



Organo Científico
de la Sociedad Mexicana
de la Ciencia del Suelo A.C.

ISSN 0187-5779

TERRA

Volumen 14

Abril - Junio de 1996

Número 2

DIVISION I

Hidrodinámica en el suelo de un pastizal en una zona árida del norte de México

**VICTOR M. REYES GOMEZ
OLIVER GRÜNBERGER
JEAN LOUIS JANEAU**

129

Niveles de contaminación de las aguas del río Atoyac, Estado de Puebla, por metales pesados, boro, grasas y aceites

**TEODORO MENDEZ GARCIA
LUCIA RODRIGUEZ DOMINGUEZ
SERGIO PALACIOS MAYORGA**

137

DIVISION II

Efecto de largo plazo de la aplicación de estiércol de ganado lechero sobre el rendimiento de forrajes y las propiedades del suelo en una región árida irrigada del norte de México

**J. Z. CASTELLANOS
J. J. MARQUES-ORTIZ
J.D. ETCHEVERS
A. AGUILAR SANTELISES
J.R. SALINAS**

151

Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*

**YOAV BASHAN
GINA HOLGUIN
RONALD FERRERA-CERRATO**

159

AGRADECIMIENTO

La Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo a través de la presente hace un sincero agradecimiento a las instituciones de educación agrícola superior de la Comarca Lagunera por su participación económica para publicar este volumen de la revista Terra. Estas instituciones son las siguientes:

- 1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Unidad Laguna.**
- 2. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 10-DGETA-SEP.**
- 3. Unidad Regional de Zonas Aridas-UACH.**
- 4. Facultad de Agricultura y Zootecnia-UJED.**

Una vez mas queda en evidencia que con la participación interdisciplinaria e interinstitucional es posible no solo darle continuidad a Terra, sino también continuar con el intercambio de avances de investigación entre investigadores por lograr los objetivos tanto individuales como grupales para fomentar la ciencia del suelo en todas sus áreas.

ATENTAMENTE

COMITE EDITORIAL

COMISION EDITORA

DR. ANDRES AGUILAR SANTELISES

Editor en jefe

DR. JAVIER Z. CASTELLANOS,

Editor adjunto

DR. GABRIEL ALCANTAR GONZALEZ,

DRA. KLAUDIA OLESCHKO,

DR. VICTOR M. ORDAZ CHAPARRO,

DR. JUAN JOSE PEÑA CABRIALES,

DR. XAVIER X. UVALLE BUENO,

Editores técnicos

M.C. JORGE ALVARADO LOPEZ,

Editor de estilo

EDITORES ASOCIADOS NACIONALES

DR. NICOLAS AGUILERA HERRERA, México

DR. MANUEL ANAYA GARDUÑO, México

DR. JESUS CABALLERO MELLADO, México

DR. LENOM J. CAJUSTE, México

DR. RONALD FERRERA CERRATO, México

DR. BENJAMIN FIGUEROA SANDOVAL, México

M.C. MARGARITA E. GUTIERREZ RUIZ, México

DR. REGGIE J. LAIRD, México

DR. ANGEL MARTINEZ GARZA, México

DR. ROBERTO NUÑEZ ESCOBAR, México

DR. JOSE LUIS OROPEZA MOTA, México

M.C. CARLOS ORTIZ SOLORIO, México

DR. ALEJANDRO VELAZQUEZ M. México

DR. ENRIQUE PALACIOS VELEZ, México

DR. OSCAR L. PALACIOS VELEZ, México

DR. BENJAMIN V. PEÑA OLVERA, México

DR. ANTONIO TURRENT FERNANDEZ, México

EDITORES ASOCIADOS INTERNACIONALES

DR. EDUARDO BESOAIN M., Chile

DR. WINFRIED E.H. BLUM, Austria

DR. ELMER BORNEMISZA, Costa Rica

DR. LUIS ALFREDO DE LEON, Colombia

DR. HARI ESWARAN, USA

DR. ANTHONY FISCHER, Australia

DR. JUAN F. GALLARDO LANCHO, España

DR. RENATO GREZ Z., Chile

DR. ALBERTO HERNANDEZ, Cuba

DR. JOSE M. HERNANDEZ MORENO, España

DR. ERIC S. JENSEN, Dinamarca

DR. WALTER LUZIO LEIGHTON, Chile

DR. JOHN T. MORAGHAN, USA

DR. HECTOR J. M. MORRAS, Argentina

DR. CHRISTIAN PRAT, Francia

DR. PARKER F. PRATT, USA

DR. PAUL QUANTIN, Francia

DR. JOSE RODRIGUEZ, Chile

DR. CARLOS ROQUERO, España

DR. KARL STAHR, Alemania

DR. BERNARDO VAN RAIJ, Brasil

DR. RAFAEL VILLEGAS, Cuba

DR. EDUARDO ZAFFARONI, Brasil

CUERPO EDITORIAL ADMINISTRATIVO

DRA. EDNA ALVAREZ SANCHEZ

Distribución

"TERRA", Registro en Trámite. Organismo Científico de la Sociedad

Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.

Volumen 14-2, abril-junio, 1996.

ISSN 0187-5779

Los artículos publicados son responsabilidad absoluta de los autores. Se

autoriza la reproducción parcial o total del contenido de esta revista,

citándola como fuente de información. Las contribuciones a esta revista

deben enviarse, en original y dos copias, redactadas conforme a las Normas

para Publicación en la Revista TERRA, al: Editor de la Revista TERRA,

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Apartado Postal 45,

56230 Chapingo, Edo. de México, México.

Oficinas: Edificio del Departamento de Suelos,

Universidad Autónoma Chapingo,

Chapingo, Estado de México.

Tel. 91(595)46024 y 42200 ext. 5237.

Fax: 91(595)48076.

EDITORIAL

Artículos Científicos

División I. Diagnóstico, Metodología y Evaluación del Recurso Suelo

Hidrodinámica en el suelo de un pastizal en una zona árida del norte de México. **VICTOR M. REYES GOMEZ, OLIVIER GRÜNBERGER Y JEAN LOUIS JANEAU**..... 129

Niveles de contaminación de las aguas del río Atoyac, Estado de Puebla, por metales pesados, boro, grasas y aceites. **TEODORO MENDEZ GARCIA, LUCIA RODRIGUEZ DOMINGUEZ Y SERGIO PALACIOS MAYORGA**..... 137

División II. Relación Suelo-Clima-Biota

Efecto de largo plazo de la aplicación de estiércol de ganado lechero sobre el rendimiento de forrajes y las propiedades del suelo en una región árida irrigada del norte de México. **J.Z. CASTELLANOS, J.J. MARQUES-ORTIZ, J.D. ETCHEVERS, A. AGUILAR-SANTELISES Y J.R. SALINAS**..... 151

Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. **YOAV BASHAN, GINA HOLGUIN Y RONALD FERRERA-CERRATO**..... 159

Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera. **YOAV BASHAN, GINA HOLGUIN Y RONALD FERRERA-CERRATO**..... 195

Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas. **GINA HOLGUIN, YOAV BASHAN Y RONALD FERRERA-CERRATO**..... 211

EDITORIAL BOARD

DR. ANDRES AGUILAR SANTELISES

Editor-in-chief

DR. JAVIER Z. CASTELLANOS,

Associate editor

DR. GABRIEL ALCANTAR GONZALEZ,

DRA. KLAUDIA OLESCHKO,

DR. VICTOR M. ORDAZ CHAPARRO,

DR. JUAN JOSE PEÑA CABRIALES,

DR. XAVIER X. UVALLE BUENO

Technical editors

M.C. JORGE ALVARADO LOPEZ,

Style editor

NATIONAL ASSOCIATE EDITORS

DR. NICOLAS AGUILERA HERRERA, México

DR. MANUEL ANAYA GARDUÑO, México

DR. JESUS CABALLERO MELLADO, México

DR. LENOM J. CAJUSTE, México

DR. RONALD FERRERA CERRATO, México

DR. BENJAMIN FIGUEROA SANDOVAL, México

M.C. MARGARITA E. GUTIERREZ RUIZ, México

DR. REGGIE J. LAIRD, México

DR. ANGEL MARTINEZ GARZA, México

DR. ROBERTO NUÑEZ ESCOBAR, México

DR. JOSE LUIS OROPEZA MOTA, México

M.C. CARLOS ORTIZ SOLORIO, México

DR. ALEJANDRO VELAZQUEZ M. México

DR. ENRIQUE PALACIOS VELEZ, México

DR. OSCAR L. PALACIOS VELEZ, México

DR. BENJAMIN V. PEÑA OLVERA, México

DR. ANTONIO TURRENT FERNANDEZ, México

INTERNATIONAL ASSOCIATE EDITORS

DR. EDUARDO BESOAIN M., Chile

DR. WINFRIED E.H. BLUM, Austria

DR. ELMER BORNEMISZA, Costa Rica

DR. LUIS ALFREDO DE LEON, Colombia

DR. HARI ESWARAN, USA

DR. ANTHONY FISCHER, Australia

DR. JUAN F. GALLARDO LANCHO, Spain

DR. RENATO GREZ Z., Chile

DR. ALBERTO HERNANDEZ, Cuba

DR. JOSE M. HERNANDEZ MORENO, Spain

DR. ERIC S. JENSEN, Denmark

DR. WALTER LUZIO LEIGHTON, Chile

DR. JOHN T. MORAGHAN, USA

DR. HECTOR J. M. MORRAS, Argentina

DR. CHRISTIAN PRAT, France

DR. PARKER F. PRATT, USA

DR. PAUL QUANTIN, France

DR. JOSE RODRIGUEZ, Chile

DR. CARLOS ROQUERO, Spain

DR. KARL STAHR, Germany

DR. BERNARDO VAN RAIJ, Brazil

DR. RAFAEL VILLEGAS, Cuba

DR. EDUARDO ZAFFARONI, Brazil

EDITORIAL STAFF

DRA. EDNA ALVAREZ SANCHEZ

Distribution

"TERRA", Registration pending. Scientific publication of the Mexican Society of Soil Science. Volume 14-2, April-June 1996.

ISSN 0187-5779

The authors take full responsibility for the articles published. Partial or total reproduction of the contents of this journal is authorized, as long as this publication is cited as the information source. When submitting articles to this journal, an original and two copies must be sent to: Editor de la Revista TERRA, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C., Apartado Postal 45, 56230 Chapingo, Edo. de México, México. Office address: Edificio del Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.

Telephone: +52(595)46024; +52(595)42200 ext. 5237.
Fax: +52(595)48076.

EDITORIAL

Scientific Articles

Division I: Diagnosis Methodology and Evaluation of the Soil Resource.

Hydrodynamic soil characterization in an arid grassland zone of Northern Mexico. **VICTOR M. REYES GOMEZ, OLIVIER GRÜNBERGER, and JEAN LOUIS JANEAU**..... 129

Contamination levels of water of the Atoyac river in the State of Puebla by heavy metals, oils, fats and boro. **TEODORO MENDEZ GARCIA, LUCIA RODRIGUEZ DOMINGUEZ, and SERGIO PALACIOS MAYORGA**..... 137

Division II: Soil-Climata-Biota Relationship

Long-term effect of dairy manure on forage yields and soil properties in an arid irrigated region of Northern Mexico. **J.Z. CASTELLANOS, J.J. MARQUES-ORTIZ, J.D. ETCHEVERS, A. AGUILAR SANTELISES, and J.R. SALINAS**..... 151

Interactions between plants and beneficial microorganisms. I. *Azospirillum*. **YOAV BASHAN, GINA HOLGUIN, and RONALD FERRERA-CERRATO**..... 159

Interactions between plants and beneficial microorganisms. II. Associative rhizosphere bacteria. **YOAV BASHAN, GINA HOLGUIN, and RONALD FERRERA-CERRATO**..... 195

Interactions between plants and beneficial microorganisms. III. Techniques for isolation and characterization of mycorrhizae fungi and plant growth-promoting bacteria. **GINA HOLGUIN, YOAV BASHAN, and RONALD FERRERA-CERRATO**..... 211

HIDRODINAMICA EN EL SUELO DE UN PASTIZAL EN UNA ZONA ARIDA DEL NORTE DE MEXICO

Hydrodynamic Soil Characterization in an Arid Grassland Zone of Northern Mexico

Víctor M. Reyes Gómez¹, Olivier Grünberger², Jean Louis Janeau²

RESUMEN

El presente trabajo contiene resultados sobre la caracterización hidrodinámica del suelo en un área de pastizal de interés forrajero, en zonas áridas. Las características hidrodinámicas se refieren a la evolución de la humedad dentro del suelo, en los procesos de mojado y secado, la cual se estimó mediante dos metodologías. En la primera, se siguió la evolución de la humedad en el suelo después de cada lluvia, durante el período estival, y también, posteriormente al período, en el proceso de secado. En la segunda, se aplicó una lámina constante de agua en el suelo por el método Muntz, para observar la evolución de la humedad antes y después de alcanzar la saturación aparente del suelo. En los dos casos se usó un dispersor de neutrones para medir las cantidades de agua en el suelo. Los resultados indican que estas áreas de pastizal presentan una hidrodinámica vinculada al estado superficial y estructura del suelo. El agua sólo penetró a una profundidad máxima de 80 cm, y se mantuvo almacenada y a disposición de las raíces del pasto (que alcanzan la profundidad máxima de 40 cm) durante el tiempo necesario para que este tipo de gramínea persista.

Palabras clave: Lluvia natural, infiltración controlada, mojado y secado del suelo.

SUMMARY

This report presents the results of a study on hydrodynamic features of a soil used for seasonal pasture. The studied hydrodynamic characteristics are related to the development of soil humidity, during the processes of soil moistening and drying using the

following methods: 1) Under natural conditions, the development of humidity within the soil just after each rain was evaluated during the summer rainy season followed by measurements later on, during the drying process. 2) Under experimental conditions Muntz controlled infiltration method was applied to a constant charge of water in order to observe how humidity develops before and after the soil becomes apparently water-saturated. The two methods were conducted using the neutron probe for local measurement of the soil water content. The results indicated that these areas are subjected to a hydrodynamic process which depends on soil structure and on the characteristics of the soil surface. The water penetrated to a depth of 80 cm only, where the moisture remained stored and available for the grass.

Index words: Natural rains, controlled infiltration, soil moistening and drying.

INTRODUCCION

En México, 55% de la superficie está cubierta por zonas áridas. La ganadería extensiva es una de las principales actividades que se realizan en estos lugares y representa un sustento para la economía del país. Esta actividad depende, además del agua, del recurso forraje proveniente de pastos naturales temporales en zonas áridas. Desde 1982, en la reserva de la biosfera de Mapimí se realizan estudios integrados que abarcan investigaciones enfocadas al conocimiento de los recursos suelo, agua y vegetación.

Dichos estudios incluyen temas como la edafología, la hidrología y la climatología, desde el punto de vista de la pluviometría; éstos servirán de marco para mejorar el aprovechamiento óptimo del suelo, el agua y, consecuentemente, la productividad vegetal y animal.

En estas zonas áridas, el primer factor limitativo es el agua, su comportamiento dentro del suelo (hidrodinámica) es determinante para el desarrollo de especies útiles para el ganado. Por estas razones se

¹ Instituto de Ecología A.C., Unidad Durango, Apartado Postal 632, 34100 Durango, Dgo.

² ORSTOM. Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo en Cooperación.

planteó el objetivo de conocer la hidrodinámica del suelo en una zona de pastizal (*Hilaria mutica*), para entender los fenómenos hidrológicos: infiltración, secado y humedecimiento del suelo, y cómo influyen éstos en las comunidades de vegetación.

De los métodos para seguir procesos hidrodinámicos de mojado y secado del suelo, el dispersor de neutrones es uno de los equipos más utilizados, tanto en eventos de lluvia natural como en aplicaciones de riego y en experimentos controlados como el tipo Muntz, para conocer drenajes internos (en la agricultura, la ganadería y la ingeniería civil), consumo de agua por plantas y pérdidas del agua del suelo. En los diferentes tipos de manejo de agostaderos naturales en la ganadería extensiva, el conocer sobre como se comporta el agua de estos suelos es determinante para un mejor manejo de los recursos suelo, agua y vegetación.

MATERIALES Y METODOS

Area de Estudio

La zona de estudio, conocida como la reserva de la biosfera de Mapimí, está localizada dentro del desierto Chihuahuense, en el Bolsón de Mapimí. La reserva tiene un área de aproximadamente 160 000 hectáreas, con una altitud entre 1100 y 1600 m y un clima del tipo BWhw(c), denominado como muy árido (García, 1981). La vegetación es del tipo "matorral desértico micrófilo" (Flores Mata *et al.*, 1971) o tipo "matorral xerófilo" (Rzedowsky, 1981).

Las principales características físicas y climáticas de la zona de estudio son:

Precipitaciones. Se caracterizan por la escasez y la poca cantidad de lluvia, así como por la repartición espacial y la variabilidad en el tiempo. En el laboratorio de la reserva de Mapimí, la media es de 264.2 mm por período anual, aunque Delhoume (1990) demuestra un gradiente geográfico de precipitaciones que va desde 200 mm hasta 400 mm o más, en la reserva de Mapimí.

Temperatura del aire. La media anual es de 20.8 °C, correspondiente a un clima cálido, con una variación estacional muy fuerte: los inviernos son muy fríos (la media de las mínimas en Enero es de 3.9 °C), y las épocas de calor son muy extremosas (media de las máximas en Junio de 36.1 °C) (Cornet, 1988).

Radiación solar. Está ligada directamente a las horas solares y a los diferentes períodos del año. La fluctuación de la radiación solar diaria varía en el curso de todo el año: de 13:12 h en otoño a 10:48 h en invierno.

Humedad del aire. La humedad relativa tiene un promedio mínimo de 10 % en Marzo, y un máximo de 85 % en Agosto.

Evaporación. En la estación meteorológica de la reserva, mediante un tanque evaporímetro (Clase A), se demostró que la evaporación total anual es de 2805 mm, sin embargo, no debe olvidarse que en los días nublados y de poco viento, la evaporación es casi nula (el 23 de enero de 1992 sólo se evaporaron 0.18 mm), y en algunas ocasiones puede ser muy elevada (20.56 mm el 9 de julio de 1992).

Geología. Su geología está representada por cerros y sierras de rocas calcáreas, con desarrollo de depósitos coluviales de pie de monte (Bartolino, 1988), entre los cuales se encuentra una gran extensión de suelo de depósitos aluviales del Cuaternario y algunos afloramientos de conglomerados de origen continental Terciario y rocas ígneas cuaternarias dominadas por basalto.

Suelos. Los tipos de suelos se diferencian esencialmente por la naturaleza del material parental y por el proceso de deposición original de este material. Se trata fundamentalmente de depósitos aluviales y coluviales cuya repartición en el paisaje es función de la geomorfología (Delhoume, 1988).

El suelo en el paisaje varía según su ubicación: se observa que en las partes más altas (cerros) el suelo es poco evolucionado de tipo Litosol sobre roca dura, Regosol sobre coluviones pedregosos. Los suelos de pie de monte son poco evolucionados, más profundos que en los cerros y son Regosoles sobre coluviones constituidos por gravas y piedras de tamaño grueso, a diferencia de la zona de bajada donde los suelos pueden ser Yermosoles o Xerosoles háplicos sobre coluviones pedregosos de tamaño medio o sobre aluviones finos y medianos que cubren las lutitas encontradas a mediana profundidad. Dentro de la zona de bajadas donde las pendientes son menores que 1%, se localiza una zona de "depresiones", en la cual se desarrollan cubiertas vegetales de tipo monoespecífico como los pastizales, donde *Hilaria mutica* es el pasto más representativo. Aquí los suelos son Yermosoles gípsicos o calcáreos sobre aluviones arcillosos que reposan a mediana profundidad sobre lutitas (Cuadro 1). Después de la zona de depresiones, el paisaje se

Cuadro 1. Características analíticas del suelo de la estación de trabajo.

| Profundidad cm | Arcilla % | Textura | | pH agua | C % | N total orgánico | C/N | CE dS/m | CaCO ₃ % | Yeso % | CIC cmol(+)/kg |
|-------------------|--------------|---------|-------|------------|--------|---------------------|------|------------|------------------------|-----------|-------------------|
| | | Limo | Arena | | | | | | | | |
| 0 a 6 | 37.5 | 20.0 | 42.5 | 8.4 | 0.55 | 0.062 | 8.9 | 1.2 | 19.0 | 7.5 | 19.7 |
| 12 a 20 | 51.5 | 12.0 | 36.5 | 8.9 | 0.57 | 0.061 | 9.3 | 1.1 | 23.0 | 8.9 | 22.5 |
| 30 a 40 | 51.1 | 14.0 | 34.9 | 8.9 | 0.38 | 0.043 | 8.8 | 0.5 | 21.3 | 9.5 | 23.5 |
| 45 a 75 | 55.1 | 12.0 | 32.9 | 8.8 | 0.38 | 0.033 | 1.5 | 6.8 | 20.7 | 9.9 | 24.5 |
| 75 a 82 | | | | 8.2 | 0.34 | 0.020 | 17.0 | 11.9 | 17.6 | 17.1 | 32.1 |

“interrumpe” con una zona de transición en bajada suave hasta un bajío denominado playa donde los suelos están desarrollados sobre material de aporte constituido por depósitos gravosos relativamente espesos (es una zona de conglomerados). En la zona más baja del paisaje denominada playa, cuyas pendientes son menores que 0.5%, el suelo puede ser del tipo Yermosol gipsico con fase salina o sódica, o del tipo Solonchaks órticos y, localmente, Vertisoles crómicos.

Hidrología. La reserva se subdivide en tres cuencas endorreicas (Henrickson, citado por Breimer, 1985). Cerca de dos terceras partes del área forman parte de la represa de la laguna Las Palomas. El noreste de la reserva drena totalmente a la laguna El Rey, la cual es uno de los lagos más salados del Bolsón de Mapimí. La Laguna Las Palomas se extiende al suroeste de la reserva y el principal río es La India, que viene del suroeste (Breimer, 1985).

Vegetación. La zona de estudio es un pastizal donde la especie *Hilaria mutica* representa más de 90% de la cobertura vegetal total, que a su vez constituye 40% de la zona. Este estrato herbáceo contiene algunas especies de cactáceas del género *Opuntia* y es dominado por un estrato arbustivo, poco denso, donde *Prosopis glandulosa* es la especie más frecuente (Besnard, 1989; Montaña y Breimer, 1988). La pendiente del área es suave (1%) con estado superficial del suelo representado por 23.91% de cobertura vegetal basal; 44.48% de costras (generalmente de tipo decantación); 10.78% de suelo desnudo; 7.35% de bioderma y 13.48% de mantillo.

Métodos

Precipitaciones. Las precipitaciones se midieron con un pluviómetro totalizador, mediante registros después de cada evento de lluvia.

Caracterización hidrodinámica del suelo. En cinco sitios, ubicados dentro de una zona de pastizal (2500 m²), se siguió la evolución del agua dentro del suelo según dos modos operativos: el primero consistió en seguir los frentes de humedad dentro del suelo, antes de la temporada de lluvia, y después de cada evento pluvial, y al final del período estival con el fin de observar la evolución del proceso de mojado y secado de esos suelos con eventos naturales de lluvia. Dicha evolución se siguió con un dispersor de neutrones tipo SOLO 5 (NARDEUX 1), de manera estratificada con dos repeticiones por cada 10 cm de profundidad de suelo para cada sitio de muestreo. Los datos se procesaron con el programa “logiciel intégré pour le traitement des données d’humidimétrie neutronique” (Poss, 1987). El segundo modo operativo consistió en aplicar la técnica Muntz (Figura 1), de infiltración controlada, simplificada por Delhoume (1990), donde bajo una lámina constante de agua, el suelo se sometió a saturación aparente en función del tiempo, lo cual se logró cuando la infiltración resultó ser constante. Durante el experimento se tomó en cuenta la infiltración total dentro del suelo, es decir, la de tipo vertical, horizontal y por grietas. Al final, por el método gráfico de la dinámica de mojado y secado, se estimó la reserva hídrica. La calibración del dispersor de neutrones se realizó de forma gravimétrica. La fecha de aplicación en el primer caso fue del 14 de junio al 10 de agosto de 1988, en el proceso de mojado del suelo; y del 16 de agosto al 22 de octubre del mismo año, para el proceso de secado. Al contrario, las mediciones de infiltración controlada se realizaron de Febrero de 1990 hasta Mayo del mismo año con el fin de evitar interferencia de lluvias, y seguir los cambios de humedad en el suelo para los dos casos.

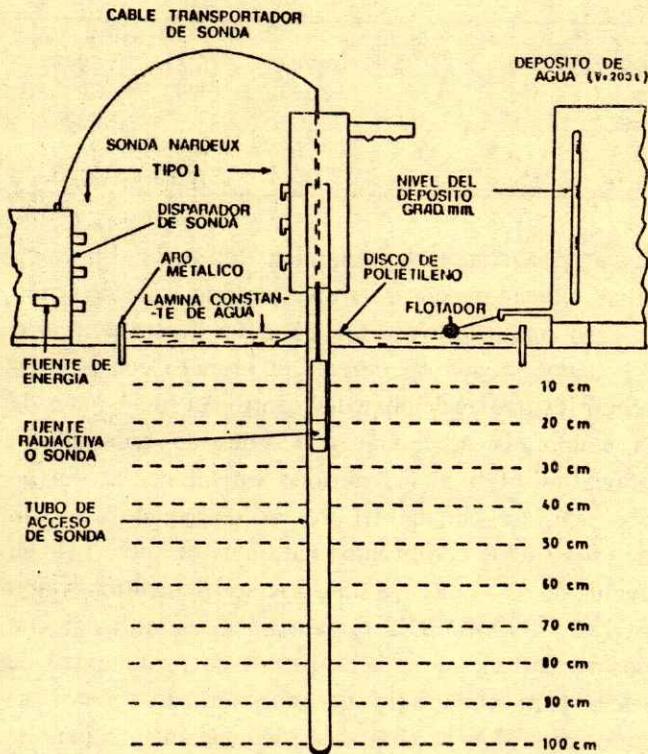


Figura 1. Diseño gráfico para estimar humedad con sonda de neutrones después de cada lluvia y durante la infiltración controlada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Precipitaciones naturales

Las lluvias ocurridas en el período estival muestran, que la máxima fue de 38.5 mm en Junio, con mínimas entre 1 y 2 mm. La repartición de lluvias en este período fue muy irregular; la primera lluvia fuerte, en la última semana de Junio fue precedida por un periodo seco hasta el 26 de julio, cuando se presentó otra lluvia de 25 mm (Figura 2). Después hubo un nuevo periodo seco para culminar en la última semana de Agosto con escasas lluvias de menos de 10 mm. La altura total registrada en la estación de trabajo fue de 135.6 mm, repartidos entre 19 eventos de lluvia desde el 14 de junio hasta el 23 de agosto.

Lámina de infiltración controlada

La altura de la lámina constante de agua se mantuvo entre 40 y 60 mm, y las fechas de aplicación fueron el 31 de enero y el 8 de mayo de 1990, en tiempos mínimos de 24 h y máximos de 46 horas. El volumen total infiltrado varió de 230 a 285 mm (Figura 3). El comportamiento de infiltración resultó al

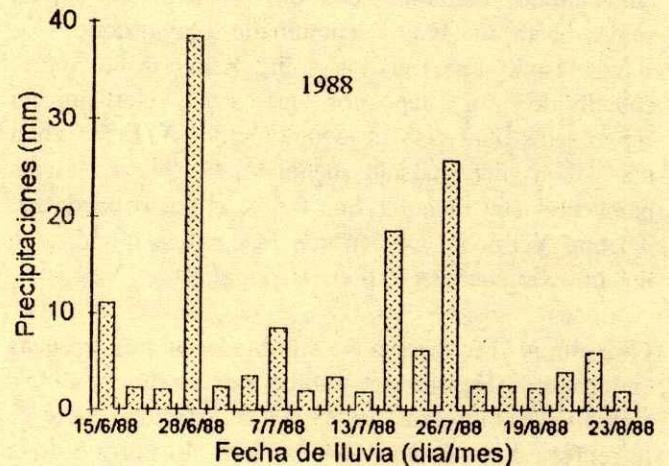


Figura 2. Ocurrencia de precipitaciones durante el periodo estival del año 1988.

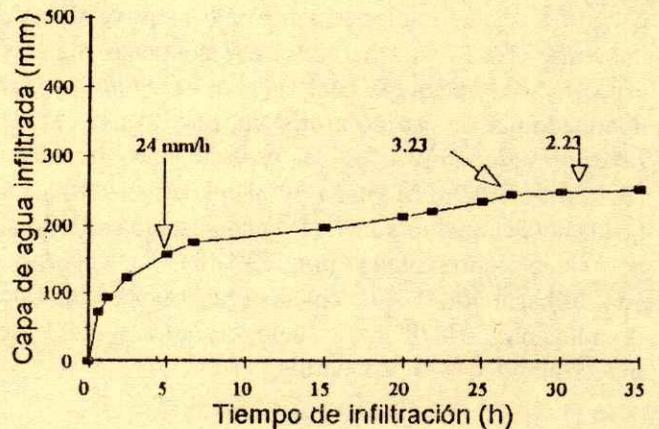


Figura 3. Espesor de la capa de agua infiltrada por la metodología Muntz (promedio de las cinco estaciones).

inicio de una forma rápida (172 mm en un tiempo de 6.9 h) cuya velocidad de infiltración alcanzó 24 mm/h (Figura 3). Después se continuó con una fase de infiltración media, donde en 19.8 h se infiltraron 64 mm a razón de 3.23 mm/h, y finalmente una infiltración lenta que tendió a ser constante, donde en 9.6 h sólo se infiltraron 22.2 mm (2.23 mm/h). Este comportamiento demuestra que las aportaciones de agua en forma de riego no resultarían convenientes, ya que aun aplicando volúmenes mayores de agua que el que aporta la lluvia, el suelo no acepta fácilmente el agua sin el efecto del impacto de las gotas de lluvia sobre la superficie del suelo, y sobre todo por efecto de hinchamiento de la capa superficial del suelo por el tipo de arcillas presentes.

Hidrodinámica

Proceso de mojado en el suelo. Tanto en las observaciones de lluvia natural como en la infiltración controlada se comprobó que el comportamiento de la humedad sigue una evolución por etapas. Primero, el agua difícilmente penetró hasta 80 cm, ya que el 4 de agosto, fecha última después de las lluvias, sólo se infiltraron 8 mm a dicha profundidad, en tanto que a 40 cm pueden infiltrarse hasta 50 mm; se observó que mediante Muntz, ni aun en la saturación aparente del suelo, se logra algo de infiltración hasta 80 cm (Figuras 4 y 5). En los dos casos se observó que la mayor dinámica de mojado del suelo es hasta 60 cm de profundidad de suelo. Tomando en cuenta los perfiles de humedad del 31 de enero y del 8 de mayo de 1990, antes de saturar el suelo por infiltración controlada, se presenta una humedad baja y uniforme en todo el suelo. Se observó que en Junio, cuando ocurren lluvias, la humedad aumentó y se mantuvo el tiempo necesario (por lo menos hasta 40 cm donde está la zona de raíces) para que el pasto salga de su "latencia" e inicie otro ciclo. Por otra parte, se entiende que el agua no penetra a mayores profundidades porque los perfiles edafológicos revelan que a 80 cm existe un estrato de lutita endurecida e impermeable. No se puede pensar que existe un flujo interno horizontal lateral, ya que en otros años se instalaron dispositivos de captura de agua con movimiento horizontal (0 a 80 cm) y nunca se registraron muestras, excepto una vez, pero en lecho de río.

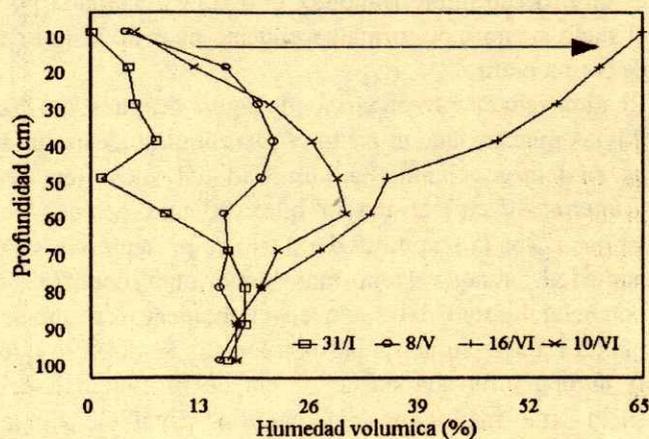


Figura 4. Proceso de mojado del suelo medido después de las lluvias, durante el periodo estival (Enero a Agosto de 1988).

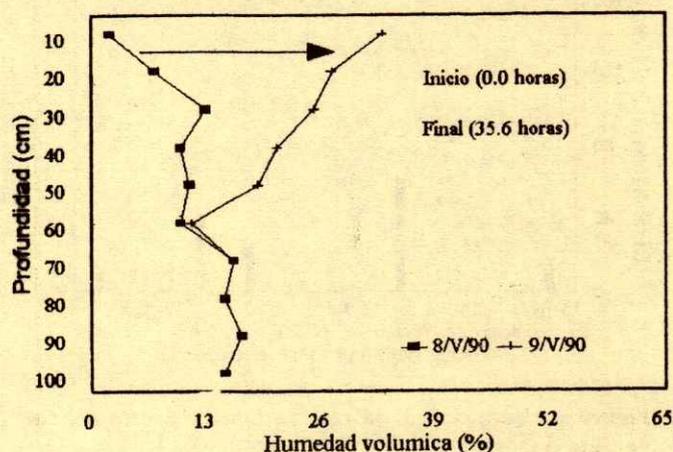


Figura 5. Proceso de mojado del suelo hasta la saturación aparente, bajo infiltración controlada (Mayo de 1990).

Reserva hídrica del suelo. La humedad de reserva varió en relación con la fecha de lluvias y, con base en el tiempo de aplicación de agua, de forma constante, ya que se apreció un incremento del agua total infiltrada, después de cada lluvia. La infiltración controlada siguió el mismo comportamiento (Figuras 6 y 7). Durante lluvias mayores que 20 mm, el agua total infiltrada alcanzó los picos más altos y se observaron 2 ó tres días después de la fecha de lluvia. Sin embargo, el efecto de lluvias repetidas fue más favorable para el suelo y se pudo ver que se almacenó más agua cuando del 21 al 26 de junio llovió tres veces y con menos de 20 mm cada lluvia. En la infiltración controlada, como

es un proceso ininterrumpido, el agua es aceptada por el suelo siempre de forma ascendente pues no se aplica de forma natural.

El almacenamiento máximo de agua después de las lluvias muestra que el pasto *Hilaria mutica* despertará de su letargo cuando la humedad del suelo (en los primeros 40 cm) es mayor que 100 mm, ya que en ambos casos la respuesta del pasto se presentó con esa humedad, aunque sería más importante conocer el potencial hídrico del suelo en el momento en que la planta reinicie su actividad fisiológica. Se observó que la lámina infiltrada hasta 80 cm de profundidad del suelo, fue mayor que la cantidad total de lluvia (llovieron 136.5 mm y se almacenaron 189.1 mm). El

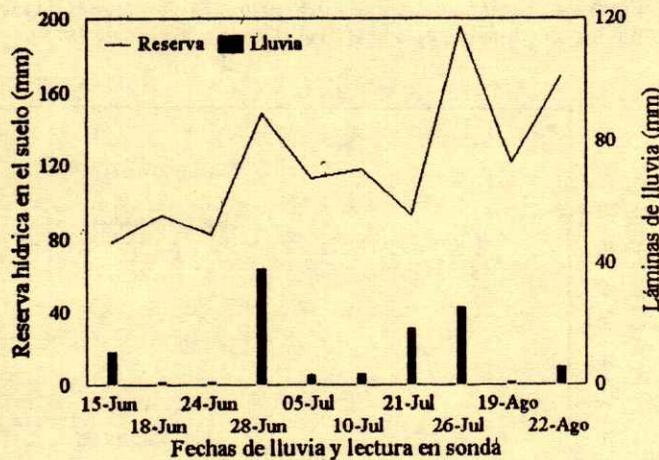


Figura 6. Variación de la reserva hídrica dentro del suelo durante el período estival del año 1988.

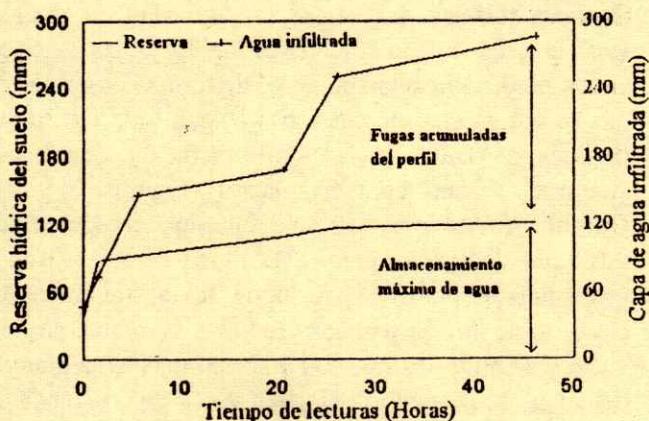


Figura 7. Variación de la reserva hídrica dentro del suelo durante la infiltración controlada (Mayo a Junio de 1990).

agua de escurrimiento proveniente de la pendiente arriba se acumuló a las precipitaciones, y originó condiciones propicias para el crecimiento de la gramínea.

Según los resultados de infiltración controlada, se ve el efecto de la dinámica de las gotas de lluvia sobre el estado superficial del suelo (Figura 7), ya que sin reorganización de las partículas de la costra superficial, el agua infiltrada fue menor (Casenave y Valentin, 1989). Debido a la presencia de arcillas como la montmorillonita, que al humedecerse se expanden y provocan una permeabilidad muy baja del suelo, como puede verse en la gráfica de la Figura 6, donde después de 24 a 46 h de aplicación de agua, no hay gran cantidad de agua almacenada en comparación con la totalidad infiltrada, ya que no supera a 130 mm de los 280 mm infiltrados, indicando con esto último que el sistema cuenta con fugas laterales que se pueden confundir con un verdadero flujo horizontal.

