

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

EFECTOS DE LA INOCULACIÓN CON AISLAMIENTOS DE RIZOBIOS Y SU INTERACCIÓN CON EL BASALTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Medicago polymorpha* L.

Effects of inoculation with rhizobia isolation and its interaction with basalt on *Medicago polymorpha* L. growth

Vasquez, Susana I.; Cossoli, Marcela R.; Romero, Amalia M. E.

Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias – UNNE.
E-mail: vasquezjpz@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación de tres aislamientos de rizobios del cepario de la cátedra de Microbiología-UNNE, con y sin el agregado de basalto, sobre el crecimiento de *Medicago polymorpha*. El ensayo tuvo un diseño factorial 3 x 2, con 6 tratamientos y 5 repeticiones, bajo invernáculo: T1: A52 sin basalto; T2: A52 con basalto; T3: A194 sin basalto; T4: A194 con basalto; T5: A140 sin basalto; T6: A140 con basalto. Los datos tomados fueron analizados mediante ANOVA, con prueba de Fisher ($p < 0,05$) para la comprobación de medias. Se pudo observar que los tratamientos T6 y T4 fueron superiores al T2 en un 37% y 22% respectivamente para la variable número de hojas por planta. El T4 presentó el mayor número de ramificaciones por planta seguido del T6, diferenciándose de T2 en un 53% y 42% respectivamente. Estas diferencias posiblemente se deban a la capacidad de estos microorganismos de promover el crecimiento vegetal mediante el mecanismo de solubilización del polvo de roca que genera mayor disponibilidad de nutrientes. El A52 se comportó de manera opuesta, obteniendo mejores resultados en las variables mencionadas en el tratamiento sin basalto (T1). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para las variables volumen radical, peso seco de raíz, vástago y producción total por planta. Sólo se observaron nódulos en una planta del T6. El resto de los tratamientos no presentaron nódulos, lo que podría atribuirse a la alta especificidad de *M. polymorpha* o al tipo de suelo utilizado en el ensayo.

Palabras claves: Trébol de carretilla, acidificación, polvo de roca basáltica.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the inoculation of three rhizobia isolation of the strain collection from the chair of Agricultural Microbiology-UNNE, with and without the addition of basalt, on the growth of *Medicago polymorpha*. The 3x2 factorial experimental design was employed, with 6 treatments and 5 replicates, in a greenhouse: T1: A52 without basalt; T2: A52 with basalt; T3: A194 without basalt; T4: A194 with basalt; T5: A140 without basalt; T6: A140 with basalt. The data collected was analyzed using ANOVA, with Fisher's test ($p < 0,05$) to check means. It was possible to observe that T6 and T4 treatments were superior than T2 by 37 % and 22% respectively, for the variable number of leaves per plant. T4 presented the highest number of branches per plant followed by T6, differing from T2 by 53% and 42% respectively. These differences are possibly due to the ability of these microorganisms to promote plant growth through the solubilization mechanism of rock dust that generates greater availability of nutrients. A52 developed in the opposite way, obtaining better results than the variables mentioned in the treatment without basalt (T1). There were no statistically significant differences among treatments for the variables root volume, root and shoot dry weight and biomass production per plant. Nodules were observed in one plant of T6 only. The rest of the treatments did not present nodules, possibly due to the high specificity of *M. polymorpha* or the type of soil used in the trial.

Key words: Burr clover, acidification, basaltic rock dust.



INTRODUCCIÓN

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es el principal mecanismo de aporte de nitrógeno en los ecosistemas naturales y es muy importante en la agricultura del trópico (Marschner, 1995). La cantidad de este elemento en la mayoría de los suelos cultivados es escasa y no puede ser suplementada a escala mundial por la producción de fertilizantes (Azcón-Bieto y Talón, 2008). En este sentido, la FBN representa una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química, desempeñando un papel muy importante en la economía del nitrógeno en la práctica agrícola (Bellone y Carrizo de Bellone, 2006; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Frioni, 2011).

