

Artículo original

Resistencia a níquel en bacterias endófitas aisladas a partir de *Oriza sativa* en Colombia

Alexander Pérez Cordero*, Edin Arroyo Canchila, Leonardo Chamorro Anaya

Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas, Grupo de Investigaciones en Bioprospección Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre, Colombia.

Recibido 18 de septiembre de 2014; aceptado 20 de febrero de 2015

Resumen: El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la resistencia de bacterias endófitas a diferentes concentraciones de níquel (Ni). Se recolectaron muestras de tejidos de plantas de arroz cultivadas en el municipio de Montelíbano, Córdoba, Colombia. Cada tejido fue sometido a un proceso de desinfección superficial para obtener el aislamiento de bacterias endófitas en el medio de cultivo agar R2A. Se aislaron 33 morfotipos de bacterias endófitas, obtenidos de raíz, macolla y hoja de diferentes variedades comerciales de arroz. Se determinó la densidad poblacional (UFC/g de tejido) por conteo en superficie y la separación de los morfotipos se realizó mediante la forma, color, tamaño y textura de las colonias bacterianas. La resistencia al Ni se evaluó *in vitro* con diferentes concentraciones de Ni en forma de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y las bacterias que mostraron resistencia fueron identificadas mediante secuenciación molecular. Los resultados de la prueba de resistencia a Ni mostraron capacidad de las bacterias endófitas de crecer a concentraciones de 0,1 hasta 0,3 mg/L de Ni. Los resultados de la identificación molecular confirmaron la presencia de *Aeromonas hydrophila* como bacteria endófitas aislada de la variedad comercial de arroz Fedearroz 2000, con la capacidad de resistir hasta 0,3 mg/L de Ni.

Palabras clave: arroz, metal pesado, resistencia a níquel, fitorremediación.

Nickel resistance of endophytic bacteria isolated from *Oriza sativa* in Colombia

Abstract: The aim of this work was to study the *in vitro* resistance of endophytic bacteria to different nickel (Ni) concentrations. Tissue samples from rice plants cultivated in the municipality of Montelíbano, Córdoba, Colombia were collected. Each specimen was submitted to surface disinfection process for the isolation of endophytic bacteria from culture in R2A agar medium. Thirty three (33) morphotypes of endophytic bacteria were obtained from root and leaf clump of different commercial varieties of rice plants. Tissue population density (CFU/g) was determined by surface counting and morphotypes separation was performed by shape, color, size and texture of the bacterial colonies. Nickel resistance *in vitro* was evaluated with different concentrations of Ni and $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and bacteria that showed resistance were identified by molecular sequencing. The test results showed resistance to Ni of the endophytic bacteria by their ability to grow at concentrations of 0.1 to 0.3 mg/L of Ni. The molecular identification results confirmed the presence of *Aeromonas hydrophila* as endophytic bacteria isolated from the commercial rice variety Fedearroz 2000, with the ability to grow in presence of concentrations of 0.3 mg/L of Ni.

Keywords: rice, heavy metal, nickel resistance, phytoremediation.

* Correspondencia:

E-mail: alexander.perez@unisucre.edu.co

Introducción

A los metales pesados se le atribuyen determinados efectos de contaminación ambiental y toxicidad, llegando a causar la muerte de personas o desarrollar enfermedades letales como el cáncer. Las altas concentraciones de metales pesados en el suelo pueden provocar cambios que, en el transcurso del tiempo, modifican la estructura del suelo, alterando así sus características fisicoquímicas. Son altamente tóxicos, ya que contaminan el aire, el agua y el suelo, y son asimilados por las plantas y demás eslabones

de la cadena trófica creando estrés oxidativo y competencia con elementos esenciales [1]. Uno de estos metales pesados es el níquel (Ni), que en cantidades pequeñas es un elemento necesario para el cuerpo humano; sin embargo, en cantidades excesivas, puede llegar a ser altamente tóxico. La sobreexposición a corto plazo al Ni no causa problemas en la salud, pero la exposición a largo plazo puede causar pérdida de peso corporal, anemia, daño en el corazón y el hígado e irritación de la piel [2].

En los horizontes superficiales del suelo (capa arable), el Ni aparece ligado a formas orgánicas, formando quelatos

fácilmente solubles [3]. En relación con lo anterior, la movilidad relativa de elementos traza en los suelos, es de suma importancia en cuanto a su disponibilidad y su potencial para lixiviarse de los perfiles del suelo hacia las aguas subterráneas, generando de esta forma un problema ambiental [4].

