

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

## Microorganisms that improve plant growth and soil quality. Review

## Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión

Raúl O. Pedraza<sup>1</sup>, Kátia R.S. Teixeira<sup>2</sup>, Ana Fernández Scavino<sup>3</sup>,  
Inés García de Salamone<sup>4</sup>, Beatriz E. Baca<sup>5</sup>, Rosario Azcón<sup>6</sup>,  
Vera L.D. Baldani<sup>2</sup>, Ruth Bonilla<sup>7</sup>.

## ABSTRACT

The present article of revision arise from theory and practical subjects developed during the course "Characterization and contribution of plant growth-promoting microorganisms in the agricultural sustainability" carried out in the Laboratory of Soil Microbiology of the Colombian Corporation of Agricultural Research (CORPOICA) located in Mosquera (Cundinamarca), Colombia, in July 2010. This activity is in the framework of the DIMIAGRI network that includes researchers from Argentina, Brazil, Colombia, Spain, Guatemala, Mexico and Uruguay, gathered in a Coordination Action funded by the Iberoamerican Program of Science and Technology for the Development (CYTED). Aspects inherent to the growth and plant health, root system, the surrounding soil (rhizosphere), microorganisms that system partners and their contribution to sustainable management of soil-plant were analyzed in this work. Topics related to the microbial biodiversity and its effect on soil quality; nutrient cycling in the soil by microbiological activity; the importance of microorganisms in plant growth-promotion and their biotechnological application as an alternative to favor sustainability and soil quality were presented. The aim of this review is to show important concepts related to the soil-plant-microorganism system, which will allow to achieve the general objective of the DIMIAGRI network: to mitigate the negative environmental impact due to the excessive use of chemical products on agricultural crops by using plant growth-promoting microorganisms, including bacteria and beneficial fungi associated to plant roots.

*Keywords:* agriculture sustainability, biodiversity, biological nitrogen fixation, mycorrhiza, nutrient cycling, rhizosphere

## RESUMEN

El presente artículo surge de la revisión de la teoría y temas prácticos desarrollados durante el curso "Caracterización y contribución de las plantas que promueven el crecimiento de microorganismos en la sostenibilidad de la agricultura", llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), ubicado en Mosquera (Cundinamarca), Colombia, en julio de 2010. Esta actividad fue desarrollada en el marco de la Red DIMIAGRI que incluye a investigadores de Argentina, Brasil, Colombia, España, Guatemala, México y Uruguay, reunidos en una acción de coordinación financiada por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Los aspectos inherentes al crecimiento y la sanidad vegetal, el sistema radical, el suelo circundante (rizósfera), los microorganismos asociados en ese sistema y su contribución al manejo sustentable del complejo suelo-planta fueron analizados en este trabajo. Se abordan temas como la biodiversidad microbiana y su efecto en la calidad del suelo; el ciclado de nutrientes del suelo por acción microbiológica; la importancia de los microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal y su utilización biotecnológica como alternativa para favorecer la sustentabilidad y calidad de los suelos. Se pretende interiorizar en los conceptos relacionados con el consorcio suelo-planta-microorganismo y el objetivo de mitigar el impacto ambiental negativo causado por el uso excesivo de insumos químicos en los cultivos agrícolas, mediante la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, que incluyen tanto a bacterias como a hongos benéficos asociados con las raíces de las plantas.

*Palabras clave:* biodiversidad; ciclado de nutrientes; sustentabilidad agrícola; fijación biológica de nitrógeno; micorrizas; rizósfera.

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina. raulpedraza03@yahoo.com.ar

<sup>2</sup> Agrobiología, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Seropédica, Brasil. katia@cnpab.embrapa.br; vera@cnpab.embrapa.br

<sup>3</sup> Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. afermand@fq.edu.uy

<sup>4</sup> Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. igarcia@agro.uba.ar

<sup>5</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. bebaca\_41@hotmail.com

<sup>6</sup> Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas – SCIC. Granada, España. rosario.azcon@eez.csic.es

<sup>7</sup> Centro de Investigación Tibaitata, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica. Mosquera, Colombia. rbonilla@corpoica.org.co

## INTRODUCCIÓN

Un ecosistema saludable para las generaciones futuras y la urgente demanda de una producción sustentable de alimentos y biocombustibles son cuestiones actualmente importantes para la sociedad mundial. Frente a este escenario, es de suma importancia el empeño de la comunidad científica en la búsqueda constante de alternativas posibles para que el aumento de la producción agrícola esté garantizado y en sintonía con una buena calidad ambiental.

La agricultura tradicional ha buscado acrecentar la producción agrícola mediante el manejo del agua, los nutrientes y el control de malezas, insectos y organismos fitopatógenos. Prácticas más recientes, apuntan a utilizar los insumos agrícolas en forma dirigida y controlada en el manejo integrado de plagas y enfermedades, la agricultura de precisión, entre otros. Así, se busca identificar los puntos más sensibles del manejo del cultivo para aumentar su rendimiento y disminuir la cantidad de agroquímicos utilizados. Por último, cabe considerar que el costo de los insumos agrícolas es altamente dependiente de variables internacionales y que sus efectos en el ambiente pueden ser perjudiciales cuando su uso es excesivo y no controlado.

En este contexto, la Red DIMIAGRI, integrada por distintos grupos de investigadores de Argentina, Brasil, Colombia, España, Guatemala, México y Uruguay, nucleados en una acción de coordinada con el financiamiento del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), lleva a cabo en forma conjunta el proyecto "La diversidad de los microorganismos benéficos como alternativa para la promoción del crecimiento vegetal y mantenimiento de la calidad de los suelos agrícolas en países iberoamericanos". Su objetivo general es mitigar el impacto ambiental negativo causado por el uso excesivo de insumos químicos en los cultivos agrícolas, mediante la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, que incluyen tanto a bacterias como a hongos benéficos asociados de forma saprofítica o simbiótica con las raíces de las plantas.

