

Concomitant action of *Methylobacterium extorquens* on the fixation of urea nitrogen of foliar application in bean plants (*Phaseolus vulgaris*)

Acción concomitante de *Methylobacterium extorquens* en la fijación de nitrógeno uréico de aplicación foliar en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Jesús Adrián Barajas-González¹, Sigifredo López-Díaz^{2*}, Gustavo Javier Acevedo-Hernández¹, Osvaldo Adrián Castellanos Hernández¹

¹Centro Universitario de la Ciénega *campus* Ocotlán Universidad de Guadalajara , av. Universidad, 1115, col. Lindavista, C.P. 47820, Ocotlán, Jalisco, México. ²Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán-Instituto Politécnico Nacional, Justo Sierra 28, Jiquilpan, C.P. 59510, Michoacán, México.

*Corresponding author.

E-mail address: slopezd@ipn.mx (S. López-Díaz).

Article history:

Received: 30 November 2016 / Received in revised form: 23 May 2017 / Accepted: 14 June 2017 / Published online: 1 July 2017

ABSTRACT

The bean is a legume, which in addition to biologically fix nitrogen, in its intensive cultivation, demands important applications of nitrogen fertilization, urea being the fertilizer most used because of its high nitrogen content of 46%, which is supplied to the plants at Through the foliage by its high solubility, which facilitates the optimal handling of the nitrogen. *Methylobacterium* is a methylotrophic facultative proteobacteria, persistent colonizer of the phyllosphere with an important metabolic potential, which has been shown to promote plant development, induce systemic resistance, attenuate plant stress and produce a broad spectrum of phytohormones and enzymes such as urease necessary for the hydrolysis of urea. The main objective of this work was to optimize the foliar absorption of urea nitrogen using different concentrations of urea with *M. extorquens* and for that the free amino acids and soluble proteins were quantified, testing 5 treatments and a control with *M. extorquens* and Urea at 3 and 4% individually and combined. The results showed effects statistically differing in the concentration of the free amino acids and soluble proteins content in the combined treatments compared with control and the individual treatments.

Keywords: Amino acids, *Methylobacterium extorquens*, Nitrogen, *Phaseolus vulgaris*, Urea.

RESUMEN

El frijol es una leguminosa, que además de fijar biológicamente el nitrógeno, en su cultivo intensivo demanda aplicaciones importantes de fertilización nitrogenada, siendo la urea el fertilizante más utilizado por su alto contenido de nitrógeno de 46%, y que es abastecida a las plantas a través del follaje por su alta solubilidad, lo cual facilita el óptimo manejo del nitrógeno. *Methylobacterium* es una α -proteobacteria methilotrónica facultativa, colonizador persistente de la filósfera con un potencial metabólico importante, el cual ha demostrado que promueve el desarrollo vegetal, induce resistencia sistémica, atenúa el estrés vegetal y produce un espectro amplio de fitohormonas y enzimas como la ureasa necesaria para la hidrólisis de la urea. El objetivo de este trabajo, fue optimizar la absorción foliar de nitrógeno uréico, empleando de manera concomitante diferentes concentraciones de urea con *M. extorquens* y para ello se cuantificaron los aminoácidos libres y proteínas solubles, probando 5 tratamientos y un control con *M. extorquens* y urea al 3 y 4% de manera individual y combinados. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa en la concentración del contenido de amino ácidos libres y proteínas solubles en los tratamientos combinados respecto al control y a los tratamientos individuales.