En Colombia existen seis yacimientos de Ni, tres de ellos están localizados en la región Caribe, en el departamento de Córdoba: Cerro Matoso, Planeta Rica y Uré; los tres restantes se encuentran en el departamento de Antioquia: Ituango, Morro Pelón y Medellín [5]. Desde hace tres décadas se explota masivamente Ni en Cerro Matoso, pequeña loma de 200 m de altura localizada en la cuenca del río San Jorge, en el municipio de Montelíbano, Córdoba.

La fitoextracción, es una técnica novedosa, de bajo costo, potencialmente efectiva para la remediación de suelos contaminados con metales pesados, al comparar con las tecnologías de remediación convencionales, químicas y físicas, que son demasiado costosas y a menudo perjudiciales para el suelo. Algunas especies de plantas (identificadas como hiperacumuladoras) que crecen en los sitios contaminados con metales pesados, tienen la capacidad de acumular altas concentraciones de estos metales [6]. Sin embargo, la mayoría de estas especies identificadas hasta ahora, no han sido utilizadas adecuadamente como fitorremediadoras, debido a su pequeña biomasa y lento crecimiento [6]. Además, concentraciones altas de metales pesados son generalmente tóxicas para la mayoría de las plantas, impidiendo su metabolismo y reduciendo su crecimiento. Por lo expresado anteriormente, es necesario desarrollar estrategias para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. En este sentido, las interacciones entre los metales, los microbios y plantas han llamado la atención por el potencial biotecnológico de microorganismos para la remoción de metales directamente en suelos contaminados, o la posible transferencia de metales acumulados a las plantas superiores [7].

Entre los microorganismos que intervienen en la fitorremediación de metales pesados, las bacterias de la rizósfera merecen especial atención, porque pueden facilitar el proceso de fitorremediación mediante el cambio de la biodisponibilidad de los metales a través de la alteración del pH del suelo, la liberación de agentes quelantes como por ejemplo ácidos orgánicos y sideróforos entre otros, y reacciones de oxidación/reducción [8].

La rizósfera proporciona un microambiente complejo y dinámico en el que microorganismos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que tienen un potencial considerable para la promoción del crecimiento de plantas y la detoxificación de compuestos de desechos peligrosos [9-11].

En los últimos años, el uso de bacterias endófitas resistentes, en la fitorremediación de metales pesados en suelos contaminados, ha adquirido mucha importancia, debido a que presentan la capacidad de tomar esos metales y utilizarlos como fuente de carbono [12-14]. Aunque se ha reportado que metales pesados tales como Ni y plomo

en altas concentraciones son tóxicos para las plantas y sus microorganismos asociados, se ha comprobado que las bacterias endófitas resistentes a metales promueven el crecimiento de las plantas [15-17]. Esto indica que las bacterias endófitas han adquirido la capacidad de ser resistentes a altas concentraciones de metales pesados y que pueden conferir a la planta mayor tolerancia al estrés ocasionado por estos contaminantes. Además, las bacterias endófitas son capaces de aumentar el crecimiento de las plantas por varios mecanismos dentro los que se incluyen: producción de sideróforos, desaminasa 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ácido indol-3-acético (AIA) y solubilización de fosfato (P) [18]. Se ha reportado que ciertas bacterias endófitas, pueden alterar la toxicidad y disponibilidad de los metales pesados en las plantas mediante la producción de sideróforos, biosurfactantes y ácidos orgánicos [13,19].

Hasta la fecha no existe información en bibliografía especializada sobre la resistencia a Ni de bacterias endófitas asociadas a variedades comerciales de arroz. En este trabajo se plantea la evaluación *in vitro* de la capacidad de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de variedades comerciales de arroz de resistir a diferentes concentraciones de Ni.

Materiales y métodos

Área de muestreo: El muestreo se realizó en el primer semestre del 2013, en lotes cultivados con variedades comerciales de arroz sembradas en el municipio de Montelíbano-Córdoba, localizado en el extremo suroriental del departamento de Córdoba, sobre la margen derecha del río San Jorge, con una superficie de 1.897 km. La cabecera municipal está a una altura de 55 msnm, 75°59'53" de latitud norte y 75°26'25" de longitud oeste y temperatura promedio de 32 °C; La humedad relativa es del 78% en tiempo de sequía y de 81% en periodos de lluvia.