Para ello, las investigaciones se focalizan en la evaluación de la diversidad genética y bioquímica de los microorganismos rizosféricos, su caracterización en relación a la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos, aporte de nutrientes, producción de hormonas vegetales y de sustancias capaces de captar hierro (sideróforos). También se incluye la selección de los microorganismos más eficientes en experimentos de inoculación en condiciones ambientales controladas de laboratorio, invernadero y de campo, al igual que el estudio de los costos de producción con la aplicación de

microorganismos *vs.* fertilizantes químicos en cultivos de interés agrícola. Con esto se pretende llegar a transferir esta tecnología al sector productivo. Así, esperamos contribuir a mejorar la calidad ambiental y producción sustentable de alimentos y biocombustibles, mediante un enfoque biológico e integrado basado en la importancia de la diversidad microbiológica y su potencial de utilización biotecnológica.

El presente artículo concentra los temas desarrollados en forma teórica y práctica en el aspectos inherentes al desarrollo vegetal, su sistema radical, el suelo circundante (rizósfera), los microorganismos asociados en ese sistema y su contribución al manejo sustentable; la biodiversidad microbiana y su efecto en la calidad del suelo; el ciclado de nutrientes del suelo por acción microbiológica; la importancia de los microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal y su utilización biotecnológica como alternativa para favorecer la sustentabilidad y calidad de los suelos iberoamericanos. Según lo expuesto, el objetivo general es realizar una revisión de conceptos y aspectos relacionados con las interacciones biológicas que se dan en el suelo y su efecto sobre el crecimiento de las plantas y la conservación del ambiente.

### La rizósfera y manejo sustentable

Las poblaciones microbianas del suelo están inmersas en un marco de interacción que afecta el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo. Ellas están involucradas en actividades fundamentales que aseguran la estabilidad y productividad, tanto de los agroecosistemas como de los ecosistemas naturales. Investigaciones estratégicas y aplicadas han demostrado el interés de ciertas actividades de cooperación microbiana para ser explotadas como una biotecnología de bajo impacto y costo para contribuir con prácticas agro-tecnológicas sustentables y amigables con el ambiente (Richardson *et al.*, 2009).

Hasido ampliamente demostrado que los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y constituyentes del suelo en la interfase raíz-suelo. Este gran conjunto de interacciones entre suelo, raíces y microorganismos da lugar al desarrollo de un ambiente dinámico conocido como rizósfera, donde una variedad de formas microbianas pueden desarrollarse activamente y en equilibrio.

Sin embargo, la mayoría de los estudios microbiológicos de la rizósfera, especialmente aquellos que describen interacciones microbianas cooperativas, han centrado su atención en bacterias y hongos. De acuerdo con sus funciones, estos se han agrupado en *i-* degradadores de residuos orgánicos, *ii-* bacterias promotoras del

crecimiento vegetal, y *iii*- hongos y bacterias antagonistas de patógenos de raíces. Algunos de estos microorganismos, los endofíticos, colonizan internamente los tejidos radicales y desarrollan actividades dentro de la planta que influyen la promoción del crecimiento y protección vegetal. Algunos de ellos son simbioses mutualistas de las plantas y entre los más importantes se incluyen a las bacterias fijadoras de nitrógeno y a los hongos micorrízicos (Barea *et al.*, 2005).

Las micorrizas contribuyen a la nutrición, particularmente en la absorción de fósforo por las plantas, tanto en ecosistemas agrícolas como naturales. Esta relación simbiótica también mejora la captación de agua y otros nutrientes, además de la transferencia de nitrógeno a partir de distintas fuentes. La simbiosis micorrízica no sólo influye en el ciclado de nutrientes en el sistema suelo-planta, sino que también mejora la sanidad vegetal a través de una protección incrementada contra el estrés, ya sean biótico (por ej., ataque de patógenos), o abiótico (por ej., sequía, salinidad, metales pesados, contaminantes orgánicos, etc.), y mejoran la estructura del suelo a través de la formación de microagregados, necesarios para un buen estado nutricional e hídrico del suelo (Barea *et al.*, 2005).

El efecto del micelio de los hongos que forman las micorrizas en la agregación del suelo fue evidenciado en numerosas situaciones ecológicas mediante la participación de la glomalina, una glicoproteína producida por las hifas externas de los hongos. Se sugirió que las glomalinas, debido a su naturaleza de tipo "pegamento hidrofóbico", participan en la iniciación y estabilización de los agregados del suelo (Miller y Jastrow, 2000).

La rizósfera constituye uno de esos puntos sensibles a la respuesta del cultivo porque concentra una gran actividad metabólica con intercambio de nutrientes entre la atmósfera y el suelo, la cual es mediada por la acción e interacción de plantas y microorganismos del suelo.

Se considera que las plantas constituyen ecosistemas complejos de eucariotas y procariotas que determinan las condiciones del hábitat que los circunda (Gray y Smith, 2005). Los microorganismos de la rizósfera contribuyen al crecimiento vegetal aumentando la disponibilidad de nutrientes limitantes como el fósforo y el nitrógeno, y a su vez, la composición y actividad de la comunidad bacteriana, está fuertemente influenciada por el tipo de vegetación presente en el suelo (Thomson *et al.*, 2010; Semmartin *et al.*, 2010).