Palabras clave: Aminoácidos, *Methylobacterium extorquens*, Nitrógeno, *Phaseolus vulgaris*, Urea.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de fertilizantes químicos para mejorar la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos, a afectado negativamente el complejo sistema de los ciclos biogeoquímicos (Perrott *et al.*, 1992; Steinshamn *et al.*, 2004), causando la lixiviación y la escorrentía de nutrientes, especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P), conduciendo a la degradación del medio ambiente (Tilman, 1998; Gyaneshwar *et al.*, 2002). Las principales causas son; la baja eficiencia en el empleo de fertilizantes y su uso continuo a largo plazo. A pesar de los efectos negativos en el medio ambiente, se prevé que la cantidad total de los fertilizantes utilizados en todo el mundo irá en aumento por la creciente población mundial, ya que una agricultura intensiva para producir mas alimentos demanda grandes cantidades de estos agroquímicos (Vitousek *et al.*, 1997; Frink *et al.*, 1999). Además, el uso excesivo de estos, contribuye al deterioro de la calidad del suelo, lo que demuestra claramente la insustentabilidad (Kang *et al.*, 2009). Es por ello, que se tienen que buscar alternativas para contar con procedimientos en la agricultura que sean menos agresivos a los ecosistemas y los cuales incrementen el aprovechamiento de los fertilizantes, ya que en la actualidad la mayor parte se lixivian aproximadamente 40% del Nitrógeno, entre 50 y 60 % del Fosforo y 40% de Potasio. Situación que constituye un problema agronómico, económico y ambiental no resuelto en los sistemas de cultivo tradicionales (Suniaga *et al.*, 2008). Para tratar de subsanar este problema, se requiere de tecnologías enfocadas hacia una agricultura sustentable, como es el uso de biofertilizantes (Mena-Violante & Olalde-Portugal, 2007), dentro de los cuales la utilización y aplicación a gran escala de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB por sus siglas en inglés) es atractivo, ya que reducirá sustancialmente el uso de fertilizantes químicos y plaguicidas además de aumentar el rendimiento de las cosechas. Una alternativa para atenuar los impactos ambientales

negativos que resultan de la utilización de fertilizantes químicos, es la inoculación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés), estas bacterias favorecen sobre el crecimiento de las plantas y su desarrollo (Holguin *et al.*, 2003; Glick *et al.*, 2007), y muchos géneros diferentes han sido comercializados para su uso en la agricultura como: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal pueden mejorar la capacidad de absorción y solubilización de nutrientes, la síntesis de fitohormonas, favorecer la germinación de semillas y el control de patógenos, la producción de la enzima ureasa, la solubilización de fósforo (P), y la síntesis de sideróforos (Kloepper *et al* 1989;. Basán & Holguín 1997; Basán & de-Basán 2005; Lucy *et al.* 2004).

Los miembros del género *Methylobacterium* se clasifican como α -proteobacteria e incluyen 51 especies reportadas (<http://www.bacterio.net/methylobacterium.html>). Este género está compuesto por bacterias Gram-negativas que son generalmente de pigmentación rosada debido a la síntesis de un carotenoide (Van Dien *et al.*, 2003) , son estrictamente aeróbicas y capaz de crecer utilizando compuestos que contienen solo un carbono (C1), tales como metanol y metilamina (Toyama *et al.*,1998), es por eso que estas bacterias se denominan "metilotróficos facultativos de pigmento rosa" (PPFMs, por sus siglas en inglés), la característica principal de estas bacterias es su habilidad para oxidar metanol utilizando la enzima metanol deshidrogenasa.

Las bacterias metilotróficas de la filósfera son altamente resistentes a la deshidratación, congelación, la radiación ionizante UV, temperaturas elevadas. y aunque se les conoce como bacterias de la filósfera, se encuentran distribuidas ubicuamente en la planta encontrándolas en la rizósfera, en las semillas y como endosimbiontes ya que *Methylobacterium* puede entrar a la planta a través de la raíz y sistemáticamente colonizar cada tejido. Varios estudios, muestran concluyentemente que *Methylobacterium* mejora el crecimiento de las plantas a través de la producción de la enzima ureasa o por fitohormonas como las citocininas y el ácido indol-3-acético (IAA), vitamina B₁₂, además, también esta muy bien documentado que *Methylobacterium* produce sideróforos y la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC) la cual disminuye los niveles de etileno en las plantas (Idris *et al.*, 2004). También, se ha reportado su influencia en la germinación de semillas, así como su efecto en los rasgos agronómicos como; el vigor de la plántula, incremento en el número de ramificaciones, elongación de raíces, tolerancia al frío/calor aumento de la actividad fotosintética al incrementar el número de estomas, concentración de clorofila y contenido de ácido málico (Cervantes-Martínez *et al.*, 2004; Holland, 1997; Freyermuth *et al.*, 1996). Una de las características importantes de esta bacteria, es que indirectamente reduce o previene los efectos dañinos de los microorganismos fitopatógenos mediante la resistencia sistémica inducida (Madhaiyan *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo, fue optimizar la absorción de nitrógeno uréico aplicado foliarmente, empleando de manera concomitante *M. extorquens* con diferentes concentraciones de urea en solución acuosa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Peruano fueron desinfectadas superficialmente con una inmersión en etanol al 70%, por un minuto, posteriormente en hipoclorito de sodio NaClO al 2% seguido de 10 lavados vigorosos con agua destilada estéril.

