





Estimulación del crecimiento de *Typha dominguensis* con bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Growth stimulation of *Typha dominguensis* with plant growth-promoting bacteria (PGPB)

Juliana Moura Mendes*¹, Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga¹, Antonio Samudio Oggero¹, Cinthia Carolina Casal Martínez¹, Lourdes Martínez¹, Pablo Arrúa¹, ¹Universidad Nacional de Asunción. Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas. San Lorenzo, Paraguay. *Autor de correspondencia: jmendes@rec.una.py.

Recibido: julio 2019

Aceptado: diciembre 2019

Recibido en versión modificada: junio 2020

Moura Mendes, J., Arrúa Alvarenga, A. A., Samudio Oggero, A., Casal Martínez, C. C., Martínez, L. & Arrúa, P. (2020). Estimulación del crecimiento de *Typha dominguensis* con bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Investigaciones y Estudios-UNA*, 11(1), 10-17. <https://doi.org/10.47133/IEUNA2>

Resumen. Las especies de *Typha* sp son utilizadas en tratamientos de fitorremediación de manera exitosa. CEMIT - DGICT - UNA ha propuesto como alternativa a problemática del lago Ypacaraí, el uso de esta planta para su recuperación. El objetivo de este trabajo fue utilizar especies de *Bacillus* sp para estimular la germinación de las semillas y aumentar el vigor y crecimiento de las plántulas de *Typha dominguensis*. Para ello, se aislaron *Bacillus* sp de semillas de *Typha dominguensis* y se seleccionaron dos aislados que fueron utilizados para el tratamiento de las mismas mediante la inoculación con suspensiones bacterianas; las semillas fueron sembradas y acondicionadas en casa de vegetación por 30 días, al cabo de los cuales se procedió con las evaluaciones y se observó que las plantas tratadas con las bacterias presentaron mejor porcentual de germinación, mayor longitud y biomasa con relación al testigo, demostrando que el tratamiento fue eficiente en la estimulación del crecimiento y aumento de la biomasa.

Palabras clave: *Bacillus* sp, Biocontrol, Fitorremediación, Semillas, Totorá.

Abstract. *Typha* sp are used in phytoremediation treatments successfully. CEMIT – DGICT - UNA has proposed the use of this plant as an alternative to the solution of the contamination of lake Ypacaraí. The objective of this work was use *Bacillus* sp to stimulate the germination of the seeds, increase the vigor and growth of the seedlings of *Typha dominguensis*. Therefore, *Bacillus* sp was isolated from seeds of *Typha dominguensis* and two isolates were selected and used for the treatment of the same by inoculation with bacterial suspensions; the seeds were sown and conditioned in the vegetation house for 30 days, after which the evaluations were carried out and it was observed that the plants treated with the bacteria presented better germination percentage, greater length and biomass in relation to the control, demonstrating that the treatment was efficient in stimulating growth and increasing biomass.

Keywords: *Bacillus* sp, Biocontrol, Phytoremediation, Seeds, Totorá.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es uno de los grandes problemas de nuestra época; atmósfera, suelos, aguas, se ven alterados por la presencia de sustancias contaminantes, siendo la recuperación de estos, sobre todo del agua, fundamental para el desarrollo de la vida humana. Se han propuesto diferentes alternativas para la recuperación de las aguas, entre ellas el uso de plantas. Diversas especies vegetales acuáticas han sido utilizadas, entre ellas, *Typha angustifolia* L. y *Thypha dominguensis* (Araújo Almeida, Coutinho de Oliveira e Kliemann, 2007; Samudio, Nakayama, Peralta & Cardozo, 2014). Araújo Almeida et al. (2007), reportaron el uso de tres especies para el tratamiento de cloacas, observando que *T. angustifolia* y *H. coronarium* fueron las más eficientes en la reducción de DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno), oxigenación del sustrato, remoción de nitrógeno y coliformes.

Las plantas de *Typha* se han comportado de manera eficaz en el mejoramiento la calidad de los efluentes y actuando en la remoción nitrógeno total, amonio, fósforo y coliformes fecales (Hidalgo, Montano & Estrada, 2010; Jerry Coleman et al., 2001; Pott & Pott, 2002; Romero-Aguilar, Colín-Cruz, Sánchez-Salinas y Ortiz-Hernández, 2009). Según Vera et al. (2010), la *Typha dominguensis* fue efectiva en la remoción de nutrientes y materia orgánica en humedal construido, en una fosa alimentada con agua residual doméstica.