Un análisis de sustentabilidad requiere de un conocimiento detallado de las interrelaciones que se presentan entre los microorganismos seleccionados incorporados (inocu-

lantes) frente a la compleja comunidad microbiana natural que habita ese microambiente (Naiman *et al.*, 2009). En este sentido, el mantenimiento de la viabilidad, diversidad de la población y el funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo es esencial para la agricultura sustentable. Esto se debe a que la fertilidad del suelo no sólo depende de su composición química, sino también de la naturaleza cuantitativa y cualitativa de los microorganismos que habitan en él (Giri *et al.*, 2005).

### **Biodiversidad microbiana y su efecto en la calidad del suelo**

La calidad del suelo es definida por su capacidad para funcionar en un marco de ecosistema natural o modificado, sostener la productividad vegetal y animal, mantener o mejorar la calidad de agua y aire, y contribuir a la salud humana y habitabilidad. La calidad del suelo está fuertemente influenciada por los procesos microbianos que en él ocurren, y éstos, relacionados con la diversidad; por tanto, es muy probable que el mantenimiento de la estructura de la comunidad microbiana tenga la capacidad de servir como indicador temprano y de gran sensibilidad de la degradación o empobrecimiento del suelo (Abril, 2003).

En los sistemas agrícolas la biodiversidad desempeña servicios ecológicos, más allá de la producción de alimento, fibra, combustibles e ingresos monetarios. Entre los ejemplos se incluyen el ciclado de nutrientes, control del microclima local, regulación de procesos hidrológicos locales, regulación de la abundancia de organismos indeseables y detoxificación de productos químicos nocivos. Estos procesos de renovación y servicios de los ecosistemas son en gran parte microbiológicos, por lo tanto, su persistencia depende del mantenimiento de la biodiversidad microbiana nativa o exógena del suelo (Altieri, 1994). El hecho de que en algunas situaciones sea el suelo, y en otras el tipo de plantas, el factor determinante de la diversidad microbiana del suelo, está relacionado con la complejidad de las interacciones microbianas en el mismo, incluyendo las interacciones microorganismos-suelo, y microorganismos-plantas (Garbeva *et al.*, 2004).

Numerosos estudios muestran que diferentes manejos agrícolas modifican la biodiversidad y alteran la estructura de las comunidades microbiológicas del suelo (Kennedy y Smith, 1995; García de Salamone *et al.*, 2006). Por ello, es indispensable implementar prácticas de manejo, como siembra directa e inclusión de mayor cantidad de gramíneas en la rotación con plantas leguminosas, que garanticen un balance positivo de nutrientes y el uso eficiente de los recursos del sistema suelo-planta, disminuyendo la degradación de la materia orgánica (Grandy *et al.*, 2006; Sisti *et al.*, 2004). Así, la fijación biológica de nitrógeno

(FBN), que constituye el mayor aporte biológico de nitrógeno a la biosfera, es vista como una fuente esencial y potencial para el desarrollo de agrosistemas sustentables (Urquiaga *et al.*, 2004).

En un gramo de suelo hay millones de bacterias cultivables, entre las cuales se encuentra una gran diversidad metabólica para transformar los elementos que forman parte de los nutrientes necesarios para todos los seres vivos. Su presencia no indica que todos los microorganismos participen activamente en la dinámica de esos elementos, ya que su contribución depende de su estado fisiológico, de su actividad enzimática y de la concentración y disponibilidad de los compuestos a utilizar. Se ha observado que diversas transformaciones microbianas como la oxidación aeróbica de metano y de amonio, así como la metanogénesis y la reducción de sulfatos, están generalmente comandadas por la actividad más que por el número de los microorganismos que intervienen específicamente en dichas transformaciones (Röling, 2007). Esta actividad metabólica depende a su vez de las condiciones circundantes, determinadas por las propiedades fisicoquímicas del suelo y por los otros organismos que comparten el hábitat.

### **Efecto de los microorganismos en el ciclo de nutrientes en el suelo**

Muchos parámetros que se emplean para medir la calidad del suelo están directamente ligados a la actividad metabólica dependiente de los microorganismos, y esa actividad es la que permite el ciclo de nutrientes.

Varias etapas del ciclo de nutrientes en el suelo son exclusivamente microbianas. Así, la degradación de la mayoría de los polímeros carbonados constituyentes de los tejidos vegetales, la producción y el consumo de metano, la fijación de nitrógeno o la oxidación de amonio a nitrito y posteriormente a nitrato, son procesos biológicos llevados a cabo sólo por microorganismos.

La principal fuente de carbono lábil en el suelo son las plantas, cuyos constituyentes principalmente son polímeros como la celulosa, hemicelulosa, lignina y proteínas, y por una pequeña fracción (alrededor del 10% del peso seco) de compuestos solubles de menor peso molecular (Horwath, 2007). Estos compuestos vegetales constituyen la principal fuente de energía y carbono para los microorganismos del suelo. Los hongos, los actinomicetes y muchas bacterias son capaces de producir enzimas extracelulares que hidrolizan dichos polímeros (Paul y Clark, 1989). Así, dan lugar a compuestos más sencillos que pueden ser utilizados por ellos y por otros que no poseen capacidad celulolítica o proteolítica, y expanden el uso de los compuestos carbonados a un grupo más amplio de organismos del suelo.

Los productos resultantes de la degradación aerobia de compuestos carbonados son la biomasa de los organismos que oxidan estos compuestos y el dióxido de carbono, producto de la oxidación completa del carbono. En condiciones anaerobias, además de biomasa microbiana, se producen compuestos reducidos del carbono, como alcoholes y ácidos y, en ausencia de sulfato o nitrato, también puede producirse gas metano.

