

**QUIMIOTAXIS COMO HERRAMIENTA PREDICTIVA DE  
COLONIZACIÓN DE BACTERIAS SILVESTRES HACIA  
DIFERENTES MODELOS VEGETALES**

**CHEMOTAXIS AS A PREDICTIVE TOOL OF WILD BACTERIA  
COLONIZATION TOWARDS DIFFERENT VEGETABLE MODELS**

Piña Guillén Jesús \*<sup>1</sup>, Salgado Bravo Rosalva <sup>1</sup>, Aguilar Jiménez Daniel <sup>1</sup>, Herrera López Humberto <sup>1</sup>, Ballinas Cardoso Jaquelin <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros, Programa Educativo de Agrobiotecnología. Prolongación Reforma 168, Barrio de Santiago Mihuacán CP 74420, Izúcar de Matamoros, Puebla.

\*Correo electrónico: fejepigu@hotmail.com

**RESUMEN**

La fertilidad del suelo está basada en su capacidad para suministrar los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas, en ello, juega un papel fundamental la comunidad microbiana que participa activamente en la generación de nutrientes y en la mineralización de la materia orgánica, aunado a la capacidad de éstos para colonizar diferentes tipos de plantas. Los ensayos propuestos en este trabajo tienen como propósito, establecer una herramienta predictiva de colonización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal hacia diferentes tipos de cultivo para que, previo a ser inoculadas en campo, se tenga información generada *in vitro* sobre la probabilidad de asociación microorganismo-planta. Se aislaron tres cepas bacterianas silvestres (denominadas B1, B7 y N6) obtenidas de suelo rizosférico y de nódulos de frijol, las cuales fueron caracterizadas

parcialmente, se realizaron pruebas de antagonismo y se determinó su actividad quimiotáctica hacia extractos radiculares de pepino, maíz, cilantro y calabaza en medio líquido y semisólido. Se pudo observar actividad antagónica de B7 sobre N6, disminuyendo su crecimiento hasta 25 veces respecto al control positivo, además se observó movimiento quimiotáctico incrementado en medio líquido respecto al observado en medio semisólido, finalmente, se observó también diferente respuesta quimiotáctica de las bacterias aisladas para cada tipo de extracto radicular, tanto en medio semisólido como en medio líquido, sobresaliendo la actividad para extractos de raíces de maíz, lo cual indica una mayor atracción hacia este modelo vegetal y por ende, más alta probabilidad de colonización.

**Palabras clave:** Quimiotaxis, Extractos, Movilidad, Colonización.

## ABSTRACT

Soil fertility is based on its capacity to supply the nutrients that are necessary for plant growing, on this, microbial community play a fundamental role which actively participate on the generation of nutrients and organic matter mineralization besides the capacity of these to colonize different kind of plants. The assays proposed on this work have as purpose to establish a predictive tool for colonization of plant growth promoting bacteria towards different kinds of yields in order to, before inoculation on field, it has *in vitro* information about the probability of microorganism-plant association. Three wild bacterial strains were isolated (named B1, B7 and N6) from rizospheric soil and bean nodules, which were partially characterized, antagonism tests were carried out and their chemotactic activity was determined towards cucumber, maize, coriander and pumpkin root extracts on liquid and

semisolid media. It was observed antagonist activity from B7 over N6 lowering growth 25 fold in comparison with positive control, besides there was increased chemotactical movement on liquid media with respect to semisolid media, it was finally observed different chemotactic response from de isolated bacteria towards each root extract on both semi solid and liquid media standing out the activity for maize root extracts which indicate higher attraction towards this vegetal model and thus higher colonization probability.

**Key words:** Chemotaxis, Extracts, Motility, Colonization.

## INTRODUCCIÓN

La agricultura actual requiere de la conjugación de altos rendimientos con impactos ambientales bajos o nulos, razón por la cual se ha optado por el uso de alternativas sustentables en los ámbitos de nutrición vegetal, control de insectos, malezas y fitopatógenos. La eficacia de los productos elaborados a base de seres vivos o derivados de ellos, destinados a la nutrición vegetal conocidos como biofertilizantes cotidianamente desarrollados con microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR), depende en buena medida de la capacidad de éstos por tolerar diferentes tipos de condiciones edáficas y climáticas una vez que son inoculados (Nihorimbere *et al.*, 2011), aunado a la capacidad que tengan éstos de asociarse con diferentes tipos de modelos vegetales, fenómeno que a su vez depende del tipo y concentración de extractos que la planta exuda a través de su sistema radicular (Buchan *et al.*, 2010). Una vez que los exudados radiculares se acumulan en la rizósfera, la actividad microbiana se incrementa considerablemente y se da lugar a un sinnúmero de interacciones entre los microorganismos presentes (Aira *et al.*, 2010) y de éstos con la planta. Reportes previos, han demostrado que diversos modelos bacterianos tienen la