Estas semillas fueron sembradas en macetas que contenían 200 g de peat moss previamente esterilizado y 300 g de arena de tezontle.

2.2. Material microbiológico

Se utilizó la bacteria *Methylobacterium extorques*, que se aisló de hojas de cultivos comerciales, y que fue identificada mediante un análisis secuencial del gen 16S rDNA de acuerdo a Zarnowski et al., 2002, se desarrolló en medio sólido AMS Agar (Ammonium Mineral Salts Agar) suplementado con 1 mL de metanol y que contenía por litro: Agar 15.0 g; sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 1.0 g; fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 0.7 g; fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0.54 g; cloruro de amonio (NH_4Cl) 0.5 g; cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.2 g; sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 4.0 mg; ácido bórico (H_3BO_4) 0.3 mg; cloruro de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) 0.2 mg; sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.1 mg; molibdato de sodio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) 0.06 mg; cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) 0.03 mg; cloruro de níquel hexahidratado ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) 0.02 mg; cloruro de cobre dihidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.01 mg. El pH del medio se ajustó a 6.8 ± 0.2 a 25°C.

El inóculo se preparó a partir de bacterias aisladas y purificadas desarrollándolas en medio de cultivo líquido con los componentes anteriormente descritos, en su fase media exponencial con una densidad óptica de 600 nm ($DO_{600}=1.2$), seguida por una centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm, lavando y resuspendiendo en una solución de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 30mM hasta obtener una densidad celular de 10^{12} UFC por mL ($DO_{600}=1.2$). Seguido de una agitación orbital durante 24 C° por 48h.

2.3. Establecimiento del diseño experimental

Se establecieron 6 tratamientos, los cuales consistieron en la inoculación foliar de *Methylobacterium extorques* (M), la inoculación foliar de *M. extorques* + fertilización foliar de urea al 3% (MU3), la inoculación foliar de *M. extorques* + fertilización foliar de urea al 4% (MU4), fertilización foliar de urea al 4% (U4), fertilización foliar de urea al 3% (U3) y un control sin fertilizar y sin inocular (C). El experimento se estableció empleando un diseño bloques al azar en condiciones de invernadero con dos repeticiones por tratamiento y cinco réplicas. Para la germinación y el desarrollo de las plantas, se empleó un sustrato sólido, el cual se preparó mezclando peat-moss con arena de tezontle en una relación 1:1 p/p, el sustrato fue esterilizado y posteriormente colocado en macetas en las cuales se sembraron las semillas de frijol. Se regaron con agua corriente hasta la aparición de las primeras hojas (8 días después de la siembra) y a partir de entonces se inició la aplicación de los tratamientos.

La inoculación de *M. extorquens* en la plantas de frijol, se realizo por la mañana y por la noche durante 7 días utilizando aspersión foliar en medio AMS líquido, aplicando 5 mL por planta hasta la primer gota. Posteriormente al establecimiento de la bacteria, se aplicaron las concentraciones de urea de acuerdo a los porcentajes de los tratamientos.

2.4. Determinación del contenido de aminoácidos libres

La concentración de aminoácidos libres se cuantifico espectrofotométricamente a 570 nm de longitud de onda por el método de la ninidrina y se utilizó metionina como estándar. Se maceraron 100 gr de hoja en mortero. El material triturado se colocó en tubos de ensayo para la realización de las extracciones etanólicas. Cada una de las tres extracciones se realizó durante 20 minutos incubando las muestras a baño maría a 80 °C; con 500 µL de etanol al 80%, 300 µL de etanol al 80% y 500 µL de etanol al 50%, respectivamente. La separación de fases se realizó por centrifugación (17,530 g, 4 °C, 5 min) y los sobrenadantes de las tres extracciones se juntaron para realizar los análisis. Posteriormente se preparó una solución de ninidrina al 0.35% en etanol, se añadió 1mL de la solución de ninidrina a 5 mL de muestra de las extracciones colocados en un tubo de ensayo que fueron colocados a baño María a 80°C durante 4 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente se registró la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm.