Mientras que la mayoría de los organismos del suelo dependen de las plantas para el suministro de carbono, el ingreso de nitrógeno en sistemas naturales depende fuertemente de los microorganismos. En particular, depende de algunas bacterias que tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico, donde se encuentra como nitrógeno elemental de forma ilimitada, y de hacerlo disponible para los demás organismos del suelo y las plantas (Atlas y Bartha, 1993). La fijación de nitrógeno es un proceso energéticamente costoso para las bacterias con esa capacidad, pero representa una gran ventaja competitiva para ellas, especialmente en suelos donde los compuestos oxidados o reducidos de nitrógeno son escasos.

Varios grupos funcionales de microorganismos que intervienen en el ciclo del nitrógeno pueden usarse como indicadores de calidad del suelo. Cabe citar como importantes en la movilización del nitrógeno a los fijadores libres o simbióticos de nitrógeno atmosférico y a los mineralizadores de nitrógeno, capaces de descomponer compuestos orgánicos nitrogenados produciendo amonio (Andrade, 2004). Otros microorganismos importantes del ciclo del nitrógeno son los oxidantes de amonio y de nitrito, bacterias aerobias de lento crecimiento, que producen nitrito y nitrato, respectivamente. Este proceso puede representar una pérdida de nitrógeno para el suelo, si no es captado por las plantas, porque el nitrato generado no se retiene y se desplaza rápidamente hacia las aguas superficiales o subterráneas. El nitrógeno del suelo también se puede perder cuando hay condiciones anaeróbicas, como las generadas en suelos inundados, cuando la materia orgánica se oxida y el nitrato se reduce por acción de las bacterias desnitrificantes que producen nitrógeno gaseoso y óxido nitroso, uno de los principales gases causantes del efecto invernadero.

La capacidad productiva de los suelos está directamente asociada con su contenido de materia orgánica que es la principal reserva del carbono orgánico y principal fuente de nutrientes para las plantas (Grandy *et al.*, 2006; Studdert *et al.*, 1997). Los cultivos de cereales brindan el aporte más importante de residuos al suelo en los sistemas de agricultura continua. Es sabido que el funcionamiento de un ecosistema terrestre depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo (Barea, 2004; Doran y Zeiss, 2000).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (por su sigla en inglés), se asocian en el nicho rizosférico con plantas de interés agronómico y en ciertos casos producen efectos benéficos directos sobre su crecimiento y nutrición tanto nitrogenada como fosforada. Así se constituyen en una alternativa económica y ecológica para aumentar la producción de alimentos (Bashan *et al.*, 2004; Caballero-Mellado, 2004; Díaz-Zorita y Fernández, 2008; Ferraris y Courerot, 2004; Naiman *et al.*, 2009; Reed y Glick, 2004). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el impacto que tienen las interacciones entre los cultivos y la microflora, tanto edáfica como asociada a las plantas, sobre la dinámica de los nutrientes puede ser considerable. En este sentido, el incremento de biomasa vegetal debido a la inoculación con PGPB puede afectar los procesos de mineralización de nutrientes, solubilización de fosfatos, FBN y otros procesos biológicos asociados a la dinámica de los nutrientes en el sistema productivo (García de Salamone *et al.*, 2009). Por ello, se requiere un conocimiento detallado de las interrelaciones que se presentan entre microorganismos agregados al sistema (inoculantes) y los nativos presentes en el suelo y asociados a las plantas.

### Importancia de los microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal

Entre los factores considerados esenciales para el desarrollo de las plantas, después del agua, el nitrógeno es el principal elemento limitante de la productividad vegetal. El aporte de este nutriente a los suelos puede ser por medio de la descomposición de la materia orgánica, descargas eléctricas, utilización de fertilizantes y por FBN. Dentro de estas posibilidades, la utilización de fertilizantes sintéticos es la práctica más empleada en la reposición de nitrógeno a los suelos cultivados, a pesar de ser costosos y por lo tanto, encarecer la producción agrícola. Sumado a esto, el hecho que parte de los fertilizantes aplicados se pierdan por procesos de lixiviación o se tornen insolubles por cationes de intercambio, hace que el proceso tradicional de cultivo sea poco eficiente (Pardo *et al.*, 2009).

En los países de clima tropical las plantas son todavía más dependientes de esos fertilizantes. Generalmente, las plantas son capaces de utilizar solamente 50% del fertilizante aplicado, mientras que el restante es perdido del sistema suelo-planta causando pérdidas económicas y contaminación ambiental (Saikia y Vanita, 2007). En este contexto, los procesos biológicos de incorporación de nutrientes a dicho sistema vienen siendo estudiados para evaluar el potencial de utilización de microorganismos en diferentes cultivos agrícolas. Diversos estudios muestran que los organismos diazotróficos (fijadores de nitrógeno), colonizan sus hospederos contribuyendo con cantidades sustanciales de nitrógeno fijado biológicamente. Por ejemplo, en

cultivos de maíz y de arroz inundado dicha contribución varía de 20 a 50 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno al año (Ferreira, 2008). En caña de azúcar puede llegar anualmente a 150 kg ha<sup>-1</sup> N (Urquiaga *et al.*, 1992). En pasturas de *Paspalum notatum*, *Brachiaria decumbens* y *B. humidicola*, el aporte de nitrógeno es de aproximadamente 20 kg ha<sup>-1</sup> al año (Brasil *et al.*, 2005; Govindarajan *et al.*, 2008).

A pesar de que la contribución de nitrógeno proveniente de la FBN está bien documentada, y muestra resultados promisorios para algunos cultivos, los estudios de identificación y selección de bacterias diazotróficas y promotoras del crecimiento vegetal asociadas a éstas y a otras plantas, deben todavía ser incentivados, ya que el nuevo escenario mundial de demanda de energía apunta hacia la producción de biocombustibles. En este contexto, el cultivo de pasto elefante (*Pennisetum purpureum*), una planta de alta relación carbono-nitrógeno, sumada a la alta producción de biomasa asociada a la FBN, con bajo uso de insumos e inversiones para su cultivo, y al igual que otras plantas con potencial bioenergético, deben ser también consideradas. La importancia de estos procesos en la producción de biomasa es esencial, pues contribuyen con la economía de fertilizantes (o sea, energía fósil), y el balance energético es positivo, siendo éste un parámetro esencial de cualquier programa bioenergético (Samson *et al.*, 2005).