Muestreo: El muestreo se realizó de forma aleatoria en zig-zag, colectando en cada sitio 10 plantas completas (incluyendo raíces, macollas y hojas) de arroz de cada variedad establecida en la granja experimental en el momento del muestreo. Las muestras fueron identificadas con la variedad respectiva y fecha de colecta. Estas fueron almacenadas y conservadas para su transporte al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre y procesadas dentro de las siguientes 24 horas después de colectadas.

Aislamiento de bacterias endófitas resistentes a Ni desde cultivos de arroz: Las plantas colectadas de cada variedad de arroz fueron sometidas a un proceso de desinfección superficial. Raíces, macollas y hojas de cada planta fueron lavadas con agua estéril y cortadas en segmentos de un 1 cm aproximadamente. El proceso de desinfección superficial para cada tejido fue realizado de acuerdo con la metodología recomendada por Pérez y col [20]. Después

del proceso de desinfección, cada tejido se depositó en un plato de porcelana y se maceró con nitrógeno líquido hasta formar una muestra homogénea. De cada homogenizado se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-8} , de las cuales se tomaron alícuotas de 0,1 mL que fueron depositadas sobre la superficie del medio de cultivo agar R2A e incubadas a 32 °C por 72 horas. La densidad poblacional de bacterias por tejido (UFC/g de tejido) fue determinada mediante el conteo directo de colonias sobre la superficie de las placas con agar. Durante el conteo se observaron y seleccionaron aquellas colonias que se diferenciaban en cuanto a forma, textura, color y tamaño [21,22].

Evaluación in vitro de resistencia a Ni: Los aislamientos purificados de bacterias endófitas obtenidos de diferentes tejidos de plantas de arroz fueron inoculados sobre la superficie del agar R2A suplementado con 50 mg/L de Ni en la forma de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [23]. Las placas fueron incubadas a 32 °C por 72 h. Las colonias resistentes a Ni, fueron colectadas y purificadas en agar R2A conteniendo 50 mg/L de Ni e incubadas en la misma condición anterior; después de este tiempo se seleccionaron las colonias, se inocularon en caldo de R2A en agitación de 150 rpm a 32 °C por 24 h. Se tomaron 10 mL de cada muestra y se inocularon en frascos con 100 mL de caldo de R2A suplementado con diferentes concentraciones de Ni (de 50 a 500 mg/L) [23]. Las muestras se incubaron en agitación a 150 rpm y 32 °C por 8 días. Se utilizaron dos controles: uno de caldo R2A inoculado con suspensión bacteriana sin Ni y el otro caldo nutritivo con diferentes concentraciones de Ni sin inóculo bacteriano. El crecimiento de las bacterias endófitas en el experimento fue determinado mediante turbidimetría, cuantificándolo a 600 nm, cada 60 minutos durante 72 horas y se tomaron las medidas con un espectrofotómetro Spectroquant® Pharo 300 [8].

Identificación de las bacterias Ni-resistentes: Los aislados bacterianos con resistencia a Ni fueron seleccionados y caracterizados morfológicamente y por tinción de Gram. Para la identificación, el ADN genómico fue extraído mediante el protocolo propuesto por Oliveira *et al* [21]. Regiones internas de los genes que codifican para el ARN ribosomal (RNAr 16S) fueron amplificadas mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) usando oligonucleótidos específicos de la región conservada de Eubacterias FD2 (5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3', bases de *Escherichia coli* 8-27) y RP1 (5' ACGGTTACCTTGTTACGCTT 3' bases de *Escherichia coli* 1492-1512) del grupo gamma-proteobacteria [24]. La reacción de amplificación fue realizada en un termociclador Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf), programado para realizar una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 15 s, alineamiento a 52 °C y extensión a 72 °C por 1 min. Las últimas 20 etapas de extensión fueron realizadas usando un incremento de 20 s por ciclo [25]. En todas las condiciones fue utilizado un control negativo que contenía solo agua ultrapura. Los

productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar, en ambos sentidos de la cadena del ácido nucleico, con un equipo de electroforesis capilar 3730XL, servicio prestado por la empresa Macrogen (Seoul, South Korea). Las secuencias se editaron y alinearon con el programa MEGA 6 para obtener así una secuencia consenso por cada aislado.

