

Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática

Mechanisms of action of fungi and bacteria used as biofertilizers in agricultural soils: a systematic review

Mecanismos de ação de fungos e bactérias empregados como biofertilizantes em solos agrícolas: uma revisão sistemática

Sara Paulina Restrepo-Correa,¹ Eliana Carolina Pineda-Meneses,² Leonardo Alberto Ríos-Osorio³

¹ Microbióloga Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia. Investigadora, Grupo de Investigación Salud y Sostenibilidad, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. spaulina.restrepo@udea.edu.co

² Microbióloga Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia. Investigadora, Grupo de Investigación Salud y Sostenibilidad, Universidad de Antioquia. pineda.pineda@udea.edu.co

³ PhD, Universitat Politècnica de Catalunya. Docente e investigador, Grupo de Investigación Salud y Sostenibilidad, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. leonardo.rios@udea.edu.co

Fecha de recepción: 29/07/2015

Fecha de aceptación: 19/01/2017

Para citar este artículo: Restrepo-Correa SP, Pineda-Meneses EC, Ríos-Osorio LA. 2017. Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 18(2):335-351

DOI: http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:635

Resumen

El fósforo, el nitrógeno, el hierro y el potasio son algunos compuestos necesarios para el crecimiento y desarrollo vegetal. Los fertilizantes químicos empleados para aumentar su concentración afectan significativamente el medioambiente y los ecosistemas del suelo. De acuerdo con la literatura científica, los microorganismos con potencial biofertilizante han demostrado poseer diversos mecanismos de acción para solubilizar estos compuestos y así cumplir con los requerimientos de las plantas. La presente revisión sistemática recopila información científica (publicada entre los años 2004 y 2014) que describe los mecanismos de acción de los biofertilizantes microbianos en suelos agrícolas. Se usaron tres bases de

datos: ScienceDirect, SpringerLink y Scopus, mediante la ruta de búsqueda (*biofertilizer*) AND (*bacteria OR fungi*) AND (*effect OR action OR mechanism*). Tras la comprobación con diversos criterios de inclusión y exclusión, la búsqueda arrojó un total de 63 artículos originales, incluyendo seis de publicaciones no indexadas. Como resultado de la revisión sistemática, se evidenció que la producción de diversos ácidos orgánicos permite la acidificación del suelo, lo cual facilita la absorción de los elementos. También se pudo observar que la solubilización de fósforo es el mecanismo más frecuentemente descrito, obtenido por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* con hasta 726,5 mg/L de solubilización en este elemento.

Palabras clave: absorción de sustancias nutritivas, acidificación, ácidos orgánicos, biofertilizantes

Abstract

Phosphorus, nitrogen, iron and potassium are some compounds necessary for plant growth and development; chemical fertilizers used to increase concentration significantly affect the environment and soil ecosystems. According to the scientific literature, microorganisms with biofertilizer potential have demonstrated various mechanisms of action to solubilize these compounds and thus meet the requirements of plants. This systematic review collects scientific information that describes the mechanisms of action of microbial fertilizers in agricultural soils, published between 2004 and 2014, in three different

databases; ScienceDirect, SpringerLink and Scopus, using the search path (*biofertilizer*) AND (*bacteria OR fungi*) AND (*effect OR action OR mechanism*). After using different inclusion and exclusion criteria, the search displayed a total of 63 original articles, including six unindexed documents. As a result of the systematic review, it indicates that the production of various organic acids allows soil acidification, facilitating absorption of elements. It was also observed that solubilization of P is the most described mechanism, by obtaining a solubilizing of 726.5 mg/L of P due to *P. pseudoalcaligenes*.

Key words: Nutrient uptake, Acidification, Organic acids, Biofertilizers

Resumo

O fósforo, o nitrogênio, o ferro e o potássio são alguns compostos necessários para o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Os fertilizantes químicos empregados para aumentar sua concentração afetam significativamente o meio ambiente e os ecossistemas do solo. De acordo com a literatura científica, os micro-organismos com potencial biofertilizante têm demonstrado possuir diversos mecanismos de ação para solubilizar esses compostos e, assim, cumprir com o que as plantas exigem. A presente revisão sistemática reúne informação científica (publicada entre 2004 e 2014) que descreve os mecanismos de ação dos biofertilizantes microbianos em solos agrícolas. Foram usadas três bases

de dados: ScienceDirect, SpringerLink e Scopus, mediante a rota de busca (*biofertilizer*) AND (*bacteria OR fungi*) AND (*effect OR action OR mechanism*). Após a comprovação com diversos critérios de inclusão e exclusão, a busca produziu um total de 63 artigos originais, incluindo seis de publicações não indexadas. Como resultado da revisão sistemática, evidenciou-se que a produção de diversos ácidos orgânicos permite a acidificação do solo, o que facilita a absorção dos elementos. Também pôde ser observado que a solubilização de fósforo é o mecanismo mais frequentemente descrito, obtido por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* com até 726,5 mg/L de solubilização nesse elemento.

Palavras chave: absorção de nutriente, acidificação, ácido orgânico, biofertilizante

Introducción

Las prácticas de la agricultura moderna que hacen uso excesivo de fertilizantes nitrogenados y a base de fósforo son ineficientes e insostenibles, dada la contaminación que generan, su alto costo y bajo rendimiento (Ram Rao et al. 2007). Por esta razón, se está imponiendo en la agricultura mundial el uso de nuevas tecnologías, como los biofertilizantes, que parecen ser una opción altamente viable para lograr un desarrollo sustentable (Chaiharn y Lumyong 2010).

El término biofertilizante hace referencia a sustancias que contienen microorganismos vivos involucrados en varias actividades del suelo (Nagananda et al. 2010), los cuales, al ser aplicados a semillas, plantas o suelos, colonizan la rizosfera o el interior de las plantas (Vessey 2004) y dan lugar a un mejor rendimiento de los cultivos (Boraste et al. 2009). El término biofertilizante, no obstante, es una palabra que aún genera confusión, ya que fácilmente se identifica con extractos de plantas, residuos urbanos compostados, mezclas microbianas con constituyentes indefinidos y formulaciones de fertilizantes químicos suplementados con compuestos orgánicos (Boraste et al. 2009).

En los últimos años, se ha investigado ampliamente acerca de la efectividad de estas sustancias, sobre todo, para ser implementadas en cultivos de interés comercial o para complementar la fertilización química (Shaukat et al. 2006).

Debido a que la información disponible sobre microorganismos involucrados en la producción de

biofertilizantes y su mecanismo de acción es amplia y dispersa, el presente estudio tuvo como objeto recopilar las investigaciones publicadas en revistas indexadas de los años 2004 a 2014 que describieran los mecanismos de acción involucrados en la acción de los biofertilizantes microbianos.

Materiales y métodos

Estrategia de búsqueda

Para la realización del presente estudio se llevó a cabo una búsqueda sistemática de literatura en tres bases de datos bibliográficas de amplio uso en el ámbito científico: ScienceDirect, SpringerLink y Scopus. Se tomó como modelo la declaración Prisma (Urrútia y Bonfill 2010).

La ruta de búsqueda empleada en la selección de los artículos científicos se realizó por sensibilidad y especificidad, con el fin de obtener la literatura científica más específica para lo requerido por este estudio. *Sensibilidad* hace referencia al uso de descriptores DeCs y *especificidad* trata sobre el uso de conectores booleanos que dan sentido lógico a la ruta de búsqueda. Las rutas de búsqueda fueron finalmente las siguientes: (*biofertilizer*) AND (*bacteria* OR *fungi*) AND (*effect* OR *Action* OR *mechanism*) (tabla 1).

Los artículos obtenidos a partir de esta ruta de búsqueda tuvieron una antigüedad no mayor a diez años, por lo cual se seleccionó un intervalo de tiempo de 2004 a 2014. Por último, para cumplir con el criterio de exhaustividad se incluyó material de publicaciones no indexadas que complementan la información recopilada en la revisión.