Proceso de secado del suelo. En el secado del suelo se apreció que los perfiles de humedad evolucionaron de tal manera que pudieron llegar al estado inicial seco. Sin embargo, se observa que en los primeros 20 cm de suelo, el agua puede perderse en 35 días, en tanto que en los siguientes centímetros de suelo el agua permanece hasta que lleguen las ligeras lluvias de invierno a recargar el "almacén" de agua (en profundidades de 50 a 80 cm). La humedad del suelo puede durar hasta el siguiente período de lluvias así como lo comprobaron las mediciones de humedad por lluvias. Por ejemplo, se observa que desde el 16 de agosto hasta el 22 de octubre, la pérdida de agua fue menos de la que se infiltró en todo el período de lluvia (Figura 8). Asimismo, el método de manera controlada mostró una hidrodinámica de secado parecida a aquella por lluvias en los primeros 20 cm, sin embargo, entre 40 y 60 cm se observó que la humedad aumenta ligeramente. Esto se debió al efecto de drenaje vertical interno del agua a profundidades mayores que 40 cm, ya que en un tiempo de 35 días, el agua evapotranspirada sólo fue a profundidades arriba de 40 cm (Figura 9). Para el secado, en los dos casos se aprecia que la hidrodinámica más importante queda limitada a 60 cm de profundidad, igual que en el proceso de mojado. Cuando el período de sequía se prolongue por dos o tres años, es decir, cuando el promedio anual sea menor que 190 mm, repartidos en lluvias con láminas menores que 35 mm, es seguro que algunas zonas de pastizal no logren perdurar. En el primer año de

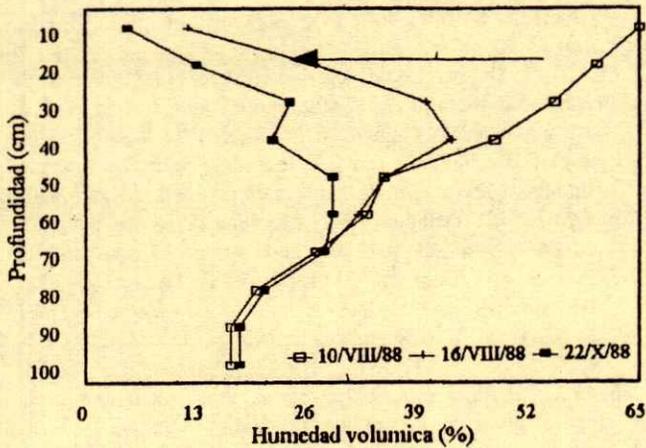


Figura 8. Proceso de secado del suelo después de la temporada de lluvias (Agosto a Octubre de 1988).

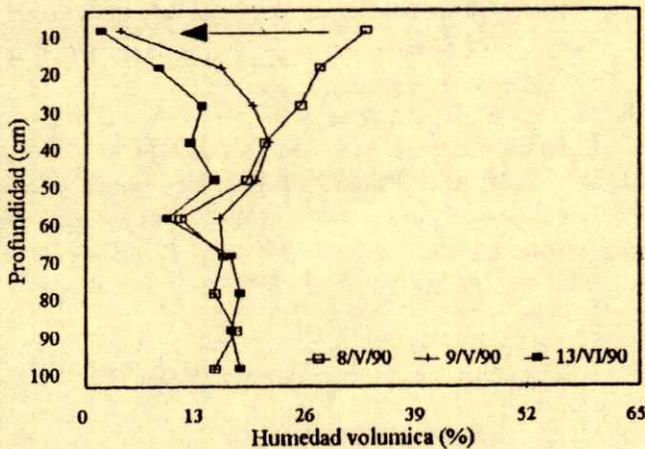


Figura 9. Proceso de secado del suelo después de la aplicación de agua en forma controlada (Mayo a Junio de 1990).

sequía, los tallos permanecen inactivos, hasta que las lluvias aparecen de nuevo. Esta adaptación de especies al medio árido varía en comportamiento como lo demostraron Cornet *et al.* (1988), quienes encontraron que las zonas de vegetación homogénea, como la del presente estudio, se ven desfavorecidas por el bajo aporte de agua. Existen otras áreas, como las denominadas "mogotes", que se han establecido en sentido perpendicular a la pendiente, ya que en periodos de sequía logran captar una mayor cantidad de agua de lluvia y escurrimiento; debido a su estructura vegetal y a su disposición en el paisaje

realizan la función de trampeadora de agua. Besnard (1989) observó que *Sporobolus airoides*, otra especie de pasto más consumida por el ganado, agota el agua rápidamente, pero *Hilaria mutica* sale de su letargo más tarde que la primera, aunque el contenido de agua fuese el mismo. Algunas zonas sin vegetación presentan un proceso de mojado y secado, muy rápido y uniforme a profundidades arriba de 100 cm, así como se comprobó en el presente estudio que en 35 días puede llegar a su estado inicial seco a lo largo del perfil analizado (150 cm). Sin embargo, en el sitio donde se experimentó, se encontró que el suelo no presentaba la capa de lutita endurecida a 80 cm como en el área de pastizal, incluso a los 2 m sólo existen dos capas de arenisca compactada que obstruyen ligeramente la infiltración, pero la evaporación se presentó muy precipitada en todo el perfil.

CONCLUSIONES

En general, la caracterización hidrodinámica de estos suelos permite entender la adaptación del pasto sabaneta (*Hilaria mutica*), en regiones tan áridas como el Bolsón de Mapimí. El proceso de mojado de estos suelos está condicionado al número de lluvias mayores que 20 mm (y a intensidades mayores que 10 mm/h) que ocurran durante el periodo estival. El agua almacenada por estos suelos supera la precipitación por estación debido a que se ubican en una zona del paisaje donde el escurrimiento (proveniente de la pendiente arriba) se logra detener en estos sitios, cuyas pendientes son menores que 1%. El pastizal actúa como trampa de escurrimiento superficial, así como actúan las formaciones de vegetación tipo mogote, que debido a su estructura de especies (arborescente-herbácea) y su ubicación plano-perpendicular con la pendiente, aprovecha una mayor cantidad de agua, tanto por la captación foliar de los arbustos, como por la distribución más amplia y profunda de las raíces. La profundidad, el tipo de suelo y el mantillo depositado sobre la superficie del suelo favorecen la infiltración y reducen la evaporación.

El proceso de humedecimiento y secado del suelo en zonas sin vegetación, que circundan a los pastizales, varía en periodos cortos y a profundidades del suelo (0 a 200 cm) que no permiten el establecimiento de vegetación.

Debido a que los suelos en este pastizal son poco profundos y de gran contenido de arcillas, el agua sólo

penetra hasta 80 cm, ya que a esa profundidad, una capa de suelo compactado de lutita impide la penetración del agua. Si el agua de escurrimiento y de la lluvia son suficientes para que el suelo se moje, se logra almacenar este líquido en los estratos inferiores del suelo (40 a 80 cm). En los períodos cortos de lluvia, el agua de estos estratos es transportada hasta los niveles superiores donde las raíces del pasto pueden aprovecharla y completar de nuevo su ciclo. Sin embargo, cuando la sequía se prolonga y si existe sobrepastoreo, la planta puede morir.

Además de conocer la función de trampa del pasto *Hilaria mutica* para captación de agua, y su utilización como forraje en la ganadería extensiva, bajo la influencia de la variación climática y edafológica, se requiere complementar este tipo de estudios con el conocimiento del potencial hídrico de los suelos y relacionarlo con el potencial base de la planta. Así mismo, se deben realizar pruebas de germinación de semillas en campo, sometidas a varios potenciales hídricos de suelo y algunos procesos naturales de lluvia, así como la ruptura de costras superficiales de suelo con el fin de favorecer el establecimiento de nuevas áreas con este tipo de cobertura herbácea.

LITERATURA CITADA

- Bartolino, J.R. 1988. Cenozoic geology of the eastern half of the La Flor Quadrangle, Durango and Chihuahua, México. *In*: Estudio integrado de los recursos vegetación, suelo y agua, en la Reserva de la Biosfera de Mapimí. C. Montaña (ed.). I. Ambiente natural y humano. MAB, Instituto de Ecología, México.
- Besnard, G. 1989. Fisiología de dos gramíneas perennes de la zona árida del norte de México. Informe interno del Instituto de Ecología y el ORSTOM.
- Breimer, R.F. 1985. Soil and Landscape Survey of the Mapimí Biosphere Reserve. Durango, México. UNESCO-MAB. Instituto de Ecología, México.
- Casenave, A. y C. Valentin. 1989. Les états de surface de la zone Sahélienne (Africa). Influence sur l'infiltración. ORSTOM, Francia.
- Cornet, A. 1988. Principales caractéristiques climatiques de la réserve de Mapimí. *In*: Estudio integrado de los recursos vegetación, suelo y agua, en la Reserva de la Biosfera de Mapimí. C. Montaña (ed.). I. Ambiente natural y humano. Durango, México. MAB, Instituto de Ecología, México, D.F.
- Cornet, A.F., J.P. Delhoume y C. Montaña. 1988. Dynamics of striped vegetation patterns and water balance in the Chihuahuan desert. *In*: Diversity and Pattern in Plant Communities. Ed. During, H.J., M.J.A. Werger y J.H. Willems. SPB Academic Publishing. The Hague. The Netherlands. pp. 221-231.
- Delhoume, J.P. 1988. Distribution spatiale des sols le long d'une toposéquence représentative. Estudio integrado de los recursos vegetación, suelo y agua, en la Reserva de la Biosfera de Mapimí. C. Montaña (ed.). I. Ambiente natural y humano. Instituto de Ecología, México, D.F.
- Delhoume, J.P. 1990. Una zona árida del norte de México: limitaciones para el desarrollo de la ganadería extensiva. *Trace* 19: 59-65.
- Flores M., G., F. Jiménez López, F. Moncayo R. y F. Takaki Takaki. 1971. Memoria del Mapa de tipos de vegetación de la República Mexicana. SARH. México, D.F.
- García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 3a edición. México, D.F.
- Montaña, C. y R.F. Breimer. 1988. Major Vegetation and Environment Units. Estudio integrado de los recursos vegetación, suelo y agua, en la Reserva de la Biosfera de Mapimí. I. Ambiente natural y humano. C. Montaña (ed.). Instituto de Ecología, Xalapa, Ver., México.
- Poss, R. 1987. Logiciel intégré pour le traitement des données d'humidimétrie neutronique, Bhyson 1.2. ORSTOM, Paris, Francia.
- Rzedowsky, J. 1981. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. pp. 432.

NIVELES DE CONTAMINACION DE LAS AGUAS DEL RIO ATOYAC, ESTADO DE PUEBLA, POR METALES PESADOS, BORO, GRASAS Y ACEITES

Contamination Levels of Water of the Atoyac River in the State of Puebla by Heavy Metals, Oils, Fats and Boro

Teodoro Méndez García¹, Lucía Rodríguez Domínguez, Sergio Palacios Mayorga

RESUMEN

El Río Atoyac, que durante años se utilizó para abastecer de agua potable a varios asentamientos humanos en el trayecto Río Frio-San Martín Texmelucan, ha sido afectado gradualmente durante su recorrido al incorporarse las aguas de desecho, tanto municipales como residuales de San Martín Texmelucan, Moyotzingo, Puebla y Tlaxcala. Después de almacenarse temporalmente su caudal en las presas Independencia y Valsequillo, se utiliza para riego agrícola en los municipios de Tecamachalco y Atlixco. Sus aguas, de acuerdo con los criterios de Richards (1994) respecto a la salinidad y sodicidad, pertenecen a la clase C₃S₁, siendo muy semejantes al agua de riego del Valle del Mezquital, Hidalgo, donde, según Sánchez (1985) son de clase C₃S₂, y deben utilizarse únicamente para riego de cultivos tolerantes a la salinidad. Al comparar la conductividad eléctrica (CE) del agua del Río Atoyac con los valores detectados en otros países, ésta alcanza niveles superiores ya que Neilsen *et al.* (1989) mencionan datos de CE que fluctúan de 853 a 1006 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en algunas aguas municipales de Canadá.

Respecto a los niveles de contaminación, los valores promedio de grasas y aceites variaron de 196 a 339 ppm, los cuales exceden las 60 ppm, establecidas como el límite permisible por la NOM-CCA-031-ECOL/93 para aguas de uso agrícola. Son muy superiores a los reportados por Sánchez (1985) en el Valle del Mezquital, Hidalgo (valores promedio de 23 ppm de grasas).

Las altas concentraciones de las sustancias antes mencionadas pueden modificar las propiedades físicas y químicas del suelo. Respecto al boro, los valores máximos de este elemento, en varios sitios exceden las 0.75 ppm consideradas como permisibles por la NTE-

CCA-032/91 para aguas de riego agrícola. Sin embargo, son inferiores a las encontradas por Mendoza (1981), quien menciona valores de 1.33 a 2.83 mg l^{-1} en el Distrito 03 en Hidalgo.

Por otro lado, las cantidades de Cu, Zn, Co y Cd solubles no rebasan los límites máximos permisibles establecidos por la NOM-CCA-032-ECOL/93 para aguas con fines agrícolas. Sin embargo, el Cr, Ni y Fe, en el sitio 9, rebasan los límites permisibles. Asimismo, los niveles de Mn, en los sitios 5 y 9, exceden los valores aceptados por la norma antes mencionada.

Palabras clave: Aguas residuales y metales pesados.

SUMMARY

Waters from Rio Atoyac have been used for several years to provide drinking water for some communities, located between Rio Frio and San Martin Texmelucan. However, the quality of this water has been affected along its course, since wastewater from San Martin Texmelucan, Moyotzingo, Puebla, and Tlaxcala joined the current. Independencia and Valsequillo dams are used as temporal storage for the above waters, and at Tecamachalco and Atlixco, the waters are used for agricultural irrigation.

According to Richards (1994) regarding salinity and sodium, these waters belong to class C₃S₁; being similar to irrigation water from Valle del Mezquital, Hidalgo. Sánchez (1985) claims that those waters are class C₃S₂, and must only be used for salinity resistant tillage. Comparing Rio Atoyac electrical conductivity (EC) with values found in other countries, the figures in Rio Atoyac are higher. Neilsen *et al.* (1989) reported values from 853 to 1006 $\mu\text{S cm}^{-1}$ for some municipal waters in Canada.

Regarding pollution levels, fats and oils average figures range from 196 to 339 ppm, exceeding 60 ppm the NOM-CCA-031-ECOL/93 permissible limit for waters used in agriculture.

¹Instituto de Geología, U.N.A.M. Ciudad Universitaria, México, D.F.

These levels are much higher than those reported by Sanchez (1985) from Valle del Mezquital, Hidalgo, with average values of 23 ppm of oils.

The high concentrations of the above substances may modify the physical and chemical soil conditions. Considering boron (B), its maximum values, in several places, exceed 0.75 ppm approved by NTE-CCA-032/91 for waters used in agriculture. However, these figures are lower than 1.33 to 2.83 mg l⁻¹ reported by Mendoza (1981) on irrigation waters from District 03 in Hidalgo.

On the other hand, soluble amounts of Cu, Zn, Co and Cd do not go further than permissible maximum limits given by NOM-CCA-032-ECOL/93 for agricultural waters. Nevertheless Cr, Ni and Fe on site 9, exceed permissible limits by NOM-CCA-032-ECOL/93. Also, Mn levels on sites 5 and 9, go beyond the accepted values by the last specification.

Index Words: Wastewater and heavy metals.

INTRODUCCION

Entre los problemas ambientales que México enfrenta actualmente, destacan la creciente contaminación de los cuerpos acuíferos y la disminución de las fuentes naturales de abastecimiento de agua, de las cuales se utiliza aproximadamente 60% para fines agrícolas y alrededor de 30% para uso doméstico e industrial. El agua que se utiliza con fines agrícolas, no obstante que es enorme, no satisface las necesidades de este recurso que son cada vez mayores, por lo que se ha tenido que implementar el uso del agua residual para este fin. Esta situación ha propiciado la degradación de los suelos por los efectos de las sales, detergentes, grasas y metales pesados presentes en las aguas residuales que se utilizan sin tratamiento alguno (Cajuste *et al.*, 1991; Gutiérrez, 1981; Mascareño, 1974; Méndez, 1982).

A diferencia de otros países, donde se utilizan aguas residuales previamente tratadas en la agricultura, en México, el único tratamiento que reciben en la mayoría de los casos, es aquel que se efectúa en forma natural, durante el recorrido del agua de las áreas urbanas a las zonas agrícolas y los canales de distribución (Carrillo *et al.*, 1992; Méndez *et al.*, 1992; Siebe, 1994). Esta situación ha provocado la introducción de contaminantes tóxicos a la cadena trófica, por lo que es necesario evaluar la dimensión de

los efectos que ocasiona la acumulación de metales pesados en el suelo, lo cual se refleja en los bajos rendimientos de los cultivos, así como en la calidad de los mismos. Aunque, en algunos Distritos de Riego, los rendimientos que se obtienen con el empleo de aguas residuales son altos, como es el caso del Valle del Mezquital donde más de 80,000 ha han sido beneficiadas con aguas residuales (Siebe, 1994), en este caso además de contemplar el rendimiento debe considerarse la problemática de la incorporación de sustancias tóxicas al suelo. En este contexto, de acuerdo con García (1990) a nivel nacional, la superficie bajo riego con aguas residuales es de 150,000 ha, utilizándose, aproximadamente 51 m³ seg⁻¹ generados por las descargas de unas 30 ciudades con más de 100,000 habitantes cada una. Entre estas ciudades se encuentran San Martín Texmelucan, Moyotzingo, Tlaxcala y Puebla que arrojan tanto las aguas municipales como las residuales al Río Atoyac. Una parte del agua de este río, después de ser almacenada temporalmente en las presas Independencia y Manuel Avila Camacho (Valsequillo), se utiliza en el Distrito de Riego 030 en Tecamachalco; mientras la mayor parte del agua del Río Atoyac sigue su curso hacia el Pacífico (INEGI; 1987). Se ha utilizado el agua de este río en algunas zonas intermedias importantes, como el Valle de Atlixco, Huaquechula e Izúcar de Matamoros, Edo. de Puebla, desde los años cuarenta en más de 3,000 ha cultivadas con maíz, alfalfa, frijol, plantas ornamentales, frutales y diversas hortalizas. En estas zonas, el uso del agua residual en la agricultura, sin previo tratamiento, ha incrementado significativamente los niveles de metales pesados en los suelos (Tamariz *et al.*, 1992), afectando las propiedades físicas y químicas de los mismos, además de su rendimiento, lo cual no ocurre en otros países, donde, por lo menos, se le da un tratamiento primario y secundario (Neilsen *et al.*, 1989).

A nivel nacional, el uso de las aguas residuales en el riego agrícola data de principios de siglo (Méndez, 1982). Actualmente, su uso se presenta dentro de un marco de escasez y conflicto por la gran demanda. Por un lado, están los efectos positivos de su uso incrementando la productividad agrícola y, por el otro, las aguas residuales que se emplean en el riego introducen al suelo metales pesados y otros contaminantes (Carrillo *et al.*, 1992; Mascareño, 1974; Siebe, 1994). En lo antes expuesto se basan los objetivos de este trabajo, enfocados a evaluar los

niveles de metales pesados, boro, grasas y aceites durante el muestreo anual del Río Atoyac en el trayecto Chiautla-Atlixco, Edo. de Puebla.

METODOLOGIA

El trabajo se realizó en el Río Atoyac, en el trayecto Chiautla-Atlixco, Edo. de Puebla, donde se ubicaron nueve sitios de muestreo que corresponden a: 1) La Soledad; 2) San Cristóbal; 3) San Cristóbal (Ameyales); 4) Moyotzingo; 5) drenaje zona industrial de Moyotzingo; 6) Zacatelco; 7) Puente Xoxtla; 8) antes de la ciudad de Puebla y 9) Atlixco (Figura 1).

Previo al muestreo, se realizaron varios recorridos de reconocimiento de la zona. El muestreo se efectuó en forma sistemática durante un año, se tomaron 108 muestras que se mantuvieron en refrigeración para los análisis de rutina y específicos. Para la determinación de grasas y aceites se añadió H_2SO_4 como conservador y, para metales pesados, las muestras fueron acidificadas con HNO_3 (US-Environmental Protection Agency, 1974). También fueron caracterizadas desde el punto de vista agrícola y de contaminación, según los siguientes análisis: actividad de los iones hidrógeno (pH) potenciométricamente y conductividad eléctrica (*in situ*) utilizando un puente de Wheatstone (Richards,

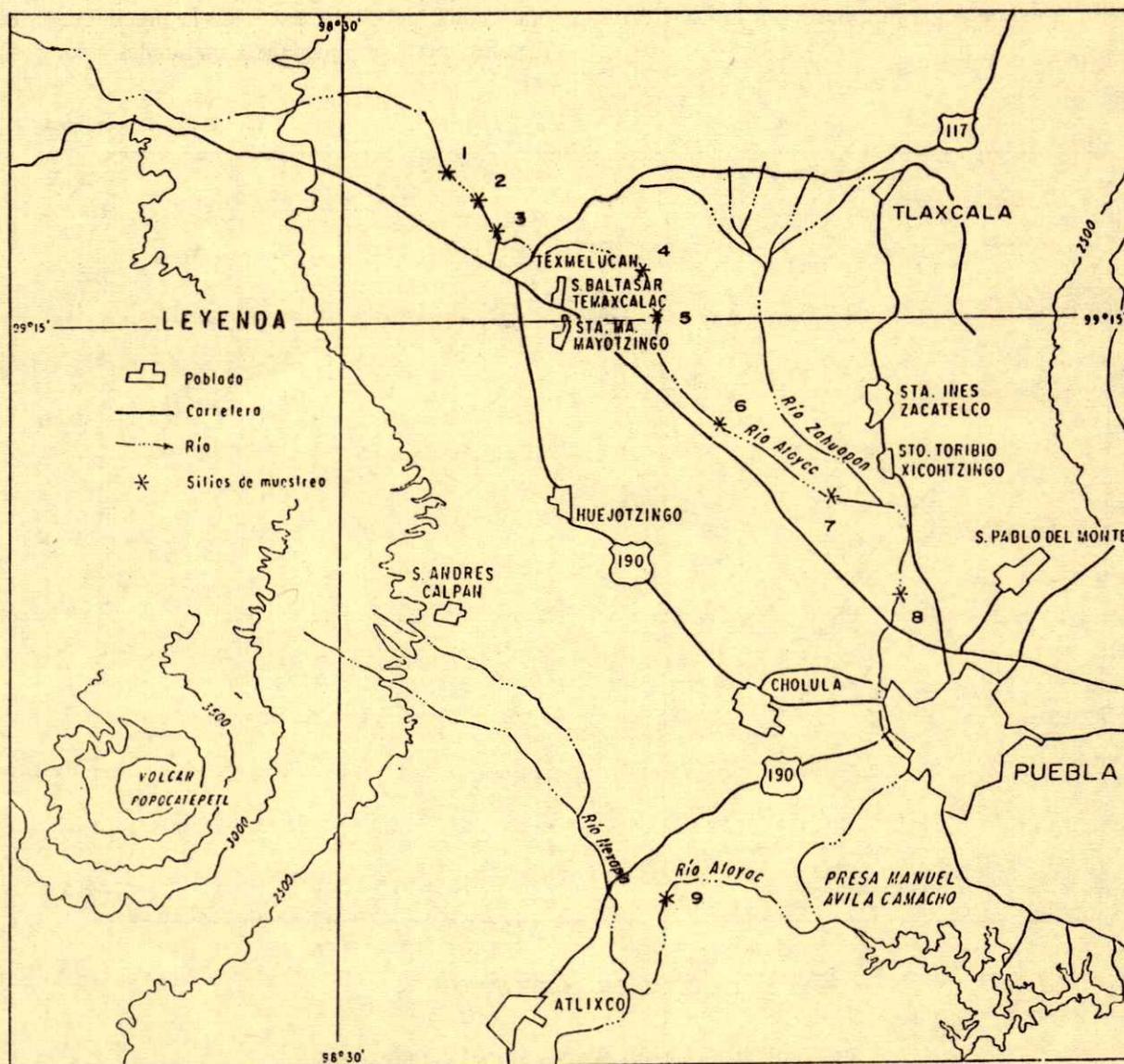


Figura 1. Localización del área de estudio y sitios de muestreo.

1994); ambas determinaciones fueron verificadas en el laboratorio; Ca^{2+} y Mg^{2+} se determinaron por el método del versenato (EDTA) 0.01 N y el Na^+ y K^+ por flamometría (APHA-AWWA-WPCF, 1994); CO_3^{2-} , HCO_3^- y Cl^- por titulación, los dos primeros con H_2SO_4 0.01 N empleando como indicadores fenolftaleína y anaranjado de metilo, respectivamente, y los Cl^- con AgNO_3 0.005 N utilizando como indicador cromato de potasio; los SO_4^{2-} se analizaron por precipitación con BaCl_2 , ambos aniones se determinaron de acuerdo con la metodología de la US-EPA (1974). Grasas y aceites se cuantificaron por el método de extracción Soxhlet y los metales solubles Fe, Cu, Mn, Zn, Pb, Cr, Co, Ni y Cd por espectrofotometría de absorción atómica de flama, ambos según la metodología propuesta por la US-EPA (1974).

RESULTADOS Y DISCUSION

El pH del agua del río Atoyac tiende a la alcalinidad durante el año en la mayoría de los sitios, observándose valores promedio de: 8.1, 8.0, 7.8, 7.7, 8.3, 8.0, 7.9, 7.6 y 7.7 para los sitios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 respectivamente (Cuadro 1; Figura 2). Estos valores y sobre todo los alcalinos (Hassanin *et al.*, 1993; Seaker, 1991) están contribuyendo a la precipitación de los metales pesados y, de esta manera, disminuyen la posibilidad de que se encuentren disponibles para las plantas, en forma muy semejante a lo que está ocurriendo en el Valle del Mezquital (Cajuste *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 1990; Méndez, 1982; Siebe, 1994), donde el pH alcalino, tanto del agua como del suelo, favorece la precipitación de los metales pesados quedando inmóviles, pero siguen

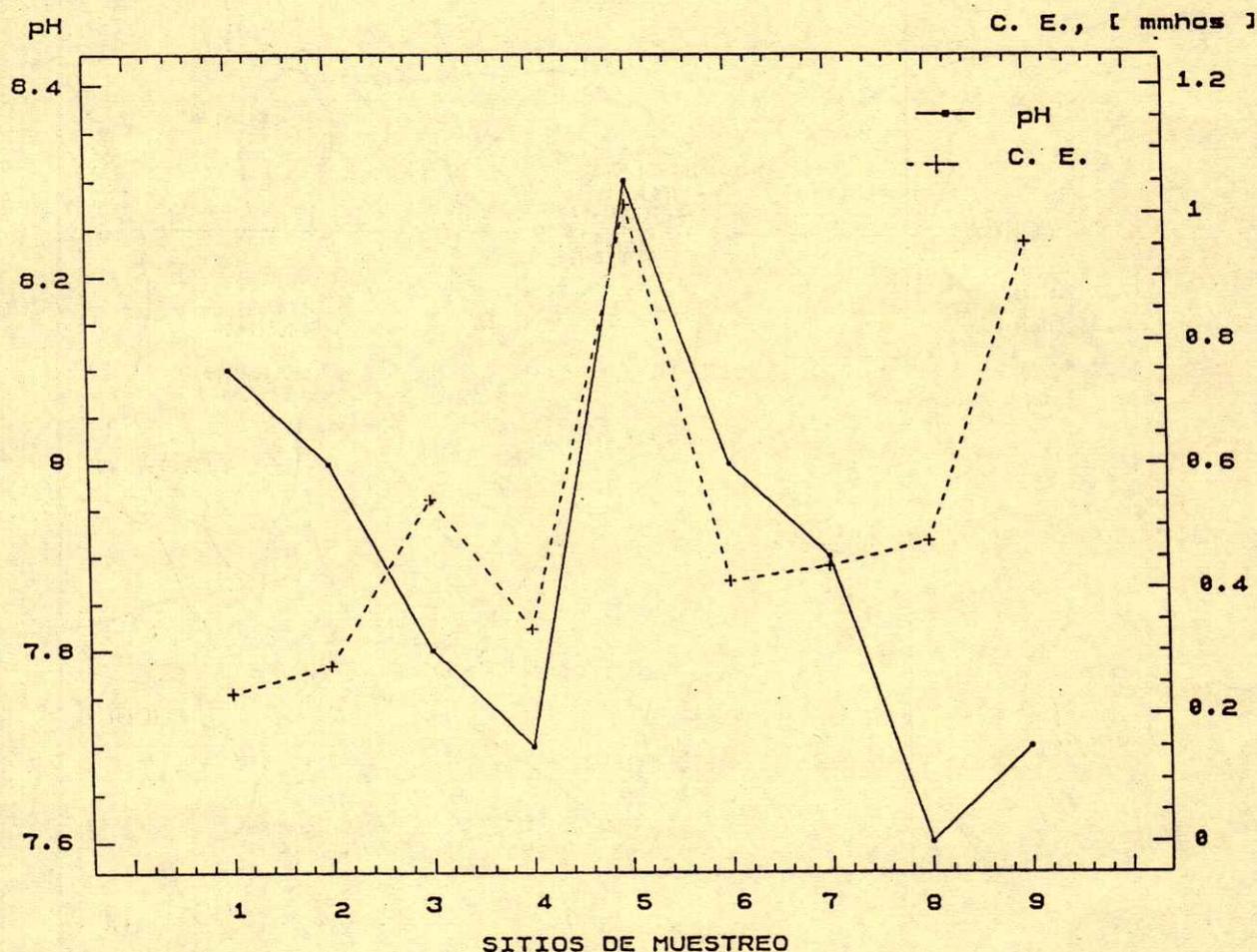


Figura 2. Fluctuaciones del pH y la CE en el río Atoyac.

representando cierto riesgo en el suelo, ya que si el pH del suelo disminuye, los metales pueden quedar disponibles para las plantas, lo cual puede ocurrir en Tecamachalco y Atlixco donde se emplea el agua del río Atoyac. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-CCA-032-ECOL/93) el pH de estas aguas se encuentra dentro de las concentraciones recomendadas por esta norma, a excepción del sitio 5, el cual permanece por arriba de los valores establecidos durante febrero, marzo, mayo, junio noviembre, con el máximo de 9.6 en el mes de mayo y la media de 8.3 (Cuadros 1 y 2; Figura 2). La alcalinidad de las aguas del río, sobre todo en los sitios 5 y 6, se debe a los aportes continuos de agua residual de las zonas industriales de San Martín Texmelucan y Moyotzingo (Rodríguez, 1992). Posteriormente, se presenta un efecto de dilución entre los sitios 7 y 8 que corresponden a los trayectos más largos del área muestreada. Además, en estos intervalos del río no existen descargas industriales. Por último, en el sitio 9, el pH aumenta nuevamente como se muestra en la Figura 2 y Cuadros 1 y 2, a consecuencia de la incorporación del agua residual, tanto de origen industrial como doméstico de las ciudades de Tlaxcala y Puebla. Los valores de pH en este trabajo son superiores a los reportados por Valera *et al.* (1990) en las aguas residuales de la planta Volkswagen en el Edo. de Puebla. Estos autores consideran, que los bajos valores de pH de 6.5 que ellos detectaron, se deben a las sustancias que incorpora la planta Volkswagen como resultado de los distintos procesos de producción. Los valores detectados en este trabajo superan también los presentes en las aguas residuales (Mendoza, 1981; Sánchez, 1985) que se emplean para riego en el Distrito de Riego 03 en el Edo. de Hidalgo. Mendoza y Sánchez encontraron una fluctuación de 7.05 a 7.55 y de 7.2 a 7.7, respectivamente. Sin embargo, los valores de pH encontrados en el río Atoyac coinciden con los de Méndez *et al.* (1990) cuyos valores de pH máximos fueron de 8.3 en las aguas residuales de la zona Metropolitana de la ciudad de México (ZMCM).

Al comparar la conductividad eléctrica con la relación de absorción de sodio, desde el punto de vista agrícola y de acuerdo con los criterios de Richards (1994), los sitios 1 y 2 corresponden a la clase C_1S_1 mientras los sitios 3, 4, 6, 7 y 8 se clasifican como clase C_2S_1 ; y los sitios 5 y 9 como clase C_3S_1 . En estos

últimos, los valores variaron de 640 a 1550 y de 370 a 1600 μS , con promedios de 1013 y 953 μS , respectivamente (Cuadros 1 y 2). Estos valores coinciden con los detectados por Valera *et al.* (1990) quienes reportaron 925 μS en las aguas residuales de la planta Volkswagen, antes de su incorporación al río Atoyac. Coinciden también con Neilsen *et al.* (1989) quienes mencionan valores de 853 a 1006 y una media de 931 $\mu S\ cm^{-1}$ en aguas municipales de Canadá. Tomando en cuenta el Criterio Ecológico de Calidad del Agua 001/89 (CE-CCA-001/89) que establece como límite 1000 μS para aguas residuales con fines agrícolas, en la zona de estudio los sitios 5, 6 y 9 tuvieron valores superiores a dicho criterio durante por lo menos un mes. Sin embargo, considerando la NOM-CCA-032/93, la cual establece un límite de 2000 μS , el agua del río, durante todo el año y en todos los sitios, permanecen muy por debajo de la norma (Cuadro 2). Si comparamos los valores de la conductividad eléctrica del agua del río, aún los valores más elevados son inferiores a los 1500, 1860 y 2200 μS que detectaron Mendoza (1981), Sánchez (1985) y Méndez *et al.* (1990), respectivamente, en las aguas residuales de la zona metropolitana de la ciudad de México, las cuales se utilizan para riego en el D.D.R. 03 del Edo. de Hidalgo. Lo anterior demuestra que, respecto a la CE, las aguas del río Atoyac muestran menos deterioro que las del Gran Canal de Desagüe de la ciudad de México.

Respecto a la salinidad efectiva, de acuerdo con los criterios de Richards (1994), los sitios 5, 7 y 9 se clasifican como de uso condicionado, ya que los valores promedio fueron 9.45, 4.73 y 7.15 meq l^{-1} , respectivamente (Cuadro 1), siendo los sitios 5 y 9 los más problemáticos respecto a esta variable, comparables únicamente a lo detectado por Sánchez (1985) quien menciona hasta 9.75 meq l^{-1} para el Túnel de Tequisquiatic. Los sitios 5 y 9 corresponden a las descargas de aguas residuales de la zona industrial de Moyotzingo y de la presa Independencia. A esta última, se incorporan, tanto las aguas de uso doméstico como las de las zonas industriales de las ciudades de Puebla y Tlaxcala (Figura 1). El mayor volumen de estas aguas se utiliza en el riego de una superficie considerable de suelos que corresponden al Distrito de Riego 030, en Tecamachalco y Atlixco, Edo. de Puebla.

Cuadro 1. Valores promedio durante un año de las características químicas y niveles de contaminación de las aguas del río Atoyac en el Estado de Puebla.

| Determinaciones | Sitios de Muestreo | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| pH | 8.1 | 8.0 | 7.8 | 7.7 | 8.3 | 8.0 | 7.9 | 7.6 | 7.7 |
| CE | 232 | 275 | 542 | 335 | 1013 | 410 | 433 | 474 | 953 |
| Ca ²⁺ | 0.950 | 1.220 | 2.210 | 1.460 | 1.600 | 1.490 | 1.460 | 1.940 | 4.800 |
| Mg ²⁺ | 1.800 | 1.600 | 2.870 | 1.630 | 3.090 | 1.580 | 2.120 | 1.510 | 2.920 |
| Na ⁺ | 0.650 | 0.740 | 0.820 | 0.980 | 4.800 | 0.940 | 1.100 | 1.460 | 2.400 |
| K ⁺ | 0.130 | 0.160 | 0.270 | 0.220 | 0.230 | 0.230 | 0.220 | 0.300 | 0.390 |
| CO ₃ ²⁻ | 0.200 | 0.300 | 0.400 | 0.200 | 2.200 | 0.400 | 0.900 | 0.300 | 0.700 |
| HCO ₃ ⁻ | 2.540 | 2.800 | 3.500 | 3.200 | 2.100 | 2.900 | 3.300 | 3.400 | 4.400 |
| Cl ⁻ | 0.546 | 0.611 | 0.708 | 0.716 | 1.525 | 0.856 | 0.795 | 0.851 | 1.941 |
| SO ₄ ²⁻ | 1.640 | 1.550 | 1.550 | 2.520 | 6.690 | 1.513 | 3.028 | 1.481 | 5.064 |
| SE | 2.720 | 2.910 | 3.010 | 3.760 | 9.450 | 3.490 | 4.730 | 3.510 | 7.150 |
| SP | 1.360 | 1.370 | 1.520 | 1.970 | 4.700 | 1.610 | 2.300 | 1.580 | 4.470 |
| RAS | 0.570 | 0.620 | 0.510 | 0.790 | 3.430 | 0.750 | 0.830 | 1.100 | 1.210 |
| Boro | 0.103 | 0.126 | 0.095 | 0.116 | 0.450 | 0.151 | 0.148 | 0.400 | 0.431 |
| Grasas | 196 | 339 | 321 | 235 | 234 | 337 | 289 | 303 | 271 |
| Fe | 0.481 | 0.602 | 0.032 | 0.536 | 0.119 | 0.363 | 0.417 | 0.720 | 1.430 |
| Cu | 0.011 | 0.008 | 0.008 | 0.016 | 0.016 | 0.009 | 0.010 | 0.011 | 0.017 |
| Mn | 0.062 | 0.033 | 0.008 | 0.032 | 0.012 | 0.030 | 0.042 | 0.122 | 0.260 |
| Zn | 0.017 | 0.011 | 0.010 | 0.024 | 0.257 | 0.026 | 0.023 | 0.046 | 0.034 |
| Pb | 0.043 | 0.051 | 0.063 | 0.065 | 0.057 | 0.061 | 0.058 | 0.059 | 0.081 |
| Cr | 0.004 | 0.004 | 0.005 | 0.004 | 0.005 | 0.003 | 0.003 | 0.004 | 0.013 |
| Co | 0.007 | 0.005 | 0.006 | 0.007 | 0.009 | 0.008 | 0.007 | 0.008 | 0.010 |
| Ni | 0.015 | 0.015 | 0.016 | 0.015 | 0.017 | 0.014 | 0.015 | 0.020 | 0.032 |
| Cd | 0.0008 | 0.0009 | 0.0008 | 0.0005 | 0.0007 | 0.0006 | 0.0007 | 0.0007 | 0.0011 |

Cuadro 2. Concentraciones máximas, mínimas y promedios de los sitios con mayores problemas en el río Atoyac, Estado de Puebla y su comparación con los criterios recomendados por SEDUE-SEDESOL.