Considerando estos antecedentes, el uso de *Thypha dominguensis* se torna una alternativa económica y viable para la fitorremediación de efluentes, en especial del lago de Ypacaraí, el cual se encuentra en proceso de eutrofización, debido a la constante contaminación y por tanto el suministro constante de plantas de *Typha* para este fin es fundamental.

Para el uso de estas plantas, un aspecto fundamental es el proceso de germinación de semillas, que es dependiente de varios factores externos que incluyen valores promedios y

gases (O₂, CO₂, etileno), presentes en el suelo, entre otros. Cuando uno o más de estos factores ecológicos se altera, a pesar de ser las semillas perfectamente viables, las mismas no germinan y se considera que se encuentran en estado de quiescencia (Doria, 2010; Varela & Arana, 2011).

La especie vegetal *Typha dominguensis* necesita de condiciones de temperatura, luz y oxígeno ideales para la germinación de sus semillas (Lorenzen, Brix, McKee, Mendelssohn & Miao, 2000; Samudio et al., 2014), y una alternativa para optimización de dichos procesos es el uso organismos benéficos promotores de crecimiento que incrementan la disponibilidad de elementos minerales como fósforo, potasio y calcio, entre otros, fijan nitrógeno atmosférico, rompen el período de latencia, reducen patógenos de las raíces y producen sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas (auxinas, citoquininas y giberelinas) que incrementan el crecimiento de la raíz (Glick, 1995; González & Fuentes, 2017).

Es importante además destacar que el tratamiento de semillas con organismos promotores de crecimiento y biocontroladores ha sido utilizado para promover la germinación de semillas que se encuentra en latencia o infectadas, controlar patógenos y proteger las semillas de los hongos del suelo (González y Fuentes, 2017; Mertz, Henning & Zimmer, 2009; Ramírez, Lozano, Méndez, Rojas y Torres, 2017).

Typha dominguensis es una macrófita de tipo fija al sustrato, del grupo emergente. El crecimiento de raíces es primordialmente superficial, señalando que la mayor biomasa de sus raíces se concentra en los primeros 30 cm. del sustrato, siendo así muy interesante la asociación con microorganismos promotores de crecimiento, que potencializarían la formación de biomasa y por subsiguiente la biorremediación (Jerry Coleman et al., 2001; Vera, Núñez & Morales, 2007). Por otro lado, el género *Bacillus* sp agrupa bacterias que se destaca por formar endoesporas que permiten su

supervivencia en diferentes condiciones medioambientales adversas; poseen además la ventaja de presentar múltiples mecanismos antagónicos frente a otros organismos especialmente hongos patógenos de plantas (Ongena, Henry & Thonart, 2009; Ramírez, Lozano, Méndez, Rojas & Torres, 2017; Tejera-Hernández, Rojas-Badía & Heydrich-Pérez, 2011).

Varios reportes anteriores han mencionado que especies de *Bacillus*, incluidos *B. subtilis* y *B. pumilus*, reducen la incidencia y severidad de patógenos en plantas, y actúan como inductores de resistencia (Araújo Almeida et al., 2007; Mertz, Henning and Zimmer, et al., 2009; Ongena et al., 2009; Pérez-García, Romero & Vicente, 2011; Xu, Jeffries, Pautasso & Jeger, 2011); además, promueven el crecimiento en consecuencia del aumento de la fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, síntesis de fitohormonas y también de forma indirecta por inhibición del crecimiento de fitopatógenos, por eso son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Manjula & Podile, 2005; Pérez-García et al., 2011; Souza, Ambrosini & Passaglia, 2015; Xu et al., 2011).

Según Tejera-Hernández et al., (2011), cepas de *Bacillus* sp asociadas al cultivo de arroz estimularon la producción de auxinas, metabolito involucrado en la estimulación del crecimiento de plantas de arroz. Otra característica positiva de la asociación de *Bacillus* sp con las plantas es el estímulo de la sensibilidad del sistema radicular en condiciones externas, facilitando la percepción y absorción de nutrientes (Manjula & Podile, 2005; Pérez-García et al., 2011; Souza et al., 2015).