capacidad de detectar ciertas sustancias como ácidos orgánicos, aminoácidos, monosacáridos y disacáridos y de orientar su movimiento hacia ellas (Porter *et al.*, 2008), fenómeno conocido como quimiotaxis, el cual puede ser positivo (atracción) o bien puede ser negativo (repulsión), de manera que cada bacteria responderá de forma distinta, dependiendo del tipo de sustancias que detecte y de la concentración de las mismas (James *et al.*, 2018). Para algunas PGPR como *Azospirillum sp.*, microorganismo habitual de la rizósfera y uno de los más utilizados en la elaboración de biofertilizantes, se han desarrollado ensayos de quimiotaxis sobre la interacción con plantas de trigo que permitió asociar su actividad como promotor de crecimiento vegetal y su capacidad de colonización (Mukherjee *et al.*, 2016).

Partiendo de estos principios, el presente trabajo propone el aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal silvestres, además de determinar si existe una interacción antagónica entre ellas y la evaluación de dos ensayos de quimiotaxis, exponiendo las cepas bacterianas aisladas a extractos radiculares de cuatro diferentes plantas y verificar si existe un fenómeno de atracción que ayude a predecir la probabilidad de colonización de dichas bacterias, hacia cada modelo vegetal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de aislamientos bacterianos.** Para el aislamiento de cepas silvestres de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, se empleó el medio Pikovskaya (Por litro de medio: glucosa 10.0 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5.0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, NaCl 0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, KCl 0.2 g, extracto de levadura 0.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.002 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.002 g, agar agar 20 g) preparado según Onyia y Anyanwu (2013) para la obtención de bacterias solubilizadoras de fósforo y se empleó el medio ELMARC (Por litro de medio:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

0.65 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, NaCl 0.1 g, manitol 2.5 g, extracto de levadura 0.5 g, 10 mL de solución de rojo Congo al 0.1 %, agar 14 g ) preparado según Angeles y Cruz (2015) para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. Para la inoculación del medio Pikovskaya, se tomó una muestra de suelo rizosférico de 20 cm de profundidad, se pesaron 10 g y se colocaron en un recipiente con 90 mL de agua estéril, se realizaron 3 diluciones seriadas con factor 1:10, se tomaron 100 µL de cada dilución y se extendieron en la superficie del medio con incubación de 72 h a 30°C. Para inocular el medio ELMARC se tomaron nódulos de frijol que fueron lavados con agua jabonosa y sumergidos por 10 min en etanol al 70%, se lavaron tres veces con agua estéril y cada nódulo se trituró en un mortero con 5 mL de agua estéril, de la solución resultante se tomaron 100 µL y se extendieron sobre la superficie del medio cultivo con incubación de 96 h a 30°C.

**Caracterización bioquímica y pruebas de antagonismo.** En los medios de cultivo con crecimiento positivo, se seleccionaron aquellas cepas con halo de transparencia mayor en el caso del medio Pikovskaya y las morfologías coloniales más abundantes en el medio ELMARC, en cada caso se realizaron tinciones de Gram, prueba de KOH, prueba de catalasa, prueba de oxidación-fermentación de Hugh-Leifson (Collins y Lyne, 2004), a las cepas obtenidas de Pikovskaya, se les cuantificó la capacidad de solubilización de fósforo siguiendo la metodología descrita por Rodríguez *et al.* (2013), usando como referencia una solución patrón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 100 ppm, a partir de la cual se realizó una curva y para las cepas obtenidas de ELMARC, se cuantificó la concentración de iones amonio, para ello se siguió la metodología descrita por García *et al.* (2010) las concentraciones se calcularon en una curva patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de NH<sub>4</sub>Cl. Una vez realizada la caracterización bioquímica, se prepararon soluciones bacterianas de

las cepas aisladas con solución salina al 0.85%, cada solución se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup> y se preparó Agar Nutritivo para realizar las pruebas de antagonismo, una vez esterilizado y vertido en cajas Petri, previo a la gelificación se incorporó 1 mL de solución bacteriana y se homogenizó con movimientos circulares, una vez gelificado el Agar Nutritivo, se inoculó la superficie con 100 µL de una solución ajustada a  $1 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup> de cualquiera de las otras dos cepas para verificar si su crecimiento se ve afectado por la presencia de la primera, como control positivo se empleó Agar Nutritivo sin solución bacteriana incorporada previo al vertido (Collins y Lyne, 2004).