NS = No se sanciona.

| Parámetro | Sitios de Muestreo | | | | | | | | | CE- CCA- 001/89 | NTE- CCA- 031/91 | NTE- CCA- 032/91 | NOM- CCA-032- ECOL/93 |
|-------------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | 5 | | | 8 | | | 9 | | | | | | |
| | Max | Min | X | Max | Min | X | Max | Min | X | | | | |
| pH | 9.6 | 7.1 | 8.3 | 8.3 | 6.5 | 7.6 | 8.6 | 7.2 | 7.7 | 6-9 | 6-9 | 6.5-8.5 | 6.5-8.5 |
| CE | 1550 | 640 | 1013 | 640 | 290 | 474 | 1600 | 370 | 953 | 1000 | 1000 | 2000 | 2000 |
| Ca ²⁺ | 2.20 | 0.860 | 1.600 | 2.800 | 0.880 | 1.940 | 8.000 | 1.320 | 4.800 | | | | |
| Mg ²⁺ | 8.96 | 0.360 | 3.090 | 3.470 | 0.470 | 1.510 | 4.840 | 1.100 | 2.920 | | | | |
| Na ⁺ | 12.43 | 0.370 | 4.800 | 2.260 | 0.220 | 1.460 | 4.340 | 0.530 | 2.400 | | | | |
| K ⁺ | 0.33 | 0.120 | 0.230 | 0.690 | 0.160 | 0.300 | 0.610 | 0.150 | 0.390 | | | | |
| CO ₃ ²⁻ | 16.80 | 0.000 | 2.200 | 1.200 | 0.000 | 0.300 | 1.200 | 0.000 | 0.700 | | | | |
| HCO ₃ ⁻ | 3.60 | 0.000 | 2.100 | 6.00 | 2.400 | 3.400 | 8.400 | 2.400 | 4.400 | 100.0 | | | |
| Cl ⁻ | 2.20 | 0.900 | 1.525 | 1.500 | 0.240 | 0.851 | 5.460 | 0.320 | 1.941 | 147.5 | | | |
| SO ₄ ²⁻ | 15.42 | 2.050 | 6.690 | 4.450 | 0.000 | 1.481 | 13.530 | 2.200 | 5.064 | 130.0 | | | |
| Grasas ppm | 788 | 16 | 234 | 938 | 21 | 303 | 748 | 41 | 271 | | | | 60 |
| Boro | 1.440 | 0.040 | 0.450 | 1.40 | 0.000 | 0.240 | 1.080 | 0.010 | 0.431 | 0.70 | | 0.75 | |
| Fe | 2.278 | 0.017 | 0.119 | 2.711 | 0.045 | 0.720 | 8.090 | 0.010 | 1.430 | 5.0 | | | 5.0 |
| Cu | 0.021 | 0.008 | 0.013 | 0.024 | 0.005 | 0.011 | 0.034 | 0.005 | 0.017 | 0.20 | 5.00 | 5.0 | 0.2 |
| Mn | 0.021 | 0.005 | 0.012 | 0.469 | 0.003 | 0.122 | 0.588 | 0.007 | 0.260 | | | 0.20 | 0.2 |
| Zn | 0.605 | 0.002 | 0.257 | 0.315 | 0.001 | 0.046 | 0.072 | 0.003 | 0.034 | 2.00 | 6.00 | 0.02 | 2.0 |
| Pb | 0.106 | 0.017 | 0.057 | 0.088 | 0.035 | 0.059 | 0.106 | 0.053 | 0.081 | 5.00 | 5.00 | 2.00 | 5.0 |
| Cr | 0.008 | 0.002 | 0.005 | 0.008 | 0.002 | 0.004 | 0.037 | 0.002 | 0.013 | 0.01 | 2.50 | | 0.1 |
| Co | 0.015 | 0.005 | 0.009 | 0.015 | 0.002 | 0.008 | 0.025 | 0.002 | 0.010 | | | | NS |
| Ni | 0.028 | 0.007 | 0.017 | 0.032 | 0.010 | 0.020 | 0.068 | 0.010 | 0.032 | 0.20 | 4.00 | 0.05 | 0.2 |
| Cd | 0.0014 | 0.0004 | 0.0007 | 0.0014 | 0.0004 | 0.0007 | 0.0024 | 0.0004 | 0.0011 | 0.01 | 0.50 | 0.01 | 0.01 |

La variable salinidad potencial indica que en la mayoría de los sitios, durante casi todo el año, el agua fue de buena calidad, ya que no rebasó los 3 meq l⁻¹ de salinidad potencial mencionados en la clasificación de Palacios y Aceves (1970), a excepción de los sitios 5 y 9 donde los valores promedio rebasan los 3 meq l⁻¹; por lo que se consideran como clase condicionada para el riego de cultivos sensibles (Cuadro 1; Figura 3). Estos resultados son semejantes a los reportados por Sánchez (1985), quien menciona hasta 6.48 meq l⁻¹.

Al analizar los resultados de los cationes Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ y K⁺, las mayores concentraciones correspondieron al calcio y al magnesio, principalmente en los meses de febrero, junio, noviembre y marzo en los sitios 5, 8 y 9, respectivamente, ya que los valores fluctuaron de 1.08 a 2.20; 0.88 a 2.80 y de 1.32 a 8.00 meq l⁻¹ con promedios de 1.60, 1.94 y 4.80

meq l⁻¹ de Ca²⁺; y 1.68 a 8.96; 0.47 a 3.47 y de 1.10 a 4.84 meq l⁻¹ con valores promedio de 3.09, 1.51 y 2.92 meq l⁻¹ de Mg²⁺, respectivamente (Cuadros 1, 2; Figura 4). Sin embargo, aunque estos elementos no son sancionados por las normas ni por los criterios ecológicos para aguas residuales con fines agrícolas, sí son los responsables de la dureza de las aguas (Rodier, 1990).

Los valores promedio, tanto de calcio como de magnesio en los sitios 5, 8 y 9 rebasan ligeramente las concentraciones detectadas por Mendoza (1981) en aguas residuales del Gran Canal con valores promedio de 1.22 y 2.35 meq l⁻¹ para calcio y magnesio, respectivamente; son muy semejantes a las reportadas por Neilsen *et al.* (1989) para algunas aguas municipales de Canadá con valores promedio de 3.0 y 2.0 meq l⁻¹ de Ca²⁺ y Mg²⁺, respectivamente. El dominio del Ca²⁺ y el Mg²⁺ sobre el Na⁺ y el K⁺ en el

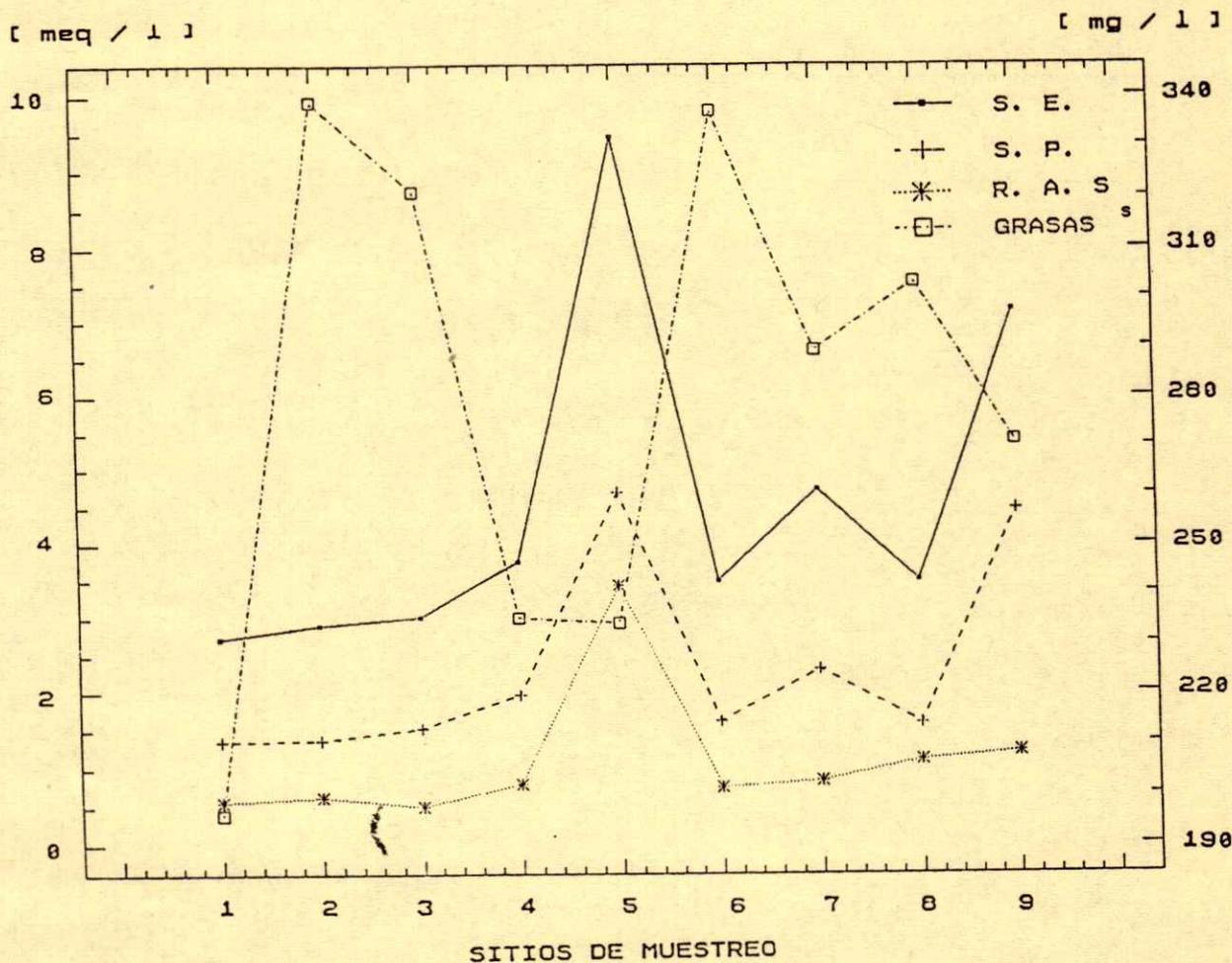


Figura 3. Fluctuaciones de la SE, SP, RAS y grasas en el río Atoyac.

agua del río Atoyac es importante, ya que al integrarse estos elementos al suelo se contrarrestan los posibles efectos del sodio (Bohn *et al.*, 1985). Esto no ha ocurrido en el Distrito de Riego 03, donde actualmente existen fuertes problemas de salinidad y sodicidad (Gutiérrez, 1981; Méndez, 1982).

Respecto al Na⁺ y K⁺, el comportamiento de ambos durante casi todo el año fue semejante, ya que los valores promedio del Na⁺ fueron 0.65, 0.74, 0.82, 0.98, 0.94, 1.10 y 1.46 meq l⁻¹ para los sitios 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8, respectivamente. Sin embargo, los sitios 5 y 9 presentan las mayores fluctuaciones de 0.37 a 12.43 y de 0.93 a 4.3 meq l⁻¹ y una media de 4.80 y 2.40 meq l⁻¹ respectivamente (Cuadros 1 y 2; Figura 4). Aunque, en general, los valores de sodio no son tan altos como los detectados por Mendoza (1981) en el agua de riego del Distrito de Riego 03, quien menciona

330 mg l⁻¹ (14.35 meq l⁻¹). No obstante, en los sitios 5 y 9, que son los más contaminados, se detectaron hasta 12.43 y 4.34 meq l⁻¹ respectivamente, lo cual podría originar serios problemas de sodicidad, sobre todo en San Martín Texmelucan y Moyotzingo que es donde se utilizan las aguas del sitio 5. En el caso del sitio 9, que corresponde a Atlixco, según los campesinos del lugar ya existen problemas de salinidad y sodicidad fomentados por la baja permeabilidad de los suelos de la zona, por lo que debe tenerse cuidado de que el uso del agua sea adecuado. En este caso las concentraciones altas de sodio, por tratarse de Vertisoles, pueden producir problemas de salinidad similares a los del Valle del Mezquital, Hidalgo. Por otro lado, algunos valores en el sitio 5 exceden los niveles máximos permisibles del CE-CCA-001/89 para aguas residuales con fines agrícolas (Cuadro 2).

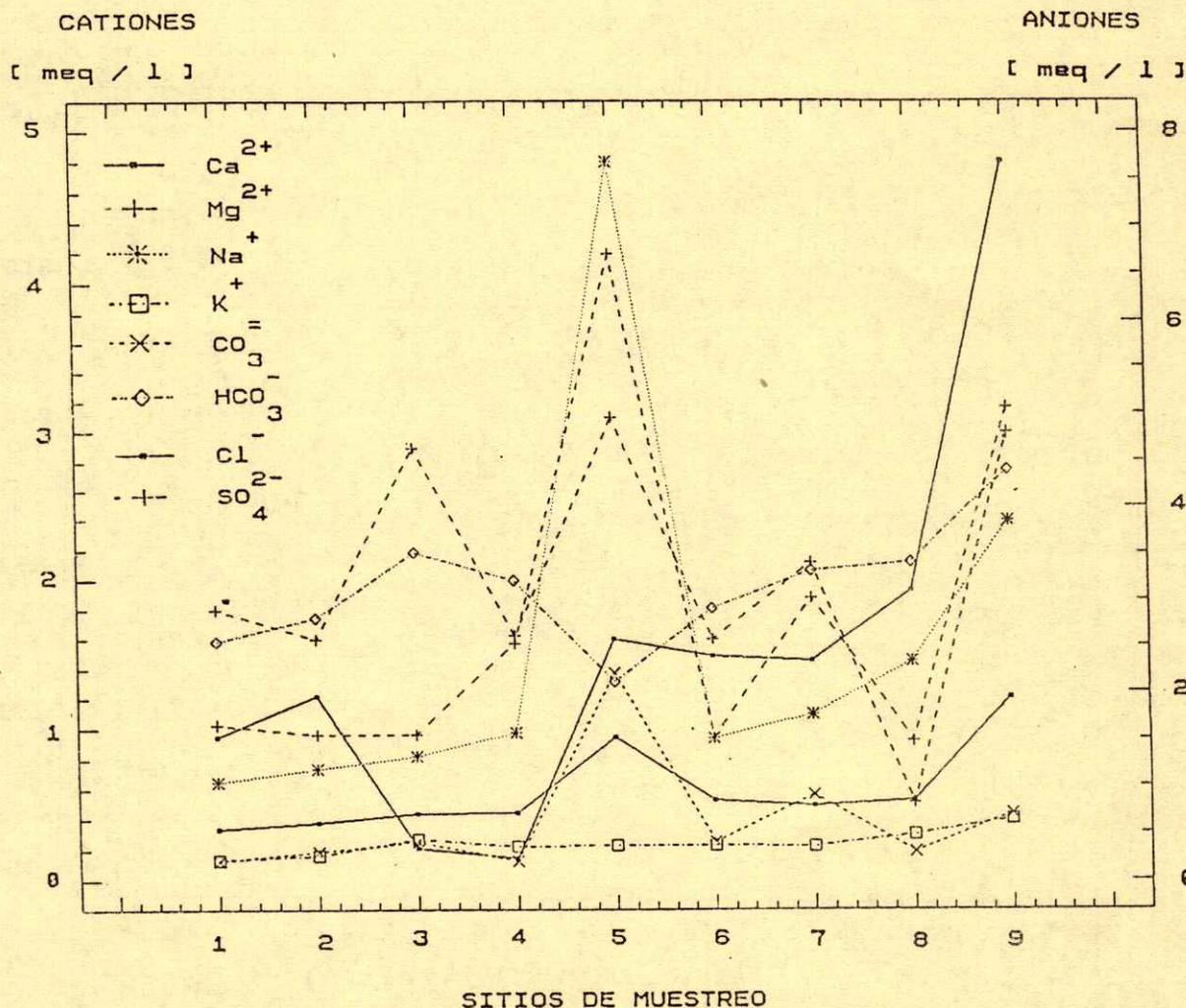


Figura 4. Fluctuaciones de los cationes y aniones en el río Atoyac.

Respecto al potasio, las mayores concentraciones se detectaron en los sitios 8 y 9 donde variaron de 0.16 a 0.69 y de 0.15 a 0.61 meq l⁻¹, con valores promedio de 0.30 y 0.39 meq l⁻¹, respectivamente (Cuadro 2; Figura 4).

Los valores de Na⁺ y CO₃²⁻ son los responsables de la alcalinidad durante la mayor parte de la trayectoria del río Atoyac, persistiendo los valores de pH altos los que, conjuntamente con la conductividad eléctrica, permiten clasificar el agua como de uso condicionada en la agricultura, sobre todo en los sitios 5 y 9 (Cuadro 1 y 2; Figura 4) (Valera *et al.*, 1990). Sin embargo, respecto al Na⁺, las concentraciones son inferiores a las encontradas por Mendoza (1981), Sánchez (1985) y Méndez (1985) en el Distrito de Riego 03, donde el último autor menciona valores de sodio que fluctuaron de 3.73 a 16.43 meq l⁻¹ con una media de 9.35 meq l⁻¹.

El ión sodio, por su abundancia en las aguas del río Atoyac, podría originar problemas en los suelos donde se utilizan estas aguas con fines agrícolas, como es el caso del municipio de Atlixco y el Distrito de Riego 030 (D.R. 030), donde hay suelos arcillosos susceptibles de ser afectados pues, de acuerdo con Richards (1994), al desplazar el Na⁺ al Ca²⁺ y al Mg²⁺ de los sitios de intercambio se originan problemas de sodicidad, produciendo efectos importantes en el desarrollo de las plantas a través de modificaciones estructurales adversas en el suelo, dispersándolo, disminuyendo su aireación, y afectando la disponibilidad de agua, así como originando alteraciones nutricionales.

De los aniones analizados, los CO₃²⁻ son los menos frecuentes durante el año (Cuadro 1) a excepción de abril y mayo donde se detectaron cantidades considerables de este anión, el cual, al combinarse con el Na⁺ influyó a elevar el pH. Sin embargo, en los sitios 5, 6 y 7 la presencia de CO₃²⁻ fue más frecuente, detectándose hasta 16.80 meq l⁻¹ en el sitio 5 en el mes de mayo (Cuadro 2) ya que este sitio es el que recibe la mayor influencia de aguas residuales, tanto de origen doméstico como industrial. La ausencia de CO₃²⁻ en las aguas que se utilizan en la agricultura es importante, ya que es uno de los iones que al combinarse con el Na⁺ origina serios problemas en la agricultura (Richards, 1994).

Respecto a los HCO₃⁻, su concentración fue muy heterogénea, encontrándose, en varios sitios, en cantidades superiores a las permitidas por el CE-CCA-001/89 para el uso de aguas residuales con fines

agrícolas. En los sitios 4, 7, 8, 3 y 9 se encontraron promedios de 3.20, 3.30, 3.40, 3.50 y 4.40 meq l⁻¹, respectivamente (Cuadros 1 y 2; Figura 4), rebasando los 100 mg l⁻¹ aceptados por el CE-CCA-001/89. Aunque la presencia de HCO₃⁻ es considerable, las altas concentraciones de los mismos no son tan perjudiciales como las de CO₃²⁻ que se encuentran presentes, como ocurre en la época de estiaje en el trayecto del río Atoyac; sin embargo, los HCO₃⁻ al llegar al suelo (Bohn *et al.*, 1985), su retención, aunque es débil, puede formar complejos estables con el Ca²⁺, Mg²⁺ y Al³⁺, los cuales al precipitarse forman sales neutras o ligeramente ácidas, que pueden repercutir en el pH del suelo y éste, a su vez, puede liberar los metales pesados que se encuentren precipitados en los suelos que han sido regados con aguas residuales durante varios años, por ejemplo en el Distrito de Riego 030 y Atlixco. Los HCO₃⁻ ejercen efectos tóxicos específicos en frijol, zacate y remolacha, en los cuales afectan el metabolismo, presentándose alteraciones con el calcio, potasio y magnesio; induciendo clorosis y disminuyendo la actividad de las bacterias del suelo (Richards, 1994).

Las concentraciones de Cl⁻, en la mayoría de los sitios y durante casi todo el año, indican que este anión está en concentraciones inferiores a los límites aceptados por el CE-CCA-001/89, a excepción de algunas muestras del sitio 9 en el que se incorporan las aguas residuales de tipo doméstico de la ciudad de Puebla, donde las mayores cantidades fueron de 5.46 meq l⁻¹ (Cuadros 1 y 2; Figura 4).

La presencia de los SO₄²⁻ en las aguas del río Atoyac es semejante a los HCO₃⁻ en su heterogeneidad, en los distintos sitios durante el año; las mayores concentraciones se encontraron en los sitios 5 y 9 con valores de 15.42 y 13.53 meq l⁻¹, respectivamente (Cuadro 2; Figura 4). Tanto estas cantidades como los valores promedio están por encima de las detectadas por Mendoza (1981), superando, también, las permitidas por el CE-CCA-001/89. Bohn *et al.* (1985) y Alloway (1990) mencionan que después de los carbonatos y fosfatos, los sulfatos son los aniones que forman los complejos de metales pesados más estables y más perjudiciales en los suelos, pero también de los más tóxicos.

Las concentraciones de grasas y aceites detectadas durante el año en los nueve sitios fueron muy heterogéneas, ya que fluctuaron desde 16 hasta 938 ppm. Sin embargo, las mayores concentraciones

encontradas fueron 938, 798, 788 y 748 ppm que corresponden a los sitios 8, 6, 5 y 9, respectivamente. Estas cantidades son inferiores a los valores de grasas reportados por Valera *et al.* (1990) de hasta 1419 ppm en las aguas residuales de la planta Volkswagen, lo que indica una dilución de este contaminante al incorporarse las aguas residuales de esta empresa al río Atoyac. Los valores promedio para los distintos sitios, durante el año, fluctuaron de 196.92 a 339.33 ppm; estas cantidades exceden los límites máximos permisibles por la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (1989) que establece como máximo 70 mg l⁻¹ para aguas residuales; la NOM-CCA-032-ECOL/93 establece como máximo 60 ppm para aguas de uso agrícola (Cuadros 1 y 2; Figura 3). Por otro lado, Valera *et al.* (1990) al cuantificar las grasas y aceites en el manto

freático, de los terrenos aledaños a la descarga ilegal de agua residual de la Volkswagen, detectaron únicamente 40.0 ppm de este contaminante, concluyendo que la mayor parte de las grasas del agua se quedan adheridas a las partículas del suelo, alterando su estructura y permeabilidad. Los valores encontrados en este trabajo, también, son inferiores a los detectados por Méndez *et al.* (1990) en aguas residuales del D.D.R. 063 en el Estado de Hidalgo, con valores hasta 6020 ppm y, para esta misma zona, Mendoza (1981) detectó 96 ppm en 1979.

Respecto a los valores promedio de boro en los nueve sitios durante el año, estos indican que se encuentran dentro de los límites establecidos por la NTE-CCA-032/91 (Cuadro 1; Figura 5). Sin embargo, se observó que los valores máximos en los sitios 5, 8 y 9, en los meses de junio, agosto, septiembre y octubre,

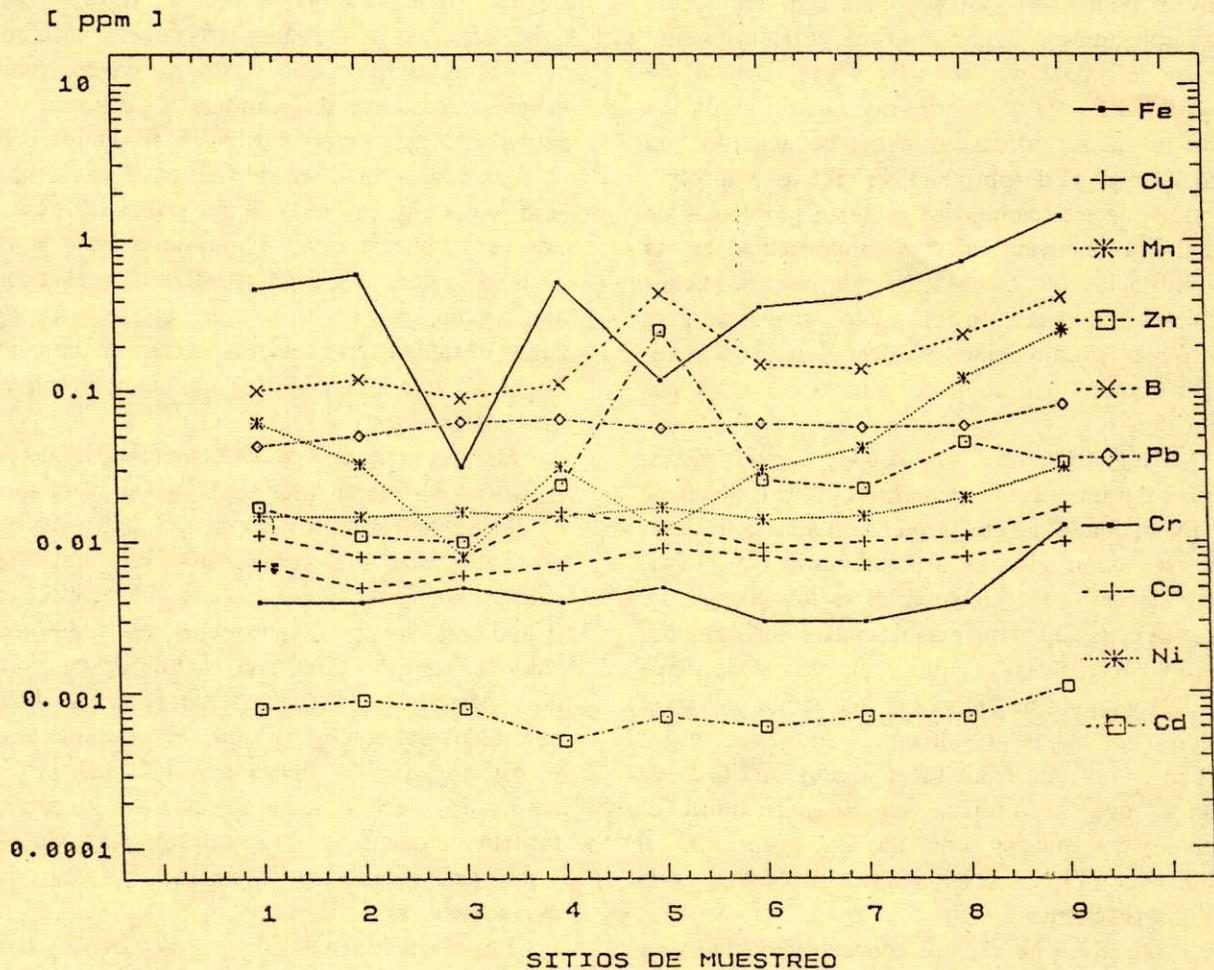


Figura 5. Variación de metales pesados y boro en el agua del río Atoyac.

rebasaron el límite permisible (Cuadro 2; Figura 5). Estas concentraciones podrían originar algunos problemas en cultivos sensibles al boro, ya que la Water Quality Criteria (US-EPA, 1972) indica que, aunque el boro es un elemento esencial para las plantas, pero éstas lo requieren en pequeñas concentraciones, por lo que cantidades superiores a 0.5 ppm pueden originar toxicidad en ciertos cultivos, mientras las plantas tolerantes soportan hasta 4.0 ppm.

Los niveles promedio de los metales solubles: Fe, Cu, Mn, Zn, Pb, Cr, Co, Ni y Cd, a excepción del Mn que se encontró excedido en los nueve sitios durante el año, indican que éstos se encuentran dentro de los niveles permisibles por la NTE-CCA-032/91. En el caso del Fe, en general, los valores detectados son semejantes a los encontrados por Valera *et al.* (1990) en aguas residuales de la planta Volkswagen, quienes mencionan 2.1 ppm, sin embargo, el valor máximo detectado en el río Atoyac supera lo detectado por estos autores.

Aunque, las concentraciones promedio de hierro en el río Atoyac, en general, no rebasan las 5.0 ppm, éstas son considerables, ya que rebasan el valor promedio (0.2567 ppm) detectado por Méndez y Guajardo (1985) en el agua empleada para riego en los suelos del D.D.R. 03 en el Edo. de Hidalgo que, hasta la fecha, es una de las zonas más impactadas por el uso de aguas residuales. Por lo tanto, es recomendable que el río Atoyac sea monitoreado continuamente, sobre todo en los sitios 5, 8 y 9, así como los suelos de las zonas de San Martín Texmelucan, Atlixco y Tecamachalco, que son las áreas agrícolas más contaminadas cercanas a los tramos del río Atoyac, monitoreadas en este trabajo.

Los valores promedio de manganeso, a excepción de los sitios 3, 5 y 8, exceden los límites de la NOM-CCA-032-ECOL/93 que establece hasta 0.02 ppm (Cuadro 1; Figura 5). Las cantidades de Mn son inferiores a las encontradas por Valera *et al.* (1990) de 1.9 mg l⁻¹ en aguas residuales de la Volkswagen, donde los valores tan altos, respecto a lo permisible, se deben quizá al amplio uso del Mn en la industria automotriz.

Las concentraciones promedio de Ni y Cr, a excepción de este último en el sitio 9, son inferiores a los niveles máximos permisibles (Cuadro 1; Figura 5). Respecto al Ni, aún los valores más altos registrados son inferiores a los detectados por Mendoza (1981), Méndez *et al.* (1990) y Carrillo *et al.* (1992) quienes mencionan valores de 0.19, 0.15 y 0.21 ppm,

respectivamente. Los niveles de cromo en el río Atoyac, a excepción del sitio 9, son inferiores a 0.01 ppm, nivel establecido como máximo para aguas de riego por el CE-CCA-001/89, y son inferiores, también, a los detectados por Mendoza (1981), Sánchez (1985), Valera *et al.* (1990), Méndez *et al.* (1990) y Cajuste *et al.* (1991), quienes mencionan 0.35, 0.21, 1.00, 0.10 y 0.11 ppm, respectivamente. Los valores detectados de Cu, Zn, Pb, Co y Cd resultaron inferiores a los niveles máximos permisibles por la Norma Oficial Mexicana (1993) y la US-EPA (1973) (Cuadros 1 y 2; Figuras 4 y 5). La mayoría de estos valores son inferiores, también, a los encontrados por varios autores que han evaluado los niveles de metales pesados en aguas residuales usadas con fines agrícolas en el Edo. de Hidalgo (Cajuste *et al.*, 1991; Carrillo *et al.*, 1992; Méndez *et al.*, 1990; Méndez y Guajardo, 1985; Mendoza, 1981; Sánchez, 1985; Siebe, 1994) y Valera *et al.* (1990) en el Edo. de Puebla.

CONCLUSIONES

Las aguas del río Atoyac, en la mayor parte de su recorrido, tienden a la alcalinidad, son ligeramente salinas sobre todo en los sitios 5 y 9 por lo que corresponden a la clase C₂S₁. De acuerdo con la salinidad efectiva, las aguas de este río son de uso condicionado. Sin embargo, con respecto a la salinidad potencial, al carbonato de sodio residual y porcentaje de sodio posible, son de buena clase.

El Na⁺, los HCO₃⁻, SO₄²⁻ y los Cl⁻ son los iones que rebasan con mayor frecuencia los criterios establecidos por la SEDUE, sobre todo en los sitios 5 y 9 durante los meses de febrero a junio, mientras que las grasas se encuentran excedidas durante todo el año. Sin embargo, la mayoría de los iones están en niveles inferiores a los detectados en el D.D.R. 03.

Los valores promedio de boro durante el año, en los nueve sitios, indican que este elemento se encuentra dentro de los límites permisibles, a excepción de los sitios 5, 8 y 9, donde se rebasaron las 0.75 ppm, sin embargo, estos valores son también inferiores a los detectados en el D.D.R. 03, Edo. de Hidalgo.

Las concentraciones de metales pesados Cu, Zn, Pb, Co y Cd se detectaron dentro de los niveles permisibles por SEDUE y la US-EPA para aguas residuales con fines agrícolas. Siendo, además inferiores a las concentraciones que se han encontrado

en el DD.R. 03 del Edo. de Hidalgo. Sin embargo, los valores promedio de Mn se encontraron excedidos durante todo el año en los sitios 1, 2, 4, 6, 7, 8 y 9. En los sitios 3 y 5 también los valores excedieron la normatividad, pero resultaron inferiores a los valores detectados por Valera *et al.* (1990) en las aguas residuales de la planta Volkswagen, y a los valores mencionados por varios autores en el D.D.R. 03.

Las cantidades detectadas de Fe, Cr y Ni se encontraron, en general, dentro de los niveles permisibles en casi todos los sitios durante todo el año, a excepción del sitio 9 donde estos tres elementos rebasaron el límite permisible durante febrero y mayo, coincidiendo con la época de estiaje. Sin embargo, los niveles de Fe, Cr, y Ni son inferiores a los detectados en el D.D.R. 03.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al I.Q. Alfonso Salas Cruz su apoyo en el manejo estadístico de los datos.

LITERATURA CITADA

- Alloway, B.J. 1990. Heavy metals in soils. John Wiley and Sons, N.Y. US: 339 p.
- APHA-AWWA-WPCF. 1994. Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater. American Public Health Association. 15th Edition. Washington, D.C. 1134 p.
- Bohn, H.L., B.L. McNeal y G.A. O'Connor. 1985 Soil Chemistry. John Wiley and Sons. NY 341 p.
- Carrillo G., R., L.J. Cajuste y L. Hernández H. 1992. Acumulación de metales pesados en un suelo regado con aguas residuales. Revista Terra 10-2: 166-173.
- Cajuste, L.J., R. Carrillo G., E. Cota G. y J.R Laird. 1991. The distribution of metals from wastewater in the Mexican Valley of Mezquital. Water, Air and Soil Pollution 57-58: 763-771.
- CE-CCA-001/89. Gaceta Ecológica. 1990. Volumen II, No. 6.
- García, O.J. 1990. Experiencia Tecnológica del Aprovechamiento del Agua Residual en la Agricultura. Comisión Nacional del Agua. IMTA.
- Gutiérrez, R.M. 1981. Estudio del contenido de iones inorgánicos en suelos y plantas de los Distritos de Riego 03 y 88. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. 251 p.
- Hassanin, A.S., T.M. Labib y A.T. Dabal. 1993. Potential Pb, Cd, Zn and B contamination of sandy soils after different irrigation periods with sewage effluent. Water, Air and Soils Pollution. 66: 239-249.
- Hernández, S.G., Maples, V.M., D. Hernández S., G. Solorio M. y G. Villarreal L. 1990. Tendencias en la acumulación de metales pesados en los suelos del Distrito de Desarrollo Rural 063, Edo. de Hidalgo, por efecto del riego con aguas negras. Primer Simposio Nacional de Degradación del Suelo. Instituto de Geología, UNAM. p. 46.
- INEGI. 1987. Síntesis Geográfica, Nomenclator y Anexo Cartográfico del Estado de Puebla. SPP.
- Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. 1989. 2a. Edición. Editorial Porrúa. 437 p.
- Mascareño, C.F. 1974. Estudio preliminar sobre contaminación de los suelos y de la producción agrícola en el Distrito de Riego 003, por el uso de aguas negras de la Ciudad de México. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 144 p.
- Méndez, G.T. 1982. Estudio sobre contaminación de los suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hgo., por ABS, boro y metales pesados por el uso de aguas negras de la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 125 p.
- Méndez G., T. y R. Guajardo V. 1985. Contaminación de las aguas negras de la Ciudad de México por boro, ABS y metales pesados. Revista Terra 3: 3-6.
- Méndez G., T., R. Guajardo V. y L. Fernández H. 1990. Impacto en los suelos del DDR 063 por el efecto de detergentes, boro, grasas y aceites presentes en las aguas residuales de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Primer Simposio Nacional de Degradación de Suelos. Instituto de Geología, UNAM. p.44.
- Méndez G., T., L. Güevara D., R. Guajardo V. y R. Huizar A. 1992. Contaminación de las aguas residuales de las ciudades de Pachuca, Tizayuca y Sahagún, Hgo., por metales pesados. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Acapulco, México. p. 108.
- Mendoza, M.H. 1981. Land treatment: A viable solution for management of wastewater in the Metropolitan Area of the Valley of Mexico. Academic Press, Inc. pp. 163-193.
- Neilsen G.H., D.S. Stevenson y J.J. Fitzpatrick. 1989. The effect of municipal wastewater irrigation and rate of N fertilization on petiole composition, yield and quality of Okanagan riesling grapes. Can J. Plant Sci. 69:1285-1294.
- NOM-CCA-031-ECOL/93. Diario Oficial de la Federación. 1993.
- NOM-CCA-032-ECOL/93. Diario Oficial de la Federación. 1993.
- NTE-CCA-032/91. Diario Oficial de la Federación. Septiembre de 1991.
- Palacios V., O. y E. Aceves N. 1970. Instructivo para el muestreo, registro de datos e interpretación de la calidad del agua para el riego agrícola. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México 49 p.
- Richards, L.A. 1994. Diagnóstico y Rehabilitación de Suelos Salinos y Sódicos. Editorial Limusa, México. 171 p.
- Rodier, J.M. 1990. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y aguas de mar. Ediciones Omega. 1059 p.
- Rodríguez D., L. 1992. Evaluación de los grados de contaminación del Río Atoyac por (Pb, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Mn y Zn), surfactantes, boro, grasas y aceites en el transecto Chiautla-Atlixco, Edo. de Puebla. Tesis de Licenciatura. ENEP-Zaragoza, UNAM 121 P.
- Sánchez D., N. 1985. Mexican Experience in using Sewage Effluent for Large Scale Irrigation. FAO. p.1-10.

- Seaker, E.M. 1991. Zinc, Copper, Cadmium and Lead in minespoil, water and plants from reclaimed mine land amended with sewage sludge. *Water, Air and Soil Poll.* 57-58: 849-859.
- Siebe, Ch. 1994. Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residuales en el DDR 03, Tula, Hgo., México. *Revista Int. Contam. Ambient.* 10 (1): 15-21.
- Tamariz, F.J.V., R. Guajardo V. y A. Cruz M. 1992. Disponibilidad de metales en tres suelos del Edo. de Puebla. *Memorias del XXV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo.* Acapulco, México.p.104.
- US-EPA. 1972. *Water Quality Criteria.* Environmental Protection Agency. Washington, D.C.
- US-EPA. 1973. *Water Quality Criteria.* Environmental Protection Agency. Washington, D.C.
- US-EPA. 1974. *Methods for chemical analysis of water and wastes: US Environmental Protection Agency.* Washington, D.C. 295 p
- Valera P., M.A., A. Cruz M., A. Ticante R. y J.L. García O. 1990. Modificación de las propiedades de un suelo por la adición de agua contaminada con grasas y aceites. 1er. *Simposio Nacional de Degradación del Suelo.* Instituto de Geología, UNAM.p. 36.

LONG-TERM EFFECT OF DAIRY MANURE ON FORAGE YIELDS AND SOIL PROPERTIES IN AN ARID IRRIGATED REGION OF NORTHERN MEXICO

Efecto de Largo Plazo de la Aplicación de Estiércol de Ganado Lechero sobre el Rendimiento de Forrajes y las Propiedades del Suelo en una Region Arida Irrigada del Norte de México

J. Z. Castellanos¹, J. J. Marques-Ortiz², J. D. Etchevers³, A. Aguilar-Santelises⁴, J. R. Salinas¹

SUMMARY

The long-term effect of dairy manure application on forage yield of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and silage corn (*Zea mays* L.), and on soil chemical and physical characteristics were evaluated in northern Mexico. Five manure treatments were evaluated from 1981 to 1987: 1) a control with no manure, 2) 30 t ha⁻¹ year⁻¹, 3) 60 t ha⁻¹ year⁻¹, 4) application of 120 t ha⁻¹ year⁻¹ (in 1981 and 1985 only), and 5) a single application of 240 t ha⁻¹ in 1981. Annual ryegrass was sown in the winter and silage corn in the summer. All of the plots received recommended rates of N and P fertilizers for northern Mexico. Application of dairy manure had significant ($p < 0.05$) positive effects during all the years for dry matter yield of annual ryegrass but only during some years for corn. Dairy manure significantly increased ($p < 0.05$) soil water infiltration, organic matter and phosphorus concentration, and reduced ($p < 0.05$) soil bulk density. Low frequent rates of manure application were more beneficial than application of large non-frequent single rates. Application of manure in Xerosols provides a complementary source of N to increase ryegrass yields per harvest and has potential to improve soil physical conditions for the arid land of northern Mexico.

Key words: Rye grass, maize, water intake, bulk density, organic matter.