Dentro de la familia de las Fabáceas, una gran proporción de especies son capaces de realizar la FBN mediante la simbiosis con bacterias del grupo rizobios, que se alojan en estructuras especializadas denominadas nódulos, ubicados generalmente en las raíces. Debido a esto, las Fabáceas juegan un papel importantísimo en el ciclo biológico del nitrógeno, incrementando la cantidad del mismo en el sistema suelo-planta, a la vez que constituyen un componente invaluable de las pasturas por su alto valor nutritivo (Carámbula, 2007).

El trébol de carretilla (*Medicago polymorpha* L.) es una Fabácea forrajera, naturalizada en el país, que se caracteriza por ser anual y de desarrollo invernal-primaveral; germina en otoño y desaparece en diciembre dejando el campo sembrado de los frutos espiralados, generalmente espinosos (carretillas, rodajillas). Tanto las plantas en vegetación como los frutos, son un importante recurso forrajero de nuestros campos, especialmente para el ganado vacuno y el ovino (Burkart, 1952). Se adapta a un rango amplio de suelos, tiene una buena capacidad fijadora de nitrógeno y no tiene requerimientos especiales de manejo (Carámbula, 2007).

Los rizobios son bacterias bacilares, aerobias, Gram negativas, que viven como heterótrofos saprófitos en el suelo cuando no están infectando a su huésped, siendo la densidad media de su población en tierras de barbecho entre 10^2 y 10^5 células por gramo de suelo. Las colonias tienen un aspecto mucilaginoso debido a la presencia de polisacáridos extracelulares. Dentro de este grupo encontramos a los que acidifican el medio de cultivo, de crecimiento rápido como el género *Rhizobium* y a los que alcalinizan el medio de cultivo, de crecimiento lento como *Bradyrhizobium*. (Bellone y Carrizo de Bellone, 2006; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Frioni, 2011).

Por otro lado, considerando la extracción de nutrientes por parte de los cultivos, el polvo de roca es utilizado como fuente alternativa a la fertilización química en la remineralización de suelos pobres o lixiviados, buscando un equilibrio en la fertilidad del suelo junto a la conservación de los recursos naturales, y a una productividad natural sostenible (Fyfe et al., 2006; Ramos Gindri et al., 2014). La roca basáltica es uno de los materiales más estudiados, por la gran posibilidad de suplir de nutrientes al suelo debido a su composición, especialmente fósforo, calcio, magnesio, y micronutrientes; y por presentar en su mayoría bajo contenido de silicio (Ramos Gindri et al., 2014). Es de baja solubilidad con un efecto residual prolongado (Ferreira et al., 2009), siendo la solubilización de los minerales un proceso directamente relacionado a la actividad biológica.

Además de la fijación simbiótica del N, algunas cepas o especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* presentan otros mecanismos para promover el crecimiento vegetal, como la capacidad de solubilizar rocas fosfóricas mediante la producción de ácidos orgánicos aumentado la disponibilidad de P en los suelos (Rudresh et al., 2005; Fernández et al., 2007; Fernández et al., 2013; Santos Torres, 2020). Por este motivo el manejo del polvo de roca podría ser más efectivo cuando se realice de forma conjunta con prácticas agronómicas como la inoculación. Por lo tanto, la posibilidad de poder encontrar cepas de rizobios que puedan ser compatibles con el uso de polvo de basalto, nos permitirá combinar dos herramientas para enriquecer los suelos agrícolas.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la inoculación con distintos aislamientos de rizobios en plantines de *Medicago polymorpha* y evaluar la interacción de los aislamientos con el polvo de roca basáltica incorporada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de aislamientos

De los aislamientos obtenidos a partir de nódulos radicales, purificados y disponibles en el stock del cepario de la Cátedra de Microbiología Agrícola-FCA, que aún no habían sido probados, se seleccionaron los aislamientos A52, A140 y A194.



Se realizó la caracterización macroscópica de los mismos mediante la morfología de las colonias. Se hicieron cultivos en placas con medio YEM-RC (K_2HPO_4 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/l; NaCl 0,1 g/l; manitol 10 g/l; extracto de levadura 1 g/l, agar 15 g/l; rojo congo 10 ml/l), se incubaron a 28°C por 24 hs y se realizó la observación bajo lupa estereoscópica. Se determinaron morfotipos celulares mediante la tinción Gram y observación en microscopio óptico (Frioni, 2011).