Tabla 1. Rutas de búsqueda

Base de datos	Ruta de búsqueda
ScienceDirect	<i>pub-date > 2003 and TITLE-ABS-KEY (biofertilizer) AND ABS (bacteria OR fungi) AND ALL (action OR effect OR mechanism)</i>
Scopus	<i>TITLE-ABS-KEY (biofertilizer) AND ABS (bacteria OR fungi) AND ALL (action OR effect OR mechanism) AND pubyear > 2003</i>
SpringerLink	<i>'biofertilizer AND (bacteria OR fungi) AND (action OR effect OR mechanism)'</i>

Fuente: Elaboración propia

Para eliminar los artículos duplicados se empleó el gestor bibliográfico EndNote Web. Además, se hizo una verificación de la selección, usando la herramienta Excel de Microsoft Office. El protocolo de búsqueda fue aplicado por dos revisores de forma independiente, cuyas diferencias fueron analizadas y resueltas por mutuo acuerdo.

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de selección (inclusión y exclusión de los artículos obtenidos mediante la ruta de búsqueda) basados en la pregunta de investigación fueron los siguientes: artículos originales, escritos en inglés, publicados en una revista indexada y con una antigüedad mayor a 10 años. Posteriormente, los artículos obtenidos se sometieron a los siguientes criterios de selección con el fin de realizar un primer

filtro: 1) que el término *biofertilizante* solo refiriera a microorganismos y no a otro tipo de sustancias denominadas de igual forma, 2) que se especificara como mínimo el género del microorganismo y 3) que se especificara el mecanismo de acción.

Por último, para refinar la búsqueda, se definió como criterio de exclusión que en los artículos seleccionados no se discriminara el mecanismo de acción por grupo microbiano, y que, además, usaran para la experimentación cepas de referencia. De cada publicación se extrajeron y tabularon los datos especificados en la revisión sistemática para el análisis (tabla 2).

Para la búsqueda de la literatura no indexada se empleó el motor de búsqueda Google Académico con la misma ruta de búsqueda definida previamente y los mismos criterios de selección.

Tabla 2. Formulario de recolección de datos aplicado a cada artículo

Datos generales

1. Título, 2. Revista, 3. Año de publicación, 4. País

Identificación de microorganismos empleados como biofertilizantes

5. Microorganismo aplicado como biofertilizante

6. Género o especie

7. Mecanismo de acción

Mecanismos de acción de hongos y bacterias que facilitan la biodisponibilidad de macro- y micronutrientes presentes en suelos

8. Solubilización de fósforo, 9. Fijación de nitrógeno (N₂), 10. Absorción de potasio, 11. Absorción de magnesio, 12. Absorción de calcio, 13. Absorción de micronutrientes, 14. Solubilización de potasio, 15. Producción de sideróforos.

Fuente: Elaboración propia

Resultados y discusión

Con los criterios de búsqueda establecidos, se obtuvo un total 639 artículos (ScienceDirect: 37, Scopus: 364 y SpringerLink: 238). A continuación, se procedió a la eliminación de 51 artículos que estaban duplicados utilizando el gestor de herramientas EndNote Web y la herramienta Excel de Microsoft Office. Al final

de este proceso, la ruta de búsqueda arrojó un total de 588 artículos, los cuales fueron evaluados con base en el título y el resumen: se eliminaron 446 debido a que no cumplían con los criterios de inclusión especificados con base en la pregunta de investigación del estudio. A continuación, se leyeron completamente los 142 artículos restantes y, como resultado de su análisis, se descartaron 85 debido a que

cumplían con los criterios de exclusión establecidos anteriormente (figura 1).

A este último resultado (57 artículos restantes) se le sumaron por exhaustividad seis investigaciones originales de revistas no indexadas encontradas en

bases de datos, que cumplían con los criterios de inclusión, y que fueron obtenidas mediante la herramienta de búsqueda Google Académico. Finalmente, se obtuvieron en total 63 documentos científicos para realizar esta revisión.

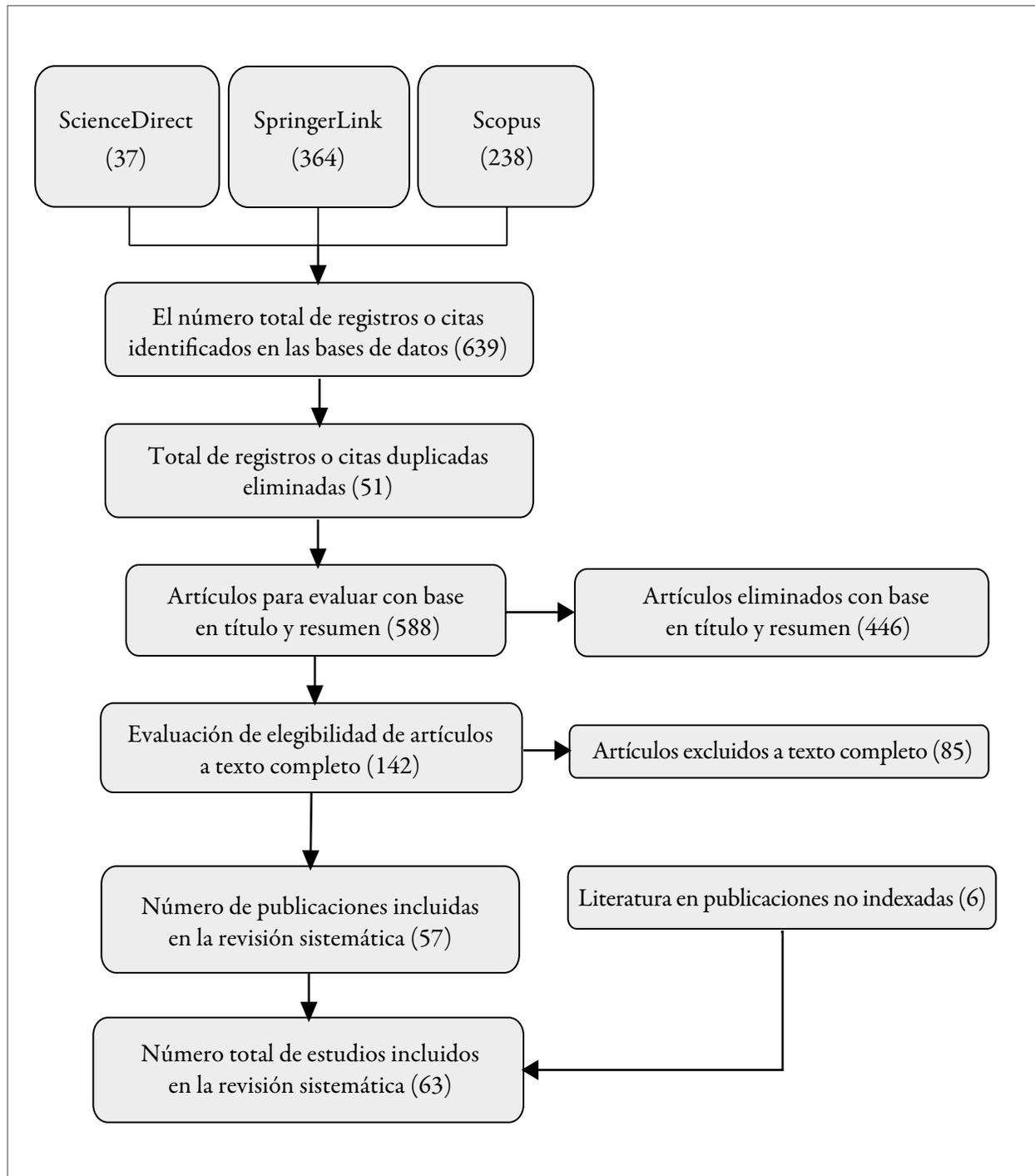


Figura 1. Flujograma para la estrategia de búsqueda (Urrútia y Bonfill 2010).

Fuente: Elaboración propia

Distribución de los artículos científicos obtenidos en la revisión

A partir de 2010 se presentó una tendencia creciente de este tipo de investigaciones sobre biofertilizantes, y en 2013 se publicó el mayor número de estudios (figura 2).