¹ Campo Experimental Bajío-INIFAP. Apdo. Postal 112, 38000 Celaya, Gto., México. ² Campo Experimental La Laguna-INIFAP. Apdo. Postal 247, Torreón, Coah., México. ³ Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillo, México. ⁴ Universidad Autónoma Chapingo, México. Correspondence author: J.Z. Castellanos, Campo Experimental Bajío, Apdo. Postal 112, 38000 Celaya, Gto., Mexico. email: casteja @ cirpac.inifap.conacyt.mx .

Aceptado: Junio de 1996.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de la aplicación de estiércol de ganado lechero sobre la producción de forraje de ballico anual y de maíz forrajero y sobre las propiedades físicas y químicas de un suelo migajón arcilloso del norte de México. Se evaluaron cinco tratamientos de estiércol: 1) Testigo sin aplicación, 2) 30 t ha⁻¹ año⁻¹, 3) 60 t ha⁻¹ año⁻¹, 4) 120 t ha⁻¹ año⁻¹ (en 1981 y en 1985 solamente), y 5) una sola dosis de 240 t ha⁻¹ en 1981. Se sembró ballico anual durante el invierno y maíz forrajero durante el verano. Todas las parcelas recibieron las dosis recomendadas de N y P mediante urea y superfosfato triple, respectivamente. La aplicación de estiércol tuvo efectos significativos ($p < 0.05$) positivos sobre el rendimiento de ballico anual durante todos los años y cortes, pero sólo durante algunos años en el maíz. La aplicación de estiércol incrementó significativamente ($p < 0.05$) la velocidad de infiltración del agua, el contenido de materia orgánica del suelo y la concentración de fósforo y redujo ($p < 0.05$) la densidad aparente del suelo. Las dosis bajas de estiércol aplicadas frecuentemente fueron más efectivas que las dosis altas equivalentes aplicadas con poca frecuencia. La aplicación de estiércol a los suelos Xerosoles del norte de México es una fuente complementaria de nitrógeno para incrementar el rendimiento de ballico anual y tiene el potencial de mejorar las propiedades físicas del suelo para las condiciones semiáridas del norte de México.

Palabras clave: Zacate ballico, maíz, infiltración, densidad aparente, materia orgánica.

INTRODUCTION

Increasing demand of milk and beef products has resulted in proliferation of dairy and beef cattle

industries under confinement in the arid zones of northern Mexico. Most arid soils are low in organic matter and, in many cases, they present physical problems (Castellanos *et al.*, 1989). Therefore, incorporation of dairy manure to these soils is a suitable alternative to dispose of animal waste and to improve fertility of irrigated arid soils.

Animal manure improves soil fertility by supplying macro and micronutrients to the soil (Bouldin *et al.*, 1984; Castellanos and Pratt, 1981; Pratt *et al.*, 1973; Sommers and Sutton, 1980), and by improving soil physical properties (Mathers *et al.*, 1980; Meek *et al.*, 1982)

Despite a considerable amount of research devoted to studying the effect of manure application to the soil on forage yield and soil properties, few studies have been focused on arid regions and most of them were short term studies.

The objective of this study was to evaluate the long term effect of dairy manure application to the soil on forage yields of ryegrass and corn, and on the physical and chemical properties of a clay loam Xerosol soil.

MATERIALS AND METHODS

This research was conducted at La Laguna Experiment Station, 17.5 km east of Torreon, Coahuila, located in north central Mexico. Average annual precipitation at the site is 234 mm with an average annual temperature of 21 °C. The experiment was established in 1981 on a calcareous clay loam Xerosol with 1% organic matter, 14.2% CaCO₃ and pH of 8.0.

The experiment lasted from September 1981 to August 1987. The experimental design was a randomized complete block with four replications. Experimental units consisted of 9 x 9 m plots. Dairy manure application treatments were: 1) a control with no manure, 2) 30 t ha⁻¹ year⁻¹, 3) 60 t ha⁻¹ year⁻¹, 4) application of 120 t ha⁻¹ year⁻¹ (in 1981 and 1985 only), and 5) a single application of 240 t ha⁻¹ in 1981. Dairy manure was obtained from an open lot. Each year, manure moisture content (fresh weight basis), organic carbon and nitrogen content (dry weight basis) were analysed and C/N ratios were calculated. Manure was applied and incorporated by plowing and disking

between late September and early October from 1981 to 1986, prior to the planting of annual rye grass. After the rye grass crop the soil was plowed and disked during May each year, before planting the corn crop.

Annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) cv. Oregon was sown every year in all plots after manure incorporation. A basic fertilization of 80 kg N ha⁻¹ and 60 kg P₂O₅ ha⁻¹ was applied at sowing to all treatments. A rate of 60 kg N ha⁻¹ was applied after each cutting. Annual ryegrass was harvested four to five times during the winter. Water applied during the growing season consisted of seven to eight 10 cm irrigations. Dry matter yield was determined after each harvest. Samples of the plant material were dried in a forced air oven for 72 h at 60°C. Samples were ground and analyzed for total N (AOAC, 1984). The ryegrass growing season ended in May, then the ryegrass was plowed and the soil disked.

Silage corn was planted after ryegrass between late May and early June. The ryegrass-corn rotation was repeated every year. Cultivar BJ-1 was grown in 1981 and 1982; and the hybrid H-412 from 1983 to 1986. Fertilization of corn consisted of 150 kg N ha⁻¹ in 1981. In subsequent years, nitrogen was applied to this crop at a rate of 200 kg ha⁻¹. In all years N was splitted in two applications and every year corn was fertilized with 60 kg P₂O₅ ha⁻¹ at planting. Water applied during the corn growing season consisted of four 12 cm irrigations. Dry matter yields of the aerial part were measured when harvesting at milky-dough stage between late August and early September. At the end of the corn growing season 12 soil samples per plot were taken at 0-30 cm depth from 1982 to 1986. These samples were bulked into a composite sample, then air dried, ground and passed through a 0.5 mm sieve and analysed for organic matter by the Walkey and Black (1934) method and for soluble P (Olsen *et al.*, 1954). During the last three years of the experiment soil bulk density data (Blake, 1965) were obtained several times during the growing season for both ryegrass and corn. Water infiltration was also measured in the soil in the ryegrass crop using the flooding method (Bertrand, 1965). Weed counting was performed during several years of the experiment for both crops using a 50 X 50 cm quadrant. Analyses of variance were conducted for a randomized complete block design (Snedecor and Cochran, 1967) and treatment means were compared using Duncan's multiple range test (SAS, 1987).

RESULTS

Characteristics of the manures are presented in Table 1. Moisture varied from 5 to 37%. While organic carbon was reasonably homogeneous between years, total N ranged from 1.49 to 2.25%. The characteristics of the manure were very typical of an arid region. During the first crop after manure application forage yields increased up to a rate of 120 t ha⁻¹, but the rate of 240 t ha⁻¹ did not reduce the yields of the crop. This did not agree with previous information by Mathers *et al.* (1975) where manure ratios higher than 150 t ha⁻¹ tended to decrease sorghum grain yields. But on the other hand, Murphy *et al.* (1972) reported that yields of silage corn were only reduced at rates higher than 240 t ha⁻¹.

In general, dairy manure application rates had a significant ($p < 0.05$) effect on dry matter yield of ryegrass (Table 2). With the exception of 1987, dry matter yield differences between the control and the rate 60 t ha⁻¹ year⁻¹ increased every year from 1.9 to 5.9 t ha⁻¹. Ryegrass average dry matter yields from 1982 to 1985 using manure application rates of 30 and 60 t ha⁻¹ year⁻¹ (totalling 120 and 240 t ha⁻¹ in four years, respectively) tended to be higher than yields from rates of 120 and 240 t ha⁻¹ applied in the first year of that period (Table 2). This suggested that low frequent rates of manure application were more efficient in increasing yield than high large single applications. The accumulated yield of ryegrass for the 30 and 60 t ha⁻¹ year⁻¹ manure rates were 22 and 33% higher, respectively, than no manure application.

Manure application did not have a significant effect on silage corn yield, except for 1982, 1986, and 1987 (Table 2). In these three years, only the manure rates of 60 t ha⁻¹ year⁻¹ and 120 t ha⁻¹ every four years were significantly higher ($p < 0.05$) than no application of manure. At the end of the experiment the accumulated yield of silage corn for the 30 and 60 t ha⁻¹ year⁻¹ manure rates were only 3 and 9% higher, respectively, than no manure application.

Initially, a positive relationship was observed between manure rate and nitrogen concentration in both ryegrass and silage corn forage (Table 3). The 30 and 60 t ha⁻¹ year⁻¹ manure rates resulted in average forage nitrogen concentrations which were 4 to 11% and 4 to 19% higher for the annual ryegrass and 14 to 31% and 14 to 36% higher than the control in silage corn, respectively for the 30 and 60 t ha⁻¹ year⁻¹,

compared to no manure application. This suggests that yield increases were partially due to the additional supply of nitrogen by manure application (Thomas and Farias, 1981). Increasing manure rates resulted in higher rates of weed infestation for both crops. Significant increases ($p < 0.05$) of *Portulaca oleracea* L. and *Amaranthus hybridum* L. were observed for corn. *P. oleracea* L. and *Brassica juncea* L. were observed for ryegrass (Data not shown). These results were consistent with previous reports on weed problems related to manure application (Azevedo and Stout, 1974).

According to manure characteristics and the method utilized (Gilbertson *et al.*, 1979), the available or mineralized N from manure was nearly half of the N applied as fertilizer (Table 4). Splitting the manure rate per year, rather than in a single application, resulted in 9 to 10% higher N-use efficiency (N recovered in plant/total available N from manure plus fertilizer $\times 100$) at the end of the first four years of the study. Denitrification and NO₃-N leaching could explain the poor N recovery from high single manure rates (Meek *et al.*, 1982; Pratt *et al.*, 1976), since losses of N as ammonia volatilization are expected to be negligible because the manure was incorporated within one or two days after application.

Soil bulk density was significantly ($p < 0.05$) affected by manure application rates both in rye grass (October to February) and in silage corn (June to August) (Table 4), but differences between manured and control treatments were higher right after incorporation of manure by plowing and disking prior to the annual rye grass planting. After tillage in both crops the bulk density increased and the differences between treatments were reduced. These results agree with previous reports of a positive effect of manure on the reduction of soil bulk density of a clay loam soil (Meek *et al.*, 1982). Water infiltration into the soil was positively affected ($p < 0.05$) by manure at the end of the ryegrass cycle when compared to no manure application (Table 6), but it was not affected at the beginning of the growing cycle. Initial water infiltration during January to March increased 65 to 90% and 40 to 70% with rates of 30 and 60 t ha⁻¹ year⁻¹, respectively. Water infiltration is directly associated with oxygen diffusion rate after irrigation, which affects plant metabolism and promotes denitrification (Castellanos and Muñoz, 1985). Meek *et al.* (1982) also reported increases in water infiltration as a result

Table 1. Moisture, organic C, total N, and C/N ratio of applied manure during the six years of the experiment.

| Year | Moisture | Organic C | Total N | C/N Ratio |
|---------|----------|-----------|---------|-----------|
| 1981 | 32.9 | 31.7 | 2.25 | 14.0 |
| 1982 | 11.0 | 36.8 | 1.99 | 18.5 |
| 1983 | 18.0 | 33.7 | 1.49 | 22.6 |
| 1984 | 5.3 | 32.2 | 1.86 | 17.3 |
| 1985 | 16.4 | 30.7 | 1.65 | 18.6 |
| 1986 | 36.7 | 27.4 | 1.53 | 17.9 |
| Average | 20.5 | 32.1 | 1.79 | 17.9 |

Table 2. Dry matter yield of rye grass and corn according to the rate of manure applied during the six years of the experiment.

| Rate of manure† | 1982 | | | | | | 1983 | | | | | | 1984 | | | | | | 1985 | | | | | | 1986 | | | | | | 1987 | | | | | | Total | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------|----|----|-----|-----|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|-----|-----|-------|----|
| | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | 0 | 30 | 60 | 120 | 240 | Total | RG |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10.8a* | 8.8a | 12.0a | 11.4a | 11.0a | 14.0a | | | | | |
| 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 180 | 11.4a | 10.3ab | 14.6b | 11.6a | 14.0d | 14.2a | | | | | |
| 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 360 | 12.7b | 10.7b | 15.3b | 12.0a | 15.0e | 14.2a | | | | | |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 120 | 0 | 240 | 13.3b | 10.6b | 15.1b | 11.5a | 12.8b | 14.1a | | | | | |
| 240 | 0 | 0 | 0 | 0 | 240 | 240 | 13.3b | 10.8b | 15.4b | 12.4a | 13.6c | 14.5a | | | | | |

†Manure was applied every year before rye grass planting.

‡ RG = Rye grass.

§ SC = Silage corn.

* Values followed by the same letter within a column are not significantly different (Duncan, p<0.05).

Table 3. Total N concentration in rye grass and silage corn during the first four years of manure treatment application.

| 1981 | Manure treatment | | | Total N concentration | | | | | | | | | |
|------|--------------------|------|------|-----------------------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | 1982 | 1983 | 1984 | 1982 | | 1983 | | 1984 | | 1985 | | Average | |
| | | | | R.Grass† | Corn | R.Grass† | Corn | R.Grass† | Corn | R.Grass† | Corn | R.Grass† | Corn |
| | t ha ⁻¹ | | | % | | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 2.81 | 1.33 | 2.13 | 1.14 | 2.20 | 0.97 | 2.52 | 0.97 | 2.41 | 1.10 |
| 30 | 30 | 30 | 30 | 2.92 | 1.46 | 2.44 | 1.40 | 2.32 | 1.11 | 2.81 | 1.28 | 2.62 | 1.34 |
| 60 | 60 | 60 | 60 | 2.82 | 1.48 | 2.51 | 1.54 | 2.63 | 1.11 | 2.96 | 1.32 | 2.73 | 1.34 |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 3.00 | 1.50 | 2.43 | 1.61 | 2.27 | 0.90 | 2.59 | 1.11 | 2.57 | 1.28 |
| 240 | 0 | 0 | 0 | 3.33 | 1.42 | 2.31 | 1.64 | 2.32 | 1.02 | 2.60 | 1.11 | 2.64 | 1.30 |

† Average of all harvests every year.

Table 4. Nitrogen balance at the end of the fourth year of the experiment, with estimated values of N mineralization

| Total manure applied | Organic-N applied | Available N from manure† | Available-N from the soil‡ | Fertilizer-N applied | Total available N | N recovered in crops | N lost§ |
|----------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| t ha ⁻¹ | | | kg ha ⁻¹ | | | % | kg ha ⁻¹ |
| 0 | 0 | 0 | 216 | 1890 | 2104 | 1594 | 76 |
| 120¶ | 1886 | 817 | 216 | 1890 | 2941 | 2080 | 71 |
| 240¶ | 3772 | 1635 | 216 | 1890 | 3739 | 2300 | 61 |
| 120 | 1810 | 1012 | 216 | 1890 | 3116 | 2048 | 66 |
| 240 | 3620 | 2025 | 216 | 1890 | 4129 | 2155 | 52 |

† Estimated by using the procedure proposed by Gilbertson *et al.* (1979).

‡ An average mineralization of 2.5% of the soil N was estimated in each year for all the treatments (priming effect of manure was assumed negligible).

§ Difference between total available N and N recovered in the crop. Include N denitrified or volatilized and leached, at the end of the four first years of the experiment.

¶ Split into four applications, one per year.

Table 5. Soil bulk density during several sampling dates during the rye grass crop growing season.

| Rate of manure t ha ⁻¹ | 1982 | | 1983 | | 1984 | | 1985 | | 1986 | | 1987 | | 1988 | |
|--------------------------------------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| | Jan | Feb |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 240 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

† Plots were plowed twice every year during September and May, manure was incorporated before plowing in September.

* Values followed by the same letter within a column are not significantly different (Duncan, p<0.05).

Table 6. Initial water infiltration at several irrigations during the rye grass crop growing season†.

| Rate of manure t ha ⁻¹ | 1983 | | 1984 | | 1985 | | 1986 | | 1987 | | 1988 | |
|--------------------------------------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| | Jan | Feb |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 240 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

† One h after watering initiation.

* Values followed by the same letter within a column are not significantly different (Duncan, p<0.05).

Table 7. Soil organic matter content at a 0-35 cm depth in plots treated with manure for the first five years of application.

| Rate of manure | | | | | Organic matter content | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------------------------|--------|--------|---------|--------|
| 1981 | 1982 | 1983 | 1984 | 1985 | 1982 | 1983 | 1984 | 1985 | 1986 |
| t ha ⁻¹ | | | | | % | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.06 a* | 1.00 a | 1.08 a | 1.06 a | 0.93 a |
| 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 1.13 a | 1.23 b | 1.51 b | 1.36 bc | 1.41 b |
| 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 1.25 ab | 1.44 c | 1.68 c | 1.87 d | 1.86 d |
| 120 | 0 | 0 | 120 | 0 | 1.52 c | 1.44 c | 1.45 b | 1.29 b | 1.60 c |
| 240 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.84 d | 1.63 c | 1.63 c | 1.48 c | 1.30 b |

* Values with the same letter in a column are not significantly different (Duncan, $p < 0.05$).

Table 8. Soluble P in the soil at 0-30 cm depth in the plots treated with manure for the five first years of application.

| Manure rate | | | | | NaHCO ₃ Soluble P | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1981 | 1982 | 1983 | 1984 | 1985 | 1982 | 1983 | 1984 | 1985 | 1986 |
| t ha ⁻¹ | | | | | mg kg ⁻¹ | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11.6a* | 15.0a | 9.6a | 7.8a | 11.6a |
| 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 17.8b | 21.6b | 27.0b | 27.1c | 28.6b |
| 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 26.7c | 31.9c | 49.2c | 53.5e | 59.1c |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 120 | 42.7d | 36.3c | 30.3b | 17.0b | 47.7d |
| 240 | 0 | 0 | 0 | 0 | 78.9e | 55.4d | 43.9c | 34.3d | 28.5b |

* Values followed by the same letter are not significantly different (Duncan $p < 0.05$).

of manure application to a clay loam soil in South Western USA. Application of manure had a significant effect ($p < 0.05$) on the content of soil organic matter, which increased linearly with the rate of manure after one year of application. The treatment with 30 t ha⁻¹ year⁻¹ increased soil organic matter from 1.0 to about 1.5% after five years of the initial application. Similarly, the treatment of 60 t ha⁻¹ year⁻¹ increased soil organic matter from 1 to 1.9% during the same period of time (Table 7). High single rates of manure resulted in high initial increases of organic matter (1.8%) but decreased down to 1.3% after the fifth year of application. The analysis of carbon balance for all treatments reported an average of 60% of manure decomposition during the first year of application, and the decomposition rate for the following years decreased from 5 to 8% year⁻¹ of the total applied during the first year. These results agreed with Meek *et al.* (1982) who also mentioned that increases in soil organic matter by manure application in arid regions were associated with improvement of soil physical properties. Phosphorus content in the soil was significantly affected ($p < 0.05$) by manure rates (Table

8). The variations of P in the soil were similar to those of organic matter. The highest P content was observed at 60 t ha⁻¹ year⁻¹. The 30 t ha⁻¹ year⁻¹ rate, corresponding to an approximate rate of 300 kg P₂O₅ ha⁻¹ year⁻¹, kept available P between 20 to 30 mg kg⁻¹ of soil. Migration of P to deeper areas of the soil profile (Pratt and Laag, 1981) could explain the reduction in availability of this nutrient from the first to the fifth year at large single manure rates.

DISCUSSION

Results from this study indicate that Xerosols of northern Mexico show a good response to the application of dairy manure resulting in a reduction of the physical constraints that have been reported for these types of soils (Castellanos *et al.*, 1989). Responses to manure application were different among ryegrass and silage corn. The better response of ryegrass could be explained by both improvement of soil physical properties and excess N from manure. Our results agree with previous reports for the same soil type in which addition of manure to a clay soil

increased alfalfa yields (Castellanos and Muñoz, 1985). Results showing improvement of soil infiltration rate and bulk density by manure application, which caused a positive effect on soil aeration levels after irrigation, were consistent with previous research by Meek *et al.* (1982) and Castellanos and Walker (1988). Adequate N fertilizer and less susceptibility of corn to soil physical constraints could have limited response of this crop to manure application. This information is consistent with Jokela (1992) who did not find significant yield increases in silage corn when applying N fertilizer and manure together. It was more beneficial to apply a small frequent rate of manure than large less frequent rates. Application of manure in Xerosols provides a complementary source of N to increase ryegrass yields per harvest and has potential to improve soil physical conditions for northern Mexico.

LITERATURE

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 1984. Official methods of analysis. 14th Ed. S. Williams Horwitz (Ed.) Arlington, Virginia. Washington. pp 15-20.
- Azevedo, J. and P. R. Stout. 1974. Farm animal manures: An overview of their role in the agricultural environment. Univ. of Calif. Div. Agric. Sci. Manual No. 44, Agric. Pub. Univ. Calif., Berkeley, Calif.
- Bertrand, A.R. 1965. Rate of water intake in the field. *In:* Black, C.A. (Ed.). Methods of Soil Analysis Part I. pp 180-196. Monograph No. 9. Madison. ASA. SSSA.
- Blake, G.R. 1965. Particle density. *In:* Black C.A. (Ed.). Methods of Soil Analysis Part I. pp 374-390. Monograph No. 9. Madison. ASA. SSSA.
- Bouldin, D.R., S.D. Klausner, and W.S. Reid. 1984. Use of nitrogen from manure. *In:* Huck (Ed.) Nitrogen in Crop Production. pp 221-248. Madison. ASA. SSSA.
- Castellanos, J.Z., J. Fraga, S.A. Enriquez, and J.L. Olvera. 1989. Estudio del problema de permeabilidad en los terrenos cultivados con alfalfa en la Laguna, Coah. *TERRA* 7: 150-166.
- Castellanos, J.Z. and J.A. Muñoz. 1985. Soil physical properties and alfalfa yields as affected by manure application to a low infiltration clayey soil. *American Society of Agricultural Engineers*. SP 13-85: 222-228.
- Castellanos, J.Z. and P.F. Pratt. 1981. Mineralization of manure nitrogen-correlation with laboratory indexes. *Soil Science Society of America Journal* 45: 354-357.
- Castellanos, J.Z. and E. Walker. 1988. Relaciones entre algunas características físicas del suelo y el rendimiento de alfalfa en parcelas tratadas con estiércol. *Turrialba* 38: 287-294.
- Gilbertson, C.A., F.A. Norstadt, A.C. Mesters, R.F. Holt, B.P. Barnet, T.M. McCalla, C.A. Onstad, and R.A. Young. 1979. Animal waste utilization on cropland and pastureland: a manual for evaluating agronomic. USDA Utilization Research Report No. 6.
- Jokela, W.E. 1992. Nitrogen fertilizer and dairy manure effects of corn yield and soil nitrate. *Soil Science* 56: 148-154.
- Mathers, A.C., B.A. Stewart, and J.D. Thomas. 1975. Residual and annual rate effects of manure on grain sorghum yields. Proceedings of the 3rd International Symposium on Livestock Wastes, ASAE, St. Joseph, Mich. pp. 252-254.
- Mathers, A.C., J.D. Thomas, B.A. Stewart, and J.E. Heering. 1980. Manure and inorganic fertilizer effects on sorghum and sunflower growth in iron-deficient soil. *Agronomy Journal* 72: 1025-1029.
- Meek, B., L. Graham, and T. Donovan. 1982. Long term effects of manure on water infiltration. *Soil Science Society of America Journal* 46: 1014-1019.
- Murphy, L.S., G.W. Wallingford, W.L. Powers, and H.L. Manges. 1972. Effects of solid beef feedlot wastes on soil conditions and plant growth. Proc. Cornell Univ. Agr. Waste Manage. Conf. Syracuse, New York. p 449.
- Olsen, S.R., C.V. Cole, F.S. Watanabe, and L.A. Dean. 1954. Estimation of available phosphorus in soil extraction with sodium bicarbonate. USDA. Circ. No. 939.
- Pratt, P.F., F.E. Broadbent, and J.P. Martin. 1973. Using organic wastes as nitrogen fertilizers. *California Agriculture* 27: 10-13.
- Pratt, P.F., S. Davis, and R.G. Sharpless. 1976. A four year trial with animal manures. *Hilgardia* 44: 99-109.
- Pratt, P.F. and A. Laag. 1981. Effects of manure and irrigation on sodium bicarbonate-extractable phosphorus. *Soil Science Society of America Journal* 45: 887-888.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1967. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
- Sommers, L.E. and A.C. Sutton. 1980. Use of waste materials as source of phosphorus. *In:* Khasawin, F.E., E.C. Sample, and E.J. Kamprath. (Eds). *The Role of Phosphorus in Agriculture*. pp. 515-544. Madison. ASA-SSSA.
- Statistical Analysis System. 1987. *SAS/STAT Guide for Personal Computers*, version 6. Cary, NC: SAS Institute.
- Thomas N. and F.J.M. Fariás. 1981. Intensive forage production in northern Mexico. I. Response of Italian ryegrass to nitrogen and irrigation. *Experimental Agriculture* 17: 291-302.
- Walkley A. and I.A. Black. 1934. An examination of the Degtjaseff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid filtration method. *Soil Science* 27: 29-38.

INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS BENEFICOS

I. AZOSPIRILLUM

Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms

I. *Azospirillum*

Yoav Bashan¹, Gina Holguin¹, Ronald Ferrera-Cerrato²

RESUMEN

Azospirillum es la bacteria asociativa más estudiada. Afecta positivamente una gran diversidad de plantas. Ha sido aislada de diferentes regiones geográficas a partir de una gran variedad de plantas pertenecientes a diferentes familias botánicas. No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, sin embargo, se discuten algunos mecanismos de acción que han sido propuestos por diferentes autores: i) Fijación de nitrógeno, ii) efectos hormonales, iii) incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, iv) alteración del funcionamiento de la membrana por medio de moléculas de comunicación celular, y v) la hipótesis aditiva la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados arriba.

Las propiedades fisiológicas y bioquímicas de *Azospirillum* le permiten ser un competidor eficaz en la rizosfera, pese a la abrumadora microflora nativa con la capacidad de colonizar raíces vegetales. Se ha encontrado que algunos de los efectos positivos que *Azospirillum* provoca sobre las plantas se ven incrementados al inocularse con otros grupos de microorganismos.

A pesar de experimentos exitosos, tanto en el campo como en el invernadero, el desarrollo comercial de *Azospirillum* se ha retrasado. La principal dificultad ha sido la inconsistencia de los resultados de campo obtenidos con la inoculación de bacterias de este género. Hay todavía muchas preguntas que responder respecto a la interacción *Azospirillum*-planta y sus respuestas requieren de un intenso esfuerzo de investigación. Una vez respondidas podremos determinar si la interacción

Azospirillum-planta se utilizará en un futuro solamente como un modelo biológico para el estudio básico de asociaciones entre plantas y bacterias benéficas, o si tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro.

Palabras clave: Agente de control biológico, bacterias diazotróficas, BPCP, especificidad, fragmentos de restricción, hibridación, inoculantes, perfil proteico, agroquímicos, rizosfera, técnicas inmunológicas.

SUMMARY

Azospirillum is the most studied associative bacteria. It affects positively a large number of plant species. It was isolated from different geographical regions and from a large number of plants belonging to diverse botanical families. The mechanism by which *Azospirillum* affects plant growth is not defined. However, the following mechanisms were proposed as the mode of action of this bacteria: (i) Nitrogen fixation, (ii) hormonal effects, (iii) increase in growth of the entire root system enabling it to adsorb water and minerals better, (iv) change in root-cell membrane function by bacterial signal molecules, and (v) the additive hypothesis suggesting that all the above mentioned mechanisms are operating each on a small scale. Their combined effect increases plant growth.

The physiological and biochemical properties of *Azospirillum* allows it to compete efficiently with native rhizosphere populations and to colonize plant roots. Some of the positive effects of *Azospirillum* are enhanced when it is coinoculated with other microorganisms. Despite success in greenhouse and field experiments, commercial exploitation of *Azospirillum* is very limited. The major difficulty is the inconsistent and unpredicted field results obtained with this bacterial genus, leaving many open questions on the basic interaction of *Azospirillum* with plants. This review presents a critical and comprehensive analysis of the developments in environmental and physiological

¹ Departamento de Microbiología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB), Apartado Postal 128, 23000 La Paz, BCS, México.

² Sección de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillo, Edo. de México, México.

Correspondencia: Fax: +52 (682) 54710 ó 53625.

studies related to *Azospirillum* interactions with plants based on information published between 1976 and 1996. This review emphasizes the central issues of *Azospirillum* research today, such as coinoculation with other microorganisms and hormonal studies, shows the less researched areas, and proposes possible avenues for the exploitation of bacterium in agriculture.

Index words: *Biological control agent, BPCP, diazotrophic bacteria, hybridization, immunological techniques, inoculants, protein profile, restriction fragments, rhizosphere, specificity.*

EL GENERO AZOSPIRILLUM

La primera especie de *Azospirillum* fue aislada en Holanda por Beijerinck (1925) a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, y fue originalmente llamada *Spirillum lipoferum*. Esta bacteria fue posteriormente aislada de suelo adherido a pastos marinos secos en Indonesia (Schröder, 1932; H.C. Derx, sin publicar, 1949, citado en Becking, 1982) y J. Döbereiner *et al.* (1976) aislaron la bacteria, siendo los primeros en reportar su amplia distribución en la rizosfera de diversos pastos tropicales. Desde entonces, se han aislado cepas de *Azospirillum* a partir de la filosfera (superficie de la planta que se encuentra expuesta al aire) (Agarwala-Dutt *et al.*, 1991; Becking, 1982; Singh, 1992a) de raíces de numerosos pastos (silvestres y cultivados), cereales y de plantas de muy diversas familias, así como de suelos tropicales, subtropicales, templados y árticos. (Bally *et al.*, 1983; Bilal *et al.*, 1990; Döbereiner *et al.*, 1976; Fages y Arsac, 1991; Fages y Lux, 1991; Gamo y Ahn, 1991; George, 1990; Hill *et al.*, 1983; Horemans *et al.*, 1988; Kosslak y Bohlool, 1983; Ladha *et al.*, 1987; Lamm y Neyra, 1981; Li y Castellano, 1987; New y Kennedy, 1989; Nosko *et al.*, 1994; Nur *et al.*, 1980b; Penot *et al.*, 1992; Rangel-Lucio *et al.*, 1991; Rao y Venkateswarlu, 1982; Singh, 1992b; Sundaram *et al.*, 1988; Tyler *et al.*, 1979; Villarreal-Romero, 1990; Wong *et al.*, 1980).

Tarrand *et al.* (1978) propusieron a *Azospirillum* como género con base en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y en experimentos sobre homología del ADN (Falk *et al.*, 1986) distinguiendo dos especies: *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*. Se han descrito tres especies más: *A. amazonense* (Falk *et al.*,

1985; Magalhães *et al.*, 1983), aislada de pastos en el área del Amazonas en Brasil; la especie halo-tolerante *A. halopraeferans*, asociada exclusivamente a raíces del pasto Kallar (Reinhold *et al.*, 1987) y la especie que degrada pectina aislada a partir de raíces de arroz, *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989; Khammas y Kaiser, 1991). Sin embargo, la mayoría de las cepas aisladas en los últimos años pertenecen a las especies *A. brasilense* o *A. lipoferum* (Krieg y Döbereiner, 1986).

EFEECTO DE AZOSPIRILLUM SOBRE LAS PLANTAS

La inoculación a plantas con *Azospirillum* puede dar como resultado un cambio significativo en varios parámetros de crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento de la cosecha. El (Los) mecanismo(s) de acción de *Azospirillum* sobre las plantas no ha(n) sido todavía elucidado(s).

La mayoría de los estudios sobre la asociación *Azospirillum*-planta se han llevado a cabo en cereales y pastos (Patriquin *et al.*, 1983) y, en menor grado, en otras familias de plantas (Bashan *et al.*, 1989b, 1989c; Crossman y Hill, 1987; Dayakar-Yadav y Nagendra-Kumar, 1991; Del-Gallo y Fabbri, 1990; Fages y Arsac, 1991; Favilli *et al.*, 1993; Fernández-Vega Figueroa, 1995; Gamo y Ahn, 1991; Govedarica *et al.*, 1993; Itzigsohn *et al.*, 1995; Kolb y Martin, 1985; Kothari Saraf, 1986; Mortley y Hill, 1990; Puente y Bashan, 1993; Russel e Ifiorah, 1995; Saha *et al.*, 1985; Sarig *et al.*, 1990; Zaady *et al.*, 1994). Los estudios han demostrado los siguientes resultados: i) Incrementos en peso seco total, concentración de nitrógeno en follaje y grano, número total de espigas, espigas fértiles, y mazorcas; ii) una floración y aparición de espigas más temprana; iii) incremento en el número de espigas y granos por espiga; iv) plantas más altas e incremento en el tamaño de la hoja; y v) tasas de germinación más altas (Albrecht *et al.*, 1981; Baldani y Döbereiner, 1980; Bashan, 1986a; Bhattarai y Hess, 1993; Bouton y Zuberer, 1979; Bouton *et al.*, 1979; Cohen *et al.*, 1980; Fulchieri y Frioni, 1994; Hegazi *et al.*, 1983; Kapulnik *et al.*, 1981a; Mertens y Hess, 1984; Millet y Feldman, 1986; O'Hara *et al.*, 1981; Pacovsky *et al.*, 1985b; Puente y Bashan, 1993; Schank *et al.*, 1981, 1985; Stancheva *et al.*, 1992; Warembourg *et al.*, 1987; Yahalom *et al.*, 1984). También se ha observado un incremento en el desarrollo del sistema de raíces, tanto en longitud como en volumen (discusión posterior).

En algunos estudios de campo, realizados con cereales, se ha llegado a observar una promoción del crecimiento vegetativo (Kapulnik *et al.*, 1982, 1983). También se ha reportado un efecto a simple vista sobre el crecimiento de varios vegetales tales como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berenjena (*Solanum melongena* L.), pimiento (*Capsicum annuum*) y algodón (*Gossypium barbadense*) (Bashan *et al.*, 1989b).

El incremento por efecto de la inoculación con *Azospirillum* en el rendimiento total de plantas crecidas en el campo, varió entre 10 y 30% (Fulchieri y Frioni, 1994; Kapulnik *et al.*, 1981c, 1987; Rao *et al.*, 1983; Watanabe y Lin, 1984). La inoculación de trigo con *Azospirillum* incrementó significativamente el rendimiento de la cosecha, desde 23% hasta 63% en 1986 y desde 29% hasta 43% en 1987 (Caballero-Mellado *et al.*, 1992). En algunos trabajos se obtuvieron incrementos en rendimiento total de la cosecha de 50 a 270% en relación a los controles con plantas no inoculadas. La obtención de incrementos hasta 20% en el rendimiento se considera comercialmente valiosa para la agricultura moderna, siempre y cuando estos resultados sean consistentes. Sin embargo, la información disponible puede resultar insuficiente como para pensar en la comercialización de un inóculo bacteriano. Por ahora, existen sólo algunas preparaciones comerciales de *Azospirillum* disponibles en el mercado (Fages, 1992; discusión posterior). No obstante ello, se han reportado muy pocos resultados negativos o nulos por efecto de la inoculación (Albrecht *et al.*, 1981; Harris *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1984a, 1984b; Stancheva *et al.*, 1992). Los resultados con rendimientos muy altos se han debido casi siempre a la utilización de parcelas control de características no usuales tales como: suelos pobres en nutrientes, riego ineficiente, condiciones climáticas inapropiadas para el cultivo en particular, etc. lo cual provoca un incremento en el rendimiento no relacionado con la actividad de *Azospirillum* (Jagnow, 1987). Es difícil realizar una evaluación apropiada de trabajos sobre "cómo responde la planta en cuanto a rendimiento", debido a la carencia de ensayos analizados estadísticamente que integren datos de diferentes localidades y temporadas de crecimiento. Además, muchos de los experimentos no pueden repetirse apropiadamente como resultado de la carencia de detalles técnicos esenciales en la descripción de métodos, tales como preparación y concentración del inóculo y métodos de inoculación. Al evaluar datos acumulados a nivel mundial durante los últimos veinte años sobre experimentos de inoculación con *Azospirillum*, Okon y

Labandera-González (1994) concluyeron que los experimentos exitosos fueron aquellos en los cuales los investigadores utilizaron en el inoculante el nivel óptimo de células. Vandenhove *et al.* (1993) encontraron que si el inóculo de *A. brasilense* es tomado de la fase exponencial del cultivo, las bacterias sobreviven mejor en suelo que tomando el inóculo de la fase estacionaria. Se propone estandarizar y optimizar inóculos para así evitar la variabilidad en la respuesta vegetal que factores de manejo no controlados pudieran provocar.

Okon (1985) concluyó que se obtuvieron efectos positivos en el rendimiento de la cosecha en aproximadamente 65% de los experimentos realizados en el campo. En 75% de los experimentos con cereales de verano, se obtuvieron incrementos en el rendimiento; con trigo de primavera se obtuvo incremento significativo sólo en 50% de los experimentos (Schank y Smith, 1984; Smith *et al.*, 1984b). En 70-75% de los experimentos realizados en macetas con algodón y varios vegetales se obtuvo un incremento significativo en el rendimiento desde 23% hasta 72% (Bashan *et al.*, 1989b).

Dos factores básicos que contribuyen a la complejidad de la respuesta de la planta a la inoculación son: la variedad de la planta cultivada, ya que cada una responde distinto a la inoculación (Arsac *et al.*, 1990; Bouton *et al.*, 1979; Millet *et al.*, 1986) y el nivel de fertilización con nitrógeno. Los rendimientos más altos se han obtenido con niveles de fertilización de nitrógeno más bajos de lo normal (75% de la cantidad de fertilizante nitrogenado utilizado normalmente (Kapulnik *et al.*, 1981b; Lau Wong, 1987; Macalintal y Urgel, 1992; Mertens y Hess, 1984; O'Hara *et al.*, 1987). Por lo tanto se consideró la inoculación con *Azospirillum* como un sustituto parcial a la fertilización con nitrógeno. Sin embargo, algunos trabajos demostraron que se incrementó el rendimiento aún con un nivel de fertilización al 100% y que el nitrógeno puede llegar a incrementar el número de bacterias en la rizosfera (Bashan *et al.*, 1989b; Chela *et al.*, 1993; Del Gallo y Fabbri, 1990; Kolb y Martin, 1988; Millet y Feldman, 1986).