**Obtención de extractos vegetales.** Para obtener extractos de raíz, se germinaron semillas de maíz, cilantro, pepino y calabaza en Peat Moss estéril en charolas de 200 cavidades, la charola se dejó en obscuridad por 3 días, posteriormente se trasladó a un invernadero y se regó diariamente con 2 L de agua destilada durante 3 semanas, a los 10 días post-germinación se regó con una solución nutritiva elaborada a partir de fertilizante soluble (18-18-18) y los días posteriores se continuó con el riego habitual. Pasadas las 3 semanas se tomaron 10 cepellones de cada modelo vegetal y fueron lavados con agua destilada para eliminar los restos de Peat Moss, las raíces fueron cortadas y se ajustó el peso a 10 g en cada caso y fueron maceradas con 50 mL de agua tridestilada, la solución resultante se esterilizó por filtración, empleando filtros milipore de 0.2 µm (Ramírez *et al.*, 2017).

**Ensayos de quimiotaxis.** Se desarrollaron dos modalidades, la primera se llevó a cabo en agar agua semisólido, el cual fue vertido en cajas Petri de 10 cm de diámetro, una vez gelificado se hicieron 6 perforaciones en la periferia y una central, todas equidistantes (1 cm) en 4 pozos se colocaron 100 µL de cada uno de los extractos vegetales, un pozo con 100 µL de ampicilina ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) como control negativo y el último pozo con 100 µL de

medio LB (por litro de medio de cultivo 10 g de polipeptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura), como control positivo, en el pozo central se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana ajustada ( $1 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), la caja Petri fue sellada e incubada a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 h. Transcurrido el periodo de incubación de cada pozo periférico, se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  para realizar conteos en cada caso. La segunda modalidad se desarrolló en medio líquido acorde a la metodología descrita por Reyes *et al.* (2016), para lo cual se utilizó un vaso de precipitados estéril, en cuya periferia se colocaron 6 tubos capilares de 5 cm de longitud y 1 mm de diámetro, que fueron llenados con las mismas soluciones que en el ensayo en medio semisólido, en el vaso se incorporó agua tridestilada estéril hasta entrar en contacto con los capilares y finalmente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución bacteriana ajustada ( $1 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) en el centro del vaso, se puso en incubación por 24 h a  $30^\circ\text{C}$ , transcurrido el periodo de incubación se retiraron los capilares y se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada tubo para realizar los conteos.

**Análisis estadísticos.** Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 18 cepas promisorias en promoción de crecimiento vegetal, 10 obtenidas en medio Pikovskaya y 8 más en medio ELMARC; una vez que se cuantificó su capacidad para solubilizar fósforo (tabla 1) y fijar nitrógeno (tabla 2), se seleccionaron aquellas cepas con los valores más altos en cada criterio las cuales fueron caracterizadas parcialmente

mediante pruebas bioquímicas y sometidas a los ensayos de antagonismo para verificar la posibilidad de elaborar un solo biofertilizante mezclando dos o más cepas.

**Tabla 1. Caracterización de cepas solubilizadoras de fósforo**

Cepa	Gram	Catalasa *	Oxidación/ fermentación**	KOH	Solubilización de fósforo (mg·L <sup>-1</sup> )	Diámetro de halo (cm)
B1	cocos Gram +	+	O/F	-	110.3 a	3.1 a
B2	bacilos Gram -	++	O	+	33.1 de	1.6 c
B3	bacilos Gram +	-	F	-	21.2 f	1.6 c
B4	bacilos Gram +	++	O	-	43.5 d	1.7 c
B5	bacilos Gram -	+	O	+	10.9 f	1.5 c
B6	bacilos Gram -	+	O/F	+	55.4 c	1.9 bc
B7	bacilos Gram +	+	O/F	-	119.1 a	3.1 a
B8	cocos Gram +	-	F	-	77.6 b	2.3 b
B9	cocos Gram +	+	O	-	66.8 bc	2.2 b
B10	bacilos Gram -	+	O	+	11.1 f	1.5 c

\*++ Alta producción de gas, + producción baja de gas, - no producción de gas. \*\* O vía oxidativa, F vía fermentativa, O/F ambas vías. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales para  $p \leq 0.05$ .