Este alto número de publicaciones durante los últimos años puede ser atribuido al evidente cambio climático, al deterioro ambiental causado por la adición indiscriminada de fertilizantes de origen químico (entre otros compuestos empleados) y a un creciente interés social y cultural en temas de conservación y recuperación de suelos. Al parecer, esto ha incrementado la concientización sobre el cuidado

y la importancia de velar por una agricultura sostenible y amigable con el medioambiente. Se está modificando la forma de pensar de los agricultores, los cuales ven como una buena alternativa la aplicación de productos constituidos por microorganismos o consorcios de estos para mejorar los rendimientos de sus cultivos y disminuir gastos innecesarios (causados por la compra de grandes cantidades de fertilizantes sintéticos para sus cultivos).

También se evidenció que existió una tendencia hacia este tipo de investigaciones, sobre todo, en países del continente asiático, como la India (40,3 % del total de las publicaciones seleccionadas) y China (17,7 % del total de los estudios) (figura 3).

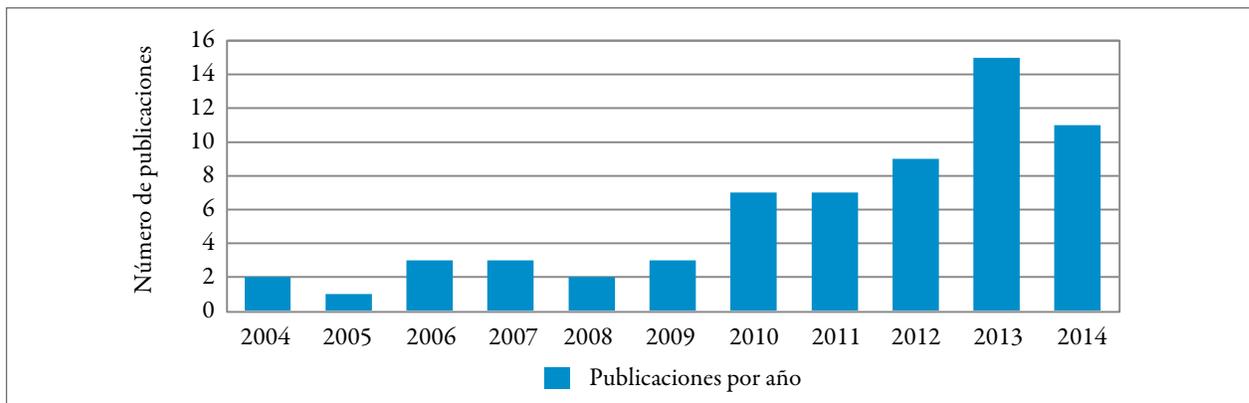


Figura 2. Número de publicaciones sobre el tema por año (2004-2014).

Fuente: Elaboración propia

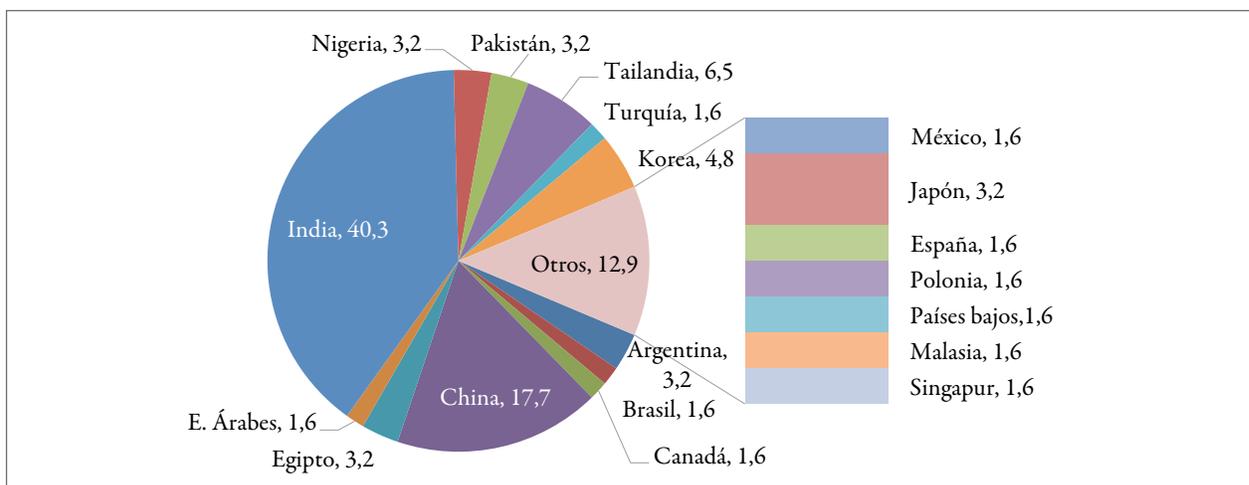


Figura 3. Porcentaje de publicaciones por país de origen de la investigación.

Fuente: Elaboración propia

La cantidad de publicaciones científicas acerca del mecanismo de acción de bacterias y hongos empleados como biofertilizantes en la India puede deberse a que la agricultura en este país es uno de los sectores más importantes de la economía, dado que contribuye en un 13,9% al PIB y genera empleo para la mitad de la población de este país (Pindi et al. 2014).

Los pequeños agricultores de la India, con bajos recursos económicos, necesitan mejorar sus semillas e implementar nuevas tecnologías para ampliar su producción, poder competir en el mercado y aumentar sus ingresos. Una de las mayores entradas económicas de este país la propicia la cosecha anual de algodón, pues representa una de las producciones económicas

más importantes de la India, fundamental para la subsistencia de millones de agricultores que cultivan este producto todos los años. Un buen ejemplo de esto es la investigación de Vootla y Pindi (2014), en la que se aisló y empleó una cepa de *Bacillus* sp. PU-7 en cultivos de algodón para el crecimiento de las plantas, el aumento de los niveles de producción de fitohormonas y el favorecimiento del desarrollo vegetal.

Esta tendencia creciente en las investigaciones por mecanismo de acción puede deberse a que el nitrógeno, el fósforo y otras moléculas son sustancias de gran importancia, cuya difícil absorción limita el rendimiento de los cultivos (tabla 3).

Tabla 3. Discriminación de los diversos tipos de microorganismos por su mecanismo de acción

Mecanismo de acción	Microorganismos	Referencias	Número de referencias
Solubilización de fósforo	<i>Achromobacter xylooxidans</i> , <i>Acinetobacter haemolyticus</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. awamori</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Burkholderia</i> sp., <i>B. cepacia</i> , <i>B. unamae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>E. cloacae</i> , <i>Glomus fasciculatum</i> , <i>G. geosporum</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>K. pneumoniae</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Oceanobacillus picturae</i> , <i>Ochrobactrum haematophilum</i> , <i>Penicillium oxalicum</i> , <i>Phosphobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. putida</i> , <i>Rhizobium</i> sp., <i>Rhodopseudomonas</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>S. marcescens</i> , <i>Thiobacillus</i> sp.	Abd-Alla et al. 2014; Ahemad y Saghir 2012; Ali et al. 2014; Aseri et al. 2008; Collavino et al. 2010; Fernández et al. 2012; George et al. 2012; Gong et al. 2014; Jasim et al. 2013; Jat y Ahlawat 2006; Jha y Kumar 2009; Jha y Saraf 2012; Jha y Subramanian 2013; Jain et al. 2012; Kang et al. 2014; Koh y Song 2007; Kumar y Chandra 2012; Vootla y Pindi 2014; Leaungvutiviroj et al. 2010; Mehnaz et al. 2010; Mehta et al. 2014; Misra et al. 2012; Nagananda et al. 2010; Ogbo 2010; Radha y Rao 2014; Tahir et al. 2013; Walia et al. 2013; Xiao et al. 2012; Zhao et al. 2012; Zhao et al. 2013	30

(Continúa)

(Continuación tabla 3)