Un aspecto recientemente revisado de la importancia de las PGPB es su capacidad para ejercer el control biológico de las enfermedades de las plantas (Compant *et al.*, 2005). La intensidad de la asociación planta-bacteria revela la capacidad de esos microorganismos de adaptarse selectivamente al nicho ecológico específico determinado por la planta y su entorno. Esta capacidad determina que las PGPB puedan ocupar y (algunas veces) desplazar por competencia a otros organismos patógenos o generar una respuesta de inmunidad o resistencia que aumente las defensas de la planta hacia la invasión de patógenos.

En el caso de las PGPB, se han realizado estudios no sólo en relación con el impacto que tiene la presencia de éstas sobre la especie vegetal, sino también con respecto a los mecanismos que estos organismos emplean para promover el crecimiento e interactuar con la planta (Sgroj *et al.*, 2009). Así, se han pautado ciertos criterios sobre la caracterización de este grupo de microorganismos para definir tanto su estrategia de promoción del desarrollo, como para pre-seleccionar aquellos con mayor potencial para ser empleados en sistemas agropecuarios sostenibles. Algunos de los criterios que hoy permiten seleccionar una bacteria con potencial PGPB son: fijación biológica de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de fósforo orgánico,

producción de inductores de crecimiento vegetal como auxinas, producción de sideróforos, ácido salicílico, ácido cianhídrico, y actividad ACC desaminasa, entre otras (Glick *et al.*, 2007; Onofre-Lemus *et al.*, 2009; Sgroy *et al.*, 2009).

Sin embargo, en ocasiones ciertas características de promoción vegetal suelen estar relacionadas con el cultivo de interés o el tipo de suelo. Cabe resaltar el hecho de que las bacterias beneficiosas no suelen actuar espacialmente de la misma manera. Algunas colonizan los tejidos vegetales internos, denominadas endófitas (ej., algunas cepas de *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*), mientras que otras no tienen esta capacidad y son designadas epífitas (ej., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp.). También se encuentran aquellas bacterias capaces de formar una estructura como nódulo, por ejemplo, en raíces de plantas leguminosas, conocidas como simbióticas (ej., *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp.), mientras que las que no poseen esta capacidad se llaman bacterias asociativas (Bécquer *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2009).

Los efectos del uso de los tratamientos biológicos pueden ser directos o indirectos (Maddonni *et al.*, 2004). Entre los primeros se encuentran la fijación de nitrógeno atmosférico, absorción incrementada de agua y nutrientes, y la producción de reguladores del crecimiento, tales como auxinas, citocininas y giberelinas (García de Salamone *et al.*, 1996; Saubidet y Barneix 2004; García de Salamone *et al.*, 2001). Estas hormonas podrían afectar el pool hormonal endógeno de la planta modificando la morfología, la superficie y la actividad enzimática radical, como así también el crecimiento de la parte aérea. Entre los efectos indirectos se incluyen la producción de sustancias que inhiben el desarrollo de patógenos vegetales con la consiguiente ventaja para el cultivo (Kloepper, 1993). Estos efectos son especialmente significativos en los estadios iniciales del desarrollo vegetal ya que son los más vulnerables para el establecimiento de las plántulas. Cuanto menor sea el período transcurrido entre la imbibición y la emergencia de la plántula, mayores serán las posibilidades de supervivencia que tendrá la misma (Barassi *et al.*, 2008).

### **Uso de microorganismos benéficos como una biotecnología que favorece la sustentabilidad de los ecosistemas**

Uno de los factores que permiten alcanzar mayor competitividad en el mercado mundial de los productos agrícolas es la reducción del uso de agroquímicos, cuyo costo depende en gran medida del precio del petróleo (especialmente el fertilizante nitrogenado) y cuyo efecto puede tener impactos nocivos sobre el ambiente. La sustitución parcial o total de agroquímicos por

microorganismos, manteniendo altos rendimientos del cultivo, es una alternativa valiosa para lograr una producción sostenible y para conquistar mercados exigentes.

La utilización de microorganismos benéficos ha tenido una amplia difusión en los últimos años, debido a su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos en distintas situaciones y a la factibilidad de permitir desarrollar una agricultura orgánica (Caballero-Mellado, 2004, Cassán y García de Salamone, 2008).

Los inoculantes microbianos representan una nueva tecnología conducente a mejorar la productividad del sistema agropecuario a largo plazo. Puede ser considerada como una tecnología limpia, alineada con principios de la agricultura sustentable, frente al aumento abusivo de la utilización de pesticidas y fertilizantes en estos últimos tiempos. Varios microorganismos son utilizados en la práctica agrícola habitual, y otros tienen potencialidad para ser utilizados en el futuro (Maddonni *et al.*, 2004; Naiman *et al.*, 2009).

La incorporación de organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos que contribuyan a la implantación, desarrollo y producción de cultivos es una alternativa que permite lograr aumentos en el crecimiento radical. Así se favorece la exploración del suelo y se mejora la accesibilidad al agua y nutrientes limitantes para los cultivos. Como consecuencia, se reducen procesos de pérdida de nutrientes móviles, se atenúan períodos de moderado estrés hídrico y se logra mantener tasas de crecimiento activo del cultivo mejorando su capacidad fotosintética (Díaz-Zorita y Fernández, 2008).