2.5. Determinación del contenido de proteínas solubles

Se pesaron 0.50 gr de material vegetal seco, se trituraron con mortero hasta obtener un polvo fino. Se resuspendio el polvo en ácido tricloroacetico al 10% en acetona y con 0.07% de -mercaptoetanol, se utilizaron 25 mL de la mezcla y se incubaron a -20 C durante 4 horas. Posteriormente se centrifugo a 12000 g x 20 min y se decantó el sobrenadante. Se Añadieron 25 ml de acetona al 80% con 0,07% -mercaptoetanol y 2 mM de EDTA. Seguido de una agitación vigorosa en el vortex para posteriormente volver a centrifugar a 12.000 g y 4 ° C durante 20 min.

Se lavó el precipitado con 100% de acetona junto con 0,07% -mercaptoetanol y 2 mM de EDTA. Se agito a 1200 g durante 20 min a 4 ° C y luego se decantó el sobrenadante. Se midió la concentración de proteína por el método de Bradford (1976) a 595 nm, y se utilizó albumina pura como standard a una concentración de 1mg/m.

3. RESULTADOS

Los tratamientos en los que se inoculó *M. extorquens* mostraron un mayor desarrollo vegetal y un mayor desarrollo de la raíz comparadas con el control y con aquellas en las cuales solamente se aplicó urea foliar (Fig. 1).



Fig. 1. Diferencia en el desarrollo vegetal y el desarrollo de la raíz entre los diferentes tratamientos.

La concentración de aminoácidos libres en las hojas se incrementaron por la fertilización foliar con urea en inoculación de *M. extorquens*, que corresponde a los tratamientos MU3 y MU (Fig. 2) en comparación con los tratamientos donde se fertilizo de manera foliar urea e inculo *M. extorquens* de manera individual U3, U4, M y con el testigo absoluto C . Las altas concentraciones de proteína en las hojas fertilizadas vía foliar e inoculadas con *M. extorquens* respecto a las fertilizadas de manera individual con urea representan una evidencia de un abasto suficiente de nitrógeno a la planta por parte de *M. extorquens*, el cual es logrado en este caso exclusivamente.

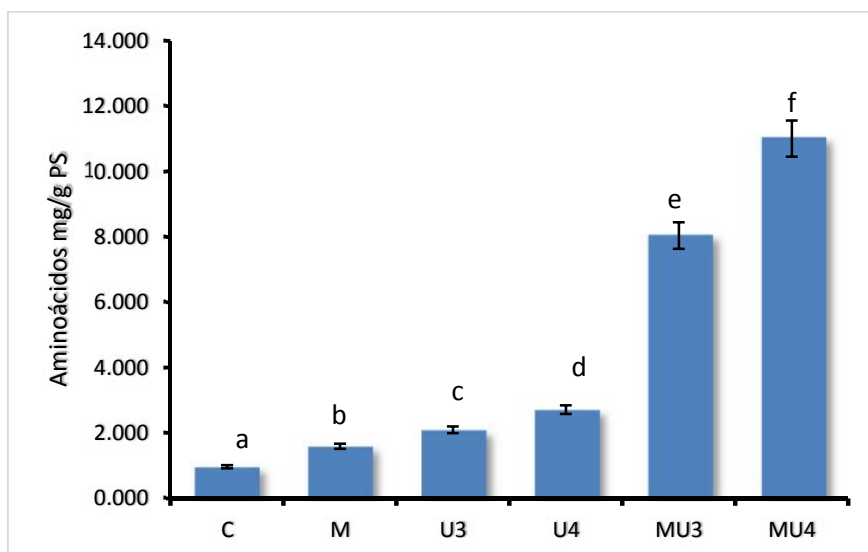


Fig. 2. Efecto de la fertilización foliar de urea de manera individual y en combinación con la inoculación de *M. extorquens* en la concentración de aminoácidos libres en hojas de frijol con una significancia de $P < 0.05$. Letras iguales no muestran diferencias estadísticamente significativas.

El contenido de proteínas solubles aumento en los tratamientos donde se asperjo urea con *M. extorquens* que corresponde a los tratamientos MU3 y MU4, respecto a los tratamientos U3, U4, M y el control C (Fig. 3).