Mecanismo de acción	Microorganismos	Referencias	Número de referencias
Fijación de nitrógeno	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Anabaena</i> sp., <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azotobacter beijerinckii</i> , <i>A. chroococcum</i> , <i>A. vinelandii</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>B. dretensis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. methylotrophicus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Burkholderia</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>E. cloacae</i> , <i>Glomus fasciculatum</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Nostoc</i> sp., <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Oceanobacillus picturae</i> , <i>Rhizobium</i> sp., <i>R. leguminosarum</i> , <i>Sphingomonas pseudosanquinis</i>	Abd-Alla et al. 2014; Ali et al. 2014; Aseri et al. 2008; Barua et al. 2011; Estrada et al. 2013; Jha y Kumar 2009; Jasim et al. 2013; Jha y Saraf 2012; Jha y Subramanian 2013; Kumar y Kumar 2014; Leungvutiviroj et al. 2010; Madhaiyan et al. 2013; Mehta et al. 2014; Nagananda et al. 2010; Ogbo 2010; Ravikumar et al. 2004; Salantur et al. 2006; Thepsukhon et al. 2013; Walia et al. 2013.	19
Solubilización de hierro o producción de sideróforos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Chryseobacterium</i> spp., <i>Glomus fasciculatum</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Ochrobactrum haematophilum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Rhizobium</i> sp.	Aseri et al. 2008; Jha y Saraf 2012; Kumar et al. 2005; Radzki et al. 2013; Tan et al. 2014; Zhao et al. 2012	6
Solubilización de potasio	<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> , <i>Rhizobium</i> sp., <i>Thiobacillus</i> sp.	Mohamed et al. 2014; Leungvutiviroj et al. 2010; Tan et al. 2014; Walia et al. 2013	4

Fuente: Elaboración propia

A esto debe añadirse que los suelos agrícolas actualmente adolecen de un déficit de estos minerales en su forma asimilable por las plantas, producto de la sobreexplotación de los suelos en las últimas décadas, lo cual ha afectado de forma directa la productividad y el tiempo oportuno de las cosechas (Collavino et al. 2010).

En términos generales, los microorganismos que se emplean para la producción de biofertilizantes pueden agruparse de la siguiente forma: fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo (figura 4), solubilizadores de hierro o productores de sideróforos y solubilizadores de potasio (Jasim et al. 2013). A continuación, se describe cada uno de estos grupos.

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento indispensable en la conformación de aminoácidos, proteínas y otros

componentes. Corresponde casi al 80 % de los gases presentes en la atmósfera (Nagananda et al. 2010). Permanece de manera casi inerte gracias a que posee en su estructura un triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, lo cual impide su aprovechamiento por la mayoría de seres vivos (Habibi et al. 2014).

Para que las plantas puedan asimilar el nitrógeno molecular (N₂), debe romperse primero el enlace más estable que posee la estructura entre los dos átomos de nitrógeno, de forma que este pueda irse incorporando ya convertido en una molécula menos fuerte (Lara et al. 2007). Esta acción puede ser realizada por algunos microorganismos como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Micrococcus* sp., *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus brevis* (Jha y Saraf 2012) y *Anabaena* sp., los cuales lo reducen y luego lo fijan en formas más asimilables para las plantas, como los iones de amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻) (Walia et al. 2013).

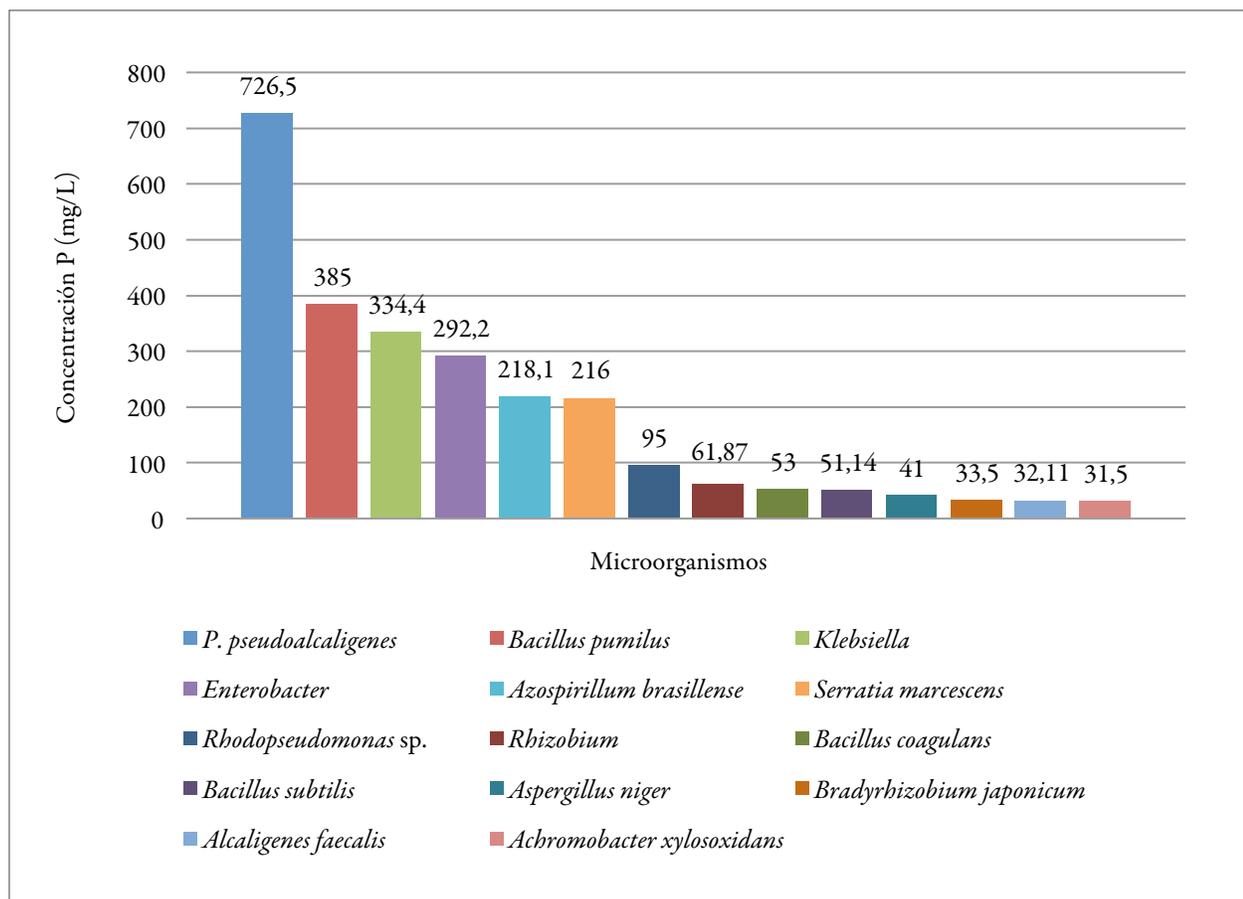


Figura 4. Cantidad solubilizada de fósforo en mg/L, con diferentes microorganismos. Fuente: Adaptado de Tan et al. (2014)

Los biofertilizantes a base de microorganismos fijadores de nitrógeno son de los más populares de este tipo (figura 5), no solamente por la importancia de este elemento en las células vegetales, sino por la amplia variedad taxonómica de los microorganismos que lo fijan, con diferentes estilos de vida y de asociación con diversas especies de plantas (en la superficie de tejidos foliares o radiculares) (Walia et al. 2013).

Además, se ha encontrado que la fijación de nitrógeno presenta tasas más altas en la superficie de la raíz que en el suelo de la rizosfera, pues en la primera se obtienen rendimientos de hasta 30 g/L para microorganismos como *Azotobacter chroococcum*, *A. beijerinckii* y *A. vinelandii* (Ravikumar et al. 2004). Este fenómeno posiblemente se deba a la cantidad y la calidad de los derivados de carbono y las sustancias promotoras provenientes de la raíz, que favorecen el aumento de la biomasa microbiana fijadora de nitrógeno (Ravikumar et al. 2004).

Microorganismos del género *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. (Salantur et al. 2006) y *Rhizobium* sp.