En condiciones de campo se encontraron diferencias significativas en la biomasa radical de cultivos de trigo no inoculado e inoculado con productos comerciales de *A. brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. Dependiendo de las combinaciones bacteria-planta los incrementos de rendimiento en cultivos de trigo, maíz y arroz pueden ser variables. Así, en distintos ensayos de trigo y de maíz realizados en la región pampeana argentina se observaron diferentes niveles de respuesta que evidenciaron variabilidad en las capacidades tanto de las PGPB como de las plantas inoculadas (García de Salamone y Monzón de Asconegui, 2008). En arroz, numerosos autores mostraron incrementos variables, que en promedio fueron del 20% en condiciones de campo (García de Salamone *et al.*, 2010; Pedraza *et al.*, 2009; Balandreau, 2002; Gopalawany y Vidhyasekaran, 1987; Omar *et al.*, 1987). Dado que en condiciones de invernadero se reportan incrementos del rendimiento del orden del 32 al 81% (Malik *et al.*, 2002; Mirza *et al.*, 2000), se pone en evidencia que existe un margen de aumento en la respuesta a la inoculación

de arroz con *Azospirillum*. En este sentido se deberían establecer las bases para lograr una correcta interacción planta-bacteria-ambiente.

Las bacterias del género *Pseudomonas* han sido utilizadas como PGPB tanto por sus efectos directos (García de Salamone y Nelson, 2006; Naiman *et al.*, 2009) como indirectos (Kloepper, 1993). La mayor cantidad de información referida a la actividad de PGPB, como por ejemplo *Pseudomonas spp.*, está vinculada a efectos indirectos, a través del control de microorganismos patógenos, produciendo compuestos antifúngicos que pueden suprimir enfermedades a través de varios mecanismos, que incluyen una mayor capacidad competitiva por los nutrientes disponibles, producción de antibióticos, sideróforos (compuestos orgánicos que captan hierro) e inducción de resistencia sistémica (Dowling y O'Gara, 1994; Keel y Défago, 1997). Por otro lado, varias cepas de *Pseudomonas* fueron caracterizadas como solubilizadoras de fósforo por su capacidad de producir ácidos orgánicos (ácido oxálico, fumárico y cítrico) y enzimas fosfatasa, facilitando la solubilización del fósforo inorgánico y otros nutrientes (Ferraris y Couretot, 2004).

En aras de avanzar en el desarrollo de alternativas de fertilización biológica, el Laboratorio de Microbiología de Suelos de CORPOICA, Colombia, ha realizado trabajos con el objeto de aislar y caracterizar microorganismos nativos con potencial para la promoción del crecimiento vegetal. Diversos cultivos fueron impactados con dicha tecnología y actualmente dicho laboratorio cuenta con un producto comercial registrado denominado MONIBAC, basado en *Azotobacter chroococcum*, el cual tiene registro de venta para diferentes cultivos (ej., algodón, gramíneas y hortalizas).

En Uruguay existe una extensa tradición en la selección y uso de rizobacterias (particularmente fijadoras simbióticas de nitrógeno) asociadas con leguminosas. En cambio, el empleo de inoculantes bacterianos para gramíneas aún no se ha implementado. Si bien, se han aislado bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas a partir plantas de arroz y se han ensayado en invernáculo (Punschke *et al.*, 2001), no se han desarrollado aún inoculantes comerciales.

Argentina constituye uno de los países latinoamericanos donde el uso de inoculantes biológicos está más afianzado, tanto en el sector productor agrícola como en el sector de fabricantes de inoculantes (Cassán y García de Salamone, 2008). Al igual que en México, la aplicación de biofertilizantes con *Azospirillum* ha sido incorporado al cultivo de granos (ej., maíz, trigo) y también de soja, en forma conjunta con otros géneros bacterianos del grupo de los rizobios. Por otro lado, Brasil es pionero en la aplicación de inoculantes con rizobios en su extensa superficie

productora de soja, logrando importantes ahorros monetarios por disminuir o suprimir la aplicación de fertilizantes de síntesis química. Actualmente también cuentan con un inoculante comercial, Masterfix gramínea, basado en *Azospirillum*, recomendado para los cultivos de maíz y trigo, además de un biofertilizante basado en una mezcla de distintas cepas de bacterias diazotróficas (en evaluación) para ser utilizado en el cultivo de caña de azúcar.

Las bacterias rizosféricas pertenecientes a la familia Rizobiaceas constituyen uno de los fertilizantes biológicos más usados y eficientes. Presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y reducirlo a forma amoniacal en una estructura sumamente especializada llamada nódulo, formada por estas bacterias en la raíz de plantas de la familia leguminosa. En ellas, la relación planta-bacteria es sumamente específica. Este aspecto es el más limitante para su uso agronómico ya que cada leguminosa sólo nodula con su rizobio específico y las no leguminosas no tienen la opción de beneficiarse de dicha asociación. Pero la gran ventaja es que el nitrógeno biológicamente adquirido es totalmente aprovechado por la planta leguminosa que mantiene la asociación simbiótica con la bacteria.

## CONCLUSIONES

Según lo expuesto precedentemente, resulta esencial el conocimiento de la microbiota, sea ésta fijadora de nitrógeno, solubilizadora de fosfatos o promotora del crecimiento vegetal, que se asocia con los diferentes cultivos agrícolas, con el propósito de maximizar los efectos benéficos de la biofertilización y bioestimulación, para desarrollar una producción agrícola más sustentable y atender la creciente demanda de alimentos de calidad y de bajo costo de producción. De esta manera, la utilización de microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de las plantas, se presenta como una gran alternativa de biofertilización. Estudios controlados de laboratorio, invernadero, y de forma más natural en el campo, han demostrado que la aplicación de estas tecnologías redundará en un beneficio para los productores. Sin embargo, ciertas consideraciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de recomendar o diseñar un inoculante basado en organismos vivos a fin de lograr su máxima potencialidad en los distintos cultivos, suelos y climas donde son aplicados.