Para determinar la capacidad de los aislamientos de alcalinizar o acidificar el medio, se cultivó por triplicado cada aislamiento en tubos de ensayo con medio líquido YEM (extracto de levadura manitol) a pH 7,1, bajo las siguientes condiciones de incubación: agitación en shaker a velocidad media (modelo G24 ambiental incubator shaker, New Brunswick scientific, Co INC Edison NJ USA), a 28° C por 24hs. La medición del pH se realizó con un peachímetro de mesada.

Prueba en planta en *Medicago polymorpha*

El ensayo se realizó en el año 2019, en el invernáculo de la Cátedra de Microbiología Agrícola-FCA., bajo un diseño factorial 3x2. El primer factor corresponde a los aislamientos, con tres niveles: A52, A194 y A140. El segundo factor corresponde al basalto, con dos niveles: con basalto y sin basalto. Los distintos tratamientos quedaron conformados de la siguiente manera (Tabla 1), con 5 repeticiones cada uno.

Tabla 1. Tratamientos del ensayo en planta de *M. polymorpha* conformados a partir de la combinación de cada aislamiento con y sin aplicación de basalto.

Tratamiento	Descripción
T1	Aislamiento n° 52 sin basalto
T2	Aislamiento n° 52 con basalto
T3	Aislamiento n° 194 sin basalto
T4	Aislamiento n° 194 con basalto
T5	Aislamiento n° 140 sin basalto
T6	Aislamiento n° 140 con basalto

El suelo fue recolectado en la Escuela Regional de Agricultura, Ganadería e Industrias Afines (ERAGIA), perteneciente a la serie de suelo Ensenada Grande, ubicado en Corrientes capital, provincia de Corrientes. Los suelos de esta serie se caracterizan por su baja fertilidad y baja retención de humedad, con un nivel de fósforo moderado a bajo y un contenido de MO menor al 1% (Escobar et al., 1996).

Previo al ensayo el suelo fue esterilizado por medio de autoclave y la efectividad de la misma se comprobó mediante el recuento de heterótrofos totales en medio de cultivo TSA (Trypteina de soja agar) en el suelo estéril y en suelo sin esterilizar mediante el Cálculo del Número Más Probable de microorganismos por el método de Mc Crady (Frioni, 2011). El resultado fue de 0 microorganismos/g de suelo a las 24 hs en la dilución $^{-1}$ en el suelo estéril y $2,5 \times 10^5$ microorganismos/g a las 24hs en la dilución $^{-1}$ en el suelo no estéril.

Las semillas de trébol de carretilla fueron cosechadas en 2018 en la Facultad de Ciencias Agrarias UNNE y esterilizadas superficialmente con alcohol 96% por 1 minuto, agua oxigenada 10 volúmenes por 2 minutos y lavado con agua estéril por 5 minutos (Herrera et al., 1996). Se sembraron 6 semillas por maceta de 1L de capacidad, luego se procedió al raleo de plantas logradas quedando 3 por maceta en todos los casos. El riego se realizó diariamente con regadera en forma manual.

Se utilizó basalto en forma de polvo de roca listo para su aplicación, con una granulometría $< 0,5$ mm. Se utilizó una dosis de 2Tn/ha, que se incorporó al suelo de las macetas a los 3 días de la siembra. El análisis de nutrientes se muestra en la tabla 2.



Tabla 2. Análisis de macro y micro-elementos total del polvo de basalto.*

N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn
----- % -----				--- % ---		----- ppm -----		
0,02	0,18	0,06	1,05	0,10	3,76	140	130	30

*Análisis de contenido total realizado en el Centro Tecnológico de Producción (CETEPRO), provincia de Co-rientes. K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn por absorción atómica. P por el método de Murphy y Riley. N en digestión ácida.

