Soil bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol*, 60:579-598.
- Igiehon N. O. y Babalola O. O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: Contribution of Nitrogen Fixing Bacteria towards sustainable agriculture. *Int J. Environ Res Health* 15(4), 574-598.
- Kontopoulou C. K., Liasis E., Iannetta P. P., Tampakaki A., Savvas D. (2017). Impact of rhizobial inoculation and reduced N supply on biomass production and biological N₂ fixation in common bean grown hydroponically. *J. Sci Food Agric*. 97:, 4353-4361.
- Meena K. K., Sorty A. M., Bitla U. M., Choudhary K., Gupta P., Pareek A., Singh D. P., Prabha R., Sahu P. K., Gupta V. K.,

- Singh H. B., Krishanani K. K., Minhas P. S. (2017). Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies. *Front. Plant Sci.* 8:172
Doi:10.3389/fpls.2017.00172
- Molina G. M. G., De la Torre A. R., Monsalvo R. A. C., Torres-Márquez M E., Montarás C. J. A. (2014) Identification of *Bordetella bronchiseptica* from canine isolates by means of sequencing 16S ribosomal DNA. *J. African Microbiology Research.* 8(19):1964-1969.
- Mwenda G. M., O'Hara G. W., De Meyer, S. E., Howieson, J. G., Terpolilli, J. J. (2018). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenia. *System. Appl Microbiol*, 41: 291-299.
- Olanrewaju, O. S., Glik, B. R., Babalola, O. O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol Biotechnol*, 33 (197): 1-16
- Pérez A. S., Coto A. O., Echemendia P. M., Ávila Q. G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?. *Rev. Protección Vegetal.* 30 (2): 77-86.
- Pérez-Montaño, F. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res*, 169:325-336.
- Poutou R. A., Burbano R. E. M., Torres K., Carraseal A. K., Mercado M. (2005). Estandarización de la extracción de adn y validación de la pcr múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum*, 10(2):61-78.
- Ramanathan A., Shanmugam V., Raguchander T., Samiyappan R. (2002). Induction of systemic resistance in Ragi against blast disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Ann. Plant. Protection Sciences.*10(2): 313-318.
- Rives N; Acebo Y; Hernández A. (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales* 28 (2): 29-38
- Rodríguez H., Fraga R., González T., Bashan Y. (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. En: Velázquez E., Rodríguez-Barrueco C. (Ed). *First International Meeting on Microbiol phosphate solubilization.* pp 15-21Salamanca España. Spring.
- Ruiz M. L. E. (2016). Caracterización polifásica de 17 cepas bacterianas del Laboratorio de Bacteriología de la FES Iztacala. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santos, R. Hérouart, D., Sogaud, S., Touati, D., Puppo, A. (2001). Oxidative Burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *MPMI*, 14(1).86-89
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2009). Informe sobre la Conservación de las Especies Vegetales. Ed. Convenio sobre la Diversidad Biológica y Botanic Gardens Conservation International (BGCI). Montreal, Quebec, Canada. p52.
- Strange R.N y Scott P.R. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Ann Review Phytopathol*, 43:83-116
- Torriente D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales.* 31: 19-26
- Turan, M., Kitiir N., Alkaya U., Gunes A., Tufenkei S., Yildirim E., Nikerel E. (2016). Making soil more accessible to plants: the case of plant growth promoting rhizobacteria. *Plant growth.* InTech, Rijeka. Doi: 10,5772/64826.
- Villegas-Espinoza J.A., Rueda-Puente E.O., Murillo-Amador B., Puente M.E., Ruiz-Espinoza F.H. Zamora-Salgado S., Beltrán M.F.A., (2014). Bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en *Prosopis chilensis*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 5(6): 1041-1053
- Yaish M.W., Al-Lawati A., Jana G.A., Vishwas Patankar H., Glick B.R. (2016). Impact of Soil Salinity on the Structure of the Bacterial Endophytic Community Identified from the Roots of Caliph Medic (*Medicago truncatula*). *PLoS ONE* 11(7): 1-17
- Zhang L., Wang Y, Wei L., Wang Y, Shen X Li S. (2013). *Taibaiella smilacinae* gen. nov., sp. nov., an endophytic member of the family Chitinophagaceae isolated from the stem of *Smilacina japonica*, and emended description of *Flavhumibacter petaseus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3769-3776