Un problema crucial en la mayoría de los experimentos de campo e invernadero, realizados hasta ahora, es la inconsistencia de la respuesta de la planta a la inoculación con *Azospirillum* spp., no importando de qué especie vegetal se trate. De esta manera no es posible garantizar el éxito del experimento (Bashan y Levanony, 1990; Bashan *et al.*, 1993; Patriquin *et al.*, 1983). Numerosos trabajos reportados en la literatura popular agrícola (especialmente aquellas revistas publicadas en

Israel y dirigidas a los campesinos) y de compañías comerciales indican, que experimentos de campo con diseños experimentales idénticos, conducidos simultáneamente bajo condiciones ambientales similares, no han producido los mismos resultados en el rendimiento que se esperaba encontrar a pesar de haber experimentado con diferentes variables del manejo agrotecnológico (maquinaria, control de hierbas y manejo de pesticidas), la utilización de cepas bacterianas diferentes, variando el tipo de planta huésped, o a través de técnicas de inoculación mejoradas (Schank y Smith, 1984). El desarrollo de un acarreador bacteriano adecuado (sintético, orgánico o inorgánico) determinará si la interacción *Azospirillum*-planta tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro. El problema podría ser resuelto si se llegan a dilucidar los siguientes factores: mecanismo(s) por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal; colonización radicular de *Azospirillum*; factores de interacción y competencia entre *Azospirillum* y otros microorganismos de la rizosfera y el papel de la planta huésped en estas interacciones; estudio de los genes involucrados en la asociación planta-bacteria y la subsecuente manipulación genética de las bacterias; actividad y sobrevivencia de *Azospirillum* en la rizosfera al ser afectada por diversos factores ambientales (pH, salinidad, materia orgánica, concentración de calcio y de nitrógeno), incluyendo la inconsistencia de la respuesta vegetal. El conocer la participación de cada uno de estos factores en la interacción *Azospirillum*-planta, permitirá el diseño de técnicas de inoculación más efectivas.

EFFECTOS DE LA INOCULACION SOBRE EL DESARROLLO DE LAS RAICES

Los efectos más sobresalientes de la inoculación vegetal con *Azospirillum* son los diversos cambios morfológicos que sufre el sistema radicular. Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan efecto. Se ha observado que el nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, es de alrededor de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc/ml) (Bashan, 1986c; Bashan *et al.*, 1989b; Kapulnik *et al.*, 1985c; Okon y Kapulnik, 1986; Smith *et al.*, 1984b), mientras que para el maíz es de 10^7 ufc/ml (Fallik *et al.*, 1988). Una concentración de

inóculo de 10^8 - 10^{10} ufc/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular (Barbieri *et al.*, 1988; Bashan, 1986c, 1990; Kapulnik *et al.*, 1985c; Morgenstern y Okon, 1987a), excepto para el tomate cuyo nivel de inoculación en condiciones *in vitro* es $>10^8$ ufc/ml (Hadas y Okon, 1987). Estos datos no han revelado cuantas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva.

Los efectos positivos de la inoculación se reflejan en diversos parámetros morfológicos de la raíz (Fallik *et al.*, 1994), incremento en la longitud (particularmente en la zona de elongación) (Del Gallo y Fendrik, 1994; Kapulnik *et al.*, 1985b, 1985c; Kolb y Martin, 1985; Levanony y Bashan, 1989b; Sarig *et al.*, 1988); en el número y longitud de las raíces laterales, lo cual incrementa el volumen radicular (Barbieri *et al.*, 1986, 1988; Kolb y Martin, 1985; Morgenstern y Okon, 1987a; Tien *et al.*, 1979; Venkateswarlu y Rao, 1983), incremento en el peso seco de la raíz (Hadas y Okon, 1987; Kapulnik *et al.*, 1981a; Morgenstern y Okon, 1987a; Schank *et al.*, 1981; Umali-Garcia *et al.*, 1980), en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares (Dubrovsky *et al.*, 1994; Hadas y Okon, 1987; Kapulnik *et al.*, 1985c; Martin y Glatzle, 1982; Morgenstern y Okon, 1987a; Umali-Garcia *et al.*, 1980; Venkateswarlu y Rao, 1983), en el área de superficie radicular (Bashan, 1986c; Fallik *et al.*, 1988), promoción de la división celular en el meristemo radicular (Levanony y Bashan, 1989b), cambios en los arreglos celulares de la corteza (Kapulnik *et al.*, 1985c; Lin *et al.*, 1983; Okon *et al.*, 1983), estimulación de la exudación radicular (Heulin *et al.*, 1987; Lee y Gaskins, 1982) y cambios en la morfología externa de las raíces (Bashan *et al.*, 1989b; Morgenstern y Okon, 1987a). Estas observaciones se fundamentaron en estudios microscópicos, pero no pudieron ser confirmadas en un estudio posterior donde se utilizó la misma cepa de *A. brasilense* (Levanony *et al.*, 1989). Otros estudios indican claramente que ocurre una disminución en la longitud radicular, masa y volumen, pese a que se observa un incremento en parámetros de crecimiento de los brotes (Kucey, 1988a; Murty y Ladha, 1988; Reynders y Vlassak, 1982).

Tales efectos contradictorios en raíces, a consecuencia de la inoculación de plantas con cepas de *Azospirillum*, son aparentemente reales, ya que la mayoría de dichos parámetros morfológicos se pueden medir fácilmente y con precisión, y fueron analizados utilizando métodos estadísticos reconocidos.

COLONIZACION RADICULAR POR *AZOSPIRILLUM*

Azospirillum puede colonizar la parte interna o externa de la raíz. En esta última, las bacterias tienden a formar pequeños agregados, aunque es posible encontrar también células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie radicular. Por otro lado, las bacterias colonizadoras de la parte externa de la raíz se encuentran embebidas en la capa mucilaginosa que cubre la superficie radicular (Bashan *et al.*, 1986; Berg *et al.*, 1979; Bilal *et al.*, 1993; Murty y Ladha, 1987; Schank *et al.*, 1979; Umali-García *et al.*, 1981). Tanto raíces vivas como muertas pueden ser colonizadas (Bashan y Levanony, 1988^a; Bashan *et al.*, 1986). En el proceso de colonización interna, las células de *Azospirillum* pueden invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares (Andreeva *et al.*, 1991; Levanony *et al.*, 1989; Patriquin y Döbereiner, 1978; Umali-García *et al.*, 1981).

Azospirillum tiende a colonizar preferentemente las zonas de elongación de la raíz y de pelos radiculares (Assmus *et al.*, 1995; Bashan *et al.*, 1986, 1991a; Okon y Kapulnik, 1986; Zamudio y Bastarrachea, 1994). En cereales, la colonización ocurre principalmente en la superficie radicular y muy pocas bacterias se adhieren a los pelos radiculares (Bashan y Levanony, 1989b; Okon y Kapulnik, 1986), mientras que en arroz se observa frecuentemente colonización masiva en estas estructuras (Murty y Ladha, 1987). En todas las plantas que han sido inoculadas con *Azospirillum* muy pocas veces se ha detectado penetración de *Azospirillum* a pelos radiculares, y se asume que *Azospirillum* no penetra a los espacios intercelulares a través de pelos radiculares. Sin embargo, *A. brasilense* Sp-245 fue encontrada repetidamente en altas densidades en el interior de células de pelos radiculares en plantas de trigo (Assmus *et al.*, 1995).

Algunas cepas de *Azospirillum* pueden colonizar los espacios intercelulares de la corteza (Andreeva *et al.*, 1991; Levanony *et al.*, 1989; Patriquin y Döbereiner, 1978; Whallon *et al.*, 1985). La población bacteriana interna comprende la mayoría de la población total radicular en trigo (Bashan *et al.*, 1986), mientras que en mijo (pearl millet) la mayoría de la población de *Azospirillum* se concentra en la superficie radicular (Matthews *et al.*, 1983). No siempre ocurre colonización interna de raíces; tal es el caso del pasto "Kallar" en el cual sólo se ha detectado colonización masiva en la superficie (Reinhold *et al.*, 1986).

Estudios sobre colonización vascular por una cepa específica de *A. lipoferum*, detectada con microscopía de luz (Patriquin y Döbereiner, 1978), no fueron confirmados por estudios de microscopía electrónica al utilizar *A. brasilense* (Levanony *et al.*, 1989).

Se desconoce el mecanismo de penetración de *Azospirillum* a los espacios intercelulares. Las diversas teorías, propuestas hasta ahora, son: (i) invasión bacteriana vía tejidos corticales destruidos donde ramificaciones de raíces laterales emergen a partir de raíces principales (Matthews *et al.*, 1983; Patriquin y Döbereiner, 1978; Umali-García *et al.*, 1980, 1981), (ii) invasión a través de pelos radiculares lisados y heridas mecánicas ocasionadas durante el crecimiento de la planta, y (iii) penetración directa a través de lamelas intermedias seguida de degradación de la pectina una vez que la bacteria logra penetrar por hendiduras de la zona cubierta por epidermis donde emerge la raíz lateral (Umali-García *et al.*, 1980). Se conoce que algunas cepas de este género producen pectinasas *in vitro* (Khammas *et al.*, 1989; Okon y Kapulnik, 1986; Plazinski y Rolfe, 1985a; Tien *et al.*, 1981).

Se han identificado dos fases en el mecanismo de adhesión de *Azospirillum* a raíces de trigo. La primera fase del proceso de adhesión de *Azospirillum* consiste en una adhesión rápida y débil dependiente de proteínas superficiales bacterianas; al enjuagar las raíces con agua, agitando suavemente, la mayoría de las bacterias se pueden liberar (Bashan *et al.*, 1986). La mayoría de las áreas radiculares son saturadas en un período de dos horas después de la inoculación, encontrándose variación dependiendo de la fase de crecimiento bacteriana y de la cepa utilizada (Bashan y Levanony, 1988b; Evers *et al.*, 1988a, 1988b; Gafni *et al.*, 1986; Sukiman y New, 1990; Umali-García *et al.*, 1980). El segundo paso (llamado anclaje) bajo condiciones *in vitro* es independiente del primero y consiste en un anclaje firme, caracterizado por la producción de fibrillas largas. Estas han sido observadas en estudios de microscopía electrónica de barrido en diversas especies vegetales (Bashan *et al.*, 1986, 1991a; Gafni *et al.*, 1986; Hadas y Okon, 1987; Okon y Kapulnik, 1986; Patriquin *et al.*, 1983; Umali-García *et al.*, 1980) formando una red que conecta las células de *Azospirillum* entre sí y a la superficie radicular de las plantas (Bashan y Holguin, 1993; Bashan *et al.*, 1991a) e involucra la participación de un polisacárido extracelular (Michiels *et al.*, 1991). Este proceso empieza después de 8 h de incubación y alcanza un nivel máximo

después de 16 h (Michiels *et al.*, 1991). Estudios preliminares indican que las fibras contienen compuestos de naturaleza proteica y polisacáridos (Bashan y Levanony, 1989b; Michiels *et al.*, 1991). El movimiento de *Azospirillum* a lo largo de la superficie radicular es mínimo, debido a la formación de estas fibras producidas por la misma bacteria. Estas fibras de soporte aseguran el transporte vertical bacteriano debido al crecimiento de la punta radicular (caliptra) hacia capas de suelo más profundas (Bashan y Levanony, 1989a).

Se ha demostrado adhesión polar de células de *Azospirillum* en raíces (Levanony *et al.*, 1989; Patriquin *et al.*, 1983; Whallon *et al.*, 1985). Sin embargo, un examen detallado de este fenómeno reveló que comprendía sólo un pequeño porcentaje del total de células. La mayor parte de la superficie radicular fue colonizada por bacterias en posición horizontal lo cual es termodinámicamente más estable. La cinética de adhesión de *A. brasilense* Sp-245 a plántulas de trigo se ajustó a la isoterma de adsorción de Langmuir indicando que existe un número saturable y específico de sitios en las raíces disponibles a ser colonizados por la cepa (Zamudio y Bastarrachea, 1994).

La adhesión fibrilar de la bacteria es dependiente de un metabolismo bacteriano activo; bacterias muertas no se adhirieron a raíces, pero bacterias vivas sí se adhirieron a materia vegetal muerta (Bashan *et al.*, 1986; Gafni *et al.*, 1986). El comparar el anclaje de *Azospirillum brasilense* Cd al poliestireno hidrofóbico con el anclaje a raíces reveló que células vivas se adhirieron significativamente más a raíces. Las células crecidas sin manganeso se anclaron a raíces en mayor concentración que células crecidas con manganeso (Bashan y Holguin, 1993).

Se desconoce el mecanismo específico por medio del cual *Azospirillum* se adhiere a las raíces. Diversos factores químicos, fisiológicos, ambientales y nutricionales regulan la adhesión de *A. brasilense* a las raíces (Bashan y Holguin, 1993; Bashan y Levanony, 1989b; Umali-García *et al.*, 1980). A través de la utilización de un mutante de *A. brasilense* sin flagelos, se demostró que el flagelo polar está involucrado en la adhesión de las bacterias a las raíces, encontrándose que flagelos polares purificados se adhieren a raíces de trigo bajo condiciones *in vitro* (Croes *et al.*, 1993). Se ha sugerido que el mecanismo de adhesión bacteria-planta está mediado por lectinas expuestas en la superficie celular de la bacteria (Del-Gallo *et al.*, 1989; Tabary *et al.*, 1984; Umali-

García *et al.*, 1980) o contenidas en el material fibrilar (Bashan y Levanony, 1988b). Es probable que la lectina de *A. brasilense* esté involucrada en la recepción de la aglutinina de germen de trigo (una de las lectinas de plantas más estudiadas) (Antonyuk *et al.*, 1993). Se encontró que la adición de aglutinina de germen de trigo a *A. brasilense* Sp-245 promovió la fijación de nitrógeno (Antonyuk *et al.*, 1993, 1995) por esta cepa, la excreción de amonio y la síntesis de IAA. Estos resultados sugieren la hipótesis de que la aglutinina de germen de trigo tiene la función de molécula de comunicación celular, la cual altera el metabolismo de *Azospirillum* en beneficio de la planta (Antonyuk *et al.*, 1995). Parece ser que el mecanismo de adhesión a raíces y la agregación de células bacterianas se encuentran relacionados con el contenido de polisacáridos en la superficie bacteriana (Del-Gallo y Haegi, 1990; Michiels *et al.*, 1990; Zaady y Okon, 1990).

Observaciones microscópicas de raíces inoculadas con *Azospirillum* revelaron la presencia de dos tipos celulares: una forma celular altamente móvil y una forma sésil que presenta dos tipos de exopolisacáridos: el componente de polisacárido capsular (CPS) y el componente de exopolisacárido (EPS) (Del Gallo *et al.*, 1989). La producción de polisacáridos extracelulares, así como de una cápsula, forma parte del proceso de formación de las formas celulares sésiles llamadas quistes (Sadasivan y Neyra, 1985).

Se ha encontrado que al crecer *Azospirillum* bajo ciertas condiciones de cultivo, tales como presencia de fructosa y nitrato, se promueve la síntesis de polisacáridos exocelulares provocando la formación de agregados celulares. Contrario a estos resultados, Zaady *et al.* (1993) encontraron que células de *A. brasilense* Cd crecidas con fructosa no formaron agregados. Se ha demostrado que un polisacárido de la superficie celular de *A. brasilense* que se une al colorante fluorescente Calofluor, es necesario para la floculación o agregación de *A. brasilense* (Michiels *et al.*, 1990). Es posible que las microfibrillas de celulosa detectadas en los agregados celulares así como los polisacáridos extracelulares, estén participando en el proceso de infección en la rizosfera, provocando la agregación de las células bacterianas colonizadoras (Sadasivan y Neyra, 1985). Se propone que la formación de agregados es una ventaja ecológica para *Azospirillum* ya que permite a la bacteria establecerse en mayor concentración en la superficie radicular. Además, bajo condiciones desfavorables, los agregados incrementarían la posibilidad de sobrevivencia de *Azospirillum* en la rizosfera.

La capacidad de adhesión de *Azospirillum* a las raíces vegetales permite a la bacteria establecer una asociación permanente con la planta. Esto es importante por varias razones: (i) Si las bacterias no se adhieren a las células radiculares, las sustancias excretadas por las bacterias se difunden hacia la rizosfera donde son consumidas por otros microorganismos. Sin embargo, si las bacterias se adhieren a la superficie radicular, parte de estas sustancias penetran a los espacios intercelulares de la corteza radicular. (ii) Si no se encuentran firmemente adheridas, las bacterias pueden ser fácilmente desprendidas de la raíz por el agua, provocando que mueran en el suelo ya que se ha demostrado que *Azospirillum* no sobrevive bien en suelos sin plantas (Bashan y Levanony, 1990; Bashan et al., 1995d). (iii) Los sitios disponibles de adhesión en raíces sin la presencia de *Azospirillum* son susceptibles de ser colonizados por otras bacterias no-benéficas. Concluyendo, el mecanismo de colonización radicular de *Azospirillum* varía dependiendo de la cepa bacteriana, especie vegetal, condiciones ambientales tales como humedad del suelo, temperatura y pH, factores químicos, fisiológicos y nutricionales y otros todavía no identificados. La interacción entre todas estas variables crea diferencias en grados y patrones de colonización radicular, tamaños poblacionales y sitios de colonización. Las principales zonas de colonización, en la mayoría de plantas estudiadas, son las de elongación y zonas de pelos radiculares.

La colonización de la superficie de la raíz, apoyada por el anclaje fibrilar, es un aspecto fundamental en la colonización de *Azospirillum*. La colonización interna de las raíces sólo ha sido demostrada en algunas especies vegetales.

MECANISMOS DE ACCION DE *AZOSPIRILLUM* SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL

No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal. Sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos de acción (Cuadro 1): i) Fijación de nitrógeno, lo cual contribuye con nitrógeno a la planta; ii) efectos hormonales, los cuales promueven el metabolismo y crecimiento vegetal; iii) incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, lo cual puede estar relacionado con cambios hormonales y que origina una mayor capacidad de absorción de agua y minerales; iv) alteración del funcionamiento de la membrana por medio

de moléculas de comunicación celular (moléculas de comunicación celular de bajo peso molecular pueden ser responsables en alterar actividad y funciones de membrana relacionadas con la absorción de iones); y v) la hipótesis aditiva la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados arriba. Se desconoce si estos mecanismos se expresan dependiendo de la cepa de *Azospirillum*. Sin embargo, ya que se ha demostrado que, en la mayoría de los casos, las cepas alteran la proporción brotes/raíces (peso seco) de la planta, se propone que las bacterias de este género ejercen sobre la planta un efecto multiparamétrico (Bashan y Dubrovsky, 1996; Bashan y Levanony, 1990).

Fijación de nitrógeno por *Azospirillum*

Todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico ya sea como bacterias libres o en asociación con plantas y participan en varias transformaciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno (Heulin et al., 1989; Hurek et al., 1988; Tarrand et al., 1978). Después de la inoculación hay un incremento en el nitrógeno total de brotes y granos de plantas inoculadas (Baldani et al., 1983, 1987; Boddey et al., 1986; Cohen et al., 1980; Hegazi et al., 1983; Kapulnik et al., 1981a, 1983, 1985b; Mertens y Hess, 1984; Nur et al., 1980a; O'Hara et al., 1981; Pacovsky et al., 1985b; Rennie et al., 1983; Schank et al. 1981; Wani et al., 1985; Warembourg et al., 1987; Yahalom et al., 1984). De aquí que, la fijación de nitrógeno fue el primer mecanismo principal sugerido para explicar el incremento del crecimiento vegetal por *Azospirillum*. La incorporación de nitrógeno atmosférico en la planta huésped por *Azospirillum* fue evaluada principalmente por el método de reducción de acetileno (Hardy et al., 1968). Sin embargo, a través de estudios que involucran el uso de $^{15}\text{N}_2$, se ha comprobado que las plantas obtienen parte de su nitrógeno de la atmósfera. Para una revisión detallada de este tema, se recomiendan los trabajos de Boddey (1987) y Boddey y Döbereiner (1988).

La contribución de la fijación de nitrógeno bacteriana al balance de nitrógeno de las plantas, está fundamentada en el hecho de que la actividad de la nitrogenasa en raíces, medida a través de la técnica de reducción de acetileno, se ve significativamente incrementada (Berg et al., 1980; Cohen et al., 1980; Hegazi et al., 1983; Hess, 1982; Kapulnik et al., 1981b; Okon et al., 1983; Patnaik et al., 1994; Rao y Rajamamohan Rao, 1983; Yahalom et al., 1984). Si todo el nitrógeno fijado por actividad bacteriana

Cuadro 1. Mecanismos de acción de *Azospirillum* sobre las plantas.**(A) Fijación de nitrógeno**

| Evidencia a favor | Evidencia en contra |
|---|---|
| Acumulación de compuestos nitrogenados en plantas inoculadas | Las cepas mutantes Nif ⁺ y Nif ⁻ provocaron un mismo efecto sobre las plantas |
| Alta actividad de la nitrogenasa en plantas inoculadas | Efectos positivos en plantas crecidas en condiciones inhibitorias a la fijación de N |
| Crecimiento vegetal normal en plantas inoculadas sin haber incorporado N | Mínima actividad de nitrogenasa en plantas con respuesta positiva a la inoculación |
| 5-18% del nitrógeno total en la planta proviene de la fijación de nitrógeno | Las concentraciones de nitrógeno fijado no explican el incremento en rendimiento de las plantas |

(B) Hormonas vegetales

| Evidencia sobre | Falta de evidencia sobre |
|---|---|
| <i>Azospirillum</i> produce <i>in vitro</i> varias hormonas vegetales | Efecto de mutantes deficientes en la producción de hormonas |
| La adición de hormonas provoca el mismo efecto sobre las plantas que la inoculación | Cambios en el equilibrio hormonal de las raíces |
| Mutantes sobreproductores de hormonas provocaron un efecto más pronunciado sobre el crecimiento vegetal | Relación entre efectos hormonales y producción en una planta mejorada |
| Prueba de que la inoculación cambia la concentración de hormonas en la planta | |

(C) Promoción a nivel general del crecimiento de la planta y en la absorción de minerales

| Evidencia sobre | Falta de evidencia sobre |
|---|--|
| Acumulación de minerales en follaje | Actividades enzimáticas relacionadas con absorción de minerales y agua |
| Actividades enzimáticas relacionadas con transformación de iones de follaje | La mayoría de las cepas promueven la absorción de minerales |
| Promoción en la absorción de agua | |
| Sustitución parcial de la fertilización con N | |
| Incremento en el flujo de protones de plantas inoculadas | |
| Incremento en muchos parámetros de crecimiento | |

fuese incorporado por la planta, se incrementaría el rendimiento en ésta (el cual se expresa en términos de concentración de nitrógeno total) (Mertens y Hess, 1984; Sarig *et al.*, 1984). Estudios sobre la inoculación de trigo y maíz han indicado que de un 5-10% (Kucey, 1988a) y hasta 18% (Rennie, 1980; Rennie *et al.*, 1983; Rennie y Thomas, 1987) del nitrógeno total de la planta se deriva de la fijación de nitrógeno; además, las plantas inoculadas crecieron normalmente con sólo una cantidad parcial del fertilizante de nitrógeno requerido para tal crecimiento, aún en zonas templadas (en las cuales *Azospirillum* es menos efectivo) y bajo cultivo intensivo (Berge *et al.*, 1990; Kapulnik *et al.*, 1981b; Millet y Feldman, 1986; Mortley y Hill, 1990; Nur *et al.*, 1980a). Por otro lado existen estudios que han mostrado baja, y a veces insignificante, actividad de la nitrogenasa en plantas que responden positivamente a la inoculación (Fernández-Vega Figueroa, 1995; Kapulnik *et al.*, 1985a; Lethbridge y Davidson, 1983; Sarig *et al.*, 1990; Venkateswarlu y Rao, 1983). Aún más, de todo el nitrógeno fijado por *Azospirillum* menos del 5% fue incorporado a las plantas huésped (Eskew *et al.*, 1981; Okon *et al.*, 1983). Esta cantidad de nitrógeno fijado es insuficiente como para explicar incrementos totales en el contenido de nitrógeno de las plantas inoculadas. Niveles altos de fertilización nitrogenada (lo que inhibe la fijación de nitrógeno) no suprimieron la respuesta positiva de la planta a la inoculación (Avivi y Feldman, 1982; Bashan *et al.*, 1989b, 1989c; Kapulnik *et al.*, 1981b, 1982, 1983; Mertens y Hess, 1984; Millet y Feldman, 1986; Pal y Malik, 1981; Rai y Gaur, 1982; Reynders y Vlassak, 1982).

El control definitivo para distinguir la contribución vía fijación de nitrógeno de otros efectos de la inoculación bacteriana es el utilizar mutantes Nif (incapaces de fijar nitrógeno) pero al mismo tiempo isogénicas con respecto a las cepas silvestres. La inoculación de cereales con mutantes Nif causó los mismos efectos en las plantas que las cepas silvestres (Barbieri *et al.*, 1986; Morgenstern y Okon, 1987a; O'Hara *et al.*, 1981). Plántulas de tomate respondieron a la inoculación con la mutante Nif de forma similar a la respuesta obtenida con la cepa silvestre (Bashan *et al.*, 1989c). Esto indica que la respuesta de la planta fue causada por otros factores diferentes a la fijación de nitrógeno.

Considerando que las bacterias asociativas no secretan amonio y, por lo tanto, proveen a la planta huésped de cantidades mínimas de nitrógeno, se seleccionaron mutantes de *A. brasilense* capaces de

excretar amonio (producto de la fijación de nitrógeno). Para contrarrestar la desventaja ecológica que esto representa, se intentó establecer estas bacterias en el interior de la raíz a través de la producción de para-nódulos (estructuras radiculares que simulan nódulos y cuya formación es inducida agregando la auxina sintética, ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Christiansen-Weniger y Van Veen, 1991). Se demostró colonización intracelular de mutantes de *A. brasilense* excretores de amonio (producto de la fijación de nitrógeno) en para-nódulos de maíz y de trigo (Christiansen-Weniger, 1992; Christiansen-Weniger y Vanderleyden, 1994). A través de estudios con $^{15}\text{N}_2$ en estas plantas, se demostró que estos mutantes lograron transferir mayores cantidades de nitrógeno a las plantas huésped que la cepa silvestre (Christiansen-Weniger y Van Veen, 1991). Estos resultados indicaron que las plantas gramíneas son potencialmente capaces de establecer una simbiosis con bacterias diazotróficas y en la cual el simbiote excretor de amonio provee a las plantas huésped de una fuente de nitrógeno. Otros trabajos en para-nódulos de raíces de plántulas de trigo (Srisikandarajah *et al.*, 1993) demostraron que la actividad nitrogenasa en para-nódulos fue mayor que en raíces inoculadas sin para-nódulos (Yu *et al.*, 1993; Zeman *et al.*, 1992).

Una estrategia innovadora en el estudio de la interacción *Azospirillum*-planta es a través del cultivo de tejidos. Cultivos de callo del pasto *Eulaliopsis binata* y de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, fueron co-cultivados con *A. lipoferum* obteniéndose actividad positiva de la nitrogenasa después de doce meses de haber sido co-inoculados (Gosal *et al.*, 1990). De Freitas y Germida (1990) desarrollaron un cultivo de raíces de trigo para estudiar las interacciones bacteria-raíz y colonización radicular por bacterias asociativas incluyendo a *A. brasilense*.

Existe la posibilidad de que la fijación de nitrógeno aporte a la planta pequeñas cantidades de nitrógeno, lo que puede ser de importancia significativa en etapas críticas del desarrollo vegetal, tales como reproducción y épocas de generación de retoños. Se puede concluir que la fijación de nitrógeno es un fenómeno que se presenta en muchas asociaciones de plantas con *Azospirillum*; sin embargo, surgen las preguntas: ¿Con cuánto nitrógeno contribuyen las bacterias a la planta y bajo qué condiciones de crecimiento ésta contribución es mayor?

Efectos hormonales de *Azospirillum* sobre las plantas

Cepas de *Azospirillum* producen diversas hormonas vegetales cuando son cultivadas en medios líquidos. Una de las principales es el ácido indol-3-acético (IAA) (Barbieri *et al.*, 1986; Fallik *et al.*, 1989; Hartmann *et al.*, 1983; Iosipenko y Ignatov, 1995; Jain y Patriquin, 1985; Kolb y Martin, 1985; Ruckdäschel *et al.*, 1988; Tien *et al.*, 1979; Venkateswarlu y Rao, 1983). Se encontró que *A. irakense* liberó al medio 10 veces menos la concentración de IAA que *A. brasilense* Sp-7 (Zimmer *et al.*, 1991) y que se requiere de oxígeno para la conversión de triptofano a IAA (Bar y Okon 1995). Varias cepas de bacterias diazotróficas asociativas utilizaron un 0.28-1.0% del triptofano disponible para la producción de IAA (Kravchenko *et al.*, 1994). La liberación de IAA se incrementó con la presencia de amonía en el medio de cultivo, así como en el inicio de la fase estacionaria de las células por lo que se le considera un metabolito secundario (Omay *et al.*, 1993). Otras hormonas detectadas a niveles más bajos, pero biológicamente significativos, son el ácido indoláctico (Tien *et al.*, 1979), ácido indol-3-butírico (IBA) (Fallik *et al.*, 1989), indol-3-etanol, indol-3-metanol (Crozier *et al.*, 1988), y compuestos de indol no identificados (Hartmann *et al.*, 1983). También varias giberelinas (Bottini *et al.*, 1989; Janzen *et al.*, 1992; Piccoli y Bottini, 1994; Rademacher, 1994; Tien *et al.*, 1979), ácido absísico (ABA) (Kolb y Martin, 1985) y citoquininas (Horemans *et al.*, 1986; Strzelczyk *et al.*, 1994a; Tien *et al.*, 1979).

Yahalom *et al.* (1991) encontraron que el efecto de la hormona IAA sobre las raíces dependió de su concentración; concentraciones de 10^{-8} M estimularon la elongación radicular, mientras que concentraciones mayores a 10^{-6} M la inhibieron y redujeron la longitud de la zona de elongación. Las hormonas vegetales pueden promover la capacidad de *Azospirillum* para fijar nitrógeno (Christiansen-Weniger, 1988; Srisankarajah *et al.*, 1993) así como su crecimiento (Strzelczyk *et al.*, 1994a). Estudios sobre la aplicación externa de hormonas sintéticas o purificadas a partir de cultivos bacterianos a plántulas, imitaron los efectos positivos que provoca *Azospirillum* sobre el desarrollo y morfología radicular (Harari *et al.*, 1988; Kucey, 1988b; Tien *et al.*, 1979; Zimmer *et al.*, 1988). Así mismo, se incrementó la longitud de las raíces (Kolb y Martin, 1985; Morgenstern y Okon, 1987a; Yahalom *et al.*, 1991), el número de pelos

radiculares (Kapulnik *et al.*, 1985c; Morgenstern y Okon, 1987a) así como la ramificación de éstos (Jain y Patriquin, 1984). Se produjeron más raíces laterales (Barbieri *et al.*, 1986; Tien *et al.*, 1979) y se incrementó la tasa de división celular y diferenciación en tejidos meristemáticos (Fallik *et al.*, 1989). Una cepa de *Azospirillum* y una mutante sobreproductora de IAA en condiciones de cultivo, modificaron considerablemente la morfología radicular (Jain y Patriquin, 1985; Kolb y Martin, 1985), mientras que mutantes incapaces o disminuidos en su capacidad de producir IAA en condiciones de cultivo, no causaron efectos en la morfología radicular (Barbieri *et al.*, 1986), en el desarrollo del sistema de raíces, y no lograron promover la absorción de minerales (Barbieri *et al.*, 1991, 1995). Sin embargo, Bothe *et al.* (1992) encontraron que la hormona IAA no logró promover la formación de raíces laterales en plántulas de trigo, mientras que la inoculación con *Azospirillum* si lo logró. Se ha observado que plantas inoculadas con *Azospirillum* mantienen en estado óptimo durante más tiempo su equilibrio hormonal que plantas no inoculadas, contribuyendo así a obtener una mayor producción. La inoculación con *Azospirillum* mejoró el equilibrio hormonal de una mutante de trigo defectuosa en la producción de hormonas (Inbal y Feldman, 1982). Se encontraron concentraciones más altas de IAA y IBA en raíces de maíz inoculadas que en plantas no inoculadas (Fallik *et al.*, 1989). La inoculación de plántulas de maíz con *A. lipoferum* alteró el equilibrio de giberilina de las plántulas (Fulchieri *et al.*, 1993).

Estos resultados aportan evidencia sobre la participación de *Azospirillum* en la regulación hormonal de la planta. Sin embargo, para poder afirmar que los efectos hormonales son el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, se deben de hacer estudios adicionales, ya que otros factores no considerados en el diseño experimental pueden estar involucrados, i.e. el nitrito, como producto del metabolismo de *Azospirillum*, o agregado directamente, provoca de igual manera un drástico incremento en la formación de raíces laterales de trigo por lo que el sistema de ensayo utilizado puede estar provocando la generación de nitrito, promoviendo así el crecimiento de las plantas (Bothe *et al.*, 1992).

Los cambios en la morfología radicular tienen un efecto directo sobre el crecimiento de la planta, dando como resultado un efecto positivo o negativo en rendi-

miento, sin embargo, estos cambios deben de demostrarse también en los diferentes estadios de la planta y no exclusivamente en la etapa de plántula.

No se ha demostrado si los efectos en la morfología radicular de la plántula pueden desaparecer o desvanecerse cuando la población de *Azospirillum* presente en la raíz disminuye drásticamente durante las etapas de maduración de la planta. Es necesario demostrar claramente cambios en el equilibrio hormonal de plantas de diferentes especies crecidas en suelo por efecto de la inoculación con *Azospirillum*.

Promoción en el desarrollo de raíces, absorción de minerales, actividad de membrana, moléculas de comunicación celular y relación planta-agua por *Azospirillum*

Además de afectar positivamente (Kapulnik *et al.*, 1981a, 1985c) o negativamente (Kucey, 1988a) muchos parámetros en raíces, la inoculación de plantas con *Azospirillum* puede afectar muchos parámetros relacionados con el follaje. Estos cambios son atribuidos directamente a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta. Se ha propuesto que la absorción de NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ y Fe^{+2} inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas (Barton *et al.*, 1986; Jain y Patriquin, 1984; Kapulnik *et al.*, 1985b; Lin *et al.*, 1983; Morgenstern y Okon, 1987b; Murty y Ladha, 1988; Sarig *et al.*, 1988). Durante el periodo de reproducción vegetal, estos minerales pueden ser transferidos a las paniculas y espigas, lo que finalmente resulta en un mayor rendimiento.

Se ha sugerido que el incremento en la absorción de minerales se debe a un incremento general en el volumen del sistema de raíces y no a un mecanismo de absorción de iones más eficaz (Morgenstern y Okon, 1987b; Murty y Ladha, 1988). Por otro lado se sugiere que la inoculación con *Azospirillum* puede provocar que la absorción de iones en el suelo sea más eficiente (Lin *et al.*, 1983) (se desconoce el mecanismo de este proceso); esto explicaría la acumulación de compuestos de nitrógeno en la planta sin existir una aparente fijación de nitrógeno. La planta puede asimilar el nitrógeno del suelo de manera más eficiente, requiriendo menos fertilización con nitrógeno.

La inoculación de frijol yorimón y frijol de soya con *A. brasilense* Cd incrementó el flujo de protones de sus raíces, reduciendo el potencial de membrana por lo que se

propuso que la membrana celular funciona como un sensor sobre el efecto de *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 1992). El cambio en la actividad del flujo de protones en raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum*, y cambios en el potencial de membrana de células radiculares, así como cambios en la concentración relativa de fosfolípidos en la membrana celular del frijol yorimón, apoyan la hipótesis que propone que en raíces inoculadas la absorción de nutrientes es más eficiente (Bashan, 1990, 1991a; Bashan y Levanony, 1991; Bashan *et al.*, 1989a, 1990, 1992). Es conocido que el flujo de protones a través de las membranas radicales se encuentra directamente relacionado con el equilibrio iónico en las raíces. Recientemente se propuso que moléculas de comunicación celular no identificadas de bajo peso molecular pueden ser responsables en alterar actividad y funciones de la membrana relacionadas con la absorción de iones (Bashan, 1991a; Bashan *et al.*, 1992). Ya que las membranas son extremadamente sensibles a cualquier cambio, pueden servir como indicadores de la actividad de *Azospirillum* a nivel celular. Se encontró que la adición de aglutinina de germen de trigo a *A. brasilense* Sp-245, además de provocar cambios en el metabolismo celular de la cepa (ver sección sobre colonización radicular de *Azospirillum*), provocó cambios en la proporción relativa de los fosfolípidos ácidos de la membrana. Es probable que los fosfolípidos ácidos estén participando en la comunicación celular a través de la membrana. Se sugiere que la aglutinina de germen de trigo puede tener la función de molécula de comunicación celular en la asociación *Azospirillum*-planta (Antonyuk *et al.*, 1995).

Además de promover la absorción de minerales, la inoculación con *Azospirillum* mejora factores relacionados con el agua y la conductividad hídrica en plantas de sorgo sometidas a un periodo de estrés acuoso, dando como resultado mayor concentración de agua en el follaje, mayor potencial hídrico en hojas, y menor temperatura de follaje que en plantas no inoculadas. Así mismo, se ha observado que la extracción total de humedad del suelo por parte de plantas inoculadas con *Azospirillum* es mayor que en plantas no inoculadas y el agua puede ser extraída de capas más profundas del suelo. Por esta razón, el incremento en rendimiento de sorgo inoculado se atribuye principalmente a una mejor captación de la humedad del subsuelo (Sarig *et al.*, 1988, 1992). Es muy probable que la promoción en la absorción de agua y minerales jueguen un papel vital en la asociación *Azospirillum*-planta. Sin embargo, la información presentada hasta ahora, no ha demostrado si estos resultados son

la causa o efecto de otros mecanismos tales como cambios en el equilibrio hormonal de las plantas. Además, la amplia gama de actividades enzimáticas relacionada con estos fenómenos ha sido estudiada de manera superficial y no se ha llevado a cabo una evaluación con mutantes deficientes en inducir la absorción de agua y minerales. Finalmente, debe aclararse que se han evaluado muy pocas cepas de *Azospirillum* y existen dudas sobre la capacidad de otras cepas y/o especies de *Azospirillum* de producir estos efectos. Existe evidencia sobre cepas de *A. brasilense* que no promovieron la absorción iónica pero sí promovieron el crecimiento de las plantas (Bashan *et al.*, 1990).