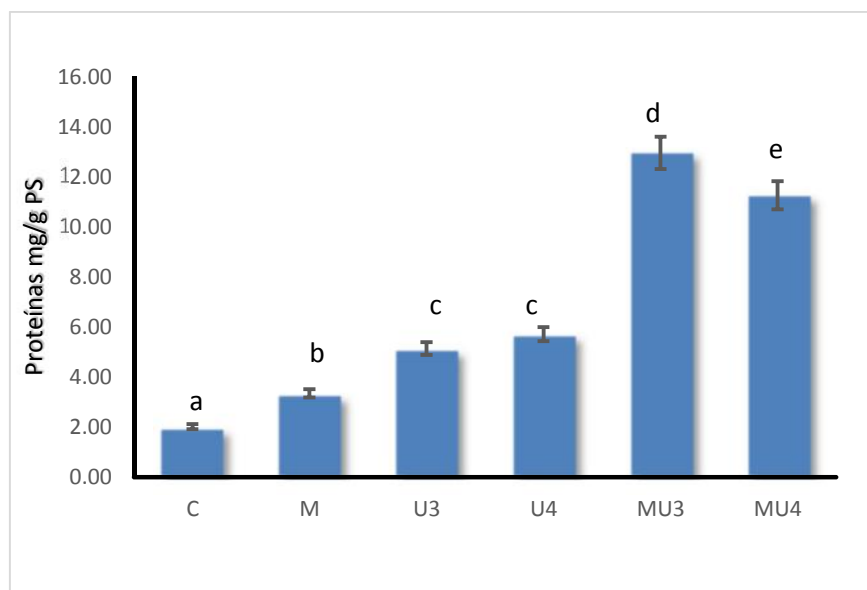


Fig. 3. Efecto de la fertilización foliar de urea de manera individual y en combinación con la inoculación de *M. extorquens* en la concentración de proteínas solubles en hojas de frijol con una significancia de $P < 0.05$. Letras iguales no muestran diferencias estadísticamente significativas

4. DISCUSIONES

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal juegan un papel importante en la asimilación de nutrientes y la relación entre *M. extorquens* y las plantas muestran perfectamente esta relación. Holland y Polacco (1992) asociaron a *Methylobacterium spp.* con el metabolismo del nitrógeno de las plantas a través de la enzima bacteriana ureasa. En el presente trabajo, se encontró que *M. extorquens* puede potencializar la fijación del nitrógeno uréico por la actividad de la enzima ureasa, cuando se aplica foliarmente una solución de urea. El abastecimiento de nitrógeno a las plantas a través del follaje facilita el óptimo manejo de éste y se minimiza las pérdidas del mismo en el ambiente, el nitrógeno de la urea es así asimilado para la elaboración de metabolitos primarios como aminoácidos y proteínas. (Trejo-Téllez *et al.*, 2005) reportaron que las concentraciones de proteína en las hojas de espinaca, se incrementaron en forma proporcional por la fertilización foliar con urea respecto a los tratamiento no fertilizados con urea, de igual manera estos autores reportaron que la concentración de aminoácidos se correlaciona de manera positiva con la fertilización proporcional foliar de urea. Los resultados obtenidos en esta investigación, tanto del contenido de aminoácidos como de proteínas, mostraron una diferencia estadísticamente significativa de los tratamientos donde se combinó la inoculación de la

bacteria y la fertilización foliar con urea con respecto a los tratamientos donde solamente se aplicó la fertilización con urea o la bacteria de manera individual y el control. En las plantas la ureasa es la única enzima capaz de capturar el nitrógeno de la urea, cualquier modificación que conduzca al aumento de la ureasa podría resultar una alternativa en la asimilación de este fertilizante.

El nitrógeno, es uno de los nutrientes más importantes en el desarrollo de la planta. Estudios muestran evidencias de que la fertilización con urea a través de las hojas es un método eficiente de abastecimiento de nitrógeno, sin embargo, este trabajo demuestra que *M. extorquens* puede ser inoculada en las hojas de las plantas y aumentar la actividad de la enzima ureasa, potencializando la absorción foliar de urea evitando aplicaciones excesivas que implican un mayor gasto económico y un riesgo al medio ambiente y salud humana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal del Laboratorio de Biología Molecular perteneciente a la División de Desarrollo Bio-Tecnológico del Centro Universitario de la Ciénega-Universidad de Guadalajara por las facilidades prestadas para la realización de los análisis necesarios del presente trabajo experimental.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Bashan Y., de-Bashan L.E. 2005. Bacteria/plant growth promotion. In: Hillel D (ed) Encyclopedia of soils in the environment, vol 1. Elsevier, Oxford, UK, pp 103-115.