Los inóculos de los aislamientos utilizados en el ensayo se prepararon en medio líquido YEM (K_2HPO_4 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/l; NaCl 0,1 g/l; manitol 10 g/l; extracto de levadura 1g/l) y se dejaron incubar con agitación en shaker a 28° C por 48hs. Se inoculó 1000 μ l/maceta de cada aislamiento a los 8 días de la siembra. Se realizó el recuento de UFC en placas en los A52 y A140, dando como resultado $1,55 \times 10^9$ UFC/mL y $2,05 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente. En el A194 se realizó el recuento mediante el Cálculo del Número Más Probable de microorganismos por el método de Mc Crady, resultando $4,5 \times 10^2$ microorganismos/ml, debido a no poder detectar el recuento de UFC en placas (Frioni, 2011).

En el ensayo en macetas se midió semanalmente el número de hojas y número de ramificaciones. La extracción de las plantas se realizó a los 55 días posteriores a la siembra. Se realizó el conteo de los nódulos presentes. Se determinó el volumen radical y se secaron las plantas en estufa para determinar peso seco de vástago y raíz.

Análisis estadísticos

El análisis de datos obtenidos se realizó por medio del análisis de la varianza (ANOVA) factorial y la comparación de medias por Fisher ($p < 0,05$). Se empleó el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de aislamientos

A partir de la caracterización macroscópica se comprobó la similitud de los aislamientos con los rizobios. Se determinó que eran Gram negativos en base a la caracterización microscópica. Se determinó que los aislamientos n° 140 y 194 acidificaron los medios de cultivo, mientras que el A52 los alcalinizó (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los distintos aislamientos utilizados en el ensayo.

	Características de las colonias						Tinción Gram	pH *
	Tamaño (mm)	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color		
A52	0,5 o menos	Circular	Entero	Convexa	Lisa brillante seca	Hialino	Negativo	7,21
A194	1-2	Circular	Entero	Convexo	Lisa brillante seca	Rosa	Negativo	5,84
A140	0,25 o menos	Circular	Entero	Convexo	Lisa brillante seca	Hialino	Negativo	6,91

* pH medido a las 24hs, con un pH inicial de 7,1

Prueba en planta de *Medicago polymorpha*

El análisis de la varianza solo mostró significancia en el factor interacción microorganismo x basalto en las variables número de hojas y número de ramificaciones por planta, no pudiéndose observar diferencias significativas en los factores por separado (Tabla 4).

En el análisis de comparación de medias de los tratamientos (Tabla 5), si se consideran solo los tratamientos con basalto, se observó una mejora significativa en T6 y T4 para las variables número de hojas y número de ramificaciones por planta, con respecto al T2. El T6 (22,13 hojas por planta) y T4 (19,80 hojas por planta) fue-

ron superiores al T2 en un 37% y 22% respectivamente. Por otro lado, el T4 presentó el mayor número de ramificaciones por planta (2,87) seguido por T6 (2,67), diferenciándose de T2 en un 53% y 42% respectivamente. Esto demuestra una interacción positiva entre microorganismos acidificadores y basalto en las variables mencionadas. Esto posiblemente se deba a la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante el mecanismo de solubilización, por medio de la producción de ácidos orgánicos, que genera una mayor disponibilidad de los nutrientes presentes en el polvo de roca basáltica. De la misma manera, Santos Torres (2020) observó que la cepa *Rhizobium sp.* T88 mostró un mayor potencial para promover el crecimiento vegetal al incrementar significativamente la biomasa seca en ryegrass perenne (*Lolium var. One50*) y en trébol rojo (*Trifolium pratense*) junto con la aplicación de roca fosfórica en un suelo deficiente en P bajo condiciones de invernadero. Además, determinó que esta cepa fue capaz de solubilizar en medio líquido fosfato tricálcico y roca fosfórica produciendo ácidos orgánicos y fosfatasas ácidas y alcalinas. Fernández et al. (2007) estudiaron la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo sobre el cultivo de soja. Entre las bacterias se incluyó un aislamiento de *Bradyrhizobium* que presentó buenas capacidades de solubilización *in vitro* con respecto a otros aislamientos. Sin embargo, los resultados en el ensayo en macetas bajo invernáculo no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación a un testigo sin inocular en las variables altura y peso seco. Por otro lado, Peireyra da Silva et al. (2013) realizaron ensayos con columnas de suelo en laboratorio, donde observó que los tratamientos con polvo de basalto indican una tendencia a incrementar el contenido de nutrientes en solución del suelo; y la inoculación con microorganismos, además de la microbiota del suelo, podría estimular la liberación de estos nutrientes; y sugiere que el uso combinado de polvos de roca y microorganismos puede ser interesante en los sistemas de producción de plantas.