ESPECIFICIDAD Y VARIABILIDAD EN AZOSPIRILLUM

Una de las preguntas más controvertidas relacionadas con las asociaciones *Azospirillum*-planta es si existe especificidad en dicha interacción como para afectar el crecimiento vegetal. Se ha sugerido que existen diferencias específicas entre las respuestas de plantas C₃ y C₄; *A. lipoferum* fue la especie predominante en colonizar plantas C₄ y *A. brasilense* lo fue en plantas C₃ de zonas tropicales (Baldani y Döbereiner, 1980; Baldani *et al.*, 1986). Así mismo, se encontró una preferencia similar a la anterior con plantas hospedadas de zonas templadas (Häahtela *et al.*, 1981; Lamm y Neyra, 1981). Cuando la especie bacteriana es inoculada a su respectiva planta hospedada, la frecuencia de éxito es mayor al hacer la combinación planta-bacteria apropiada (Baldani *et al.*, 1983, 1987; Pereira *et al.*, 1988; Rangel-Lucio, 1991; Reynders y Vlassak, 1982). Diferentes efectos morfogénicos en pelos radicales de trigo han sido atribuidos a ciertas cepas de *Azospirillum* en particular (Jain y Patriquin, 1984; Patriquin *et al.*, 1983). Algunos estudios demuestran que algunas plantas (de muchas variedades probadas) respondieron a la inoculación con una cepa de *Azospirillum* en particular (Bouton *et al.*, 1979; Garcia de Salomone y Döbereiner, 1996; Millet *et al.*, 1986; Wani *et al.*, 1985). Hay indicaciones de que la especificidad no es a nivel especie sino a nivel cepa. Caballero-Mellado *et al.* (1992) encontraron que los incrementos en rendimiento de trigo dependieron de la cepa de *Azospirillum brasilense* utilizada. Por otro lado, otros estudios muestran falta de especificidad en la interacción *Azospirillum*-planta. La cepa Cd/Sp-7 de *A. brasilense* benefició un gran número de cereales de verano e invierno tales como trigo, maíz, *Setaria*, verduras

como tomate, berenjenas, pimientos y plantas de cultivo industriales (Bashan *et al.*, 1989b; Kapulnik *et al.*, 1981c, 1983; Smith *et al.*, 1984b; Yahalom *et al.*, 1984). La inoculación de semillas del Cardon gigante (*Pachycereus pringlei*) con cepas de *Azospirillum* redujo el tiempo de germinación de las semillas y promovió el crecimiento de las plántulas (Puente y Bashan, 1993). Además, la inoculación de frijol yorimón (cowpea) y soya con la cepa Cd de *A. brasilense* produjo cambios en el metabolismo de estas plantas (Bashan *et al.*, 1990; 1992). Las cepas Cd y Sp-245 de *A. brasilense* colonizaron exitosamente 64 especies de plantas de las cuales 48 eran hierbas (perennes y anuales) y 16 eran plantas de cultivo (Bashan y Holguin, 1995).

Considerando que *Azospirillum* afecta positivamente un gran diversidad de plantas, se propone que no existe especificidad en la asociación *Azospirillum*-planta. Sin embargo, esto no significa que no pueda existir mayor afinidad entre una especie bacteriana y su respectiva planta hospedante que con otra planta a la que nunca ha estado asociada.

Para confirmar esta propuesta es necesario: i) Realizar pruebas comparativas con cepas obtenidas en lugares diferentes e inoculadas a un solo tipo de planta hospedada, así como pruebas de inoculación con una sola cepa realizadas en plantas hospedantes diferentes e, ii) implementar pruebas rápidas para evaluar la asociación planta-bacteria en todas las cepas y así poder predecir combinaciones planta-bacteria exitosas antes de realizar pruebas de campo (Sukiman y New, 1990).

INTERACCION DE AZOSPIRILLUM CON MICROFLORA DE LA RIZOSFERA

Después de su incorporación al suelo, las células de *Azospirillum* se deben adaptar rápidamente a las condiciones siempre cambiantes de la rizosfera, mismas que incluyen modificaciones frecuentes en la disponibilidad de nutrientes, así como la interacción con bacterias nativas las cuales compiten también por los nutrientes disponibles. Las interacciones pueden ser antagonistas, sinergistas o del tipo predador-presa, en las cuales *Azospirillum* puede ser presa disponible para la micro y macro-fauna necesitada de nutrientes.

La interacción microbiana más estudiada de *Azospirillum* involucra a *Rhizobium*. Por un lado, pruebas de campo e invernadero han demostrado que una inoculación simultánea de *Azospirillum* y *Rhizobium* o el inocular *Azospirillum* a leguminosas colonizadas de

manera natural por los rizobios, da como resultado incremento en la fijación de nitrógeno, mayor número de nódulos, incremento en el contenido de aminoácidos de raíces y brotes, y eventualmente un incremento en rendimiento (Andreeva *et al.*, 1991, 1993; Del Gallo y Fabbri, 1991; Elmokadem y Badawi, 1992; Fabbri y Del Gallo, 1995; Hassouna *et al.*, 1994; Iruthayathas *et al.*, 1983; Itzigsohn *et al.*, 1993; Rai, 1983; Sarig *et al.*, 1986; Yadav *et al.*, 1992; Yahalom *et al.*, 1990). Se encontró que el flavonoide luteolina (inductor del gen involucrado en nodulación) incrementó al igual que *Azospirillum* la formación de nódulos en alfalfa (Itzigsohn *et al.*, 1993).

La inoculación de frijol con floculados (agregados masivos) conteniendo una mezcla de *Azospirillum* y *Rhizobium* promovió significativamente la nodulación y el crecimiento de las plantas (Neyra *et al.*, 1995), sin embargo, la inoculación mixta de *Rhizobium* y *Azospirillum* en cacahuate no produjo ningún efecto sinérgico en la simbiosis *Rhizobium*-planta (Raverkar y Konde, 1990).

Estudios de inoculación mixta en laboratorio han generado datos contradictorios. La aplicación de *A. brasilense* previa a *Rhizobium* incrementó la formación de nódulos en zonas libres de pelos radiculares, aun cuando *Rhizobium* fue aplicado en una concentración no inductora a la formación de nódulos. Este incremento en la susceptibilidad de las leguminosas a la infección por *Rhizobium* fue atribuido al efecto estimulador de las hormonas secretadas por *Azospirillum*. Estas hormonas inducen la formación de un mayor número de células epidérmicas, las cuales se diferencian en pelos radiculares. Esto favorece la infección por *Rhizobium* debido a que este organismo infecta principalmente a través de pelos radiculares (Schmidt *et al.*, 1988; Yahalom *et al.*, 1987). Sin embargo, cuando las células de *Azospirillum* llegan a sobrepasar en número a las células de *Rhizobium* en la mezcla, la inoculación mixta provoca efectos negativos, impidiendo la nodulación de trébol (Plazinski y Rolfe, 1985b, 1985c, 1985d). Aparentemente, la colonización de *Azospirillum* en pelos radiculares bloquea los sitios de infección de *Rhizobium*.

Al agregar *Azospirillum* en concentraciones mayores a 10^8 cfu/ml se inhibió el proceso de elongación de las raíces, aunque este efecto fue menor al combinarse *Azospirillum* con *Rhizobium* (Yahalom *et al.*, 1991). Se ha demostrado la participación del etileno en procesos de senescencia de las plantas. La inoculación de *Azospirillum* a una concentración de 10^9 cfu/ml provocó un incremento

en la producción endógena de etileno por las raíces. A una concentración menor del inóculo, no se incrementó la producción de etileno por las raíces. La producción de etileno por *Azospirillum* dependió de la presencia de metionina cuando la fuente de carbono son malato y succinato (Strzelczyk *et al.*, 1994a). La inoculación con *Azospirillum* incrementó la actividad específica de las enzimas glucosa-6-fosfato heshidrogenasa y otras enzimas al compararse con inoculaciones únicas con *Rhizobium* (Yahalom *et al.*, 1990).

Estos reportes sobre la interacción *Azospirillum*-*Rhizobium* indican que, antes de hacer inferencias, se debe definir cómo interactúan exactamente ambos géneros.

En contraste, la inoculación mixta con *Azospirillum* y hongos micorrízicos vesículo-arbusculares (V-A) origina una interacción sinérgica, obteniéndose un incremento significativo en crecimiento y en el contenido de fósforo de las plantas. Esta inoculación doble podría reemplazar la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y fósforo (Al-Nahidh y Gomah, 1991; Barea *et al.*, 1983; Pacovsky, 1988; Pacovsky *et al.*, 1985a; Singh, 1992b; Singh *et al.*, 1990; Subba Rao *et al.*, 1985a; 1985b) y promover la infección de hongos micorrízicos en plantas (Barea *et al.*, 1983). Los extractos libres de células de *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia* sp., *Azospirillum brasilense* Cd y *A. lipoferum* promovieron la germinación de esporas del hongo micorrízico *G. fasciculatum* (Tilak y Dwivedi, 1990).

Estudios con plantas de sorgo demostraron que la inoculación combinada de *A. brasilense* y las bacterias solubilizadoras de fosfato *Pseudomonas striata* o *Bacillus polymyxa*, incrementó significativamente el rendimiento del grano y la absorción de nitrógeno y fósforo al compararse con los resultados de la inoculación con un solo grupo de organismos (Alagawadi y Gaur, 1992). Los pocos datos obtenidos hasta ahora son alentadores y estimulan la investigación hacia este tipo de interacción, además de que la descripción de las propiedades elementales de esta interesante interacción bacterias-hongos-plantas es muy reciente.

La inoculación de plantas de cebada en maceta con las combinaciones bacterianas *A. lipoferum* 137 + *Agrobacterium radiobacter* 10 (solubilizadora de fosfato) y *A. lipoferum* 137 + *Arthrobacter mysorens* 7, incrementaron el rendimiento de las plantas al compararse con inoculaciones únicas. Las inoculaciones dobles tuvieron un mejor efecto sobre el desarrollo de las plantas cuando la concentración de nitrógeno combinado en el

suelo era baja. Se concluye que la inoculación con mezclas bacterianas permite que las plantas tengan un alimentación más balanceada, mejorándose la absorción del nitrógeno y fósforo presentes en el suelo. Experimentos de campo con tres variedades de cebada confirmaron el hecho de que la inoculación con cultivos mixtos le ayuda a la planta a alcanzar un equilibrio nutricional, e incrementa significativamente su rendimiento al compararse con inoculaciones únicas (Belimov *et al.*, 1995a).

La inoculación mixta de *A. brasilense* y *A. lipoferum* con el hongo agente de control biológico *Phialophora radicola* incrementó significativamente el peso seco de brotes de plantas de trigo al compararse con inoculaciones únicas. Se encontró que el filtrado del hongo estimuló el crecimiento de ambas cepas de *Azospirillum* (Flouri *et al.*, 1995).

Se inhibió la colonización de células de *A. brasilense* en raíces del pasto Kallar (*Leptochloa fusca*) al inocular las semillas del pasto simultáneamente con *Herbaspirillum seropedicae* (Stein *et al.*, 1995).

La inoculación mixta de *Azospirillum lipoferum* y el hongo micorrizico *Glomus intraradices* en plantas de sorgo, incrementó todos los parámetros de crecimiento de las plantas, los niveles de fosfatasa en raíces así como la absorción de minerales, al compararse con inoculaciones únicas (Veerawamy *et al.*, 1992). Al inocular trigo con *A. brasilense* y *Glomus* sp. se incrementó el peso fresco y seco de brotes y raíces (Gori y Favilli, 1995). La inoculación doble de *Glomus macrocarpum* y *A. brasilense* en la planta *Corchorus ollitorius* promovió su crecimiento (Bali y Mukerji, 1991).

Azospirillum establece asociaciones con una gran variedad de bacterias que degradan polisacáridos en las cuales los productos de degradación o fermentación generados por ellas son utilizados por *Azospirillum* como fuentes de energía o carbono. De la inoculación con *Azospirillum* y *Cellulomonas* u hongos celulolíticos surge una interacción sinérgica, promoviéndose la descomposición de paja por las bacterias o los hongos. Los cultivos bacterianos mixtos, líquidos o en suelo, degradan más eficientemente la celulosa que los microorganismos celulolíticos por sí mismos. La interacción microbiana también promueve la fijación de nitrógeno de *Azospirillum*. Se ha encontrado que las células de *Azospirillum* y *Cellulomonas* spp. se encontraban en relación estrecha y cercana, facilitándose de esta manera

una asociación mutualista (Halsall y Gibson, 1985, 1986, 1991; Halsall y Goodchild, 1986; Halsall *et al.*, 1985; Markus y Krämer, 1988). Este sinérgismo podría explicar indirectamente el rendimiento más alto que se ha obtenido con *Azospirillum* ocurrido en suelo mezclado con paja (Hegazi, 1988; Hegazi *et al.*, 1983). Al crecer a *A. brasilense* en cultivo mixto con *Enterobacter cloacae*, utilizando glucosa como fuente de carbono, *E. cloacae* degradó la glucosa produciendo ácido acético y succínico, los cuales fueron utilizados por *A. brasilense* para fijar nitrógeno (Kaiser, 1995). Se ha encontrado que la degradación de pectina por *Bacillus* (Khammas y Kaiser, 1992) se incrementó en presencia de *Azospirillum*. Se obtuvo un incremento en la actividad de la nitrogenasa de *A. brasilense* al crecer en cultivo mixto con *Arthrobacter giacomelloi*. Esta interacción parece estar regulada por un intercambio de metabolitos (Lippi *et al.*, 1992). Al crecer a *A. brasilense* Cd en cultivo mixto con *Staphylococcus* sp., bacteria aislada de la rizosfera del mangle *Avicennia germinans*, se incrementó la fijación de nitrógeno de la primera. El efecto fue mayor al agregar el dializado diluido de *Staphylococcus* sp. al cultivo de *A. brasilense* Cd y se debió parcialmente a la liberación de ácido aspártico por *Staphylococcus* sp. (Holguin y Bashan, 1996). De manera similar a la interacción entre *Azospirillum* y hongos micorrizicos V-A, es necesario primero definir estas interacciones antes de evaluar su potencial. Estos resultados sugieren que *Azospirillum* puede establecer interacciones positivas con otras bacterias de la rizosfera sin importar si se trata de bacterias de otros ambientes completamente ajenos (Holguin y Bashan, 1993).

Las interacciones mencionadas anteriormente representan sólo una fracción pequeña de las relaciones que *Azospirillum* sostiene con otros microorganismos de la rizosfera. Su interacción con especies predominantes de *Pseudomonas* y con poblaciones de *Bacillus* ha sido escasamente estudiada, y la aplicación de *Pseudomonas* sp., la cual sobrepasó en número a *Azospirillum*, inhibió el efecto benéfico de *Azospirillum* sobre las plantas (Fallik *et al.*, 1988). Muchas especies de *Azospirillum* producen bacteriocinas, las cuales, sorprendentemente, inhibieron a otras especies del mismo género (Oliveira y Drozdowicz, 1981, 1987; Skorupska *et al.*, 1985; Tapia-Hernandez *et al.*, 1990). Estas bacteriocinas no identificadas desaparecieron después de haber sido aplicadas en varios tipos de suelos, pero persistieron en suelo con bajo contenido de

materia orgánica y minerales de arcilla (Oliveira y Drozdowicz, 1988). Se desconoce el significado ecológico de las bacteriocinas producidas por *Azospirillum*.

Se ha demostrado que algunos microorganismos del suelo, tales como streptomycetos y hongos, ejercen efectos antagónicos sobre *Azospirillum*, sin embargo, no se logró establecer si esto se debe a la producción de antibióticos (Drozdowicz y Ferreira Santos, 1987; Kulinska y Drozdowicz, 1983; Kulinska y Kroczyńska, 1990; Zuberer y Roth, 1982). Muchas cepas de *Azospirillum* son altamente resistentes a una amplia gama de antibióticos, tales como streptomycina, rifamicina y penicilina (Baldani et al., 1986; Bashan y Levanony, 1985; Döbereiner y Baldani, 1979; Horemans et al., 1987), por lo que el aislamiento de cepas de *Azospirillum* resistentes a antibióticos es una tarea simple. Aprovechando la resistencia natural de *Azospirillum* hacia los antibióticos, se ha mejorado la colonización radicular de *Azospirillum* con un subsecuente incremento en el rendimiento de plantas de trigo cultivadas en macetas. Estos resultados sugieren el utilizar compuestos a los cuales *Azospirillum* es resistente, pero que inhiben temporalmente la microflora natural competidora. Aunque esta inhibición dura solamente algunas semanas, esta resistencia de *Azospirillum* hacia una amplia gama de antibióticos le confirió una ventaja significativa sobre otros organismos en la colonización radicular (Bashan, 1986a). Obviamente esta práctica no puede ser utilizada directamente en el campo, ya que tendría que tratarse todo el suelo ocupado por el sistema de raíces, práctica que originaría altos costos así como contaminación del suelo. Sin embargo, se debe evaluar este enfoque utilizando agroquímicos baratos que no representen un peligro para la salud de la población y no contaminen el medio ambiente.

El tamaño poblacional de *Azospirillum* ha sido estimado en 1-10% de la población total de la rizosfera (Okon, 1985). Es probable que en algunos casos se obtengan estos números, sin embargo, generalmente se obtienen cifras más bajas. Conteos de rutina en la rizosfera indican que este porcentaje es una sobreestimación. En plantas creciendo en suelo, las poblaciones de *Azospirillum* son relativamente pequeñas; el número poblacional más alto fue registrado en cereales de verano en Brasil (10^6 - 10^8 ufc/g) (Baldani et al., 1983). Por lo general, la población de *Azospirillum* es mucho más pequeña, alcanzando un tamaño poblacional promedio de 10^3 - 10^6 ufc/g en trigo (Balandreau, 1986; Bashan y Wolowelsky, 1987; Bashan et al., 1987, 1991b;

Levanony y Bashan, 1989a, 1990, 1991a; Levanony et al., 1987; Negi et al., 1987). En varias ocasiones se han reportado poblaciones de la rizosfera aún más pequeñas (Albrecht et al., 1983; Harris et al., 1989; Smith et al., 1984b). De esta manera, una estimación más adecuada del tamaño poblacional de *Azospirillum* estaría dentro de los valores 0.001-1% de la población total de la rizosfera (O'Hara et al., 1981). Las técnicas de inmunoabsorbencia (ELISA y ABELISA) se han utilizado con éxito para la identificación y conteo de *Azospirillum* en suelo o raíces (Levanony y Bashan, 1990, 1991a; Levanony et al., 1987). Estas técnicas presentan la inconveniencia de no detectar niveles poblacionales bajos (menor a 10^3 bacterias por mililitro).

Recientemente se ha incrementado el número de trabajos relacionados con el estudio de las interacciones entre *Azospirillum* y otros microorganismos. Sin embargo, la información se encuentra muy fragmentada, dispersa entre datos no relacionados con el tema y es de naturaleza descriptiva. Todos estos factores hacen imposible una predicción confiable de las interacciones más importantes. Considerando que *Azospirillum* comprende sólo una pequeña fracción de la población de la rizosfera, es de suponer que muchas otras especies bacterianas afectarán positiva o negativamente a *Azospirillum* en la rizosfera y su participación deberá de tomarse en cuenta al incorporar *Azospirillum* al suelo. Janzen y McGill (1995) demostraron que en microambientes fisicoquímicamente definidos, la proliferación de *A. brasilense* Cd dependió de las interacciones entre las poblaciones a nivel de la comunidad.

AZOSPIRILLUM COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Aun cuando *Azospirillum* no logró reducir el índice de enfermedad provocado por algunos hongos patógenos (Hadas y Okon, 1987), existen algunos trabajos que nos hacen pensar en el potencial de *Azospirillum* como agente de control biológico. Una cepa de *A. lipoferum* produjo sideróforos el cual exhibe actividad antimicrobiana en algunas bacterias y hongos (Shah et al., 1992). La inoculación de algunas dicotiledóneas con *A. brasilense* inhibió el desarrollo de cáncer provocado por *Agrobacterium tumefaciens* (Bakanchikova et al., 1993). El nivel poblacional de *Staphylococcus* sp., decayó drásticamente al crecer en cultivo mixto con *A. brasilense* Cd (Holguin y Bashan, 1996).

AZOSPIRILLUM COMO COMPETIDOR EN LA RIZOSFERA

La gran cantidad de estudios relacionados con las propiedades fisiológicas y bioquímicas de *Azospirillum* revelaron que este género no presenta características especiales que lo distinguan de otros géneros bacterianos presentes en la rizosfera (Hartmann y Zimmer, 1994; Pedrosa, 1988). Sin embargo, algunas especies en particular y aún cepas individuales de *Azospirillum* poseen características de otras especies bacterianas. Esto faculta a dichos organismos a competir eficazmente en la rizosfera de diferentes plantas, a partir de niveles de inóculo extremadamente bajos (10^6 ufc/m²), pese a la abrumadora microflora nativa con la capacidad de colonizar raíces vegetales en condiciones de campo (Bashan, 1986c).

Por definición, todo *Azospirillum* nativo es fijador de nitrógeno y capaz de satisfacer sus necesidades de nitrógeno (Tarrand *et al.*, 1978). Dado que la actividad de la nitrogenasa es sensible a la presencia de oxígeno, *Azospirillum* debe fijar nitrógeno bajo condiciones microaerofílicas (Hartmann y Hurek, 1988) y más aún, algunas cepas presentan una marcada respuesta aerotáctica, que puede llegar a enmascarar otras propiedades relacionadas con substratos químicos (Barak *et al.*, 1982a, 1982b; Das y Mishra, 1984; Del Gallo *et al.*, 1988; Grishanin *et al.*, 1991; Hurek *et al.*, 1987; Okon *et al.*, 1980; Reiner y Okon, 1986). También presentan taxis hacia gradientes "redox" (Grishanin *et al.*, 1991; Zhulin y Armitage, 1992). *Azospirillum* es un microorganismo versátil en su nutrición, dado que las muchas vías metabólicas alternas le permiten consumir una amplia variedad de ácidos orgánicos, azúcares, y aminoácidos de origen vegetal o microbiano disponibles en la rizosfera (Okon, 1985). *Azospirillum* produce vitaminas del grupo B (tiamina, biotina, riboflavina, ácido nicotínico y pantoténico) al crecerse en cultivo líquido y su crecimiento se ve afectado por la presencia de éstas (Dahm *et al.*, 1993; Rodelas *et al.*, 1993). La aplicación artificial de vitaminas al medio también afecta el crecimiento de *Azospirillum* (Rozycki *et al.*, 1992). Casi todas las cepas son altamente móviles, tanto *in vitro* como en el suelo, y poseen una significativa movilidad quimiotáctica hacia una gran variedad de compuestos (Barak *et al.*, 1983; Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987; Hall y Krieg, 1984; Heinrich y Hess, 1985; Lopez de Victoria y Lovell, 1993; Maheswari y Purushothaman, 1990; Mandimba *et al.*, 1986; Okon *et al.*, 1980;

Reinhold *et al.*, 1985). La respuesta quimiotáctica de *Azospirillum* no ha demostrado especificidad en cuanto al tipo de planta (Fedi *et al.*, 1992).

Se evaluó la capacidad de la cepa silvestre Cd de *A. brasilense* y de una mutante deficiente en movimiento, de trasladarse de raíces de una planta hacia otra en arena y charolas con suelo. La cepa no-móvil no se trasladó a raíces no inoculadas permaneciendo en el sitio de inoculación, mientras que la cepa móvil se trasladó de una planta inoculada hacia otra no inoculada. La presencia de sustancias atrayentes tanto como de repelentes determinaron la movilidad. Se propone que el traslado de *A. brasilense* de la raíz de una planta hacia otra es un paso preliminar al proceso de reconocimiento de la bacteria hacia la planta. El traslado de *Azospirillum* hacia las raíces de otras plantas es un proceso activo que no depende de la influencia de algún atrayente o repelente en particular (Bashan y Holguin, 1994; Zhulin y Armitage, 1993) y es influenciado posiblemente por el efecto global de los atrayentes y repelentes exudados por las raíces (Bashan y Holguin, 1994). En cuanto al traslado de *A. brasilense* entre hierbas, la cepa móvil se trasladó de una planta hacia otra independientemente de la especie o familia botánica de la planta ó si se trataba de hierbas perennes o anuales. En suelos saturados de agua sin plantas, *Azospirillum* permaneció en el sitio de inoculación sin moverse (Bashan y Holguin, 1995). *Azospirillum* presentó quimiotaxis a concentraciones pico y nanomolares de ácidos aromáticos, por lo que se considera que *Azospirillum* presenta mecanismos sensoriales más sensibles para la detección de sustancias que otras bacterias del suelo pudiéndolas utilizar como fuentes de energía y carbono. Esta capacidad seguramente contribuye a su sobrevivencia y capacidad de colonización (Lopez de Victoria y Lovell, 1993; Lopez de Victoria *et al.*, 1994). La quimiotaxis dependió de la fase de crecimiento de las células. *A. brasilense* mostró quimiotaxis en respuesta a gradientes temporales de quimioefectores (Zhulin y Armitage, 1993). Cambios en el comportamiento quimiotáctico de *A. brasilense* Sp-7 coincidió con cambios en el potencial de membrana, el principal componente de fuerza motriz para el flagelo (Zhulin *et al.*, 1995), por lo que se propone que la quimiotaxis depende del mecanismo de bombeo de protones que acciona al flagelo.

A. brasilense migra hacia las raíces, a través de secciones de suelo carentes de plantas (Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987) y tienen capacidad de movilidad inter-radical (Bashan y Holguin, 1994; Broek *et*

al., 1993). Mutantes no móviles presentan menos habilidad de colonización que las cepas nativas (Bashan y Holguin, 1994; Kimmel et al., 1990). Las bacterias pueden ser transferidas pasivamente a grandes profundidades a través de la punta de las raíces que se encuentren en proceso de crecimiento (Bashan y Levanony, 1989a) o por medio de su propia movilidad (Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987). Sus flagelos polares rotan en sentido de las manecillas del reloj así como en dirección contraria (Zhulin y Armitage, 1993).

Bajo condiciones de estrés tales como radiación ultravioleta, desecación o tensión osmótica y escasez de nutrientes, *Azospirillum* es capaz de formar quistes, los cuales incrementan significativamente el índice de sobrevivencia de las células (Bashan et al., 1991a; Bleakley et al., 1988; Lamm y Neyra, 1981; Madi et al., 1988; Murray y Moyles, 1987; Oliveira y Desouza, 1991; Sadasivan y Neyra, 1985, 1987; Zaady et al., 1993). *Azospirillum* acumula grandes cantidades de poli-Beta-hidroxibutirato (PHB) (hasta un 70% de su peso seco) el cual puede ser almacenado para una bioconversión posterior o utilizado como fuente de energía cuando el organismo se enfrenta a escasez de nutrientes (Berg et al., 1979; Tal y Okon, 1985). Se demostró que estas formas enquistadas ricas en PHB sobreviven mejor que células sin PHB, siendo los quistes formas celulares fisiológicamente activas (Assmus et al., 1995) capaces de fijar nitrógeno en ausencia de una fuente de carbón exógena (Okon y Itzigsohn, 1992).

A. amazonense y *A. halopraeferans* son resistentes a los ácidos, a sales y a altas temperaturas (Hartmann, 1988; Reinhold et al., 1988a), lo que favorece significativamente sus índices de sobrevivencia en la rizosfera. La tolerancia de bacterias del género *Azospirillum* hacia altas concentraciones de NaCl, sacarosa o polietilenglicol, se incrementa en el orden de *A. amazonense*, *A. lipoferum*, *A. brasilense* y *A. halopraeferans* (Hartmann et al., 1991; Rai, 1991). Los mecanismos de regulación osmótica de *Azospirillum* involucra la acumulación de prolina, glutamato y glicina betaina (Madkour et al., 1990; Riou y Rudulier, 1990; Riou et al., 1991) y de beta (1-3), beta (1-6) glucano (Altabe et al., 1994).

Los estudios de sobrevivencia de *Azospirillum* en su nicho microecológico natural demuestran que este microorganismo sobrevive por periodos prolongados de tiempo y sólo el tamaño de la población llega a variar. Las cepas de *Azospirillum* pueden sobrevivir en raíces durante la temporada de invierno bajo condiciones templadas, pero el

nivel de población se mantiene relativamente bajo (De Coninck et al., 1988; Harris et al., 1989; Horemans et al., 1988), a excepción del trabajo realizado por Germida (1986) en el cual se observó un buen nivel de sobrevivencia en suelos de climas templados. Asimismo, se ha demostrado que *Azospirillum* sobrevive en raíces durante toda la temporada de crecimiento de cereales (Bashan y Levanony, 1987; Bashan et al., 1987; Jagnow, 1982) y arroz (Nayak et al., 1986). Sin embargo, se ha demostrado que *Azospirillum* es incapaz de recuperar su nivel poblacional original después del invierno (Fages, 1992; Harris et al., 1989; Horemans et al., 1988). En tanto que en zonas templadas se encontró que ocurre una transferencia de bacterias de la rizosfera a plantas ubicadas lejos del área original de inoculación, por medio de corrientes de aire (Bashan, 1991b). La importancia ecológica de esta habilidad de sobrevivencia a largo plazo tiene todavía que ser determinada. Dada la capacidad de *Azospirillum* para sobrevivir por periodos prolongados, su habilidad de reinoculación y su fase aérea, la explotación comercial de *Azospirillum* puede llegar a obstaculizarse, ya que una sola inoculación del producto bastaría para producir efectos benéficos por varios años.

La mayoría de las cepas de *Azospirillum* se encuentran en la rizosfera; sin embargo, algunas cepas permanecen en el suelo. *Azospirillum* fue originalmente aislada de suelos arenosos (Beijerinck, 1925); aunque se ha encontrado que bacterias similares al género se encuentran sólo en aluviales de Somalia (Favilli et al., 1988). En un gran número de campos belgas persisten niveles bajos de *Azospirillum* sin importar la textura del suelo (De Coninck et al., 1988; Horemans et al., 1988), mientras que es común encontrar altos niveles de cepas nativas en suelos tropicales. La explicación a este fenómeno se desconoce ya que estos suelos no han sido caracterizados (Döbereiner, 1988; Döbereiner et al., 1976; Patriquin et al., 1983). Una evaluación de la sobrevivencia de *A. brasilense* Cd y Sp-245 en 23 tipos de suelos diferentes obtenidos de distintas regiones geográficas, así como un análisis de la tasa de sobrevivencia para 15 parámetros edáficos diferentes, demostraron que en presencia de plantas la tasa de sobrevivencia fue buena y no dependió del tipo u origen del suelo (Bashan et al., 1995c,d). En ausencia de plantas se encontró que por periodos prolongados (35-45 días), *Azospirillum* sobrevive pobremente en la mayoría de los suelos, tanto en el campo como en el invernadero y casi desaparece después de un periodo menor de 15 días. Aún así, una fracción de la población puede sobrevivir en el

suelo por periodos prolongados (Albrecht *et al.*, 1983; Bashan *et al.*, 1995a,b,c,d; Bashan y Levanony, 1987, 1988c; Horemans *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1984b), siempre y cuando las condiciones de estrés (falta de humedad y materia orgánica, valores bajos de pH, altas concentraciones de carbonato de calcio y alto porcentaje de arena) no prevalezcan (Bashan *et al.*, 1995d; Germida, 1986; Hegazi, 1988; Jagnow, 1982; Sadasivan *et al.*, 1986a; Schank *et al.*, 1985). Se encontró correlación positiva entre la viabilidad bacteriana y porcentaje de arcilla, nitrógeno, materia orgánica y capacidad de retención de agua. Concentraciones altas de CaCO_3 y presencia de arena tuvieron efectos adversos en la sobrevivencia de las cepas (Bashan *et al.*, 1995a,b).

En contraste con sus características superiores, ya mencionadas, *Azospirillum* puede ser parasitado por *Bdellovibrio* sp. en suelo (Germida, 1987) y puede servir de presa a protozoarios nativos del suelo. Como conclusión, *Azospirillum* tiene el potencial para mantener un buen nivel de sobrevivencia en la rizosfera. Es probable que su versatilidad metabólica le permita competir eficazmente con otra microflora de la rizosfera, sin embargo, se requieren de más estudios sobre rizocompetencia para verificar lo anterior. Las varias fases de *Azospirillum* en la rizosfera se muestran en la Figura 1.

INTERACCION DE *AZOSPIRILLUM* CON PARTICULAS DEL SUELO

La inoculación de plantas con *Azospirillum* en algunas ocasiones se ha realizado aplicando las bacterias directamente al suelo, junto a las plántulas germinadas (Bashan, 1986b; Okon y Hadar, 1987). Durante este proceso, la bacteria es expuesta a fuerzas físicas y químicas naturales e interacciones que ocurren entre las bacterias y partículas del suelo. Para superar estas barreras y colonizar las raíces, *Azospirillum* tiene que generar la fuerza física suficiente como para poder desplazarse en el subsuelo (Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987). Pocos trabajos han abordado el estudio de la interacción de *Azospirillum* con partículas del suelo. Las células de *Azospirillum* usualmente se encuentran adheridas de manera irreversible a la fracción superior del perfil de suelo, principalmente mediante interacciones electrostáticas con arcillas y materia orgánica. *A. brasilense* Cd se adsorbió fuertemente a suelos de textura ligera así como a los de textura pesada, sin embargo, se

adsorbió muy ligeramente a partículas de cuarzo (Levanony y Bashan, 1991b).

Las condiciones fisicoquímicas del suelo, tales como pH, el grado de humedad y la disponibilidad de sustancias químicas que atraen a las bacterias, afectan en diferentes grados de magnitud la adhesión de *Azospirillum* al suelo (Bashan y Levanony, 1988c; Horemans *et al.*, 1988). La adhesión de *Azospirillum* a arena pura, carente de arcillas y materia orgánica, es débil, y es llevada a cabo por una red de puentes proteicos que entrelazan la célula bacteriana y las partículas de cuarzo. Se concluye que las fibrillas bacterianas son esenciales para el anclaje de *A. brasilense* Cd. La formación de puentes proteicos es controlada principalmente por la disponibilidad de nutrimentos los cuales serán utilizados para su síntesis (Bashan y Levanony, 1988d, 1991; Bashan *et al.*, 1991a).

La concentración de nitrato disponible en el suelo para las plantas se puede reducir debido a la desnitrificación, a la que se le puede atribuir hasta un 20-30% de pérdidas de nitrógeno aplicado como fertilizante (Firestone, 1982). La participación de *Azospirillum* en este proceso de pérdidas de nitrógeno provocadas por la desnitrificación debe ser investigada.

ASPECTOS AGROTECNICOS: INOCULANTES Y SU INTERACCION CON PESTICIDAS

Una poderosa razón para entender la interacción *Azospirillum*-planta, es la aplicación comercial de la bacteria en sistemas agrícolas de países modernos y de países en vía de desarrollo. Sorprendentemente, muy poco se ha publicado acerca de los aspectos agrotécnicos del sistema, i.e. efectos potenciales de una inoculación con *Azospirillum*, conjuntamente con diferentes compuestos químicos aplicados en sembradíos de interés comercial. Este tipo de información, la cual sería llevada a cabo por compañías de investigación y desarrollo, no es accesible, ya que este tipo de compañías se niegan a publicar sus resultados (Fages, 1992).

Aún después de haber establecido la mejor combinación planta-*Azospirillum*, para la producción comercial de cultivos todavía persiste el problema de lograr una aplicación exitosa de las bacterias. Las bacterias tienen que llegar a la raíz a pesar de que el sistema de raíces se encuentre muy extendido; la inoculación bacteriana debe realizarse en el momento preciso requerido por la planta (Bashan, 1986c); las téc-

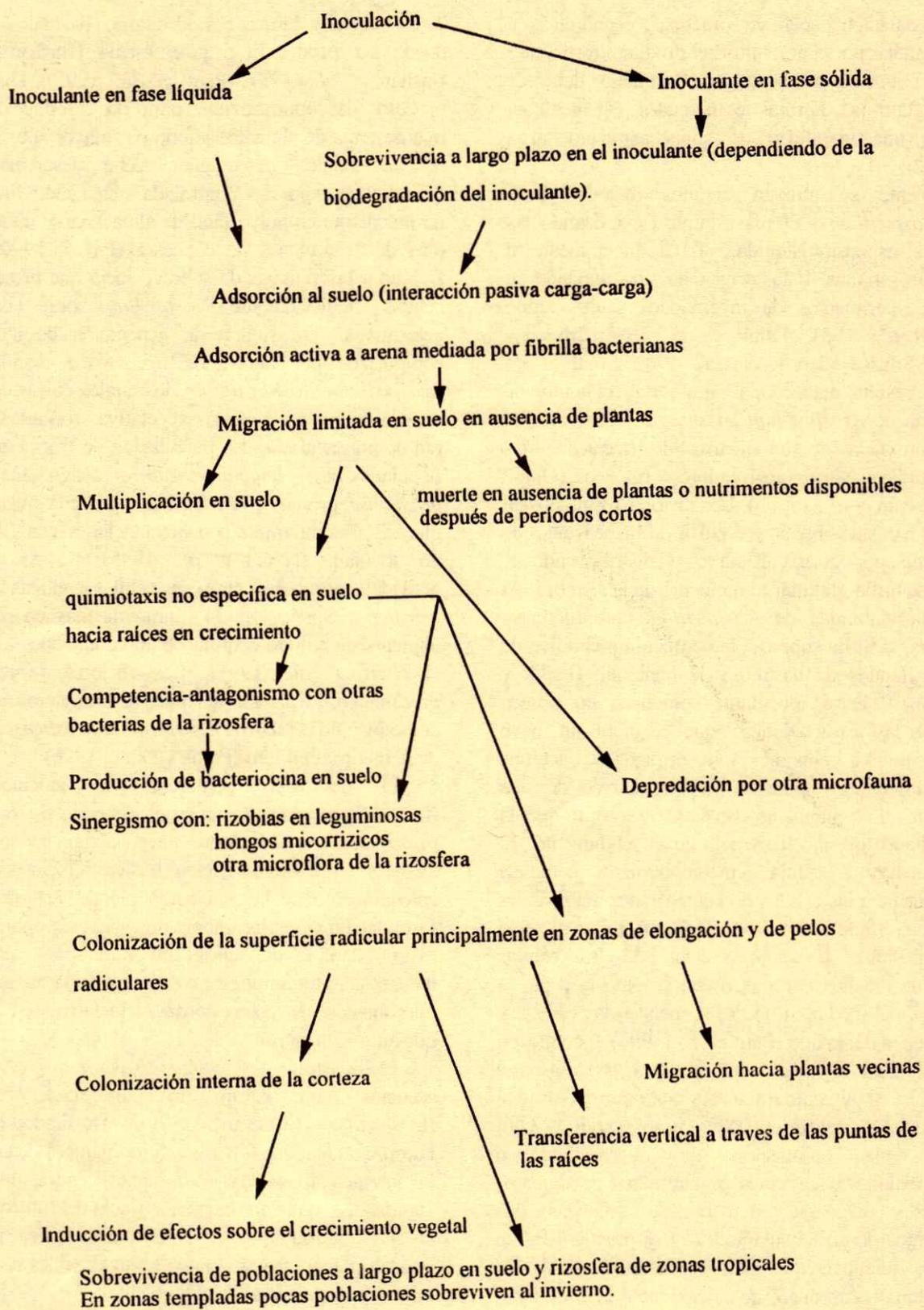


Figura 1. Fases de *Azospirillum* en la rizosfera*, solo indicaciones.

nicas de inoculación deben ser prácticas, económicas y fáciles de manejar por el agricultor; el producto formulado debe proveer inóculo suficiente para la planta; debe ser competitivo con las normas comerciales vigentes, así como tener una viabilidad de almacenamiento larga (Fages, 1992).