(Abd-Alla et al. 2014; Tan et al. 2014) han demostrado tener gran potencial para ser empleados como biofertilizantes, pues son altamente ubicuos y comúnmente hallados en aislamiento de diversas muestras de suelo (Aseri et al. 2008). Esto evidencia que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y los rizobios juegan roles de vital importancia en la matriz del suelo, pues por poseer enzimas para fijar nitrógeno son capaces de abastecer de este elemento a diversos cultivos (Tan et al. 2014). En el caso de *Azospirillum brasilense* se han encontrado los siguientes beneficios: incrementos mayores al 18% en la biomasa total de las plantas (Salantur et al. 2006), estímulo del crecimiento de hasta el 72% en los brotes de plantas (Vootla y Pindi 2014) y aumento en más del 50% en el área foliar (Aseri et al. 2008).

Se ha encontrado que especies del género *Rhizobium* sp. son potenciales ingredientes de preparaciones celulares por su capacidad para fijar nitrógeno. Sin embargo, las cantidades de nitrógeno fijado pueden variar significativamente de una especie a otra, tal y como puede comprobarse en el estudio realizado por Habibi et al. (2014), quienes encontraron

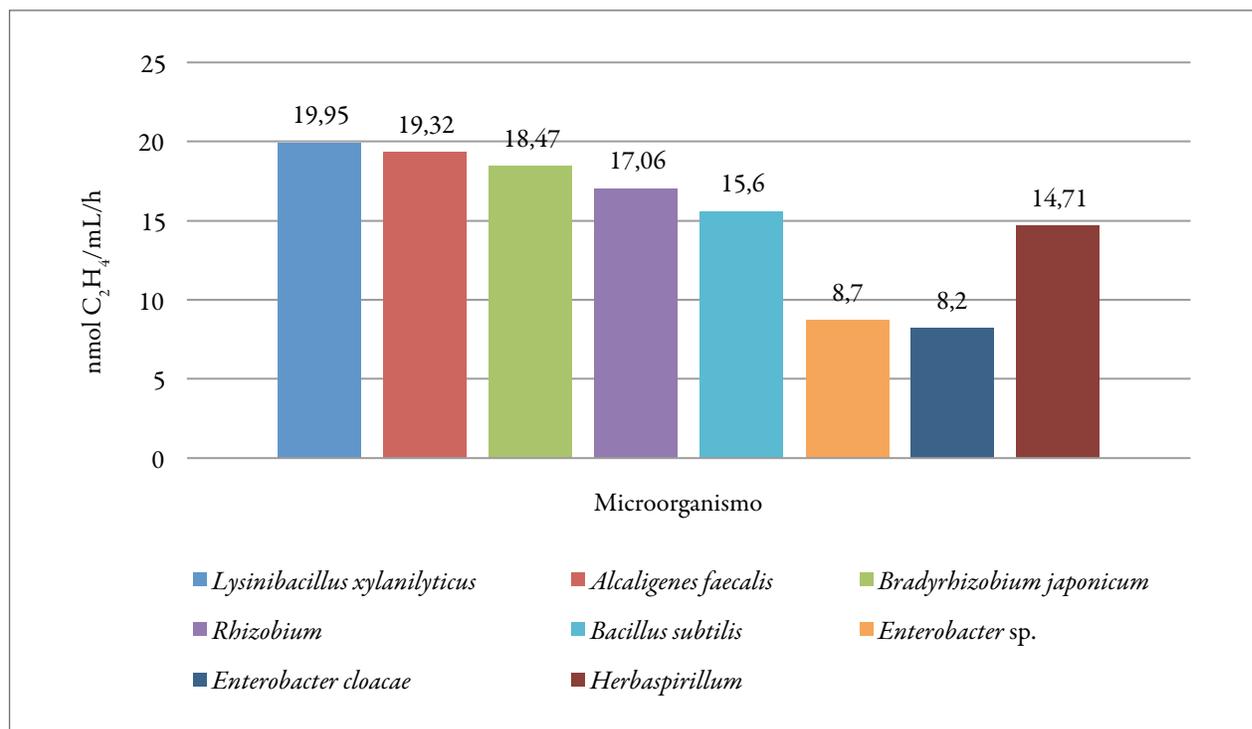


Figura 5. Concentración de nitrógeno fijado por ocho cepas de microorganismos.

Fuente: Adaptado de Tan et al. (2014)

que *Rhizobium daejeonense* tiene rendimientos de 528 nm de actividad de nitrogenasas. Por su parte, Abd-Alla et al. (2014) encontraron que *Rhizobium leguminosarum* puede fijar hasta 2,30 moles de nitrógeno. Por el contrario, especies del género *Enterobacter* parecen no tener un incremento demasiado significativo en el aumento de la biomasa de ciertos cultivos, con tan solo 8,70 nmol C₂H₄ de la actividad de nitrogenasa en ciertos cultivos (Madhaiyan et al. 2013).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno pueden llevar a cabo la síntesis de la nitrogenasa, que consiste en dos unidades: componente I, constituido por la ferro-molibdo-proteína y componente II, constituido por hierro y azufre. Ambos componentes intervienen en la reducción del nitrógeno y de otros compuestos como el acetileno CH=CH → CH₂=CH₂ y la ciamida C=N (Dalton y Kramer 2006).

El gen *nifH* codifica una serie de proteínas reguladoras que participan en la fijación de nitrógeno, además de codificar la nitrogenasa y hacerla participe en esta fijación. La reacción consiste en la reducción del dinitrógeno (N₂) a amoníaco (NH₃⁺), con una alta demanda de ATP, reacción que puede presentarse de la siguiente forma: N₂ + 16ATP + 8e⁻ + 8H⁺ = 2NH₃ + 8H₂ + 16ADP + 16Pi.

El NH₃⁺ es convertido a NH₄⁺ en las condiciones ácidas de la rizosfera del suelo. Después de esta síntesis, el NH₄⁺ es utilizado por las bacterias o las plantas en un proceso llamado asimilación del amonio, en el cual por lo general se forma glutamina y otros compuestos nitrogenados.

Las diferencias entre las concentraciones de las actividades de la nitrogenasa se deben a las características metabólicas de cada microorganismo y a las condiciones de estrés que pueda presentar la rizosfera del suelo, como la temperatura, el pH y la salinidad. En 2004 se demostró que la fijación de nitrógeno disminuyó al emplear concentraciones de NaCl entre 20g/L y 25g/L en el medio, y la actividad se detuvo totalmente con 30g/L (Ravikumar et al. 2004).

Por otra parte, los nódulos de las raíces también presentan reducción del nitrógeno a NH para luego ser utilizado por las plantas. A cambio, esta proporciona carbono para el crecimiento de los microorganismos (Thepsukhon et al. 2013). La simbiosis *Rhizobium*-leguminosas es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria y la planta. La organogénesis del nódulo es un proceso inducido por un “intercambio de señales” entre los dos participantes de la interacción, el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta). Es esencial la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta.

Se observaron distintos resultados en la planta al inocular microorganismos con diferentes tratamientos: *Rhizobium leguminosarum*, *Glomus geosporum* y *G. mosseae*, individualmente o por inoculación dual (Abd-Alla et al. 2014). Los mejores resultados se dieron con la inoculación dual, en aspectos como el aumento de la actividad de la nitrogenasa, aumento significativo sobre el control en número y masa de nódulos, contenido de leghemoglobina del nódulo, colonización de micorrizas y masa seca de raíz.

Entre las bacterias fijadoras de vida libre, las más numerosas y eficaces son formas aeróbicas pertenecientes al género *Azotobacter*. De este, la especie más abundante en los suelos neutros y alcalinos es *A. chroococcum*, mientras que otras especies como *A. beijerinckia* domina en suelos ácidos (Ravikumar et al. 2004).