Un aspecto fundamental para la producción de humedales artificiales con especies de *Typha*, es el establecimiento adecuado del sustrato, considerando que los mismos poseen bajos niveles de materia orgánica y nutrientes, tienen pH propensos a la acidez y, generalmente, no ofrecen el soporte físico y químico requerido por las plantas, siendo así

necesario el enriquecimiento de los sustratos con detritos y microorganismos (Gopal, 1999; V. Pott & A. Pott, 2002).

Considerando todos los aspectos anteriormente mencionados se estudiaron cepas de *Bacillus* sp para la promoción de la estimulación de la germinación de semillas de *Typha dominguensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Typha dominguensis* fueron proveídas por CEMIT-DGICT-UNA, las mismas fueron almacenadas en condiciones de temperatura y humedad óptimas. Los experimentos fueron desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología y casa de vegetación del CEMIT-DGICT-UNA.

Selección de Organismos Benéficos. Para la selección e identificación de los microorganismos benéficos, se desinfectaron las semillas de *Typha dominguensis* con hipoclorito a 3%, a continuación, se sembraron en Agar Papa Dextrosa (PDA) y posteriormente, las placas fueron incubadas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3 días. Se aislaron las bacterias presentes en las semillas y fueron utilizadas para el resto del experimento aquellos organismos que presentaron características de *Bacillus* sp según la clave taxonómica del Manual de Bergey: Tinción de Gram, requerimiento de oxígeno, prueba de la catalasa, morfología y motilidad.

Pruebas de promoción de crecimiento de la planta. Promoción de germinación. Se distribuyeron uniformemente las semillas por tratamiento en bandejas conteniendo arena previamente esterilizada. Posteriormente las mismas fueron colocadas en la casa de vegetación bajo condiciones controladas: 20° a 30°C .

Las semillas de *Typha dominguensis* fueron tratadas con suspensiones de 1×10^9 UFC de *Bacillus* sp, denominadas T3 y T5 (Figura 1).

Los tratamientos control carecían de la suspensión bacteriana. A los 7 días se midió

el porcentaje de germinación y a los 30 días se observó la uniformidad de crecimiento (Lorenzen et al., 2000).

Promoción de crecimiento. Para determinar la promoción de crecimiento se estableció un experimento en condiciones de casa de vegetación y esterilidad durante 30 días. Fueron realizados 3 tratamientos: control e inoculadas (T3 y T5), cada uno con 5 repeticiones. Cumplido el tiempo se midió la longitud total y de las raíces, la biomasa del vástago y el peso fresco y seco total (60°C durante 24 h) (Mora & Toro, 2007).

Análisis estadísticos. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencia entre tratamientos y

para la comparación múltiple entre medias se utilizó la prueba de Tukey, fue considerado significativo cuando el $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism®5.0.

RESULTADOS

Fueron purificadas las colonias que presentaron características de *Bacillus* sp en medio Agar Nutritivo e identificadas según la clave de Bergey cocos-bacillus Gram positivos; formadoras de endoesporas, requerimiento de oxígeno, motilidad y catalasa positiva (Figura 2).

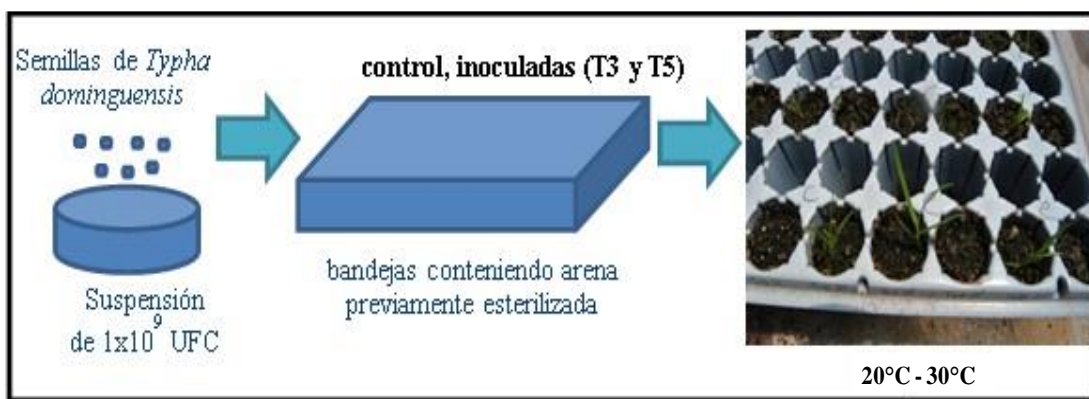


Figura 1. Esquema representativo del ensayo en invernadero con las semillas tratadas con las cepas T3 y T5.