Actualmente se utilizan algunos métodos para inocular *Azospirillum*. El más simple es aplicando las bacterias en suspensión líquida, ya sea directamente al suelo o a las semillas. Esta técnica ha sido utilizada en numerosos experimentos de invernadero y de campo (Albrecht *et al.*, 1981; Fallik *et al.*, 1988; Millet y Feldman, 1986; Reynders y Vlassak, 1982; Smith *et al.*, 1984b) pero resulta inadecuada puesto que el tiempo de sobrevivencia de *Azospirillum* en suelo es relativamente corto en ausencia de un acarreador (técnicas más confiables utilizan varios acarreadores orgánicos (Okon, 1985; Sadasivan *et al.*, 1986b). Los mejores resultados en rendimiento han sido obtenidos a partir de suspensiones de turba vertido por goteo al surco o distribuyendo el inoculante de turba granular al momento de la siembra. Al comparar la viabilidad de *Azospirillum* con diferentes acarreadores, la turba superó a la vermiculita, el polvo de talco, los gránulos de basalto y la bentonita (Fallik y Okon, 1996). Estos inoculantes prácticos no poseen ninguna de las características que requiere un buen inoculante debido a la liberación incontrolada de bacterias y varias dificultades técnicas ya que carece de una viabilidad de almacenamiento (Bashan, 1986b), lo que da como resultado una inconsistencia en el rendimiento. El encapsulamiento de células en biopolímeros como el alginato protege a las células de las tensiones ambientales y permite una gradual liberación de las bacterias al suelo (Bashan, 1986b). La sobrevivencia de las células dependerá de muchos parámetros tales como la cepa, la composición del medio en que se suspenden las células y las condiciones de secado. Paul *et al.* (1993) encontraron que la viabilidad de células de *Azospirillum lipoferum* encapsuladas en alginato (macroesferas) es mayor con una tasa baja de secado (1.18g/g peso seco/h). Otra opción es la producción de microesferas o microencapsulados bacterianos en una matriz de alginatos y liofilizados. De esta manera, se satisfacen los requerimientos de un inoculante bueno y práctico. Es un acarreador químicamente inerte similar a polvo de mármol, arena o carbonato de calcio, seco, fácil de usar, uniforme, biodegradable por organismos del suelo, de naturaleza no-tóxica, que contiene una población bacteriana vasta y uniforme, permite la liberación gradual

de las bacterias durante periodos largos hasta de un mes, y puede ser producido a gran escala (Bashan, 1986b; Bashan *et al.*, 1987; Paul *et al.*, 1993). Durante el proceso de optimización para la producción de microesferas de alginato, se obtuvo mayor sobrevivencia de las células al agregar leche descremada con deshidratación por aire controlada, obteniendo, finalmente, un inoculante en polvo fácil de almacenar y manejar con más de 10 billones de células/g (Fages, 1990, 1992). Debido a las ventajas de sobrevivencia que presentan las células enquistadas de *Azospirillum* sobre las células vegetativas, se sugiere la generación de inoculantes compuestos por agregados masivos o floculados de *Azospirillum* y/o *Rhizobium*, los cuales consisten en una mezcla de quistes y células vegetativas rodeados por una red de polisacáridos. La inoculación de frijol con formas floculadas de *R. leguminosarum* o coagregadas con *A. brasilense*, promovió la nodulación y el crecimiento de las plantas al compararse con inoculaciones con *Rhizobium* no floculado (Neyra *et al.*, 1995). Se encontró alta actividad nitrato reductasa en células enquistadas de *A. brasilense* Sp-7 y Sp-245 inmovilizadas en esferas de alginato, en cultivo continuo bajo condiciones anaerobias (Ueckert *et al.*, 1991). Los mejores resultados en crecimiento de plantas de maíz se obtuvieron al utilizar como inóculo células de *Azospirillum brasilense* con 40% de polihidroxibutirato (Fallik y Okon, 1996).

El desarrollo comercial de inoculantes de *Azospirillum* a escala industrial depende de tres factores principales, los cuales están interrelacionados entre sí: (1) avances en la investigación básica relacionada con el entendimiento de la asociación planta-bacteria; (2) una formulación y una tecnología de aplicación optimizadas; y (3) un cambio de actitud favorable por parte de las industrias agroquímicas y semilleras hacia los inoculantes microbianos, así como normas legislativas en cada país que autoricen su uso.

El desarrollo de inoculantes avanzados es una tarea esencial para lograr una aplicación futura de *Azospirillum*. El desarrollo de un acarreador bacteriano adecuado (sintético, orgánico o inorgánico) determinará si la interacción *Azospirillum*-planta tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro.

Los agroquímicos, especialmente los pesticidas, pueden ejercer efectos colaterales indeseables sobre microorganismos presentes en el ambiente.

Se ha ignorado la investigación relacionada con esta área de estudio. La única información disponible se refiere a estudios realizados *in vitro* donde los herbicidas,

fungicidas e insecticidas afectaron negativa o positivamente la actividad de la nitrogenasa (Buff *et al.*, 1992; Gallori *et al.*, 1991; Haahtela *et al.*, 1988; Jagnow *et al.*, 1979; Jena *et al.*, 1992; Martinez-Toledo *et al.*, 1990; Rivarola *et al.*, 1992; Roslycky, 1990; Salmeron *et al.*, 1991), así como el crecimiento de *Azospirillum* (Gadkari 1987, 1988; Omar *et al.*, 1992) y el proceso de respiración bacteriana (Omar y Abd-Alla, 1992).

Se estudió el efecto de thiobencarb en *Azospirillum* asociado con arroz bajo condiciones de laboratorio y campo y se encontró que tuvo un efecto negativo en el crecimiento de las plántulas (Omar *et al.*, 1992). Jena *et al.* (1990) concluyen que bajo condiciones de no inundación en cultivo de arroz, el efecto de los herbicidas sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas dependió del tipo de suelo, concentración del herbicida y del grupo de bacteria.

El pesticida diflubenzuron incrementó significativamente el crecimiento, reducción de acetileno y concentraciones de ATP en células de *A. brasilense* (Sanchez *et al.*, 1994). De seis pesticidas probados, cinco inhibieron el crecimiento y la fijación de nitrógeno de *Azospirillum lipoferum* y cuatro afectaron la movilidad y volumen celular. La incorporación de insecticidas en el medio de crecimiento puede provocar el rompimiento de células de *Azospirillum* y la generación de células enquistadas (Mano *et al.*, 1988) o un incremento en la fijación de nitrógeno y producción de IAA (Jena *et al.*, 1987).

Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que *Azospirillum* puede tolerar altas concentraciones de algunos herbicidas y pesticidas (Langenbach *et al.*, 1991; Salmeron *et al.*, 1991). *A. lipoferum* pudo reducir un compuesto aromático utilizado en la fabricación de pesticidas, colorantes, explosivos y solventes industriales (Russel y Muszynski, 1995).

La aplicación tecnológica de *Azospirillum* dependerá de la realización de más estudios bajo condiciones de campo sobre el efecto de los agroquímicos sobre la fisiología de estas bacterias.

TECNICAS EN LA IDENTIFICACION, LOCALIZACION DE AZOSPIRILLUM EN RAICES Y ESTUDIO DE LA INTERACCION PLANTA-BACTERIA

Generalmente se siguen cuatro estrategias diferentes para el monitoreo de poblaciones y colonización de *Azospirillum* en raíces y suelo: Los métodos tradicionales,

los métodos inmunológicos, los métodos moleculares y combinaciones de varios métodos.

Los métodos tradicionales utilizan marcadores de resistencia a los antibióticos (García de Salomone y Döbereiner, 1996), métodos de microscopía directa con técnicas de inmunofluorescencia (Schloter *et al.*, 1992), métodos de conteo por dilución en placa (Puente y Bashan, 1993), técnicas de cultivo y métodos fisiológicos de rutina. Estos métodos son populares en aquellos laboratorios de investigación agronómica, preocupados por monitorear la presencia de determinadas cepas en suelo o en plantas. Estos métodos no son útiles para la identificación de bacterias a nivel de especie. Además, la mayoría de estos métodos no pueden detectar niveles poblacionales bajos (menores a 10^4 - 10^5 bacterias/ml). Se puede mejorar el método de inmunofluorescencia a través del procesado de imágenes de microfotografías epifluorescentes o con microscopía de barrido con laser (scanning confocal laser microscopy), el cual involucra la iluminación de un solo punto de la muestra por un rayo laser eliminando la interferencia provocada por otros componentes de la muestra no enfocados, al mismo tiempo que permite (a través del procesado de imágenes) la reconstrucción en tres dimensiones del objeto analizado (Schloter *et al.*, 1995). Los métodos de detección inmunológicos han empezado a cobrar importancia en ecología microbiana para el rastreo de microorganismos específicos y para el análisis de la comunidad bacteriana. Para una aplicación confiable de estas técnicas, los anticuerpos monoclonales o el antisuero policlonal utilizados deben cumplir ciertos criterios de calidad. Se debe descartar la posibilidad de reacción cruzada así como determinar la localización celular del determinante antigénico, las características de afinidad y la expresión del determinante antigénico en condiciones ambientales. Los métodos inmunológicos pueden ser utilizados para la identificación, cuantificación y enriquecimiento de bacterias específicas, así como para la visualización de células *in situ*. La sensibilidad de estas técnicas inmunológicas avanzadas es comparable a los resultados obtenidos con la reacción en cadena de la polimerasa PCR (polymerase chain reaction) (Schloter *et al.*, 1995).

Una de las técnicas inmunológicas más útiles y directas es la técnica ELISA con sus variantes. Su principal desventaja es que el nivel de detección no es mayor a 10^4 bacterias/ml de suelo (Levanony *et al.*, 1987). La incorporación del complejo avidina-biotina a la técnica estándar de ELISA mejoró el nivel de detección y la cuan-

tificación de *A. brasilense* (Levanony y Bashan, 1990). Para mejorar el nivel de detección, se desarrolló un método sencillo de enriquecimiento, basado en la multiplicación limitada de *A. brasilense* en el medio semi-sólido convencional. El conteo de las bacterias se realiza después por la técnica ELISA o por la técnica del Número Más Probable (NMP) (Bashan *et al.*, 1991b).

Un método aún más sensible y rápido que la técnica ELISA es el inmunoensayo basado en quimioluminiscencia. Con este método fue posible cuantificar a *A. brasilense* Sp-7 hasta a una densidad de 100 bacterias/ml de extracto de suelo (Schloter *et al.*, 1992).

Las técnicas de vanguardia para la detección de microorganismos son las moleculares utilizadas solas o en combinación con técnicas inmunológicas. Por ahora, estas técnicas son principalmente utilizadas en laboratorios de investigación para la detección de especies y, hasta donde sabemos, no han sido utilizadas a gran escala por la industria de los inoculantes. Sin embargo, es de esperarse que, debido a su precisión, en un futuro estas técnicas serán ampliamente utilizadas.

Existen varios métodos de análisis del perfil proteico o "fingerprinting" para identificar especies de *Azospirillum*, siendo posible, en algunos casos, diferenciar hasta cepas de una misma especie. El análisis del perfil proteico utilizando electroforesis en "pulsed-field gel" demostró que diferentes cepas de *Azospirillum* asociadas a plantas de cultivo diferentes, mostraron un patrón genético muy similar (Eid y Sherwood, 1995). El análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP) es otra opción para la identificación de bacterias a nivel cepa. La identificación de células de *Azospirillum* a través del RFLP del operon histidina y el análisis del 16S rDNA, son métodos fáciles, rápidos, confiables y reproducibles (Grifoni *et al.*, 1995) o a través de sondas (probes) de *Azospirillum* basados en el gen del 16S-rRNA (Kabir *et al.*, 1995). Giovannetti *et al.* (1992) tuvieron éxito en la identificación de cepas pertenecientes a las especies *A. lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense* utilizando el análisis del patrón de restricción, por lo que sugieren su uso para la identificación rutinaria de *Azospirillum*. Al marcar a *A. brasilense* con el transposon Tn5, el nivel de detección alcanzó niveles tan bajos como de 25 células/g de suelo (Christiansen-Weniger, 1992). Adicionalmente, los genes indicadores (reporter genes) NifA-lacZ fueron utilizados para localizar a *A. brasilense* Sp-7 en raíces de trigo (Katupitiya *et al.*, 1995).

Se utilizó hibridación de células completas con sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia (fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes) para el monitoreo *in situ* de *A. brasilense* en plántulas de trigo. Para eliminar la interferencia provocada por la fluorescencia que emiten otros componentes de la muestra, se utilizó "scanning confocal laser microscopy". Esta técnica permitió un análisis de alta resolución de la distribución espacial de las bacterias en la rizosfera del trigo (Assmus *et al.*, 1995).

Además de las técnicas mencionadas, se utilizó un método microcalorimétrico basado en la producción de calor del cultivo, para medir la sobrevivencia de las bacterias en suelo así como su metabolismo *in situ* (Vandenhove *et al.*, 1993). Ellos proponen caracterizar los cultivos de *Azospirillum* y estandarizar y optimizar inóculos a través de datos microcalorimétricos del cultivo.

En suma, aunque las técnicas tradicionales seguirán siendo utilizadas con fines prácticos, seguramente serán reemplazadas por versiones sencillas o kits de los métodos avanzados descritos aquí.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En la discusión general de la última conferencia internacional sobre *Azospirillum* y microorganismos relacionados sostenida en Sárvár, Hungría, 1994, los participantes decidieron dirigir los esfuerzos de investigación futura sobre fisiología y ecología de *Azospirillum* a los siguientes temas: (i) co-inoculación con otros microorganismos, (ii) inoculación de plantas maderables, (iii) la participación de superficies bacterianas y vegetales en el proceso de adhesión, (iv) la importancia del genotipo en la interacción *Azospirillum*-planta, (v) especificidad y afinidad, y (vi) adaptabilidad ambiental (rizocompetencia).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue escrito en memoria del Sr. Avner Bashan de Israel quien alentó la investigación agrícola. Agradecemos a la Srita. Patricia Vázquez por organizar las citas bibliográficas y a Edgar Yuan por las búsquedas en los bancos de datos. Este trabajo fue realizado con el apoyo económico #3541-A del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

LITERATURA CITADA

- Agarwala Dutt, R., K.V.B.R. Tilak y J.P.S. Rana. 1991. Isolation of *Azospirillum* from the interior of various parts of some graminaceous plants. *Z. Mikrobiol.* 146: 217-219.
- Alagawadi, A.R. y A.C. Gaur. 1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in dry land. *Trop. Agric.* 69: 347-350.
- Albrecht, S.L., M.H. Gaskins, J.R. Milam, S.C. Schank y R.L. Smith. 1983. Ecological factors affecting survival and activity of *Azospirillum* in the rhizosphere. In: *Azospirillum* II *Experientia Supplementum*, Vol. 48. W. Klingmüller (Ed.) Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 138-148.
- Albrecht, S.L., Y. Okon, L. Lonnquist y R.H. Burris. 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Sci.* 21: 301-306.
- Al-Nahidh, S y A.H.M. Gomah. 1991. Response of wheat to dual inoculation with VA-mycorrhiza and *Azospirillum*, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. *Arid Soil Res. Rehabil.* 5: 83-96.
- Altabe, S.G., N. Inon-de-Iannino., D. De-Mendoza y R.A. Ugalde. 1994. New osmoregulated β (1-3), β (1-6) glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 176: 4890-4898.
- Andreeva, I.N., K. Mandkhan, T.V. Red'kina., E.N. Mishustin y S.F. Izmilov. 1991. Effect of *Azospirillum brasilense* on formation and nitrogen-fixing activity of bean and soybean nodules. *Soviet Plant Physiology* 38: 646-651.
- Andreeva, I.N., T.V. Red'kina y S.F.I. Smailov. 1993. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium*-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russian J. Plant Physiol.* 40: 901-906.
- Antonyuk, L.P., O.R. Fomina, M.A. Galkin y V.V. Ignatov. 1993. The effect of wheat germ agglutinin on dinitrogen fixation, glutamine synthetase activity and ammonia excretion in *Azospirillum brasilense* Sp 245. *FEMS Microbiol. Lett.* 110: 285-289.
- Antonyuk, L.P. O.R. Fomina, A. Kalinina, S. Semenov, M. Nesmeyanova y V. Ignatov. 1995. Wheat lectin possibly serves as a signal molecule in the *Azospirillum*-wheat association. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 319-324.
- Arsac, J.F., C. Lamothe, D. Mulard y J. Fages. 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10: 640-654.
- Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J.R. Lawrence y A. Hartmann. 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013-1019.
- Avivi, Y. y M. Feldman. 1982. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. *Isr. J. Bot.* 32: 237-245.
- Bakanchikova, T.I., E.V. Lobanok, L.K. Pavlova Ivanova, T.V. Red'kina, Z.A. Nagapetyan y A.N. Majsuryan. 1993. Inhibition of tumor formation process in dicotyledonous plants by *Azospirillum brasilense* strains. *Mikrobiologiya* (Russian Federation) 62: 515-523. (In Russian).
- Balandreau, J. 1986. Ecological factors and adaptive processes in N_2 -fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant Soil* 90: 73-92.
- Baldani, V.L.D. y J. Döbereiner. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem* 12: 433-439.
- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 924-929.
- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol. Fertil. Soils* 4: 37-40.
- Baldani, V.L.D., M.A. De B. Alvarez, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* 90: 35-46.
- Bali, M y K.G. Mukerji. 1991. Interaction between VA mycorrhizal fungi and root microflora of jute. *Dev. Agric. Manage. For. Ecol.* 24: 396-401.
- Bar, T. y Y. Okon. 1995. Conversion of tryptophan, indole-3-pyruvic acid, indole-3-lactic acid and indole to indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense* Sp 7. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds) NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 347-359.
- Barak, R., I. Nur y Y. Okon. 1983. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 399-403.
- Barak, R., I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982a. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *J. Bact.* 152: 643-649.
- Barak, R., I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982b. Tactic responses of *Azospirillum brasilense* towards oxygen and organic compounds. *Isr. J. Bot.* 31: 229-236.
- Barbieri, P., A. Bernardi, E. Galli y G. Zanetti. 1988. Effects of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on wheat roots development. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 181-188.
- Barbieri, P., C. Baggio, M. Bazzicalupo, E. Galli, G. Zanetti y M.P. Nuti. 1991. *Azospirillum*-gramineae interaction: effect of indole-3-acetic acid. *Dev. Plant Soil Sci.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht 48: 161-168.
- Barbieri, P., C. Trambaioli, G. Zanetti y E. Galli. 1995. Inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd affects the root system development of *Sorghum bicolor*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 335-340.
- Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli y G. Zanetti. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some

- mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 87-90.
- Barea, J.M., A.F. Bonis y A. Olivares. 1983. Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 15: 705-709.
- Barton, L.L., G.V. Johnson y S. Orbock Miller. 1986. The effect of *Azospirillum brasilense* on iron absorption and translocation by sorghum. *J. Plant Nut.* 9: 557-565.
- Bashan, Y. 1986a. Enhancement of wheat roots colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of the rhizosphere microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1067-1071.
- Bashan, Y. 1986b. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1089-1098.
- Bashan, Y. 1986c. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* 18: 297-301.
- Bashan, Y. 1986d. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.* 132: 3407-3414.
- Bashan, Y. 1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. *Can. J. Microbiol.* 36: 419-425.
- Bashan, Y. 1991a. Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 37: 958-963.
- Bashan, Y. 1991b. Air-borne transmission of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. *Microb. Ecol.* 22: 257-269.
- Bashan, Y., A. Carrillo y G. Holguin. 1995a. New synthetic and multi-species bacterial inoculants for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications. I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov y W.E. Newton (Eds). In the series "Current plant science and biotechnology in agriculture" Vol. 27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. p. 750.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 379-385.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1994. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2120-2131.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1995. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microb. Ecol.* 29: 269-281.
- Bashan, Y., G. Holguin y A. Carrillo. 1995b. Mixed bacterial inoculants and micro-encapsulated synthetic inoculants: present status and future prospects. In: International Workshop on Associative Interactions of Nitrogen-Fixing Bacteria with Plants. Saratov, Russia. pp. 42-44.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R.E. Whitmoyer y H. Levanony. 1991a. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant Soil.* 132: 73-83.
- Bashan, Y., G. Mitiku, O. Ziv-Vecht y H. Levanony. 1991b. Estimation of minimal numbers of *Azospirillum brasilense* using time-limited liquid enrichment combined with enzyme-linked immunosorbent assay. *Soil Biol. Biochem.* 23: 135-138.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1985. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 31: 947-952.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3473-3480.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988a. Interaction between *Azospirillum brasilense* Cd and wheat root cells during early stages of root colonization. In: *Azospirillum* IV, Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 166-173.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988b. Migration, colonization and adsorption of *Azospirillum brasilense* to wheat roots. In: Lectins-biology, biochemistry, clinical biochemistry. T. C. Bøg-Hansen y D. L. J. Freed (Eds). Vol. 6. Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. pp. 69-84.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988c. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1811-1820.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988d. Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to a light-textured soil by protein bridging. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2269-2279.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1989a. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2899-2908.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1989b. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can. J. Microbiol.* 35: 936-944.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil.* 137: 99-103.
- Bashan, Y., H. Levanony y E. Klein. 1986. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 132: 3069-3073.
- Bashan, Y., H. Levanony y G. Mitiku. 1989a. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 35: 691-697.
- Bashan, Y., H. Levanony y O. Ziv-Vecht. 1987. The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. *Can. J. Microbiol.* 33: 1074-1079.
- Bashan, Y., H. Levanony y R.E. Whitmoyer. 1991b. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* 137: 187-196.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R.E. Whitmoyer y H. Levanony. 1991c. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant and Soil* 132: 73-83.

- Bashan, Y y J.G. Dubrovsky. 1996. *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. Biol. Fertil. Soils. (In Press).
- Bashan, Y. y J. Wolowelsky. 1987. Soil samplers for quantifying microorganisms. Soil Sci. 143: 132-138.
- Bashan, Y., L. Alcaraz-Melendez y G. Toledo. 1992. Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Symbiosis 13: 217-228.
- Bashan, Y., M.E. Puente, M.N. Rodríguez-Mendoza, G. Holguin, G. Toledo, R. Ferrera-Cerrato y S. Pedrín. 1995c. Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 441-449.
- Bashan, Y., M.E. Puente, M.N. Rodríguez-Mendoza, G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato y S. Pedrín. 1995d. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1938-1945.
- Bashan, Y., M. Singh y H. Levanony. 1989c. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. Canadian Journal of Botany 67: 2429-2434.
- Bashan, Y., S.K. Harrison y R.E. Whitmoyer. 1990. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. Appl. Environ. Microbiol. 56: 769-775.
- Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanony y A. Asade. 1989b. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Botany 67: 1317-1324.
- Becking, J.H. 1982. *Azospirillum lipoferum*-a reappraisal. In: *Azospirillum*, Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 130-149.
- Beijerinck, M.W. 1925. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann? Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 2, 63: 353-359.
- Belimov, A.A., A.P. Kojemiakov, C.V. Chuvarliyeva. 1995a. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. Plant Soil. 173: 29-37.
- Berg, R.H., M.E. Tyler, N.J. Novick, V. Vasil y I.K. Vasil. 1980. Biology of *Azospirillum*-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. Appl. Environ. Microbiol. 39: 642-649.
- Berg, R.H., V. Vasil y I.K. Vasil. 1979. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association II. Ultrastructure. Protoplasma 101: 143-163.
- Berge, O, J. Fages, D. Mulard y J. Balandreau. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. Symbiosis 9: 259-266.
- Bhattacharai, T. y D. Hess. 1993. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. Plant Soil 151: 67-76.
- Bilal, R., G. Rasul, M. Arshad y K.A. Malik. 1993. Attachment, colonization and proliferation of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter* spp. on root surface of grasses. World. J. Microbiol. Biotechnol. 9: 63-69.
- Bilal, R., G. Rasul, J.A. Qureshi y K.A. Malik. 1990. Characterization of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology 6: 46-52.
- Bleakley, B.H., M.H. Gaskins, D.H. Hubbell, y S.G. Zam. 1988. Floc formation by *Azospirillum lipoferum* grown on poly-hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2986-2995.
- Boddey, R.M. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Gramineae. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 6: 209-266.
- Boddey, R.M. y J. Döbereiner. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. Plant Soil 108: 53-65.
- Boddey, R.M., V.L.D. Baldani, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. Plant Soil 95: 109-121.
- Bothe, H., H. Koersgen, T. Lehmacher y B. Hundeshagen. 1992. Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. Symbiosis 13: 167-179.
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce y R.P. Pharis. 1989. Identification of gibberellins A₁, A₃, and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47.
- Bouton, J.H., R.L. Smith, S.C. Schank, G.W. Burton, M.E. Tyler, R.C. Littell, N.R. Gallaher y K.H. Quesenberry. 1979. Response of pearl millet inbreds and hybrids to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Crop Sci. 19: 12-16.
- Bouton, J.H. y D.A. Zuberer. 1979. Response of *Panicum maximum* Jacq. to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Plant Soil 52: 585-590.
- Broek, A.V., J. Michiels, A. Van Gool y J. Vanderleyden. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *NifH* genes during association. Mol. plant-microbe inter. 6: 592-600.
- Buff, K., D.M.S. Mano y T. Langenbach. 1992. Effect of endosulfan on *Azospirillum lipoferum* growth, morphology, nitrogenase activity and protein binding. Appl. Environ. Microbiol. 8: 3173-3176.
- Caballero Mellado, J., M.G. Carcano Montiel y M.A. Mascarua Esparza. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13: 243-253.
- Chela, G.S. M.S. Tiwana, I.S. Thind, K.P. Puri y K. Kaur. 1993. Effect of bacterial cultures and nitrogen fertility on the yield and quality of maize fodder (*Zea mays* L.). Ann. Biol. 9: 83-86.
- Christiansen-Weniger, C. 1988. An influence of plant growth substances on growth and nitrogenase activity from *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 141-149.

- Christiansen-Weniger, C. 1992. Dynamics of a transposon Tn5 mutant of *Azospirillum brasilense* in soil and rhizosphere of spring wheat. *Symbiosis* 13: 85-100.
- Christiansen-Weniger, C. y J.A. Van Veen. 1991. NH₄⁺-excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3006-3012.
- Christiansen-Weniger, C. y J. Vanderleyden. 1994. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. *Biol. Fertil. Soils* 17: 1-8.
- Cohen, E., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur y Y. Henis. 1980. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.* 66: 746-749.
- Croes, C.L., S.Moens, E. Van Bastelaere, J. Vanderleyden y K.W. Michiels. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2261-2269.
- Crossman, S.M. y Hill, W.A. 1987. Inoculation of sweet potato with *Azospirillum*. *HortScience* 22: 420-422.
- Crozier, A., P. Arruda, J.M. Jasmin, A.M. Monteiro y G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2833-2837.
- Dahm, H., H. Rozycki, E. Strzelczyk y C.Y. Li. 1993. Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. *Z. Mikrobiol.* 148: 195-203.
- Das, A. y A.K. Mishra. 1984. Aerotolerant growth in *Azospirillum brasilense* induced by dehydroxyphenyl iron-binding compound. *Curr. Microbiol.* 11: 313-316.
- Dayakar Yadav, B.R. y T.D. Nagendra Kumar. 1991. Response of mulberry (*Morus alba* var. local) to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Indian j. Microbiol.* 31: 109-111.
- De Coninck, K., S. Horemans, S. Rombombage y K. Vlassak. 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. *Plant Soil* 110: 213-218.
- De Freitas, J.R. y J.J. Germida. 1990. A root tissue culture system to study winter wheat-rhizobacteria interactions. *Appl. Microbiol. Biotech.* 33: 589-595.
- Del Gallo, M. y A. Haegi. 1990. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis* 9: 155-161.
- Del Gallo, M. y I. Fendrik. 1994. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: *Azospirillum/plant associations*. Y. Okon (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 57-75.
- Del Gallo, M., L. Gratani y G. Morpurgo. 1988. Selection at the chemostat of *Azospirillum brasilense* Cd N₂-fixing at high O₂ pressure. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 75-82.
- Del Gallo, M., M. Negi y C.A. Neyra. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 171: 3504-3510.
- Del Gallo, M. y P. Fabbri. 1990. Inoculation of *Azospirillum brasilense* Cd on chickpea (*Cicer arietinum*). *Symbiosis* 9: 283-287.
- Del Gallo, M. y P. Fabbri. 1991. Effect of soil organic matter on chickpea inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* bv. ciceri. *Plant Soil* 137: 171-175.
- Döbereiner, J. 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110: 207-212.
- Döbereiner, J., I.E. Marriell y M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
- Döbereiner, J. y V.L.D. Baldani. 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 1264-1269.
- Drozdowicz, A. y G.M. Ferreira Santos. 1987. Nitrogenase activity in mixed cultures of *Azospirillum* with other bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 142: 487-493.
- Dubrovsky, J.G., M.E. Puente y Y. Bashan. 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp-245 on root hairs growth. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1657-1664.
- Elmokadem, M.T. y Badawi, A.M. 1992. Effect of *Azospirillum* inoculation on the amino acid content in roots and shoots of wheat, barley, peas and lupin. *Z. Mikrobiol.* 147: 119-125.
- Eskew, D.L., A.R.J. Eaglesham y A.A. App. 1981. Heterotrophic ¹⁵N₂ fixation and distribution of newly fixed nitrogen in a rice-flooded soil system. *Plant Physiol.* 68: 48-52.
- Eyers, M., J. Vanderleyden y A. Van Gool. 1988a. Attachment of *Azospirillum* to isolated plant cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 435-439.
- Eyers, M., F. Waelkens, J. Vanderleyden y A.P. Van Gool. 1988b. Quantitative measurement of *Azospirillum* plant cell attachment. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 174-180.
- Fabbri, P. y M. Del Gallo. 1995. Specific interaction between chickpea (*Cicer arietinum*) and three chickpea-*Rhizobium* strains inoculated singularly and in combination with *Azospirillum brasilense* Cd. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics- physiology -ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 257-267.
- Fages, J. 1990. An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotech.* 32: 473-478.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: Formulation and application technology. *Symbiosis* 13: 15-26.
- Fages, J. y J.F. Arzac. 1991. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. *Plant. Soil.* 137: 87-90.
- Fages, J. y B. Lux. 1991. Identification of bacteria isolated from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivated in a French Soil. *Can. J. Microbiol.* 37: 971-974.

- Falk, E.C., J. Döbereiner, J.L. Johnson y N.R. Krieg. 1985. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 117-118.
- Falk, E.C., J.L. Johnson, V.L.D. Baldani, J. Döbereiner y N. R. Krieg. 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 80-95.
- Fallik, E., S. Sarig y Y. Okon. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum/plant associations*. Y. Okon (Ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 77-85.
- Fallik, E. y Y. Okon. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28: 123-126.
- Fallik, E., Y. Okon, E. Epstein, A. Goldman y M. Fischer. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* - inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21: 147-153.
- Fallik, E., Y. Okon y M. Fischer. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 20: 45-49.
- Favilli, F., F. Trinci y W. Balloni. 1988. *Azospirillum* spp ecology of some soils of the Somali republic. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 223-233.
- Favilli, R., R. Pastorelli y A. Gori. 1993. Response of sugar beet to *Azospirillum* bacterization in field experiments. *Agr. Med.* 123: 281-285.
- Fedi, S., P. Montaini y F. Favilli. 1992. Chemotactic response of *Azospirillum* toward root exudates of C₃ and C₄ plants. *Symbiosis* 13: 101-105.
- Fernandez-Vega Figueroa, Z.C. 1995. Capacidad fijadora de nitrógeno *in vitro* e *in vivo* de dos cepas de *Azospirillum* en plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México.
- Firestone, M.K. 1982. Biological denitrification. In: *Nitrogen in agricultural soils*. F.J. Stevenson (Ed.). Agronomy monograph, American Society for Agronomy, Madison, WI. 22: 289-326.
- Flouri, F., K. Sini y C. Balis. 1995. Interactions between *Azospirillum* and *Phialophora radicicola*. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 231-237.
- Fulchieri, M., C. Lucangeli y R. Bottini. 1993. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status on corn seedling roots. *Plant Cell Physiol.* 34: 1305-1309.
- Fulchieri, M. y L. Frioni. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 26: 921-923.
- Gadkari, D. 1987. Influence of the herbicides Arelon, Goltix and Stomp on growth and nitrogenase activity of *Azospirillum lipoferum*. *Zentralbl. Mikrobiol.* 142: 587-594.
- Gadkari, D. 1988. Influence of herbicides on growth and nitrogenase activity of *Azospirillum*. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 150-158.
- Gafni, R., Y. Okon, Y. Kapulnik y M. Fischer. 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem.* 18: 69-75.
- Gallori, E., E. Casalone, C.M. Colella, S. Daly y M. Polsinelli. 1991. 1,8-Naphthalic anhydride antidote enhances the toxic effects of captan and thiram fungicides on *Azospirillum brasilense* cells. *Res. Microbiol.* 142: 1005-1012.
- Gamo, T. y S.B. Ahn. 1991. Growth-promoting *Azospirillum* spp. isolated from the roots of several non-gramineous crops in Japan. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 37: 455-461.
- García de Salomone, I. y J. Döbereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soil* 21:193-196.
- George, M. 1990. *Azospirillum* for nitrogen fixation in coconut (a research note). *Philippine J. Coconut Studies* 15: 1-3.
- Germida, J.J. 1986. Population dynamics of *Azospirillum brasilense* and its bacteriophage in soil. *Plant Soil* 90: 117-128.
- Germida, J.J. 1987. Isolation of *Bdellovibrio* spp. that prey on *Azospirillum brasilense* in soil. *Can. J. Microbiol.* 33: 459-461.
- Giovannetti, L., S. Fedi, A. Gori, P. Montaini y S. Ventura. 1992. Identification of *Azospirillum* strains at the genome level with total DNA restriction pattern analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 37-41.
- Gori, A. y F. Favilli. 1995. First results on individual and dual inoculation with *Azospirillum - glomus* on wheat. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology- ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds) NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 245-249.
- Gosal, S.K., R.P. Gupta y S.S. Gosal. 1990. Establishment of association between *Azospirillum* and non-legumes *in vitro* and plant regeneration. *Ann. Biol.* 6: 161-165.
- Govedarica, M., N. Milosevic, M. Jarak y M. Vojvodic Vukovic. 1993. Effectiveness of *Azospirillum lipoferum* strains in carrot. *Zemljiste I. Biljka (Yugoslavia)* 42: 121-125. (in Serbian)
- Grifoni, A., M. Bazzicalupo, C. Di-Serio, S. Fancelli y R. Fani. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 85-91.
- Grishanin, R.N., I.I. Chalmina, I.B. Zhulin. 1991. Behaviour of *Azospirillum brasilense* in a spatial gradient of oxygen and in a 'redox' gradient of an artificial electron acceptor. *J.Gen.Microbiol.* 137: 2781-2785.
- Haahtela, K., S. Kilpi y K. Kari. 1988. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 123-127.

- Haahtela, K., T. Wartiovaara, V. Sundman y J. Skujins. 1981. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 203-206.
- Hadas, R. y Y. Okon. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils* 5: 241-247.
- Hall, P.G. y N.R. Krieg. 1984. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 433-435.
- Halsall, D.M. y A.H. Gibson. 1985. Cellulose decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Cellulomonas gelida* and *Azospirillum* species of *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1021-1026.
- Halsall, D.M. y A.H. Gibson. 1986. Comparison of two *Cellulomonas* strains and their interaction with *Azospirillum brasilense* in degradation of wheat straw and associated nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 855-861.
- Halsall, D.M. y A.H. Gibson. 1991. Nitrogenase activity (C₂H₂ reduction) in straw-amended wheat belt soils in response to diazotrophs inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 987-998.
- Halsall, D.M. y D.J. Goodchild. 1986. Nitrogen fixation associated with development and localization of mixed population of *Cellulomonas* sp. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 849-852.
- Halsall, D.M., G.L. Turner y A.H. Gibson. 1985. Straw and xylan utilization by pure cultures of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 423-428.
- Harari, A., J. Kigel y Y. Okon. 1988. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant Soil* 110: 275-282.
- Hardy, R.W., R.D. Holsten, E.K. Jackson y R.C. Burns. 1968. The acetylene-etylene assay for N₂ fixation: Laboratory and Field evaluation. *Plant Physiology*. 43: 1185-1207.
- Harris, J.M., J.A. Lucas, M.R. Davey, G. Lethbridge y K.A. Powell. 1989. Establishment of *Azospirillum* inoculant in the rhizosphere of winter wheat. *Soil Biol. Biochem.* 21: 59-64.
- Hartmann, A. 1988. Osmoregulatory properties of *Azospirillum* spp. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 122-130.
- Hartmann, A., M. Singh y W. Klingmüller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
- Hartmann, A., S.R. Prabhu y E.A. Galinski. 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil*. 137: 105-109.
- Hartmann, A. y T. Hurek. 1988. Effect of carotenoid overproduction on oxygen tolerance of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2449-2455.
- Hartmann, A. y W. Zimmer. 1994. Physiology of *Azospirillum*. *In: Azospirillum/plant associations.* Y. Okon (Ed.) CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 15-39.
- Hassouna, M.G., M.T. Hassan y M.A. Madkour. 1994. Increased yields of alfalfa (*Medicago sativa*) inoculated with N₂-fixing bacteria and cultivated in a calcareous soil of Northwestern Egypt. *Arid Soil Res. Rehabilit.* 8: 389-393.
- Hegazi, N.A. 1988. Modification of soil environment through straw application versus *Azospirillum* spp. inoculation. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 215-222.
- Hegazi, N.A., M. Monib, H.A. Amer y E.S. Shokr. 1983. Response of maize plants to inoculation with azospirilla and (or) straw amendment in Egypt. *Can. J. Microbiol.* 29: 888-894.
- Heinrich, D. y D. Hess. 1985. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.* 31: 26-31.
- Hess, D. 1982. Induction of nitrogenase activity in *Azospirillum* by wheat. *In: Azospirillum: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 69-74.
- Heulin, T., A. Guckert y J. Balandreau. 1987. Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. *Biol. Fertil. Soils*. 4: 9-14.
- Heulin, T., M. Rahman, A.M.N. Omar, Z. Rafidison, J.C. Pierrat y J. Balandreau. 1989. Experimental and mathematical procedures for comparing N₂-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. *J. Microbiol. Meth.* 9:163-173.
- Hill, W.A., P. Bacon-Hill., S.M. Crossman y C. Stevens. 1983. Characterization of N₂-fixing bacteria associated with sweet potato roots. *Can. J. Microbiol.* 29: 860-862.
- Holguin, G. y Y. Bashan. 1993. Increasing the nitrogen-fixing activity of *Azospirillum* by mixed culturing with *Staphylococcus* sp. *In: New horizons in nitrogen fixation.* R. Palacios, J. Mara y W.E. Newton (Eds). Nijhoff/Junk, Dordrecht, The Netherlands. (in press).
- Holguin, G., y Y. Bashan. 1996. Co-culturing of *Azospirillum brasilense* Cd with the mangrove rhizosphere bacteria *Staphylococcus* sp. promotes its nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* (accepted).
- Horemans, S., K. De Coninck, J. Neuray, R. Hermans y K. Vlassak. 1986. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2: 341-346.
- Horemans, S., K. De Koninck y K. Vlassak. 1988. Aspects of the ecology of *Azospirillum* sp. in Belgian soils. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 207-214.
- Horemans, S., S. Demarsin, J. Neuray y K. Vlassak. 1987. Suitability of the BLCR medium for isolating *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 33: 806-808.
- Hurek, T., B. Reinhold, I. Fendrik y E.G. Niemann. 1987. Root-zone-specific oxygen tolerance of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 163-169.
- Hurek, T., B. Reinhold, E.G. Niemann y I. Fendrik. 1988. N₂-dependent growth of *Azospirillum* spp. in batch cultures at low concentrations of oxygen. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 115-121.