En general, los parámetros ecológicos, sinérgicos, fisiológicos y los procesos bioquímicos de los microorganismos en el ambiente son determinantes y actúan de manera integrada con los diferentes cultivos, dando lugar a una o más respuestas cuyas relaciones con los parámetros agronómicos tendrán que ser bien determinadas. Por lo tanto, los procesos que contribuyen

a la promoción de crecimiento de las plantas deberán considerar las respuestas desde diversos puntos de vista técnico-científico.

La adquisición de nutrientes del suelo está gobernada por el crecimiento radical y su interacción con los componentes bióticos y abióticos del suelo. Esta interacción se manifiesta en gran medida por las propiedades físicas, químicas y biológicas de la rizósfera. A partir de un mejor conocimiento de las interacciones de la rizósfera y de cómo se asocian las raíces con los microorganismos del suelo habrá oportunidad para mejorar la eficiencia de la captación de nutrientes por las plantas. Esto podrá ocurrir ya sea por selección directa de plantas, manipulación del crecimiento radical o mediante el manejo de las comunidades microbianas autóctonas y/o inocula-

ciones específicas para lograr interacciones simbióticas y asociativas eficientes. Tales interacciones han demostrado su contribución al crecimiento de las plantas y a la calidad de los suelos; por lo tanto, constituyen aspectos críticos que deberán ser considerados en el desarrollo de una agricultura sostenible y buen funcionamiento del ecosistema.

#### A G R A D E C I M I E N T O S

Los autores agradecen a los directivos y personal de Corpoica el apoyo brindado para la realización del curso en el Laboratorio de Microbiología de Suelos. También agradecen el financiamiento del CYTED y CNPq (Proc. N<sup>o</sup> 490013/2010-4) mediante la Red DIMIAGRI/Acción 409AC0379.



## REFERENCIAS

- Abril A. 2003. ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Austral* 13:195-204.
- Altieri MA. 1994. Biodiversity and pest management in agroecosystems. Haworth Press, New York, 185 p.
- Andrade D. 2004. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. En: Varma A, Abbott L, Werner D, Hampf R (eds.). *Plant surface microbiology*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 52-69.
- Atlas R, Bartha R. 1993. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 3<sup>rd</sup> ed. Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA. 563 p.
- Balandreau J. 2002. The spermosphere model to select for plant growth promoting rhizobacteria. En: Kennedy IR, Choudhury ATMA (eds.). *Biofertilisers in action*. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, Australia. pp. 55-63.
- Barassi CA, Sueldo RJ, Creus CM. 2008. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. En: Cassán F, García de Salamone IE (eds.). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires.
- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En: Buscot F, Varma A (eds.). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 195-212.
- Barea JM. 2004. Impacto de las micorrizas en la calidad del suelo y la productividad vegetal en sistemas agrícolas y espacios naturales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.). *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 7-11.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. 2004. *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521-577.
- Bécquer CJ, Salas B, Archambault D, Slaski J, Anyia A. 2008. Selección de rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá, inoculados en maíz (*Zea mays*, L.). Fase I: invernadero. *Pastos y Forrajes* 31(3):229-246.
- Brasil MS, Baldani JJ, Baldani VLD. 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas asociadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira Ciência do Solo* 29(2):179-190.
- Caballero Mellado, J. 2004. Uso de *Azospirillum* como alternativa tecnológica viable para cultivos de cereales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.). *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 45-49.
- Cassán FD, García de Salamone IE. 2008. *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires.
- Compant S, Duffy D, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951-4959.
- Díaz-Zorita M, Fernández CMV. 2008. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. En: Cassán F, García de Salamone IE (eds.). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. pp.155-166.
- Doran JW, Zeiss MR. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied and Soil Ecology* 15:3-11.
- Dowling DN, O'Gara F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology* 12(4):133-141.
- Ferraris G, Courerot L. 2004. Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas* spp) en trigo. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 9:37-39.
- Ferreira JS. 2008. Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz: Qualidade do inoculante e necessidade de reinoculação, (tesis de doctorado), Seropédica, Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42:243-270.
- García de Salamone IE, Döbereiner J, Urquiaga S, Boddey RM. 1996. Biological Nitrogen Fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. *Biology & Fertility of Soils* 23:249-256.
- García de Salamone IE, Escobar Ortega JS, Gatica M, Di Salvo LP, Vilches MV, Zubillaga MM, Urquiaga S. 2009. Effect of *Azospirillum* inoculation on N-cycling microorganisms associated with rice and wheat crops. En: 16<sup>th</sup> Nitrogen Workshop, Connecting Different Scales of Nitrogen Use in Agriculture. Turin, Italy.
- García de Salamone IE, Hynes RK, Nelson LM. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47:404-411.
- García de Salamone IE, Michelena R, Rodríguez A, Montemitioli I, Gatti S, Rorig M. 2006. Ocurrencia de micorrizas vesículo arbusculares en plantas de maíz, soja y trigo en sistemas de siembra directa. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires* 26(1):67-72.
- García de Salamone IE, Monzón de Asconegui MA. 2008. Ecofisiología de la respuesta a la inoculación con *Azospirillum* en cultivos de cereales. En: Cassán F, García de Salamone IE (eds.). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. pp. 209-226.
- García de Salamone IE, Nelson LM. 2006. Inoculación de plantas de trigo con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* con probada capacidad de producir citoquininas. En: XXVI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. Chascomús, Argentina.
- García de Salamone IE, Salvo LP, Escobar Ortega JS, Boa Sorte PMF, Urquiaga S, Teixeira KRS. 2010. Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil* 336(1-2):351-362.
- Giri B, Pham HG, Kumari R, Prasad R, Varma A. 2005. Microbial diversity in soils. En: Buscot F, Varma A (eds.). *Soil biology. Volume 3. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag. Berlin.
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119:329-339.
- Gopalawany G, Vidhyasekaran P. 1987. Efficacy of *Azospirillum brasilense* in increasing rice yield. *International Rice Research Newsletter* 12(1):34-36.
- Govindarajan M, Balandreau J, Kwon S, Weon H, Lakshminarasimhan C. 2008. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamsensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology* 55(1):21-37.