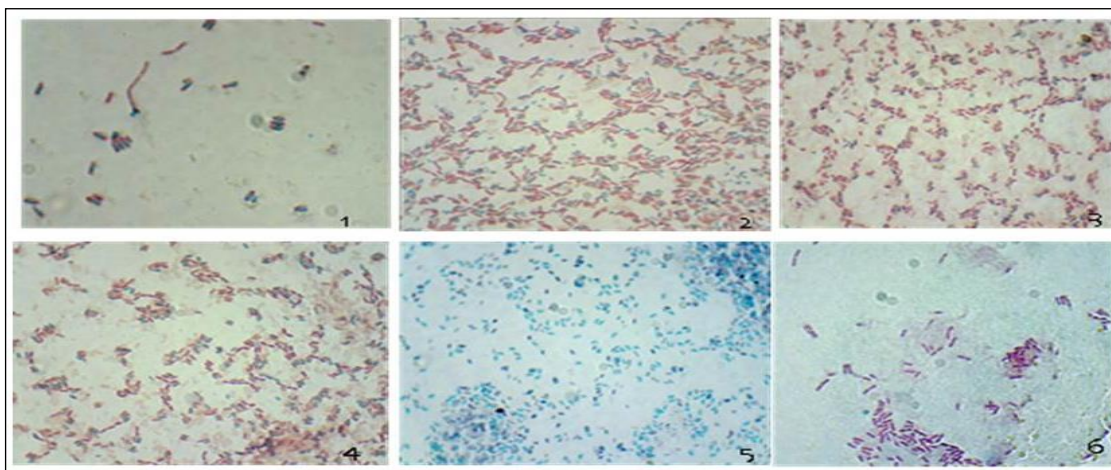


Figura 2. Diferentes aislados de *Bacillus* sp provenientes de las semillas de *Typha dominguensis*. Observación microscópica en 40x con tinción de endoesporas.

De forma aleatoria fueron seleccionadas dos cepas de *Bacillus* sp, nominadas T3 y T5 (Fig. 3) y entonces se procedió al tratamiento de las semillas con las respectivas suspensiones. Con relación a la germinación de las semillas, el tratamiento control presentó 28,1% mientras los tratamientos T3 y T5 presentaron, respectivamente, 50%; 93,7% de germinación.

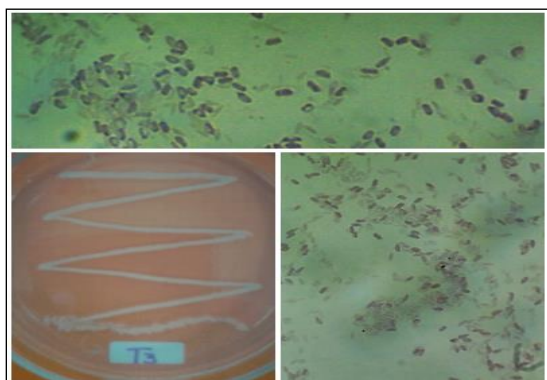


Figura 3. Características Morfológicas de la Cepa de *Bacillus* sp. T3 - Visualización microscópica y crecimiento en Agar nutritivo. Las flechas indican la formación de endoesporas. a: Observación microscópica en 100x con tinción de endoesporas; b: Macromorfología de la cepa en agar nutritivo; c: Observación microscópica en 40x con tinción de endoesporas.

En la figura 4 se observan las imágenes de los diferentes tratamientos, es posible visualizar el crecimiento irregular presentado por el testigo mientras que las plantas tratadas con las suspensiones bacterianas presentaron crecimiento uniforme y mayor vigorosidad; además las raíces presentaron mayor grosor y robustez.