Solubilización de fósforo

El fósforo es un mineral esencial en los procesos nutricionales de las plantas, pues hace parte de una gran cantidad de moléculas de importancia para las células. Sin embargo, las plantas no poseen la capacidad de sintetizarlo, además de que el contenido total de fósforo en los suelos promedios es de 0,05 %, y únicamente el 0,1 % del total de fósforo presente en esta matriz está en forma disponible para las plantas, ya que la mayor parte está en forma insoluble como parte de fosfatos de calcio y hierro (Radzki et al. 2013). Por lo anterior, se hace conveniente la aplicación de microorganismos solubilizadores de fosfato.

Los microorganismos solubilizadores de fósforo presentan habilidades para reducir el pH mediante la secreción de diferentes tipos de ácidos, lo cual permite bajar el pH de la rizosfera y, consecuentemente, disociar las formas de enlaces de fosfato que vuelven este elemento no asimilable (Ravikumar et al. 2014). Aunque se ha encontrado que un pH de alrededor de 4 es el ideal para solubilizar el fósforo inorgánico, es poco probable encontrar en la naturaleza algún ambiente con este grado de acidez. Microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Serratia marcescens*, *Serratia* sp., y *Enterobacter cloacae* (Misra et al. 2012) son capaces de solubilizar más de 450 mg/ml de fósforo en suelos con altas concentraciones de metales pesados y con condiciones de alta humedad y temperatura (Misra et al. 2012). Inclusive, algunos biofertilizantes tienen la capacidad de solubilizar fosfato en suelos con altas concentraciones de agroquímicos como Fipronil ((*RS*)-5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile) y Piriproxifen (4-Phenoxyphenyl (*R/S*)-2-(2-pyridyloxy)propyl ether 2-[1-(4-Phenoxyphenoxy)propan-2-yloxy]pyridine) (Misra et al. 2012).

También, dependiendo de la naturaleza de los metales que acompañan al fósforo —lo que está relacionado directamente con el tipo de suelo—, puede variar su grado de subutilización. Ogbo (2010) encontró que, dentro de la misma especie para los hongos *Aspergillus fumigatus* y *A. niger*, puede variar el grado de liberación del fósforo al medio. En estos, al parecer es más fácil la separación cuando el fósforo está como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, seguida de AlPO_4 , y es menor el grado de disociación cuando está como FePO_4 (Ogbo 2010).

La salinidad y la actividad del agua parecen también condicionar la actividad de la fosfatasa. Por esto, el tipo de suelo resulta muy relevante a la hora de seleccionar los microorganismos que van a constituir un biofertilizante (Kumar y Chandra 2012).

Se encontró que los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Misra et al. 2012; Ahemad y Saghir 2012) son géneros

comúnmente encontrados en aislamientos realizados cuando se buscan bacterias solubilizadoras de fósforo (Tahir et al. 2013). Algunos *Bacillus* como *B. coagulans* solubilizan fósforo inorgánico y fósforo mineral en cantidades superiores a 20 mg/kg, y otras bacterias como *Bacillus pumilus* alcanzan valores de hasta 385 mg/L y *P. pseudoalcaligenes* valores de 726,5 mg/L (Jha y Subramanian 2013; Tahir et al. 2013). Las bacterias solubilizadoras de fosfato llevan a cabo la conversión de fósforo insoluble a soluble en fosfatos y ortofosfatos mediante la secreción de ácidos orgánicos.

Ácidos orgánicos como el ácido 2 cetoglucónico, el ácido cítrico, el ácido málico y el ácido oxálico han sido detectados en la rizosfera de varios cultivos y vegetales. Adicionalmente, se ha encontrado que el tipo de ácido predominante en el medio está directamente relacionado con la diversidad de fuentes de carbono existentes (Tahir et al. 2013). Sin embargo, aunque el pH pueda ser un factor determinante en la liberación de fosfato asimilable, se ha encontrado que la asimilación de iones amonio y la actividad de las fitasas por parte de los microorganismos solubilizadores son también factores de gran relevancia (Misra et al. 2012).

El fósforo del suelo puede encontrarse en dos formas: fósforo orgánico y fósforo inorgánico; la distribución de cada una de estas se halla relacionada con las características del suelo (Son et al. 2006).

La solubilización del fósforo orgánico se debe a la acción de enzimas hidrolíticas extracelulares, las cuales permiten la reducción de las diversas macromoléculas a oligómeros, monómeros e iones pequeños. Estas enzimas encargadas de liberar fósforo orgánico se clasifican en tres grupos: i) fosfomonoesterasas o fosfatasa no específicas, las cuales efectúan la defosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhídros presentes en la materia orgánica; ii) fitasas, las cuales liberan el fósforo del ácido fítico, y iii) fosfonatasas y liasas carbono-fósforo, enzimas que llevan a cabo el clivaje del enlace C-P presente en fosfonatos orgánicos. Las fosfatasa ácidas y las fitasas

son al parecer las que presentan mayor actividad en los suelos (Patiño 2010; Corrales et al. 2014).

Con respecto al fósforo inorgánico, este se encuentra generalmente formando enlaces de gran estabilidad con hidróxidos de hierro, aluminio o manganeso, los cuales son menos solubles que los compuestos de fósforo orgánico. En general, se acepta que el mecanismo más común de solubilización del fosfato mineral es la secreción de ácidos orgánicos sintetizados por los microorganismos solubilizadores de fosfato; aunque también este fenómeno está directamente condicionado por el pH y la mineralogía del suelo (Son et al. 2006; Beltrán 2014).

Existen dos mecanismos principales para la solubilización del fósforo inorgánico. El primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H^+ provenientes del citrato se intercambian por el fósforo ligado a la superficie de los cristales del $Al(OH)_3$ o $Fe(OH)_3$, los reducen y liberan el fósforo. El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos, ya que a través de sus grupos hidroxil y carboxil se quelan los cationes unidos al fosfato y lo convierten en formas solubles (Trivedi y Sa 2008; Beltrán 2014).

Solubilización de hierro o producción de sideróforos

El hierro (Fe) es fundamental para diversas funciones celulares. En la naturaleza se encuentra principalmente en la forma Fe^{3+} , como parte de sales e hidróxidos de muy baja solubilidad. Su papel es fundamental en el metabolismo celular como cofactor de numerosas enzimas (Aguado-Santacruz et al. 2012). En condiciones fisiológicas, el hierro puede existir en la forma ferrosa (Fe^{2+}) o en la forma férrica (Fe^{3+}).

En la búsqueda sistemática de literatura se encontraron artículos que centraban su atención en la solubilización de hierro. Actualmente, a nivel agrícola, la quelación del hierro se hace mediante secuestrantes

sintéticos como el EDTA y el EDDHA. Sin embargo, estos suponen un peligro ambiental, pues liberan a su vez otros metales pesados que se encuentran en el suelo o el agua, lo cual representa un riesgo para la salud de los organismos vivos (Radzki et al. 2013). *Pseudomonas aeruginosa* ha resultado ser un microorganismo de gran aplicación, porque además de solubilizar fosfato, también tiene la capacidad de producir sideróforos para la quelación del hierro (Kumar et al. 2005).

En un estudio realizado por Radzki et al. (2013), se encontró que *Chryseobacterium* sp. liberó 23,8 g de hierro al suelo por un periodo de 70 días, como producto de la síntesis de sideróforos. Por otra parte, *Ochrobactrum haematophilum* aumentó casi en un 45 %, en un periodo de tres días, la cantidad de sideróforos disponibles (Zhao et al. 2012). *Bacillus pumilus* ha demostrado tener la capacidad de solubilizar hierro del medio, lo cual favorece la absorción de este metal en las plantas y, por tanto, el crecimiento vegetal (Estrada et al. 2013). *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus brevis* han demostrado estimular el crecimiento de las plantas en más de un 70 % por su habilidad de hacer disponible el hierro (Jha y Saraf 2012).