Las secuencias consenso obtenidas fueron alineadas con secuencias de la base de datos genética GenBank usando la herramienta BlastN, para determinar, mediante los criterios de máxima identidad, cobertura y puntuación total en el alineamiento múltiple, con qué tipo de grupo bacteriano estaba filogenéticamente relacionado el ADN amplificado. Se consideró que una muestra fue apropiada para el análisis genético cuando presentó una cobertura (Query Cover) superior al 90% y de identidad superior al 94% con secuencias de las bases de datos NCBI, EMBL y DDBJ. Las secuencias depositadas en las bases de datos que presentaron homología con las muestras fueron alineadas mediante el programa MEGA 6.

Análisis estadísticos: Diferencias entre la densidad poblacional (UFC/g de tejido) de bacterias endófitas en función a variedades y tipo de tejido fueron analizadas por ANOVA multifactorial. Asimismo se utilizó la prueba múltiple de rango (Tukey) para establecer diferencias por separado entre comunidades de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) con relación a variedad y tipo de tejido colonizado.

Resultados y discusión.

Aislamiento de bacterias endófitas de variedades de arroz: Un total de 33 aislados de bacterias endófitas fueron obtenidos de las variedades comercial de arroz Fedearroz 473 y Fedearroz 2000. La densidad de bacterias endófitas aisladas de los diferentes tejidos de estas dos variedades de arroz osciló entre $8,62 \times 10^8$ en hoja $\pm 3,2 \times 10^{10}$ para raíz. La prueba múltiple de rango para densidad de bacterias endófitas (UFC/g de tejido) en función a tipo de tejido y variedad, mostró mayor presencia de bacterias endófitas asociadas a raíces con respecto a macolla y hojas. La variedad Fedearroz 473 presentó mayor densidad de bacterias endófitas ($2,07 \times 10^{10}$ UFC/g de raíz), con relación a la variedad Fedearroz 2000 ($1,56 \times 10^{10}$ UFC/g de raíz). A la fecha no existen reportes en la bibliografía especializada sobre la densidad poblacional de bacterias endófitas asociadas a estas dos variedades comerciales de arroz, razón por la cual nuestros resultados son inéditos. Por lo tanto, se realizarán estudios posteriores sobre la densidad poblacional de estas bacterias en estos cultivos en diferentes condiciones edafoclimáticas.

Trabajos realizados por Mano *et al.* sobre densidad poblacional de bacterias endófitas cultivables en semillas de arroz, encontraron poblaciones de 10^2 a 10^6 UFC/g de peso fresco; además, estos autores reportaron variación en la cantidad de estas bacterias con respecto al tipo de tejido analizado [26]. Se ha reportado presencia de bacterias endófitas en semilla, raíz, macollas, hoja y hoja bandera

de diferentes variedades de arroz [27]. Estudios acerca de poblaciones de bacterias endófitas sobre 2.400 segmentos de plantas de arroz cultivadas en el sureste de la India, demostraron que la tasa de colonización de tejidos por bacterias endófitas varió según la época del año [28].

Trabajos realizados por Pillay y Norwark sobre la densidad poblacional de bacterias endófitas, asociadas a diferentes especies vegetales, concluyeron que la presencia de estas bacterias es altamente variable; esta variación dependió de la especie de bacteria y el genotipo de la planta hospedera, además del estado de desarrollo de la planta, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales [29].

Prueba *in vitro* de resistencia a Ni por bacterias endófitas:

De los 33 aislados obtenidos de diferentes tejidos de las variedades comerciales de arroz, solo el aislado identificado como T3F2000 creció en diferentes concentraciones de Ni. Los resultados de la prueba *in vitro* de resistencia mostraron que el aislado T3F2000 tuvo diferentes patrones de crecimiento en concentraciones de 0,1 a 0,3 g/L de Ni con respecto al crecimiento normal del testigo; el mayor crecimiento observado a 600 nm fue para la concentración de 0,1 g/L, el cual se mantuvo hasta las 45 horas de haber iniciado el experimento. En la figura 1 se observa que, a la concentración de 0,2 g/L de Ni, este aislado mostró una etapa de adaptación o fase Lag de 20 h y después de este tiempo entró en fase exponencial, la cual se mantuvo hasta las 56 h, y el crecimiento de este aislado fue menor comparado con la concentración de 0,1 g/L.