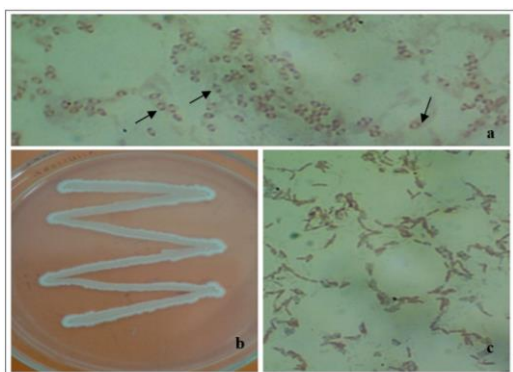


Figura 4. Características Morfológicas de la Cepa de *Bacillus* sp. T5 - Visualización microscópica y crecimiento en Agar nutritivo. Las flechas indican la formación de endoesporas. a: Observación microscópica en 100x con tinción de endoesporas; b: Macromorfología de la cepa en agar nutritivo; c: Observación microscópica en 40x con tinción de endoesporas

Al evaluar la longitud de las raíces y longitud total de las plantas, se observaron diferencias significativas entre las plantas tratadas con las suspensiones de *Bacillus* sp y el testigo tratado con agua, claramente visualizado en las figuras 5 y 6.



Figura 5. Comparación del crecimiento de *T. domingensis* en los diferentes tratamientos: control, T5 y T3, respectivamente.

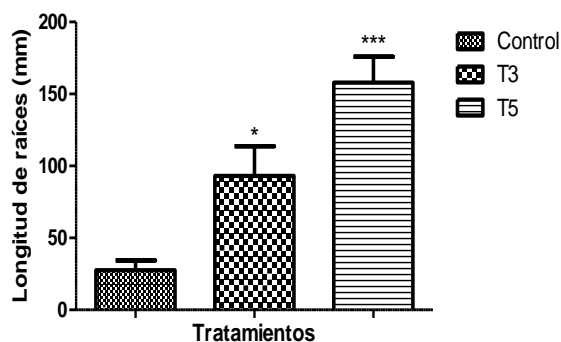


Figura 6. Análisis de longitud de las raíces de las plantas, después de 30 días del tratamiento de las semillas. ANOVA, seguido del test de Tukey ($p < 0,05$). * Indica diferencia significativa en relación al testigo.

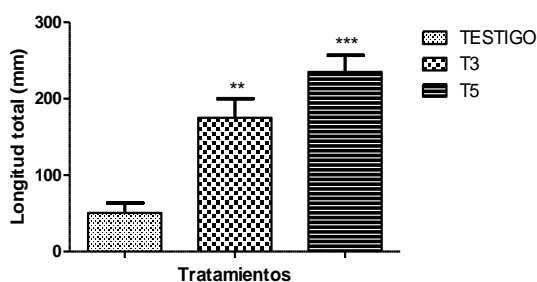


Figura 7. Evaluación de longitud total de las plantas, después de 30 días del tratamiento de las semillas. ANOVA, seguido de la prueba de Tukey ($p < 0,05$). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ cuando comparado al testigo.

En la figura 7 se observa la biomasa del vástago, donde al igual que en el caso de la

longitud total, se presentaron diferencias significativas la diferencia entre las plantas tratadas y el control.

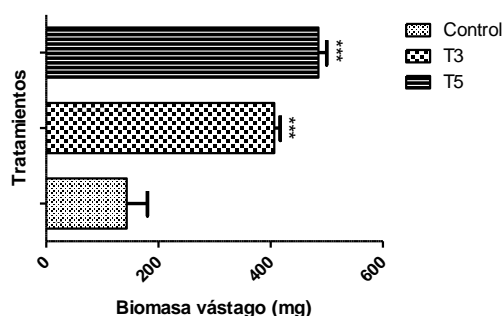


Figura 8. Biomasa del vástago en miligramos de las plantas frescas, en el 30° día posterior al tratamiento. ANOVA, seguido del test de Tukey ($p < 0,05$). *Indica diferencia significativa con relación al testigo.

Por último, se analizó el peso fresco y seco total de las plántulas de titora, figura 8 y 9, respectivamente.

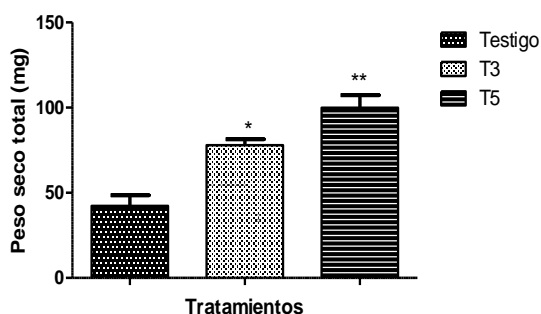


Figura 9. Peso seco total en miligramos de las plántulas de *Thypha dominguensis* ANOVA, seguido del test de Tukey ($p < 0,05$) *Indica diferencia significativa en relación al testigo.