Por otra parte, la reacción de un ion metálico de hierro divalente o trivalente con un ligando forma un quelato, debido a que ciertos átomos del ligando orgánico donan electrones al catión. Casi todos los sideróforos que se han identificado contienen como grupo ligando al ácido hidroxámico, catecol o al ácido hidroxicarboxílico. De acuerdo con el grupo funcional quelador del hierro, los sideróforos pueden clasificarse en catecolatos (fenolatos), hidroximatos e hidroxicarboxilatos, que forman complejos octaédricos hexadentados con el metal. Algunos sideróforos son más eficaces que otros para quelar el hierro y la gran diversidad de moléculas producidas por estos microorganismos se relaciona con una amplia variedad de sustratos que pueden usar (Kumar et al. 2005; Aguado-Santacruz et al. 2012; Zhao et al. 2012; Radzki et al. 2013).

Solubilización de potasio

Otro de los minerales de los cuales se hallaron algunos estudios fue el potasio. Su importancia radica en que además de regular la absorción de CO₂ en las plantas, juega un papel capital en otra gran cantidad de procesos metabólicos. Entre las publicaciones se hallaron cuatro estudios que evaluaban la capacidad solubilizadora de potasio por parte de microorganismos. Estudios hechos por Leungvutiviroj et al. (2010) demuestran que *Bacillus subtilis* puede solubilizar hasta 43,3 mg/kg de potasio, y Tan et al. (2014) encontraron que *Alcaligenes faecalis* alcanzó a solubilizar hasta 11,45 mg/L.

Los diferentes mecanismos empleados para la solubilización de potasio son la disminución del pH, la mejora de la quelación de los cationes unidos al potasio y la acidólisis de la zona circundante del microorganismo (Usha y Padmavathi 2013).

La disminución en el pH del medio sugiere la liberación de ácidos orgánicos y protones por los microorganismos. Tal acidólisis generada por los ácidos orgánicos producidos puede disolver directamente el potasio como resultado de liberaciones lentas de potasio intercambiable o puede quelar los iones silicio y aluminio asociados con el potasio (Kumar y Chandra 2012). Por lo tanto, la síntesis y secreción de ácidos orgánicos por los microorganismos acidifica el entorno circundante, lo que, en última instancia, conduce a la liberación de iones potasio del potasio mineral, ya sea por protonación o acidificación. De los diferentes ácidos orgánicos que participan en la solubilización del potasio, el ácido succínico, cítrico, glucónico, α -cetoglucónico y oxálico son los ácidos liberados en mayor cantidad por distintos microorganismos (Leungvutiviroj et al. 2010; Tan et al. 2014).

Conclusiones

El incremento en los últimos años de estudios centrados en la temática de biofertilizantes microbianos da cuenta del gran potencial de estas tecno-

logías agrícolas alternativas para la explotación y conservación del suelo.

De manera general, se comprobó que la aplicación de un determinado tipo de bacteria produce efectos positivos en el crecimiento de las plantas. Esto resulta promisorio en la medida que la aplicación combinada de microorganismos podría generar una potenciación o aumento de sus habilidades solubilizadoras (Leungvutiviroj et al. 2010).

Algunos autores sugieren que cuando se aplica un biofertilizante probado solamente a nivel de laboratorio, los resultados en campo no son los esperados. Esto es debido a que las condiciones físicas, químicas y biológicas del entorno varían de manera drástica, por lo cual, es importante realizar también pruebas en campo (Mehnaz et al. 2010).

También se resalta que los aislados de microorganismos locales deben preferirse para la inoculación de cultivos, pues ellos están mejor adaptados a las condiciones ambientales y pueden, por tanto, ser más competitivos que las bacterias no nativas. Se puede afirmar, en consecuencia, que para un suelo específico debería prepararse un biofertilizante determinado que contenga en su mayor parte cepas de microorganismos nativos (Salantur et al. 2006).

Las poblaciones bacterianas de una planta inoculada o de un cultivo tienden a ser mayores en los estadios tempranos de crecimiento de los vegetales, ya que en estas etapas la disponibilidad de fuentes de carbono es mayor. En efecto, a medida que aumenta la edad del cultivo, el número de microorganismos decae, ya que las fuentes de nutrientes empiezan también a agotarse, por esta razón, es fundamental realizar un seguimiento a la supervivencia de las bacterias después de la siembra de semillas o plántulas y durante la colonización temprana de raíces (Mehnaz et al. 2010).

Los microorganismos producen ácidos orgánicos tales como malato, citrato y oxalato, que contribuyen a la liberación de fósforo inorgánico en los suelos mediante el empleo de las enzimas fitasas y fosfatasa para romper los enlaces como el C-O-P y facilitar

su posterior absorción por las raíces de las plantas. Esto reduce la aplicación de fertilizantes químicos (Kumar y Chandra 2012).

El empleo de microorganismos como biofertilizantes presenta no solo beneficios para el rendimiento de cultivos, aumento del tamaño de las plántulas y longitud de raíces y hojas, sino que, además, es una alternativa económica y menos nociva para la conservación de la biodiversidad funcional del ecosistema del suelo.

Finalmente, este trabajo presentó algunas limitaciones en cuanto a la identificación de publicaciones relacionadas con la acción de hongos como biofertilizantes, pues la mayor parte de las obtenidas con el protocolo diseñado se inclinó al empleo de bacterias. Así, pocos autores hallados en este trabajo investigaron

la actividad fúngica en los biofertilizantes, como Xiao et al. (2012), quienes evaluaron la capacidad solubilizadora de *Aspergillus fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger* y *Penicillium simplicissimum*. De estos, el último solubilizó 85,43 mg/L de fósforo, seguido por *A. niger* con un 79,75 mg/L y *A. japonicus* con 75,70 mg/L. También se observó el caso de algunas especies de micorrizas del género *Glomus* para el caso del nitrógeno (Abd-Alla et al. 2014). Por ello, es importante en futuros estudios incluir descriptores de mayor sensibilidad relacionados con los hongos.

Descargos de responsabilidad

Los autores declaran que no existieron conflictos de interés que comprometieran la validez de los resultados presentados en este artículo.

Referencias

- Abd-Alla MH, El-Enany AW, Nafady NA, Khalaf DM, Morsy FM. 2014. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res.* 169(1):49-58.
- Aguado-Santacruz G, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz R. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fotosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev Fitotec Mex.* 35(1):9-21.
- Ahemad M, Saghir M. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. *J Pest Sci.* 84(1):123-131.
- Ali S, Hameed S, Imran A, Iqbal M, Lazarovits G. 2014. Genetic, physiological and biochemical characterization of *Bacillus* sp. strain RMB7 exhibiting plant growth promoting and broad spectrum antifungal activities. *Microb Cell Fact.* 13:144.
- Aseri GK, Jain N, Panwar J, Rao AV, Meghwal PR. 2008. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Sci Hortic.* 117(2):130-135.
- Barua S, Tripathi S, Chakraborty A, Ghosh S, Chakrabarti K. 2011. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. *Microbiol Res.* 167(2): 95-102.
- Beltrán M. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria.* 15(1):101-113.
- Boraste A, Vamsi K, Jhadav A, Khairnar Y, Gupta N, Trivedi S, Patil P, Gupta G, Gupta M, Mujapara AK, et al. 2009. Biofertilizers: a novel tool for Agriculture. *Int J Microbiol.* 1(2):23-31.
- Chaiharn M, Lumyong S. 2010. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Curr Microbiol.* 62(1):173-181.
- Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM. 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol Fertil Soils.* 46(7):727-738.
- Corrales L, Sánchez L, Arévalo Z, Moreno V. 2014. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA.* 12(21):165-178.
- Dalton D, Kramer S. 2006. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. En: Gnanamanickam SS, editor. *Plant-Associated Bacteria.* Netherlands: Springer.
- Estrada G, Divan V, De Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani J. 2013. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil.* 369(1):115-129.
- Fernández L, Agaras B, Zalba P, Wall LG, Valverde C. 2012. *Pseudomonas* spp. isolates with high phosphate-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. *Biol Fertil Soils.* 48(7): 763-773.