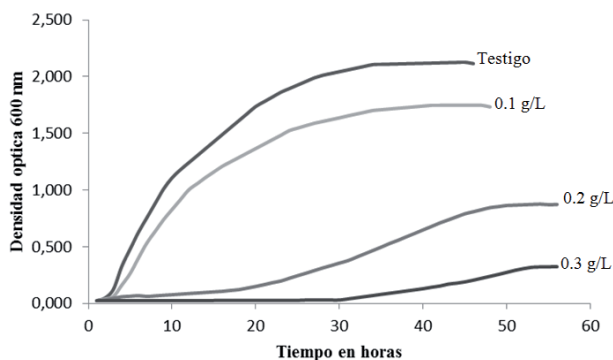


Figura 1. Prueba *in vitro* de resistencia a diferentes concentraciones de Ni en forma de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ del aislado T3F2000 proveniente de variedades comerciales de arroz en el municipio de Montelíbano-Córdoba, Colombia, 2014.

Con respecto al crecimiento del aislado en la concentración 0,3 g/L, se observó una fase de adaptación mayor de 35 h con respecto al testigo y al crecimiento del aislado en las otras dos concentraciones de Ni utilizadas. A concentraciones de 0,3 g/L el aislado mostró un leve crecimiento a partir de las 36 h y se mantuvo hasta las 55 h del experimento (Figura 1). El bajo crecimiento de este aislado, a concentración de 0,3 g/L, puede explicarse por los efectos de toxicidad del metal, que provocaron alteraciones en las características metabólicas y fisiológicas de las bacterias [30]. Estos

resultados demuestran que a medida que se aumentó la concentración del metal no solo disminuyó la cantidad de células bacterianas, sino que también se retardó el crecimiento, necesitando más tiempo para que la bacteria se adaptara y recuperara su capacidad para crecer en un medio contaminado con Ni, como lo demostraron trabajos similares realizados por Kamika y Momba [30].

Identificación de bacterias endófitas resistentes a Ni: Los resultados obtenidos por secuenciamiento mostraron un porcentaje de similitud del 98% con *Aeromonas hydrophila*. Hardoim y col., reportaron *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* como una bacteria endófitas con actividad promotora de crecimiento asociada a raíces de plantas de arroz cultivadas en Filipinas [31]. En este trabajo se informó por primera vez esta bacteria endófitas aislada de macollas de la variedad comercial de arroz Fedearroz 2000, cultivada en fincas arroceras del municipio de Montelíbano, Córdoba, Colombia, con capacidad de resistir concentraciones de Ni de 0,3 g/L.

Estudios realizados de la especie vegetal *Thlaspi goesingense*, revelaron que las bacterias endófitas pueden tolerar altos niveles de Ni. De 25 cepas aisladas, 16 mostraron capacidad de tolerar concentraciones de Ni de 0,587 a 0,70 g/L en comparación a las bacterias rizosféricas, las cuales toleraron 0,29 g/L de este metal cuando fueron evaluadas *in vitro* [16].

Otro estudio llevado a cabo sobre el efecto de la inoculación de cepas de bacterias endófitas resistentes a Ni, como potencial de fitoestabilización en varias especies de plantas, incluyendo *Brassica juncea*, *Luffa cylindrica* y *Sorghum halepense*, mostró que la bacteria endófitas *Bacillus megaterium* toleró concentraciones de Ni de 1.200 g/L *in vitro* y también presentó resistencia a otros metales como cobre, zinc, cadmio, plomo y cromo [32].

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron la capacidad de *Aeromonas hydrophila*, aislada de macollas de la variedad comercial de arroz Fedearroz 2000 cultivado en el municipio de Montelíbano-Córdoba, Colombia, de resistir *in vitro* hasta 0,3 g/L de Ni en la forma de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. En estudios posteriores se evaluará la capacidad de *Aeromonas hydrophila* en la promoción de crecimiento en plantas de arroz y su posible uso como insumo biotecnológico, para asistir a los procesos de fitorremediación de los suelos en ambientes contaminados con Ni, a los efectos de reducir el efecto tóxico de este metal en plantas de arroz.