Bashan Y. & Holguin G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology 43(2): 103-121.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry. 72(7): 248-254.

Cervantes-Martinez J., Lopez-Diaz S. & Rodriguez-Garay B. 2004. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser induced fluorescence. Plant Science 166(4): 889-892.

Freyermuth, S.; Long, R. & Mathur, S. 1996. Metabolic aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: Lidstrom ME, Tabita FR (eds) Microbial growth on C1 compounds. Kluwer, Dordrecht. pp 277-284.

Frink C., Waggoner P.E. & Ausubel J.H. 1999. Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. Proceedings of the National Academy of Science. 96(4):1175-1180.

Glick R. B., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J. & Mcconkey. 2007. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. *Critical Review in Plant Sciences* 26(5): 227-242.

Gyaneshwar P., Kumar G.N., Parekh L.J. & Poole P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245 (1): 83-93.

Holguin G., Bashan Y., Puente E., Carrillo A., Bethlenfalvay G., Rojas A., Vázquez P., Toledo G., Jiménez M., Glick B. R., de Bashan L. G., Lebsky V., Moreno M. & Hernandez J. P. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. *Agricultura Técnica en México* 29: 201-211.

Holland M.A., & Polacco J.C. 1992. Urease-null and hydrogenase null phenotypes of a phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in two soybean mutants. *Plant Physiology* 98(3): 942-948.

Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W.W. & Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goessingense*. *Applied Environmental Microbiology* 70(5):2667-2677.

Kang S., Hamayun M., Joo G., Khan A., Kim Y., Kim S., Joeng H. & Lee I. 2009. Effect of *Burkholderia* sp. KCTC11096BP Ponsomephysiochemical attributes of cucumber. *European Journal of Soil Biology*. 12(3): 264-268.

Kloepper J.W., Lifshitz R. & Zablutowicz R.M. 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology* 7(7): 39-44.

Lucy M., Reed E. & Glick B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86(1): 1-25.

Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Seshadri S., Chung H.Y., Yang J.C., Sundaram S.P. & Sa T.M. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Botanical Bulletin Academia Sinica*. 45(2): 315-324.

Mena-Violante H. G., & Olalde-Portugal V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* 113(2): 103-106.

Perrott K.W., Sarathchandra S.U. & Dow B.W. 1992. Seasonal and fertilizer effects on the organic cycle and microbial biomass in a hill country soil under pasture. *Australian Journal of Soil Research*. 30(3): 383-394.

Steinshamn H., Thuen E., Bleken M.A., Brenoe U.T., Ekerholt G. & Yri C. 2004. Utilization of nitrogen (N) and phosphorus (P) in an organic dairy farming system in Norway. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 104(3):509-522.

Suniaga J., Rodríguez A., Rázuri L., Romero E. & Montilla E. 2008. Fertilización, mediante fertirriego, durante diferentes etapas del ciclo de cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.) en condiciones de bosque seco premontano. *Agricultura Andina*. 8 (1):113-126.

Tilman, D. 1998. The greening of the green revolution. *Nature*, Engelstad, O.P. (ed.); third edition. *Soil*. 396:211-212.

Toyama H., Anthony C., & Lidstrom M. E. 1998. Construction of insertion and deletion mxa mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*.166(1): 1-7.

Trejo-Téllez L. I., Gómez-Merino F. C., Rodríguez-Mendoza M. N., & Alcántar-González, G. 2005. Fertilización foliar con urea en la partición de nitrógeno en espinaca. *Terra Latinoamericana*, 23(4): 495-503.

Van Dien S. J., Okubo Y., Hough M. T., Korotkova N., Taitano T., & Lidstrom M. E. 2003. Reconstruction of C3 and C4 metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. *Microbiology*.149(3): 601-609.

Vitousek P. M., Aber J. D., Howarth R. W., Likens G. E., Matson P.A., Schindler D. W., Schlesinger W. H. & Tilman D. G. 1997. Technical report: human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*. 7(3): 737-750.

Zarnowsk R., Felske A., Ellis R. J., Geuns J. M. & Pietr, S. J. 2002. A *Methylobacterium*-like organism from algal crusts covering silicone rubber electric insulators in Africa *Journal of Applied Microbiology* 93(6): 1012-1019