Tabla 4. Análisis de varianza para las variables biométricas del ensayo de *M. polymorpha*.

p-valor	Nº de hojas*	Nº de ramificaciones*	Volumen radical (mL)	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco total (g)
Factor A: aislamientos	0,0863 ^{ns}	0,2763 ^{ns}	0,4137 ^{ns}	0,9267 ^{ns}	0,7739 ^{ns}	0,9084 ^{ns}
Factor B: basalto	0,5869 ^{ns}	0,7520 ^{ns}	0,8346 ^{ns}	0,5524 ^{ns}	0,6255 ^{ns}	0,5722 ^{ns}
Aislamientos x basalto	0,0171 ^x	0,0496 ^x	0,3796 ^{ns}	0,1096 ^{ns}	0,1206 ^{ns}	0,0987 ^{ns}

En el tratamiento T1 (sin basalto) se incrementó significativamente el número de hojas por planta (23,5% más) y el número de ramificaciones por planta (42,7% más), con respecto al T2; similar a lo hallado por Romero (2021) donde el tratamiento con *Bradyrhizobium* tuvo un mejor comportamiento en la variable número de hojas sin el uso de basalto en el ensayo en macetas con Caupí (*Vigna unguiculata*). Esto podría deberse a que el aislamiento A52 alcalinizó el medio de cultivo, resultando en una interacción negativa entre microorganismo y basalto.

En las variables volumen radical, peso seco de raíz, vástago y total por planta no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Romero (2021), quién no halló diferencias significativas en el análisis de varianza factorial en la interacción inoculantes x basalto para los tratamientos con *Bradyrhizobium* en las variables número de hojas, altura, volumen radical y biomasa total en el ensayo en macetas con *Avena strigosa*.

La formación de nódulos sólo se observó en una planta del tratamiento T6 y su efectividad no fue comprobada. El resto de los tratamientos no presentaron nódulos. Esto puede deberse a que *Medicago polymorpha* es un huésped de alta especificidad y los aislamientos utilizados no son compatibles con esta especie. El proceso de nodulación también se pudo ver afectado por el tipo de suelo usado en el ensayo, caracterizado por tener de moderado a bajo contenido de P en el suelo. Esto fue planteado en Santos Torres (2020) que a pesar de que observó un aumento significativo en la biomasa del trébol rojo inoculados con *Rhizobium*, observó pocos nódulos.



los y la mayoría de ellos eran blancos, lo que indica que estaban inactivos, sugiriendo la hipótesis de que la deficiencia de P en el suelo podría haber limitado significativamente el proceso de nodulación y la cepa de *Rhizobium* logró mejoras en la biomasa mediante otros mecanismos de promoción.

Tabla 5. Valores promedios de las variables analizadas por planta del ensayo en macetas de *M. polymorpha*.

Tratamientos	Nº de hojas*	Nº de ramificaciones*	Volumen radical (mL)	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco total (g)
1	19,93 ab	2,67 a	1,20 a	0,13 a	0,13 a	0,26 a
2	16,13 c	1,87 b	0,93 a	0,09 a	0,10 a	0,19 a
3	17,07 bc	2,47 ab	1,17 a	0,10 a	0,11 a	0,21 a
4	19,80 ab	2,87 a	1,43 a	0,12 a	0,13 a	0,25 a
5	19,33 abc	2,47 ab	1,33 a	0,11 a	0,12 a	0,24 a
6	22,13 a	2,67 a	1,23 a	0,11 a	0,12 a	0,23 a

* Se analizaron los datos de la última medición. Medias con una letra común no tuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$).

CONCLUSIONES

De lo expuesto se puede concluir que algunas variables se vieron favorecidas por la combinación de microorganismos con basalto, pudiendo ser la producción de ácidos orgánicos, que provocaron la acidificación del medio y la posible solubilización del polvo de basalto, uno de los mecanismos por los cuales estos microorganismos realizaron su actividad promotora. Por lo tanto, los aislamientos A140 y A194 podrían ser promisorios como biofertilizantes para su uso combinado con el polvo de basalto.