En la tabla 1 se puede observar que las cepas denominadas B1 y B7 presentan los valores más elevados de solubilización de fósforo (110.3 mg·L<sup>-1</sup> y 119.1 mg·L<sup>-1</sup> respectivamente), superiores a los reportados por Estrada *et al* (2012) para cepas de *Herbaspirillum* e inferiores a los encontrados para cepas de *Enterobacter* en ensayos *in vitro* (Sánchez *et al.* 2012), los resultados de cuantificación de fósforo soluble en medio líquido presentan la

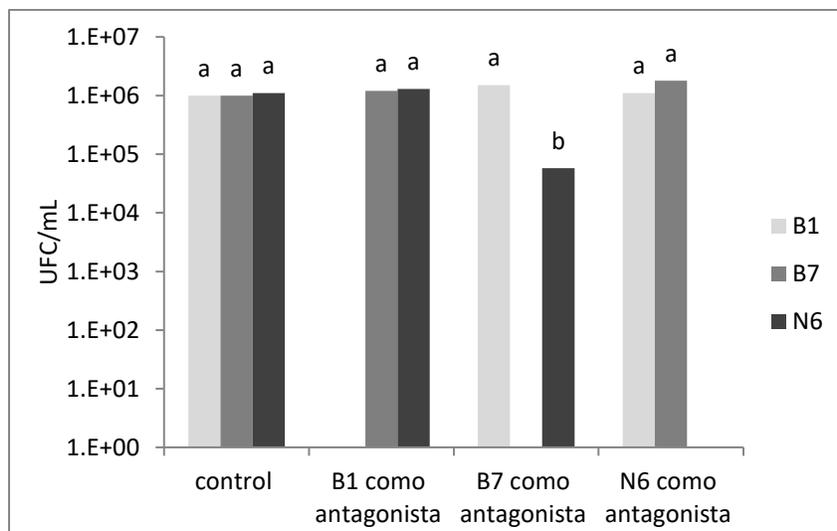
misma tendencia observada en medio sólido, donde se midió el diámetro del halo de transparencia, por lo cual ambas cepas fueron seleccionadas para los ensayos posteriores.

**Tabla 2. Caracterización de cepas fijadoras de nitrógeno**

Cepa	Gram	Catalasa *	Oxidación/ fermentación**	KOH	Producción de amonio (mg·L <sup>-1</sup> )
N1	bacilos Gram +	+	O/F	-	10.8 c
N2	bacilos Gram -	+	O	+	23.1 b
N3	bacilos Gram +	-	F	-	22.2 bc
N4	bacilos Gram +	++	O/F	-	14.5 c
N5	bacilos Gram -	+	O	+	10.9 c
N6	bacilos Gram -	+	O/F	+	58.5 a
N7	bacilos Gram +	+	O/F	-	11.4 c
N8	bacilos Gram -	+	O	+	11.1 c

\*++ Alta producción de gas, + producción baja de gas, - no producción de gas. \*\* O vía oxidativa, F vía fermentativa, O/F ambas vías. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales para  $p \leq 0.05$ .

Del mismo modo, puede observarse en la tabla 2, que la cepa N6 presenta los valores más elevados en la cuantificación de iones amonio, lo cual es un indicativo de su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, los valores encontrados aquí son superiores a los reportados por Lara *et al* (2007) para cepas nativas de Córdoba de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* y equiparables a los reportados por García *et al* (2010), por ello se seleccionó esta cepa al ser la fijadora de nitrógeno más eficiente en este ensayo.



Grafica 1. Ensayos de antagonismo de las cepas B1, B7 y N6 barras con la misma letra son estadísticamente iguales para  $p \leq 0.05$ .