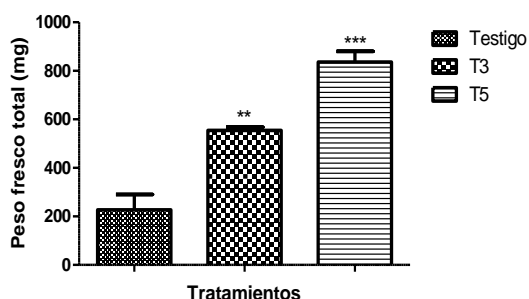


Figura 10. Peso fresco total en miligramos de *Thypha dominguensis* en el en el 30° día posterior al tratamiento de las semillas. ANOVA, seguido del test de Tukey ($p < 0,05$). * Indica diferencia significativa con relación al testigo.

En ambos se observaron diferencias estadísticas significativas en las semillas tratadas con T3 y T5 cuando fueron comparadas con el testigo, tratado con agua.

DISCUSIÓN

El uso de *Bacillus* sp formadores de endoesporas para diferentes fines está siendo ampliamente difundido, como agente antagonico, estimulante de crecimiento entre otras propiedades. Por estar presente en el hábitat natural de las raíces y suelos, estos organismos, presentan un amplio espectro de acción demostrando su uso como una alternativa creciente e inteligente en el manejo integrado de enfermedades (Lanna, Ferro & Silva, 2010).

Es notable la diferencia de porcentual de germinación de las semillas tratadas con suspensiones de *Bacillus* sp al compararse con el testigo, que logró a penas 23% de germinación. Estos datos coinciden con Manjula & Podile (2005), que trató semillas de poroto con una formulación de *B. subtilis* y observó una rápida germinación, al igual que en otro estudio conducido por Araújo (2008) cuando trató semillas de algodón, maíz y soja.

El uso de plantas en tratamiento de aguas residuales ha crecido cada día más debido a la búsqueda de alternativas más amigables con el medio ambiente y a que su principal mecanismo de acción es la transferencia de oxígeno a las raíces y rizomas que se encuentran en agua a ser tratada, tornando de esta manera el ambiente acuático más propicio al desarrollo de microorganismos que actúan en la remediación (Araújo Almeida et al., 2007).

Así la producción de raíces más gruesas y robustas, como fue observado en las plántulas tratadas con el *Bacillus* sp, podría auxiliar para ampliar la superficie de contacto entre los microorganismos remediadores, por tanto, será mayor la cantidad de oxígeno transportado y

aumentará la absorción de nutrientes acelerando su crecimiento en el inicio de su desarrollo.

Las semillas tratadas con las cepas T3 y T5 de *Bacillus* sp presentaron mayor longitud de raíces y total al compararlas con el testigo con agua. Estos resultados coinciden con Araújo, 2008, que trató las semillas de maíz con *Bacillus* sp y obtuvo un aumento del área foliar y altura de la planta.

La biomasa del vástago se mostró aumentada cuando las semillas fueron tratadas con las cepas en estudio de *Bacillus* sp, este dato es muy importante, considerando que las raíces de la totora ejercen un papel fundamental en la fitorremediación.

También fue significativo el aumento del peso fresco y seco total de las plántulas, ampliando así la superficie para la fotosíntesis y así más absorción de sustancias contaminantes, además de una mayor distribución de oxígeno a las raíces y el aumento de la eficiencia de los microorganismos. Otro punto a destacar como beneficio adicional, es el aprovechamiento de la biomasa producida para diferentes usos: como fuente de energía, como compost o como alimento animal, así como su máxima capacidad de integración en el entorno (Ansola & Luis, 1994).

Se debe resaltar que este es el primer trabajo realizado a cerca del tratamiento de semillas de totora con microorganismos benéficos, demostrando relevancia de esta investigación en el País y como potencial bioproducto para la Universidad Nacional de Asunción.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que el tratamiento de las semillas de totora con cepas de *Bacillus* sp se mostró eficiente y una alternativa biológica a la estimulación de germinación y crecimiento de esta, entre tanto, es necesario más estudios para una futura formulación biológica para

tratamiento de semillas.