Por otro lado, el A52 se comportó de manera opuesta, obteniéndose mejores resultados en las variables mencionadas en el tratamiento sin basalto, por lo cual no se recomendaría su uso combinado con el polvo de basalto.

La falta de nodulación en la mayor parte de las plantas puede deberse a diversos factores, los que deberán considerarse para futuros estudios.

REFERENCIAS

- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. (2ª ed.) McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Bellone, C.H. y Carrizo de Bellone, S. (2006). Fijación biológica del nitrógeno atmosférico. (1ª ed.) - Tucumán: El Autor. 223p.
- Burkart, A. (1952). *Las leguminosas argentinas: silvestres y cultivadas*. 2nd edn (2ª ed.). ACME Agency Buenos Aires.
- Carámbula, M. (2007). *Pasturas y forrajes: potenciales y alternativas para producir forrajes*. (Vol.1) Hemisferio Sur.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Escobar, E.H., Ligier, H.D., Melgar, R., Matteio, H. y Vallejos, O. (1996). Mapa de suelos de la provincia de Corrientes 1: 500.000. Convenio MAGIC-INTA. Recursos Naturales, EEA INTA Corrientes.
- Fernández, L.A., Zalba P., Gómez, M.A. y Sagardoy, M.A. (2007). Phosphate solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Bio Fertil Soils*. 43(6):805-809. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0172-3>
- Fernández, L.A. y Sagardoy, M.A. (2013). Bacterias solubilizadoras de fósforo como biofertilizantes: aislamiento, caracterización, diversidad y promoción del crecimiento vegetal. Review. En: García de Salamone, Vázquez, Penna y Casán (Eds.). *Rizosfera, biodiversidad y agricultura sustentable*. (pp. 137-150). Asociación Argentina de Microbiología.



-
- Ferreira, E.R.N.C., Almeida, J.A. y Mafra, A.L.** (2009). Pó de basalto, desenvolvimento e nutrição do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e propriedades químicas de um Cambissolo Húmico. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, Vol 8 (2): 111-121. <https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5318>
- Frioni, L.** (2011). *Microbiología básica, ambiental y agrícola*. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.
- Fyfe, W., Leonardos, O. y Theodoro, S.** (2006). Sustainable farming with native rocks: the transition without revolution. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78(4): 715-720. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000400007>
- Herrera, A., Longeri, L., y Ovalle, C.** (1996). Estudio de la efectividad de cepas chilenas de *Rhizobium meliloti* en simbiosis con *Medicago polymorpha*. *Agricultura Técnica*, 56 (1): 36-42. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/27436>
- Marschner, H.** (1995). Functions of mineral nutrients: macronutrients. En: *Mineral Nutrition of Higher Plants*, (2ª ed.). Academic Press, London, 379-396.
- Pereyra da Silva, L.D., de Azevedo, A.C. y Filho, R.A.** (2013) Ação de microorganismos em pó-de-basalto . In *II Congresso Brasileiro de Rochagem* (p. 43).
- Ramos Gindri, C., Gislaïne de Mello, A. y Kautzman Müller, R.** (2014). A preliminary study of acid volcanic rocks for stonemeal application. *Environmental Nanotechnology Monitoring and management*. Vol. 1-2: 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2014.03.002>
- Rudresh, D.L., Shivaprakash, M.K. y Prasad, R.D.** (2005) Effect of combined application of Rhizobium, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium L.*). *Appl. Soil Ecol.* 28 (2): 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.07.005>
- Santos Torres, M.T.** (2020). *Mejoramiento de la fertilización fosfatada en la asociación ryegrass y trébol rojo mediante el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato*. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología Bogota, Universidad Nacional de Colombia.
- Romero, A.M.E.** (2021). Efecto de *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp* y *Bradyrhizobium sp* en la disponibilidad de nutrientes del polvo de roca basáltica para cultivos de caupí y avena negra. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/51230>