Referencias

1. Sinhal VK, Srivastava A, Singh VP. EDTA and citric acid mediated phytoextraction of Zn, Cu, Pb and Cd through marigold (*Tagetes erecta*). J Environ Biol. 2010; 31:255-9.
2. Pérez RG. Efecto de los metales pesados en el medio ambiente y la salud humana. Pinar del Río. Cuba: Departamento de Geología, Universidad de Pinar del

- Río “Hermanos Saíz Montes de Oca”; 2011.
3. Corinne PR, Fang JZ, Steve PM. Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence of soil properties, Ni solubility and speciation. *Environ Pollut*. 2006; 145:596-605.
 4. Burt R, Wilson MA, Keck TJ, Dougherty BD, Strom DE, Lindahl J.A. Trace element speciation in selected smelter-contaminated soils in Anaconda and Deer Lodge Valley, Montana, USA. *Advances Environ Res*. 2003; 8:51-67.
 5. Unidad de Planeación Minero Energética, UPME, 2009. “El níquel en Colombia”. Disponible en: http://www.upme.gov.co/Docs/Niquel_Colombia.pdf. Acceso 23 de julio 2014.
 6. Baker A, Brooks R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1989; 1:81-126.
 7. Guo L, Andrews J, Riding R, Dennis P, Dresser Q. Possible microbial effects on stable carbon isotopes in hot-spring travertines. *J Sediment Res*. 1996; 66:468-73.
 8. Ma Y, Rajkumar M, Luo Y, Freitas H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants – effects on plant growth and Ni uptake. *J Hazard Mater*. 2011; 196:230-7.
 9. Belimov A, Hontzeas N, Safronova V, Demchinskaya S, Piluzza G, Bullitta S, Glick B. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* LCzern.). *Soil Biol Biochem*. 2005; 37:241-50.
 10. Black R, Choate D, Bardhan S, Revis N, Barton L, Zocco T. Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environ Toxicol Chem*. 1993; 12:1365-76.
 11. De-Souza M, Huang C, Chee, N, Terry N. Rhizosphere bacteria enhance that accumulation of selenium and mercury in wetland plants. *Plants*. 1999; 209:259-63.
 12. Mastretta C, Taghavi S, Van D, Mengoni A, Galardi F, Gonnelli C, *et al*. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int J Phytoremed*. 2009; 11:251-67.
 13. Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, He LY, Qian M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ Pollut*. 2008; 156:1164-70.
 14. Sun LN, Zhang YF, He LY, Chen ZJ, Wang QY, Qian M, *et al*. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresour Technol*. 2010; 101:501-9.
 15. Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbrielli R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb Ecol*. 2007; 53:306-16.
 16. Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70:2667-77.
 17. Lodewyckx C, Taghavi S, Mergeay M, Vangronsveld J, Clijsters H, Van D. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *Int J Phytoremediation*. 2001; 3:173-87.
 18. Rajkumar M, Freitas H. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. 2009; 77:153-60.
 19. Saravanan VS, Madhaiyan M, Thangaraju M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*. 2007; 66:1794-8.
 20. Pérez CA, Rojas SJ, Fuente CJ. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biol Colomb*. 2010; 15:1-18.
 21. Oliveira MV, Santos TMA, Vale HM, Delvaux JC, Cordero PA, Ferreira AB, Miguel PB, Totola MR, D. Costa M, Moraes CA, Borges AC. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can J Microbiol*. 2013; 59:221-30.
 22. Pérez AF, Tuberquia A, Amell D. Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agron Mesoam*. 2014; 25:213-23.
 23. Rajkumar M, Ying MA, Freitas H. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *J Environ Manage*. 2013; 128:973-80.
 24. Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991; 1:697-703.
 25. Bunge M, Lechner U. Anaerobic transformation of dioxins by bacteria from river sediments: diversity of the dehalogenating community. *Anaerobic Dehalogenation*. 2001; 4:69-81.
 26. Mano H, Tanaka F, Watanabe A, Kaga H, Okunishi S, Morisaki H. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes Environ*. 2006; 21:86-100.
 27. Hironobu M, Hisau M. Endophytic bacteria in the plant rice. *Microbes Environ*. 2008; 23:19-117.
 28. Shankar B, Shashikala J, Krishnamurthy YL. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. *Microbiol Res*. 2009; 164:290-6.
 29. Pillay VK, Norwark J. Inoculum, density, temperature, and genotype effect on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato

- (*Lycopersicon esculentum L.*), seeding inoculated with a pseudomonal bacterium. Can J Microbiol. 1997; 43:354-61.
30. Kamika I, Momba, MN. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. BMC Microbiol. 2013; 10:13-28.
 31. Hardoim PR, Andreote FD, Reinhold HB, Sessitsch A, Van OL, Van EJ. Rice root associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. FEMS Microbiol Ecol. 2009; 77:154-64.
 32. Rajkumar M, Ying MA, Freitas H. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. J Environ Manage. 2013; 128:973-80.