FINANCIACIÓN

La investigación fue presentada por el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, financiado con fondos de investigación del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Convocatoria 2013.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansola, G. & Luis, E. de. (1994). Concentración de nutrientes en helófitos acuáticos utilizados en depuración de agua residual. *Limnética*, 10(1), 33-36.
- Araújo Almeida, R., Coutinho de Oliveira, L. F. & Kliemann, H. J. (2007). Eficiência de espécies vegetais na purificação do esgoto sanitário. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 37(1), 1-9.
- Araújo, F. F. de. (2008). Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciencia e Agrotecnologia*, 32(2), 456-462. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200017>
- Coleman, J., Hench, K., Garbutt, K., Sexstone, A., Bissonnette, G. & Skousen, J. (2001). Treatment of Domestic Wastewater by Three Plant Species in Constructed Wetlands. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128, 283-295.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canada Journal Microbiology*, 41(2), 109-117.
- González F. H. & Fuentes M., N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17. <https://doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
- Gopal, B. (1999). Natural and constructed wetlands for wastewater treatment: Potentials and problems. *Water Science and Technology*, 40(3), 27-35.
- Hidalgo, J. C., Montano, J. J. & Estrada, M. S. (2010). Recent Applications of Waste Water By Means. *Theoria*, 14(1), 17-25. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0982>
- Lanna, R., Ferro, H. M. & Silva, R. (2010). Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, 4(2), 12-20. <https://doi.org/10.0000/RTCAB.V4I2.145>
- Lorenzen, B., Brix, H., McKee, K. L., Mendelssohn, I. A. & Miao, S. (2000). Seed germination of two Everglades species, *Cladium jamaicense* and *Typha domingensis*. *Aquatic Botany*, 66(3), 169-180.
- Manjula, K. & Podile, A. R. (2005). Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1057-1062.

- Mertz, L. M., Henning, F. A. & Zimmer, P. D. (2009). Bioprotectors and chemical fungicides in the treatment of soybean seeds. *Ciência Rural*, 39(1).
- Mora, E., & Toro, M. (2007). Estimulación del crecimiento vegetal por Burkholderia cepacia, una cepa nativa de suelos ácidos de sabanas venezolanas. *Agronomía Tropical*, 57(2).
- Ongena, M., Henry, G. & Thonart, P. (2009). The Roles of Cyclic Lipopeptides in the Biocontrol Activity of Bacillus subtilis. *Recent Developments in Management of Plant Diseases*, 59-69.
- Pérez-García, A., Romero, D. & Vicente, A. de. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 187-193.
- Pott, V. J. & Pott, A. (2002). Potencial do uso de plantas aquáticas na despoluição da água. *Documentos*, 133: EMBRAPA.
- Ramírez, L. C. C., Lozano, L. C., Méndez, M. A. G., Rojas, S. J. R. & Torres, J. N. R. (2017). Bacillus spp : una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA*, 15(27), 45-65.
- Romero-Aguilar, M., Colín-Cruz, A., Sánchez-Salinas, E. & Ortiz-Hernández, M. L. (2009). Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: Evaluación de la carga de remoción de la carga orgánica. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(3), 157-167.
- Samudio, A., Nakayama, H., Peralta, I. & Cardozo, C. (2014). Calidad fisiológica de semillas de Typha dominguensis Pers. (Totorá) y propagación en condiciones controladas. *Rojasiana*, 13(2), 53-62.
- Souza, R. de, Ambrosini, A. & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC*, 42(3), 131-138.
- Varela, S. A. & Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Serie técnica: "Sistemas Forestales Integrados"*: INTA. <https://doi.org/10.2478/rjdnmd-2013-0020>
- Vera, A., Núñez, M. & Morales, C. A. E. (2007). Estudio de la relación entre el crecimiento de la macrófita Typha dominguensis y la remoción de nitrógeno, fósforo y materia orgánica en un humedal construido. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 24(1), 300-304.
- Vera, A., Andrade, C., Flores, E., Núñez, M., Cárdenas, C. & Morales, E. (2010). Removal of nutrients and organic matter in a constructed wetland, in function of the development of the macrophyte Typha dominguensis. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 33(2), 153-163.
- Xu, X., Jeffries, P., Pautasso, M. & Jeger, M. J. (2011). Combined Use of Biocontrol Agents to Manage Plant Diseases in Theory and Practice. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-10-0216>.