En los ensayos de antagonismo se puede observar en la gráfica 1 que N6 presenta un crecimiento hasta aproximadamente 25 veces menor en presencia de B7 ( $5.8 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), comparado contra el crecimiento de N6 en el control (cultivo axénico con crecimiento de  $1.3 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), por ésta razón la cepa B7 se descarta en los ensayos posteriores, en el resto de los ensayos de antagonismo no se observa ningún otro fenómeno de disminución de crecimiento, pues en cada caso se observan patrones equiparables a los testigos. Las interacciones microbianas ocurren con una alta frecuencia y son de una amplia diversidad, principalmente entre microorganismos aislados de suelo (Pellkofer *et al.*, 2016), en ellas se definen los nichos ecológicos que cada uno ocupa y se evita la redundancia, es por ello que resulta indispensable determinar el tipo de interacción que ocurre entre las cepas obtenidas.

**Tabla 3. Ensayo de Quimiotaxis en medio semisólido**

cepa	Control + (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Control - (UFC·mL <sup>-1</sup> )*	Maíz (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Cilantro (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Calabaza (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Pepino (UFC·mL <sup>-1</sup> )
B1	6.2X10 <sup>3</sup>	0	5.9X10 <sup>3</sup>	8X10 <sup>2</sup>	2.2X10 <sup>3</sup>	9X10 <sup>2</sup>
N6	7.1X10 <sup>3</sup>	0	5.4X10 <sup>3</sup>	3.9X10 <sup>3</sup>	2.6X10 <sup>3</sup>	7X10 <sup>2</sup>

Ensayos de Quimiotaxis para las cepas B1 y N6 hacia diferentes extractos vegetales medidos como crecimiento microbiano (UFC·mL<sup>-1</sup>) en medio semisólido a las 48 h. \*No presentó crecimiento.

En los ensayos de quimiotaxis en medio semisólido, se observa en la tabla 3, que tanto B1 como N6, no presentan atracción hacia el control negativo (ampicilina) y presentan atracción hacia todos los extractos vegetales y al control positivo (caldo LB), sin embargo, se observa respuesta diferente para cada extracto, en ambas cepas se presenta mayor atracción para extractos de maíz y una atracción baja hacia extractos de pepino, sin embargo, N6 presenta atracción fuerte hacia extractos de cilantro y para B1 los extractos de éste son los que presentan valores más bajos.

**Tabla 4. Ensayo de Quimiotaxis en medio líquido**

cepa	Control + (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Control - (UFC·mL <sup>-1</sup> )*	Maíz (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Cilantro (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Calabaza (UFC·mL <sup>-1</sup> )	Pepino (UFC·mL <sup>-1</sup> )
B1	8.1X10 <sup>4</sup>	0	8X10 <sup>4</sup>	3.7X10 <sup>4</sup>	5.6X10 <sup>4</sup>	9X10 <sup>3</sup>
N6	9.3X10 <sup>4</sup>	0	8.2X10 <sup>4</sup>	7.6X10 <sup>4</sup>	3.3X10 <sup>4</sup>	7.4X10 <sup>3</sup>

Ensayos de Quimiotaxis para las cepas B1 y N6 hacia diferentes extractos vegetales medidos como crecimiento microbiano (UFC·mL<sup>-1</sup>) en medio líquido a las 24 h. \*No presentó crecimiento.

En la tabla 4 se puede observar, que para el ensayo de quimiotaxis en medio líquido, los valores de crecimiento encontrados, son superiores que en el ensayo en medio semisólido (hasta 10 veces mayor), sin embargo, se puede apreciar que existe una tendencia de atracción semejante en ambos ensayos, en los dos casos, se presenta alta atracción hacia extractos radiculares de maíz que son prácticamente equiparables a los valores encontrados