- Grandy AS, Robertson GP, Thelen KD. 2006. Do productivity and environmental trade-offs justify periodically cultivating No-till cropping systems? *Agronomy Journal* 98:1377-1383.
- Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37:395-412.
- Horwath W. 2007. Carbon cycling and formation of soil organic matter. En: Paul, EA (ed.). *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. Academic Press New York, USA. pp. 303-339.
- Keel C, Défago G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. En: Gange AC, Brown VK (eds.). *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Blackwell Science. London. pp. 27-46.
- Kennedy AC, Smith KL. 1995. Soil microbial diversity and sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170:75-86.
- Kloepper JWE. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological agents. En: Metting FB (ed.). *Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker. New York. USA. pp. 255-274.
- Maddonni GA, Ruiz RA, Vilariño P, García de Salamone IE. 2004. Fertilización en los cultivos para grano. En: Satorre EH, Benech Arnold R, Slafer G, de la Fuente E, Miralles D, Otegui M, Savin R (eds.). *Producción de granos, bases funcionales para su manejo*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 499-557.
- Malik KA, Mirza MS, Hassan U, Mehnaz S, Rasul G, Haurat J, Bally R, Normand P. 2002. The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. En: Kennedy IR, Choudhury ATMA (eds) *Biofertilisers in action*. Rural Industries Research and Development Corporation. Canberra, Australia. pp. 73-83.
- Miller RM, Jastrow JD. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. En: Kapulnik Y, Douds Jr DD (eds.). *Arbuscular mycorrhiza: physiology and function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp. 3-18.
- Mirza MS, Rasul G, Mehnaz S, Ladha JK, So RB, Ali S, Malik KA. 2000. Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. En: Ladha JK, Reddy PM (eds.). *The quest for nitrogen fixation in rice*. International Rice Research Institute, Los Baños, Filipinas. pp. 191-204.
- Naiman AD, Latronico AE, García de Salamone IE. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Journal of Soil Biology* 45:44-51.
- Omar N, Weinhard P, Heulin T, Alaa-El-Din MN, Balandrean J. 1987. Inoculation duriz par des bactéries fixatrices d'azote. Sélection in vitro des génotypes á associer au champ. *Comptes Renduz de l'Académie des Sciences III* 305(7):247-250.
- Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J. 2009. ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and Its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 75(20):6581-6590.
- Pardo G, Cavero J, Aibar J, Zaragoza C. 2009. Nutrient evolution in soil and cereal yield under different fertilization type in dryland. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 84:267-279.
- Paul EA, Clark FE. 1989. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. San Diego, USA. 273 p.
- Pedraza RO, Bellone CH, Bellone SC, Boa Sorte PMF, Teixeira KRS. 2009. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology* 45:36-43.
- Punschke K, Carlomagno M, Labandera, C. 2001. Potencial agronómico de bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas de arroz. En: 3ª Conferencia Internacional de Arroz de Clima Templado. Punta del Este, Uruguay.
- Reed MLE, Glick BR. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339.
- Rojas DF, Garrido MF, Bonilla RB. 2009. Standardization of a complex culture media for multiplication of C50 *Rhizobium* sp. Strain. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10(1):70-80.
- Roling W. 2007. Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biogeochemical fluxes by population size and cellular activity. *FEMS Microbiology and Ecology* 62:202-210.
- Saikia SP, Vanita J. 2007. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma. *Current Science* 92(3):317-322.
- Samson R, Mani S, Boddey R, Sokhansanj S, Quesada D, Urquiaga S, Reis V, Holem C. 2005. The potential of C4 perennial grasses for developing a global BIOHEAT industry. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:461-495.
- Saubidet MI, Barneix AJ. 2004. Crecimiento y acumulación de nitrógeno en plantas de trigo inoculadas con rizobacterias, en hidroponía. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.). *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 187-193.
- Semmartin, M, Di Bella C, García de Salamone IE. 2010. Grazing-induced changes in plant species composition affect plant and soil properties of grassland mesocosms. *Plant and Soil* 328:471-481.
- Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, Del Papa MF, Lagares A, Luna V. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:371-381.
- Sisti CPJ, Santos HP, Kochhann R, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RS. 2004. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional and zero tillage in southern Brazil. *Soil Tillage Research* 76:39-58.
- Studdert GA, Echeverria HE, Casanovas EM. 1997. Crop pasture rotation for sustaining the quality and productivity of a Typic Argiudol. *Soil Science Society of America Journal* 61:1466-1472.
- Thomson B, Ostle N, McNmara N, Bailey M, Whiteley A, Griffiths R. 2010. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. *Microbial Ecology* 59:335-343.
- Urquiaga S, Cruz KHS, Boddey RM. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science of Society of America Journal* 56:105-114.
- Urquiaga S, Jantalia CP, Alves BJR, Boddey RM. 2004. Importancia de la FBN en el secuestro de carbono en el suelo y en la sustentabilidad agrícola. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.). *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp.1-6.