- George P, Gupta A, Gopal M, Thomas L, Thomas GV. 2012. Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* K1SII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *World J Microbiol Biotechnol.* 29(1):109-117.
- Gong M, Du P, Liu X, Zhu C. 2014. Transformation of inorganic P fractions of soil and plant growth promotion by phosphate-solubilizing ability of *Penicillium oxalicum* II. *J Microbiol.* 52(12):1012-1019.
- Habibi S, Djedidi S, Prongjunthuek K, Mortuza MF, Ohkama-Ohtsu N, Sekimoto H, Yokoyama, T. 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil.* 379(1):51-66.
- Jain R, Saxena J, Sharma V. 2012. Effect of phosphate-solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. *Folia Microbiol (Praha).* 57(6): 533-541.
- Jasim B, Jimtha J, Jyothis M, Radhakrishnan EK. 2013. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regul.* 71(1):1-11.
- Jat RS, Ahlawat IPS. 2006. Direct and residual effect of vermicompost, biofertilizers and phosphorus on soil nutrient dynamics and productivity of chickpea-fodder maize sequence. *J Sustain Agr.* 28(1): 41-54.
- Jha CK, Saraf M. 2012. Evaluation of multispecies plant-growth-promoting consortia for the growth promotion of *Jatropha curcas* L. *J Plant Growth Regul.* 31(4):588-598.
- Jha P, Kumar A. 2009. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microb Ecol.* 58(1):179-188.
- Jha Y, Subramanian RB. 2013. Characterization of root-associated bacteria from paddy and its growth-promotion efficacy. *3 Biotech.* 4(3):25-330.
- Kang SM, Radhakrishnan R, You YH, Joo GJ, Lee IJ, Lee KE, Kim JH. 2014. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian J Microbiol.* 54(4):427-433.
- Koh RH, Song HG. 2007. Effects of application of *Rhodospseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *J Microbiol Biotechnol.* 17(11):1805-1810.
- Kumar B, Chandra J. 2012. Efficiency of *Bacillus coagulans* as P biofertilizer to mobilize native soil organic and poorly soluble phosphates and increase crop yield. *Arch Agron Soil Sci.* 58(10):1099-1115.
- Kumar P, Kumar P. 2014. Enhanced nitrogen fixing in *Sesbania grandiflora* by *Azospirillum* (BPL7) sp. isolated from Godavari Belt Region, Andhra Pradesh, India. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci.* 84(3):549-559.
- Kumar R, Ayyadurai N, Pandiaraja P, Reddy AV, Venkateswarlu Y, Prakash O, Sakthivel N. 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J Appl Microbiol.* 98(1):145-154.
- Lara C, Villalba M, Oviedo L. 2007. Bacterias fijadoras de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Rev Colomb Biotecnol.* 9(2):6-14.
- Leungyutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki, K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74(5):1098-1101.
- Madhaiyan M, Peng N, Te NS, Hsin C, Lin C, Lin F, Reddy C, Yan H, Ji L. 2013. Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated *Enterobacter* species. *Biotechnol Biofuels.* 6:140.
- Mehnaz S, Kowalik T, Reynolds B, Lazarovits G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biol Biochem.* 42(10):1848-1856.
- Mehta P, Walia A, Kakkar N, Shirkot CK. 2014. Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylotrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities. *Acta Physiol Plant.* 36(8):2033-2045.
- Misra N, Gupta G, Jha P. 2012. Assessment of mineral phosphate solubilizing properties and molecular characterization of zinc-tolerant bacteria. *J Basic Microbiol.* 52(5):549-558.
- Mohamed AA, Eweda WEE, Heggo AM, Hassan EA. 2014. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulphur-oxidising bacteria on onion (*Allium cepa* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in sandy soil under greenhouse conditions. *Ann Agric Sci (Cairo).* 59(1): 109-118.
- Nagananda GS, Das A, Bhattacharya S, Kalpana T. 2010. In vitro studies on the effects of biofertilizers (*Azotobacter* and *Rhizobium*) on seed germination and development of *Trigonella foenum-graecum* L. using a novel glass marble containing liquid medium. *Int J Botany.* 6(4):394-403.
- Ogbo FC. 2010. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. *Bioresource Technol.* 101(11):4120-4124.
- Patiño CO. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca: estudio de biodiversidad y eficiencia [tesis de doctorado]. [Palmira]: Universidad Nacional de Colombia.
- Pindi PK, Sultana T, Vootla PK. 2014. Plant growth regulation of Bt-cotton through *Bacillus* species. *3 Biotech.* 4(3):305-315.
- Radha TK, Rao DLN. 2014. Plant growth promoting bacteria from cow dung based biodynamic preparations. *Indian J Microbiol.* 54(4):413-418.
- Radzki W, Gutiérrez FJ, Algar E, Lucas-García JA, García-Villaraco A, Ramos B. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 104(3):321-30.
- Ram Rao DM, Kodandaramaiah J, Reddy MP, Katiyar RS, Rahmathulla VK. 2007. Effect of VAM fungi and bacterial biofertilizers on mulberry leaf quality and silkworm cocoon characters under semiarid conditions. *Caspian J Env Sci.* 5(2):111-117.

- Ravikumar S, Kathiresan K, Thadedus Maria Lgnatiammal S, Babu M, Shanthi S. 2004. Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *J Exp Mar Biol Ecol.* 312(1):5-17.
- Ravikumar S, Shanthi S, Kalaiarasi A, Sumaya M. 2014. The biofertilizer effect of halophilic phosphate solubilising bacteria on *Oryza sativa*. *Middle East J Sci Res.* 19(10):1406-1411.
- Salantur A, Ozturk A, Akten S. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environ.* 52(3):111-118.
- Shaukat K, Afrasayab S, Hasnain S. 2006. Growth responses of *Helianthus annuus* to plant growth promoting Rhizobacteria used as a biofertilizers. *Int J Agric Res.* 1(6):573-581.
- Son T, Diep C, Giang T. 2006. Effect of *Bradyrhizobia* and phosphate solubilizing bacteria application on soybean in rotational system in the Mekong delta. *Omonrice.* 14:48-57.
- Tahir M, Mirza MS, Zaheer A, Rocha Dimitrov M, Smidt H, Hameed S. 2013. Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16S rRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Aust J Crop Sci.* 7(9):1284-1292.
- Tan KZ, Radziah O, Halimi MS, Khairuddin AR, Habib SH, Shamsuddin ZH. 2014. Isolation and characterization of rhizobia and plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on growth of rice seedlings. *Am J Agric Biol Sci.* 9(3):342-360.
- Thepsukhon A, Choonluchanon S, Tajima S, Nomura M, Ruamrungsri S. 2013. Identification of endophytic bacteria associated with N₂ fixation and indole acetic acid synthesis as growth promoters in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. *J Plant Nutr.* 36(9):1424-1438.
- Trivedi P, Sa T. 2008. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr Microbiol.* 56(2):140-144.
- Urrútia G, Bonfill X. 2010. [Prisma declaration: a proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses]. *Med Clin (Barc).* 135(11):507-511.
- Usha S, Padmavathi T. 2013. Effect of plant growth promoting microorganisms from rhizosphere of *Piper nigrum* L. *Int J Pharm Bio Sci.* 4(1):835-846.
- Vessey J. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255(2):571-586.
- Vootla PK, Pindi PK. 2014. Enhanced Nitrogen fixing in *Sesbania grandiflora* by *Azospirillum* (BPL7) sp. isolated from Godavari Belt Region, Andhra Pradesh, India. *P Natl A Sci India B.* 84(3):549-559.
- Walia A, Mehta P, Chauhan A, Shirkot CK. 2013. Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions. *P Natl A Sci India B.* 84(1):145-155.
- Xiao C, Zhang H, Fang Y, Chi R. 2012. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. *Appl Biochem Biotechnol.* 169(1):123-133.
- Zhao L, Teng S, Liu Y. 2012. Characterization of a versatile rhizospheric organism from cucumber identified as *Ochrobactrum haematophilum*. *J Basic Microbiol.* 52(2):232-244.
- Zhao K, Penttinen P, Zhanga X, Ao X, Liu M, Yu X, Chen Q. 2013. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiol Res.* 169(1):76-82.