en el control positivo y los valores más bajos son hacia extractos de pepino; en el caso de los extractos de calabaza y cilantro, se siguen patrones distintos para cada cepa, se observa también que N6 siguió el mismo patrón de atracción en ambos ensayos (líquido y semisólido). Los valores de quimiotaxis reportados aquí para el medio líquido son equiparables a los reportados por Kumar *et al.* (2018) para cepas de *Xanthomonas oryzae* e inferiores a los presentados por Mukherjee *et al.* (2016) para una cepa silvestre de *Azospirillum sp.* Estos resultados ofrecen un panorama preliminar de la probabilidad de colonización de B1 y N6 para cada modelo vegetal evaluado, proceso que resulta fundamental en la determinación de efectividad de un biofertilizante, pues si no existe colonización efectiva o una interacción positiva del microorganismo con la planta, la probabilidad de éxito disminuye considerablemente.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este ensayo, han permitido generar un esquema de obtención y eliminación de cepas bacterianas a razón de su capacidad como promotoras de crecimiento vegetal, de su interacción con otros microorganismos o de su interacción con diferentes modelos vegetales. En este sentido, se seleccionaron dos cepas promisorias en la elaboración de biofertilizantes, una de ellas con capacidad para solubilizar fósforo (B1) y la otra como fijadora de nitrógeno (N6). La quimiotaxis encontrada para B1 y N6 hacia extractos de raíz permite, de manera preliminar, establecer un mecanismo predictivo de colonización hacia diferentes modelos vegetales, se demuestra que en medio líquido hay valores más elevados de crecimiento en cada extracto vegetal, en comparación con el medio semisólido, finalmente, se puede aseverar que ambas cepas tienen una atracción mayor por extractos de maíz y su atracción más baja, fue por extractos de pepino, lo cual permite

inferir baja probabilidad de colonización hacia éste último y una alta probabilidad de colonización hacia plantas de maíz.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aira, M., Gómez B., Lazcano, C., Bååth, E., and Domínguez, J. 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol.Biochem.* 42, 2276– 2281. doi:10.1016/j.soilbio.2010. 08.029.

Angeles, J., and Cruz, T. 2015. Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 6, núm. 5, junio-agosto, 2015, pp. 929-942

Buchan, A., Crombie, B., Alexandre, G.M. 2010. Temporal dynamics and genetic diversity of chemotactic-competent microbial populations in the rhizosphere. *Environ Microbiol* 12:3171–3184.

Collins, C., and Lyne, P. 2004. *Microbiological Methods*. Holder Headline group, 8th ed: 82, 90-99 pp.

Estrada, G., Baldani, V., De Oliveira D., Urquiaga S, Baldani J. 2012. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*. 2012;361.

García, F., Muñoz, H., Carreño, C. and Mendoza, G. 2010. Characterization of native strains of *Azospirillum spp.* and its effect on growth of *Oryza sativa* L. “rice” in Lambayeque. *Scientia Agropecuaria* 1(2010) 107-116.

James, A., Frankel N., and Emonet, T. 2018. Behavioral Variability and Phenotypic Diversity in Bacterial Chemotaxis. *Annu Rev Biophys*; 47: 595–616. doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010954.

Kumar, R., Samal, B., and Chat, S. 2018. *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* chemotaxis components and chemoreceptor Mcp2 are involved in the sensing of constituents of xylem sap and contribute to the regulation of virulence-associated functions and entry into rice. *Molecular Plant Pathology*; **19**(11), 2397–2415. doi: 10.1111/mpp.12718.

Lara, C., Villalba, M., Oviedo, L. 2007. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9 (2), 6-14.

Mukherjee, T, Kumar, D, Burriss, N, Xie Z, Alexandre G. 2016. *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *J Bacteriol* 198:1764 –1772. doi:10.1128/JB.00020-16.

Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M. & Thonart, P. 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(2), 327-337.

Onyia, C., and Anyanwu, C. 2013. Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. *Journal of yeast and Fungal R.* Vol. 4(5), 52-57.

- Pellkofer, S., van der Heijden, M., Schmid B., Wagg C. 2016. Soil communities promote temporal stability and species asynchrony in experimental grassland communities. *PLoS ONE* 11 (2) 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0148015.
- Porter, S., Wadhams, G., Armitage, J. 2008. *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signalling. *Trends Microbiol* 16:251–260.
- Ramírez, D., Naranjo, B., Duchicela J. 2017. Stimulation of germination of spores and root colonization of *Diversispora trimulares* by flavonoids in *Nicotiana glauca* root exudates. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 20(2): 341-351.
- Reyes, J.A., García, V., Rico, M., Corral, A., Krell T. 2016. Identification and Characterization of Bacterial Chemoreceptors Using Quantitative Capillary and Gradient Plate Chemotaxis Assays. *Bioprotocol* 6 (8): 1-11.
- Rodríguez, O., Aguilera, I., Pérez, R. 2013. Adaptation of a Colorimetric Micro Method for Quantification Soluble Phosphorus in Microbial Cultures. *Rev Cubana de Química* 25 (1): 3-8.
- Sánchez, D., Gómez, R., Garrido, M. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*;3(7): 1401-1415.