- Inbal, E. y M. Feldman. 1982. The response of a hormonal mutant of common wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. *Isr. J. Bot.* 31: 257-263.
- Iosipenko, A., y V. Ignatov. 1995. Physiological aspects of phytohormone production by *Azospirillum brasilense* Sp 7. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 307-312.
- Iruthayathas, E.E., S. Gunasekaran y K. Vlassak. 1983. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N₂-fixation of winged bean and soybean. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 20: 231-240.
- Itzigsohn, R., Y. Kapulnik, Y. Okon y A. Dovrat. 1993. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 39: 610-615.
- Itzigsohn, R., Z. Abbass, S. Sarig y Y. Okon. 1995. Inoculation effects of *Azospirillum* on sunflowers (*Helianthus annuus*) under different fertilization and irrigation regimes. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 503-513.
- Jagnow, G. 1982. Growth and survival of *Azospirillum lipoferum* in soil and rhizosphere as influenced by ecological stress conditions. In: *Azospirillum: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.) Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 100-107.
- Jagnow, G. 1987. Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria: possible causes of success and failure with regard to yield response - a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 150: 361-368.
- Jagnow, G., O. Heinemeyer y S. Draeger. 1979. Choice of liquid, semisolid, or soil suspension media: an important factor modifying the effect of pesticides on the nitrogenase (C₂H₂) activity of *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter chroococcum* and *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Ecotox. Environ. Safety* 3: 152-158.
- Jain, D.K. y D.G. Patriquin. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1208-1213.
- Jain, D.K. y D.G. Patriquin. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.
- Janzen, R.A. y W.B. McGill. 1995. Community-level interactions control proliferation of *Azospirillum brasilense* Cd in microcosms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 189-196.
- Janzen, R.A., S.B. Rood, J.F. Dormaar y W.B. McGill. 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture on chemically defined medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1061-1064.
- Jena, P.K., T.K. Adhya y V.R. Rao. 1987. Nitrogen fixation and indole acetic acid production by *Azospirillum* sp. as influenced by an insecticide, carbofuran. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 355-360.
- Jena, P.K., T.K. Adhya y V.R. Rao. 1990. Nitrogen-fixing bacterial populations as influenced by butachlor and thiobencarb in rice soils. *Z. Mikrobiol.* 145: 457-460.
- Jena, P.K., T.K. Adhya y V.R. Rao. 1992. Nitrogen fixation in *Azospirillum* sp. isolated from rice roots and soils as influenced by carbofuran and combined nitrogen. *Z. Mikrobiol.* 147: 340-344.
- Kabir, M.M., D. Faure, J. Haurat, P. Normand, C. Jacoud, P. Wadoux y R. Bally. 1995. Oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequences for the identification of four *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 41:1081-1087.
- Kaiser, P. 1995. Diazotrophic mixed cultures of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter cloacae*. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 207-212.
- Kapulnik, Y., M. Feldman, Y. Okon y Y. Henis. 1985a. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in israel. *Soil Biol. Biochem.* 17: 509-515.
- Kapulnik, Y., R. Gafni y Y. Okon. 1985b. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃⁻ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Can. J. Bot.* 63: 627-631.
- Kapulnik, Y., J. Kigel, Y. Okon, I. Nur y Y. Henis. 1981a. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil* 61: 65-70.
- Kapulnik, Y., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur y Y. Henis. 1981b. Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain Cd). *Plant Physiol.* 68: 340-343.
- Kapulnik, Y., Y. Okon y Y. Henis. 1985c. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.
- Kapulnik, Y., Y. Okon y Y. Henis. 1987. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. Turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. *Biol. Fertil. Soils* 4: 27-35.
- Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur y Y. Okon. 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 895-899.
- Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982. The effect of *Azospirillum* inoculation on growth and yield of corn. *Isr. J. Bot.* 31: 247-255.
- Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon, J. Kigel y Y. Henis. 1981c. Yield increases in summer cereal crops of Israeli fields inoculated with *Azospirillum*. *Exp. Agric* 17: 179-187.
- Katupitiya, S., P.B. New, C. Elmerich y I.R. Kennedy. 1995. Improved N₂ fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: studies of colonization using reporting genes. *Soil Biol. Biochem.* 27: 447-452.
- Khammas, K.M., E. Ageron, P.A.D. Grimont y P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium

- associated with rice roots and rhizosphere soil. Research in Microbiology 140: 679-693.
- Khammas, K.M. y P. Kaiser. 1991. Characterization of pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. Plant and Soil 137: 75-79.
- Khammas, K.M. y P. Kaiser. 1992. Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. Can. J. of Microbiol. 38: 794-797.
- Kimmel, S., B. Reinhold-Hurek, I. Fendrik y E.G. Niemann. 1990. Contribution of chemotaxis and aerotaxis to the establishment of *Azospirillum* in the rhizosphere. Proceedings of the international conference on the mechanisms between soil plant microorganisms in the rhizosphere 9: 195-197.
- Kolb, W. y P. Martin. 1985. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indole acetic acid. In: *Azospirillum* III: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 215-221.
- Kolb, W. y P. Martin. 1988. Influence of nitrogen on the number of N₂-fixing and total bacteria in the rhizosphere. Soil Biol. Biochem. 20: 221-225.
- Kosslak, R.M. y B.B. Bohlool. 1983. Prevalence of *Azospirillum* spp. in the rhizosphere of tropical plants. Can. J. Microbiol. 29: 649-652.
- Kothari, S.K. y C.S. Saraf. 1986. Response of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) to bacterial seed inoculation and application of phosphorus fertilizer. J. Agric. Sci. 107: 463-466.
- Kravchenko, L.V., E.I. Leonova y I.A. Tikhonovich. 1994. Effect of root exudates of non-legume plants on the response of auxin production by associated diazotrophs. Microb. Releases. 2: 267-271.
- Krieg, N.R. y J. Döbereiner. 1986. The genus *Azospirillum*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. N.R. Krieg y J. G. Holt. (Eds). Vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 96-104.
- Kucey, R.M.N. 1988a. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. Can. J. Microbiol. 34: 735-739.
- Kucey, R.M.N. 1988b. Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus* C-11-25 on two wheat cultivars. J. Appl. Bacteriol. 64: 187-196.
- Kulinska, D. y A. Drozdowicz. 1983. Occurrence of microorganisms antagonistic to *Azospirillum* spp. Zentralbl. Mikrobiol. 138: 585-594.
- Kulinska, D. y B. Kroczyńska. 1990. Occurrence of actinomycetes antagonistic to *Azospirillum* spp. [*Azospirillum lipoferum*] in rye monoculture. Annals of Warsaw Agricultural University. no. 22. pp. 55-61.
- Ladha, J.K., R.B. So y I. Watanabe. 1987. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in different soils. Plant Soil 102: 127-129.
- Lamm, R.B. y C.A. Neyra. 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. Can. J. Microbiol. 27: 1320-1325.
- Langenbach, T., D.M.S. Mano, W. De-Souza y A.N. Hagler. 1991. Influence of insecticides on growth, nitrogenase activity and morphology of *Azospirillum lipoferum*. Cienc. Cult. 43: 207-209.
- Lau-Wong, M.M. 1987. Field testing of the effectiveness of bacterial fertilizer in Nepal. Agric. Ecosyst. Environ. 19: 145-153.
- Lee, K.J. y M.H. Gaskins. 1982. Increased root exudation of ¹⁴C-compounds by sorghum seedlings inoculated with nitrogen-fixing bacteria. Plant Soil 69: 391-399.
- Lethbridge, G. y M.S. Davidson. 1983. Root-associated nitrogen-fixing bacteria and their role in the nitrogen nutrition of wheat estimated by ¹⁵N isotope dilution. Soil Biol. Biochem. 15: 365-374.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1989a. Localization of specific antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in its exopolysaccharide by immuno-gold staining. Current Microbiology. 18: 145-149.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1989b. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Bot. 67: 2213-2216.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1990. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. Current Microbiology 20: 91-94.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1991a. Enumeration and identification of rhizosphere bacteria by advanced immuno techniques. In: Plant growth-promoting hizobacteria-progress and prospects. C. Keel, B. Koller y G. Défago. IOBC/WPRS Bulletin, Zürich, Switzerland. pp. 231-237.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1991b. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. Plant and Soil 137: 91-97.
- Levanony, H., Y. Bashan y Z.E. Kahana. 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd. in cereals roots. Appl. Environ. Microbiol. 53: 358-364.
- Levanony, H., Y. Bashan, B. Romano y E. Klein. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat roots by immuno-gold labeling. Plant Soil 117: 207-218.
- Li, C.Y. y M.A. Castellano. 1987. *Azospirillum* isolated from within sporocarps of the mycorrhizal fungi *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* and *Rhizopogon vinicolor*. Trans. Br. Mycol. Soc. 88: 563-565.
- Lin, W., Y. Okon y R.W.F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1775-1779.
- Lippi, D., I. Cacciari, T. Pietrosanti y W. Pietrosanti. 1992. Interactions between *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed culture. Symbiosis 13: 107-114.
- López de Victoria, G. y C.R. Lovell. 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2951-2955.
- López de Victoria, G., D.R. Fielder, R.K. Zimmer faust y C.R. Lovell. 1994. Motility behavior of *Azospirillum* species in

- response to aromatic compounds. *Can. J. Microbiol.* 40: 705-711.
- Macalintal, E.M. y G.V. Urgel. 1992. Effects of *Azospirillum*-inoculated seedpieces and rate of nitrogen application on yields of sugarcane. *Philippine Sugar Quarterly* 3: 8-10.
- Madi, L., M. Kessel, E. Sadovnik y Y. Henis. 1988. Electron microscopic studies of aggregation and pellicle formation in *Azospirillum* spp. *Plant Soil* 109: 115-121.
- Madkour, M.A., L.T. Smith y G.M. Smith. 1990. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2876-2881.
- Magalhães, F.M.M., J.I. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall y J. Döbereiner. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 55: 417-430.
- Maheswari, M. y D. Purushothaman. 1990. Root exudate of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) as chemoattractant for *Azospirillum*. *Curr. Sci.* 59: 110-111.
- Mandimba, G., T. Heulin, R. Bally, A. Guckert y J. Balandreau. 1986. Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant Soil* 90: 129-139.
- Mano, D.M.S., A.C.M. Matos y T. Langenbach. 1988. The effect of dicofol on morphology growth and nitrogenase activity of *Azospirillum lipoferum*. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 159-165.
- Markus, P. y J. Krämer. 1988. Importance of nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria in organic farming systems. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 197-204.
- Martinez-Toledo, M.V., V. Salmeron y J. González-López. 1990. Effect of phenoxy and benzoic acid herbicides on nitrogenase activity and growth of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 22: 879-881.
- Martin, P. y A. Glatzle. 1982. Mutual influences of *Azospirillum* spp. and grass seedlings. In: *Azospirillum*: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 108-120.
- Matthews, S.W., S.C. Schank, H.C. Aldrich y R.L. Smith. 1983. Peroxidase-antiperoxidase labeling of *Azospirillum brasilense* in field-grown pearl millet. *Soil Biol. Biochem.* 6: 699-703.
- Mertens, T. y D. Hess. 1984. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. *Plant Soil* 82: 87-99.
- Michiels, K.W., C.L. Croes y J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2241-2246.
- Michiels, K., C. Verreth y J. Vanderleyden. 1990. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 705-711.
- Millet, E. y M. Feldman. 1986. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant Soil* 80: 255-259.
- Millet, E., Y. Avivi y M. Feldman. 1986. Yield response of various wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 80: 261-266.
- Morgenstern, E. y Y. Okon. 1987a. The effect of *Azospirillum brasilense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* *Sorghum sudanense*. *Arid Soil Res. Rehabil.* 1: 115-127.
- Morgenstern, E. y Y. Okon. 1987b. Promotion of plant growth and NO₃⁻ and RB⁺ uptake in *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense* inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Arid Soil Res. Rehabil.* 1:211-217.
- Mortley, D.G. y W.A. Hill. 1990. Sweetpotato growth and nitrogen content following nitrogen application and inoculation with *Azospirillum*. *HortScience* 25: 758-759.
- Murray, R.G.E. y D. Moyles. 1987. Differentiation of the cell wall of *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 33: 132-137.
- Murty, M.G. y J.K. Ladha. 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryza sativa* L.) *Biol. Fertil. Soils* 4: 3-7.
- Murty, M.G. y J.K. Ladha. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil* 108: 281-285.
- Nayak, D.N., J.K. Ladha y I. Watanabe. 1986. The fate of marker *Azospirillum lipoferum* inoculated into rice and its effect on growth, yield and N₂ fixation of plants studied by acetylene reduction, ¹⁵N₂ feeding and ¹⁵N dilution techniques. *Biol. Fert. Soils* 2: 7-14.
- Negi, M., K.V. Sadasivam y K.V.B.R. Tilak. 1987. Establishment of *Azotobacter* and *Azospirillum* in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) in organic-amended soils. *Zentralbl. Mikrobiol.* 142: 149-154.
- New, P.B. y I.R. Kennedy. 1989. Regional Distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in eastern Australia. *Microbial Ecology* 17: 299-309.
- Neyra, C.A., A. Atkinson y O. Olubayi. 1995. Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 429-439.
- Nosko, P., L.C. Bliss y F.D. Cook. 1994. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of High Arctic graminoids. *Arct. Alp. Res.* 26: 180-186.
- Nur, I., Y. Okon y Y. Henis. 1980a. An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. *Can. J. Microbiol.* 26: 482-485.
- Nur, I., Y. Okon y Y. Henis. 1980b. Comparative studies of nitrogen-fixing bacteria associated with grasses in Israel with *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 26: 714-718.
- O'Hara, G.W., M.R. Davey y J.A. Lucas. 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. *Can. J. Microbiol.* 27: 871-877.
- O'Hara, G.W., M.R. Davey y J.A. Lucas. 1987. Effect of nitrogen on the yield response of *Pennisetum americanum*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* to inoculation with

- Azospirillum brasilense* under temperate conditions. Biol. Fertil. Soils 4: 67-72.
- Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology 3: 223-228.
- Okon, Y., L. Cakmakci, I. Nur y I. Chet. 1980. Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*: a note. Microb. Ecol. 6: 277-280
- Okon, Y. y Y. Hadar. 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancers. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6: 61-85.
- Okon, Y., P.G. Heytler y R.W.F. Hardy. 1983. N₂ fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. Appl. Environ. Microbiol. 46: 694-497.
- Okon, Y. y R. Itzigsohn. 1992. Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. FEMS Microbiol. Lett. 103: 131-139.
- Okon, Y. y Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum* - inoculated roots. Plant Soil 90: 3-16.
- Okon, Y. y C.A. Labandera-Gonzalez. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 26: 1591-1601.
- Oliveira, R.G.B. y A. Drozdowicz. 1981. Bacteriocins in the genus *Azospirillum*. Rev. Microbiol. (Brazil) 12: 42-47.
- Oliveira, R.G.B. y A. Drozdowicz. 1987. Inhibition of producing strains of *Azospirillum lipoferum* by their own bacteriocin. Zentralbl. Mikrobiol. 142: 387-391.
- Oliveira, R.G.B. y A. Drozdowicz. 1988. Are *Azospirillum* bacteriocins produced and active in soil? In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 101-108
- Oliveira, R.G.B. y M.L. DeSouza. 1991. Partial characterization of a brown pigment produced by *Azospirillum lipoferum*. Rev. Microbiol. (Brazil) 22: 340-344.
- Omar, M.N.A., O. Berge, E.E. Hassanein y S.N. Shalan. 1992. *In vitro* and *in situ* effects of herbicide thiobencarb on rice-*Azospirillum* association. Symbiosis 13: 55-63.
- Omar, S.A. y M.H. Abd-Alla. 1992. Effect of pesticides on growth, respiration and nitrogenase activity of *Azotobacter* and *Azospirillum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 326-328.
- Omay, S.H., W.A. Schmidt, P. Martin y F. Bangerth. 1993. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. Can. J. Microbiol. 39: 187-192.
- Pacovsky, R.S. 1988. Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition. Plant Soil 110: 283-287.
- Pacovsky, R.S., G. Fuller y E.A. Paul. 1985a. Influence of soil on the interactions between endomycorrhizae and *Azospirillum* in *Sorghum*. Soil Biol. Biochem. 17: 525-531.
- Pacovsky, R.S., E.A. Paul y G.J. Bethlenfalvay. 1985b. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. Plant Soil 85: 145-148.
- Pal, U.R. y H.S. Malik. 1981. Contribution of *Azospirillum brasilense* to the nitrogen needs of grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in humid sub-tropics. Plant Soil 63: 501-504.
- Patnaik, G.K., L.K. Bose, A.M. Mehta y V.R. Rao. 1994. Rhizosphere nitrogenase and *Azospirillum* sp. association with wild, trisomic and cultivated rice. Microbiol. Res. 149: 42-46.
- Patriquin, D.G. y J. Döbereiner. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can. J. Microbiol. 24: 734-747.
- Patriquin, D.G., J. Döbereiner y D.K. Jain. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can. J. Microbiol. 29: 900-915.
- Paul, E., J. Fages, P. Blanc, G. Goma y A. Pareilleux. 1993. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 34-39.
- Pedrosa, F.O. 1988. Physiology, biochemistry, and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. CRC crit. Rev. Plant Sci. 6: 345-384.
- Penot, I., N. Berges, C. Guinguene y J. Fages. 1992. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays*) in France, using biochemical tests and plasmid profiles. Canadian Journal of Microbiology 38: 798-803.
- Pereira, J.A.R., V.A. Cavalcante, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1988. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp and *Herbaspirillum seropedicae*. Plant Soil 110: 269-274.
- Piccoli, P. y R. Bottini. 1994. Effects of C/N ratio, N content, pH, and incubation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum*. Symbiosis 17: 229-236.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985a. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. J. Plant Physiol. 120: 181-187.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985b. *Azospirillum*-*Rhizobium* interaction leading to a plant growth stimulation without nodule formation. Can. J. Microbiol. 31: 1026-1030.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985c. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 49: 984-989.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985d. Interaction of *Azospirillum* and *Rhizobium* strains leading to inhibition of nodulation. Appl. Environ. Microbiol. 49: 990-993.
- Puente, M.E. y Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). Symbiosis 15: 49-60.
- Rademacher, W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. Plant Growth Regul. 15: 303-314.
- Rai, R. 1983. Efficacy of associative N₂-fixation by streptomycin-resistant mutants of *Azospirillum brasilense* with genotypes of chick pea *Rhizobium* strains. J. Agric. Sci. Camb. 100: 75-80.
- Rai, R. 1991. Isolation, characterization and associative N-fixation of acid-tolerant *Azospirillum brasilense* strains associated with Eleusine coracana in low pH-Al-rich acid soil. Dev. Plant Soil Sci. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. 45: 663-671.
- Rai, S.N. y A.C. Gaur. 1982. Nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. and effect of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of wheat crop. Plant Soil 69: 233-238.

- Rangel-Lucio, J.A., R. Ferrera-Cerrato, J.D. Molina-Galan, N. Rodriguez-Mendoza. 1991. Influencia de la variabilidad genética del maíz (*Zea mays* L.) sobre la actividad de *Azospirillum* sp. J.L. Tovar S. y R. Quintero L. (Eds.) La Investigación Edafológica en México 1990-1991. Memorias XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Pachuca, Hidalgo, México.
- Rao, A.V. y B. Venkateswarlu. 1982. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the Indian desert. *Can. J. Microbiol.* 28: 778-782.
- Rao, J.I.N. y V.R. Rajamamohan Rao. 1983. Nitrogenase activity in the rice rhizosphere soil as affected by *Azospirillum* inoculation and fertilizer nitrogen under upland conditions. *Curr. Sci.* 52: 686-688.
- Rao, V.R., D.N. Nayak, P.B.B.N. Charyulu y T.K. Adhay. 1983. Yield responses of rice to root inoculation with *Azospirillum*. *J. Agric. Sci. Camb.* 100: 689-691.
- Raverkar, K.P. y B.K. Konde. 1990. Influence of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on *Arachis hypogaea* L. and detection of *Rhizobium* by ELISA. *Indian J. Microbiol.* 30: 209-212.
- Reiner, O. y Y. Okon. 1986. Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 32: 829-834.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Baldani y J. Döbereiner. 1988. Temperature and salt tolerance of *Azospirillum* spp from salt-affected soils in Brazil. In: *Azospirillum* IV. Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 234-241.
- Reinhold, B., T. Hurek y I. Fendrik. 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bact.* 162: 190-195.
- Reinhold, B., T. Hurek, E.G. Niemann y I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520-526.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans y J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Rennie, R.J. 1980. ¹⁵N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Can. J. Bot.* 58: 21-24.
- Rennie, R.J., J.R. Defreitas, A.P. Ruschel y P.V. Vose. 1983. ¹⁵N-isotope dilution to quantify dinitrogen (N₂) fixation associated with Canadian and Brazilian wheat. *Can. J. Bot.* 61: 1667-1671.
- Rennie, R.J. y J.B. Thomas. 1987. ¹⁵N-determined effect of inoculation with N₂ fixing bacteria on nitrogen assimilation in Western Canadian wheats. *Plant Soil* 100: 213-223.
- Reynders, L. y K. Vlassak. 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil.* 66: 217-223.
- Riou, N. y D. Le Rudulier. 1990. Osmoregulation in *Azospirillum brasilense*: glycine betaine transport enhances growth and nitrogen fixation under salt stress. *J. Gen. Microbiol.* 136: 455-461.
- Riou, N., M.C. Poggi y D. Le Rudulier. 1991. Characterization of an osmoregulated periplasmic glycine betaine-binding protein in *Azospirillum brasilense* sp7. *Biochimie* 73: 1187-1193.
- Rivarola, V., A. Fabra, G. Mori y H. Balegno. 1992. *In vitro* protein synthesis is affected by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Toxicology* 73: 71-79.
- Rodelas, B., V. Salmeron, M.V. Martinez-Toledo y J. González-López. 1993. Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media. *Plant Soil* 153: 97-101.
- Roslycky, E.B. 1990. Effect of sethoxydim on some properties of *Azotobacter* and *Azospirillum* spp. *Phyton* 51: 111-123.
- Rozycki, H., E. Strzelczyk, E. Raczowska y C.Y. Li. 1992. Effect of different carbon and nitrogen sources and vitamins on growth of *Azospirillum* spp isolated from coniferous ectomycorrhizae and sporocarps of ectomycorrhizal fungi. *Acta Microbiol. Polonica* 41: 193-201.
- Ruckdäschel, E., B.L. Kittell, D.R. Helinski y W. Klingmüller. 1988. Aromatic amino acid aminotransferases of *Azospirillum lipoferum* and their possible involvement in IAA biosynthesis. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 49-53.
- Russel, S. y C.C. Ifiorah. 1995. Occurrence of dinitrogen-fixing bacteria and acetylene reduction activity in a rhizosphere of five selected plants from tropics. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 549-554.
- Russel, S. y S. Muszynski. 1995. Reduction of 4-chloronitrobenzene by *Azospirillum lipoferum*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 369-375.
- Sadasivan, K.V., M. Negi y K.V.B.R. Tilak. 1986a. Survival of *Azospirillum brasilense* and *Azotobacter chroococcum* in organic-amended soil-based carriers. *Zentralbl. Mikrobiol.* 141: 567-570.
- Sadasivan, K.V., R.K. Tyagi y S. Ramarethinam. 1986b. Evaluation of some agricultural wastes as carriers for bacterial inoculants. *Agric. Wastes* 17: 301-306.
- Sadasivan, L. y C.A. Neyra. 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.* 163: 716-723.
- Sadasivan, L. y C.A. Neyra. 1987. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *J. Bacteriol.* 169: 1670-1677.
- Saha, K.C., S. Sannigrahi y L.N. Mandal. 1985. Effect of inoculation of *Azospirillum lipoferum* on nitrogen fixation in rhizosphere soil, their association with roots, yields and nitrogen uptake by mustard (*Brassica juncea*). *Plant Soil* 87: 273-280.
- Salmeron, V., M.V. Martinez-Toledo y J. Gonzalez-Lopez. 1991. Effects of alachlor and metolachlor on the biological activity of *Azospirillum brasilense* grown in chemically defined and

- dialyzed-soil media. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 493-499.
- Sánchez, C.E., B. Rodelas, M.V. Martínez Toledo, V. Salmeron y González J. López. 1994. Diflubenzuron and the biological activity of *Azospirillum brasilense*. *Toxicol. Environ. Chem.* 42: 241-247.
- Sarig, S., A. Blum y Y. Okon. 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agric. Sci. Camb.* 110: 271-277.
- Sarig, S., Y. Kapulnik, I. Nur y Y. Okon. 1984. Response of non-irrigated *Sorghum bicolor* to *Azospirillum* inoculation. *Exp. Agric.* 20: 59-66.
- Sarig, S., Y. Kapulnik y Y. Okon. 1986. Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant Soil.* 90: 335-342.
- Sarig, S., Y. Okon y A. Blum. 1990. Promotion of leaf area development and yield in *Sorghum bicolor* inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 9: 235-245.
- Sarig, S., Y. Okon y A. Blum. 1992. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. *J. Plant Nutr.* 15: 805-819.
- Schank, S.C. y R.L. Smith. 1984. Status and evaluation of associative grass-bacteria N₂-fixing systems in Florida. *Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla.* 43: 120-123.
- Schank, S.C., R.L. Smith, G.C. Weiser, D.A. Zuberer, J.H. Bouton, K.H. Quesenberry, M.E. Tyler, J.R. Milam y R.C. Littell. 1979. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. *Soil. Biol. Biochem.* 11: 287-295.
- Schank, S.C., R.L. Smith, J.R. Milam y R.C. Littell. 1985. Testing grass-bacteria combinations for associative N₂fixation potential. *Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla.* 45: 179-184.
- Schank, S.C., K.L. Weier y I.C. Macrae. 1981. Plant yield and nitrogen content of a digitgrass in response to *Azospirillum* inoculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 342-345.
- Schlöter, M., B. Assmus y A. Hartmann. 1995. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotechnol. Adv.* 13: 75-90.
- Schlöter, M., W. Bode, A. Hartmann y F. Beese. 1992. Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. *Soil Biol. Biochem.* 24: 399-403.
- Schmidt, W., P. Martin, S.H. Omay y F. Bangerth. 1988. Influence of *Azospirillum brasilense* on nodulation of legumes. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 92-100.
- Schroder, M. 1932. Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskrankh. Hyg. Abt 2*, 85: 177-212.
- Shah, S., V. Karkhanis y A. Desai. 1992. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum*. *Curr. Microbiol.* 25: 347-351.
- Singh, C.S. 1992a. Prevalence of *Azospirillum* within the stem nodules of *Aeschynomene* spp. and *Neptunia* sp. *Z. Mikrobiol.* 147: 455-458.
- Singh, C.S. 1992b. Mass inoculum production of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizae. 1. Selection of host in the presence of *Azospirillum brasilense*. *Zentralblatt fuer Microbiologie* 147: 447-453.
- Singh, C.S., J.S. Amawate, S.P. Tyagi y A. Kapoor. 1990. Interaction effect of *Glomus fasciculatum* and *Azospirillum brasilense* on yields of various genotypes of wheat (*Triticum aestivum*) in pots. *Z. Mikrobiol.* 145: 203-208.
- Skorupska, A., M. Brzezinska, A. Choma, D. Kulinska y Z. Lokiewicz. 1985. Physiological characterization, plasmids and bacteriocinogenicity of *Azospirillum*. *Microbios* 44: 243-251.
- Smith, R.L., S.C. Schank y R.C. Littell. 1984a. The influence of shading on associative N₂ fixation. *Plant Soil* 80: 43-52.
- Smith, R.L., S.C. Schank, J.R. Milam y A.A. Baltensperger. 1984b. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1331-1336.
- Sriskandarajah, S., I.R. Kennedy, D. Yu y Y. T. Tchan. 1993. Effects of plant growth regulators on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. *Plant Soil.* 153: 165-178.
- Stancheva, I., I. Dimitrov, N. Kaloyanova, A. Dimitrova y M. Angelov. 1992. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize. *Agronomie* 12: 319-324.
- Stancheva, I. y N. Dinev. 1992. Effects of inoculation of maize and species of *Tribe triticeae* with *Azospirillum brasilense*. *J. Plant Physiol.* 140: 550-552.
- Stein, T., J. Ueckert y I. Fendrik. 1995. Establishment of two nitrogen-fixing bacteria on roots of Kallar grass using alginate-coated seeds in Mixed inoculation. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 240-243.
- Strzelczyk, E., M. Kampert y C.Y. Li. 1994a. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149: 55-60.
- Strzelczyk, E., M. Kampert, H. Rozycki y C.Y. Li. 1994b. Effect of plant growth hormones on growth of *Azospirillum* sp. in media with different carbon sources. *Acta microbiol. Polonica* 43: 89-95.
- Subba Rao, N.S., K.V.B.R. Tilak y C.S. Singh. 1985a. Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pots. *Soil Biol. Biochem.* 17: 119-121.
- Subba Rao, N.S., K.V.B.R. Tilak y C.S. Singh. 1985b. Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant Soil* 84: 283-286.
- Sukiman, H.I. y P.B. New. 1990. Relationship between root colonization and initial adsorption of *Azospirillum* to plant roots. *Microbial Ecology* 20: 65-74.
- Sundaram, S., A. Arunakumari y R.V. Klucas. 1988. Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.* 34: 212-217.

- Tabary, F., J. Balandreau y R. Bourrillon. Purification of the rice embryo lectin and its binding to nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 549-555.
- Tal, S. y Y. Okon. 1985. Production of the reserve material poly-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31: 608-613.
- Tapia-Hernández, A., M.A. Mascarúa-Esparza y J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* 64: 73-83.
- Tarrand, J.J., N.R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. And *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- Tien, T.M., H.G. Diem, M.H. Gaskins y D.H. Hubbell. 1981. Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 27: 426-431.
- Tien, T.M., M.H. Gaskins y D.H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- Tilak, K.V.B.R. y A. Dwivedi. 1990. Enhancement of spore germination of *Glomus fasciculatum* by bacterial cell free extracts. *Indian J. Exp. Biol.* 28: 373-375.
- Tyler, M.E., J.R. Milam, R.L. Smith, S.C. Schank y D.A. Zuberer. 1979. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. *Can. J. Microbiol.* 25: 693-697.
- Ueckert, J., J. Döbereiner, I. Fendrik y E.G. Niemann. 1991. Nitrate reductase activity of *Azospirillum brasilense* SP7 and SP245 V- and C-forms in continuous culture. *Dev. Plant Soil Sci.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht 48: 249-253.
- Umali-Garcia, M., D.H. Hubbell, M.H. Gaskins y F.B. Dazzo. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.
- Umali-Garcia, M., D.H. Hubbell, M.H. Gaskins y F.B. Dazzo. 1981. Adsorption and mode of entry of *Azospirillum brasilense* to grass roots. In: *Associative N₂-fixation*. P.B. Vose y A.P. Ruschel (Eds). Vol. 1. CRC Press, Boca Raton. pp. 49-62.
- Vandebroek, A. y J. Vanderleyden. 1995. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association - Review. *Critical Rev. Plant Sci.* 14: 445-466.
- Vandenhove, H., R. Merckx, M. van Steenberghe y K. Vlassak. 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 25: 513-519.
- Veeraswamy, J., T. Padmavathi y K. Venkateswarlu. 1992. Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. *Indian J. Microbiol.* 32: 305-308.
- Venkateswarlu, B. y A.V. Rao. 1983. Response of pearl millet to inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil.* 74: 379-386.
- Villareal-Romero, M. 1990. Efecto de la doble inoculación *Azospirillum* sp. endomicorriza (V-A) en la producción de trigo (*Triticum aestivum*, L.) Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México.
- Wani, S.P., S. Chandrapalaiah y P.J. Dart. 1985. Response of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. *Expl. Agric.* 21: 175-182.
- Warembourg, F.R., R. Dreessen, K. Vlassak y F. Lafont. 1987. Peculiar effect of *Azospirillum* inoculation on growth and nitrogen balance of winter wheat (*Triticum aestivum*). *Biol. Fertil Soils* 4: 55-59.
- Watanabe, I. y C. Lin. 1984. Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30: 117-124.
- Whallon, J.H., G.F. Acker y H. El-khawas. 1985. Electron microscopy of young wheat roots inoculated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum III: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 223-229.
- Wong, P.P., N.E. Stenberg y L. Edgar. 1980. Characterization of a bacterium of the genus *Azospirillum* from cellulolytic nitrogen-fixing mixed cultures. *Can. J. Microbiol.* 26: 291-296.
- Yadav, K., V. Prasad, K. Mandal y N. Ahmad. 1992. Effect of co-inoculation (*Azospirillum* and *Rhizobium* strains) on nodulation, yield, nutrient uptake and quality of lentil in calcareous soil [*Lens culinaris*]. *LENS-Newsletter* 19: 29-31.
- Yahalom, E., A. Dovrat, Y. Okon, y H. Czosnek. 1991. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Cd and *Rhizobium* on the root morphology of burr medic (*Medicago polymorpha* L.). *Isr. J. Bot.* 40: 155-164.
- Yahalom, E., Y. Kapulnik y Y. Okon. 1984. Response of *Setaria italica* to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil* 82: 77-85.
- Yahalom, E., Y. Okon y A. Dovrat. 1987. *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. *Can. J. Microbiol.* 33: 510-514.
- Yahalom, E., Y. Okon y A. Dovrat. 1990. Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). *Can. J. Microbiol.* 36: 10-14.
- Yu, D.G., I.R. Kennedy y Y.T. Tchan. 1993. Verification of nitrogenase activity (C₂H₂ reduction) in *Azospirillum* populated, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induced, root structure of wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 187-195.
- Zaady, E. y Y. Okon. 1990. Cultural conditions affecting *Azospirillum brasilense* cell aggregation and adsorption to maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1103-1107.
- Zaady, E., Y. Okon y A. Perevolotsky. 1994. Growth response of Mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Range Manag.* 47: 12-15.
- Zaady, E., A. Perevolotsky y Y. Okon. 1993. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense* Cd. *Soil Biol. Biochem.* 25: 819-823.
- Zamudio, M. y F. Bastarrachea. 1994. Adhesiveness and root hair deformation capacity of *Azospirillum* strains for wheat seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 26: 791-797.

- Zeman, A.M.M., Y.T. Tchan, C. Elmerich y I.R. Kennedy. 1992. Nitrogenase activity in wheat seedlings bearing para-nodules induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and inoculated with *Azospirillum*. Res. Microbiol. 143: 847-855.
- Zhulin, I.B. y J.P. Armitage. 1992. The role of taxis in the ecology of *Azospirillum*. Symbiosis 13: 199-206.
- Zhulin, I.B. y J.P. Armitage. 1993. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 175: 952-958.
- Zhulin, I.B., L.E. Sarmiento y B.L. Taylor. 1995. Changes in membrane potential upon chemotactic stimulation of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 299-305.
- Zimmer, W., C. Aparicio y C. Elmerich. 1991. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*; identification and sequencing of a trpGDC cluster. Mol. Gen. Genet. 229: 41-51.
- Zimmer, W., K. Roeben y H. Bothe. 1988. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. Planta 176: 333-342.
- Zuberer, D.A. y M. Roth. 1982. *In vitro* inhibition of nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria by rhizosphere actinomycetes associated with grasses. Can. J. Microbiol. 28: 705-709.

INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS BENEFICOS

II. BACTERIAS ASOCIATIVAS DE LA RIZOSFERA

Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms

II. Associative rhizosphere bacteria

Yoav Bashan¹, Gina Holguin¹, Ronald Ferrera-Cerrato²

RESUMEN

Esta revisión sobre bacterias asociativas no incluye a *Azospirillum* ni a agentes bacterianos utilizados en control biológico. Algunas especies del género *Bacillus* y *Azotobacter* son consideradas BPCP porque presentan características que las identifican como tales: Las cepas de *Bacillus* a) promovieron la emergencia de las plántulas y el crecimiento foliar en varias especies vegetales, b) presentan buena sobrevivencia en la rizosfera, c) sintetizan hormonas vegetales, d) producen efectos sinergistas sobre el crecimiento vegetal al incorporarse en cultivo mixto con *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y hongos micorrizicos y e) son solubilizadores de fosfato eficientes. En cuanto a *Azotobacter*, a) promueve el crecimiento de muchas especies vegetales pertenecientes a diferentes familias botánicas, b) sintetiza hormonas vegetales como la auxina, giberilina y citoquinina y c) la inoculación mixta de *Azotobacter* con *Rhizobium* o *Azospirillum* incrementó el desarrollo vegetal e incrementó la fijación de nitrógeno. Es una de las bacterias fijadoras de nitrógeno más comunes de suelos templados y en la rizosfera de varias especies vegetales de India. Aparentemente *Azotobacter* no es específica para alguna planta en particular y es inhibida por herbicidas comunes. Otras bacterias con potencial para ser BPCP y que se discuten en esta revisión son *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Alcaligenes faecalis*, *Azoarcus* sp., *Serratia* sp., cianobacterias y bacterias que oxidan azufre.

¹Departamento de Microbiología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB), Apartado Postal 128, 2300 La Paz, BCS, México.

²Sección de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillo, Edo. de México, México.

Correspondencia: Fax: +52 (682) 54710 ó 53625.

Aceptado: Enero de 1996.

Palabras clave: Aislamiento, bacterias oxidantes del azufre, cianobacterias, diazotrófico, rizosfera, sobrevivencia, solubilización de fosfato, inoculación mixta, pesticida.

SUMMARY

This review deals with associative rhizosphere bacteria apart from *Azospirillum* and biocontrol agents. Some strains of *Bacillus* and *Azotobacter* are considered plant beneficial bacteria because they possess characteristics beneficial for plants. These characteristics include *Bacillus* strains that promote seed germination and foliage growth for some vegetables. They survive well in the rhizosphere, synthesize plant growth hormones, and produce synergistic effects on plants when mixed in cocultures with other known beneficial bacteria like *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, and with mycorrhizae fungi. Some strains are phosphate solubilizers. *Azotobacter* strains promote the growth of many plant species, synthesize plant hormones and have an effect similar to *Bacillus* in cocultures with other beneficial microorganisms. Other bacterial genera with the potential of plant growth promotion are: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Alcaligenes faecalis*, *Azoarcus*, *Serratia*, various cyanobacteria and sulfur oxidizing bacteria. The commonality of all these bacteria is they are little studied. Therefore, comprehensive analysis of their potential value for agriculture, using current knowledge, is premature. Nevertheless, this review highlighted their positive effects on plants to encourage further research in these relatively neglected areas.

Index words: Cyanobacteria, diazotrophic, isolation, mixed inoculation, pesticides, phosphate solubilization, rhizosphere, survival, sulfur oxidizing bacteria.

INTRODUCCION

Las principales actividades benéficas llevadas a cabo por bacterias de la rizosfera asociadas a raíces o asociativas incluyen la solubilización de minerales y nutrientes, fijación de nitrógeno, producción de hormonas reguladoras del crecimiento, interacción sinérgica con otros microorganismos benéficos de la rizosfera, y la inhibición de fitopatógenos; todas estas actividades incrementan la productividad vegetal (Gaskins *et al.*, 1985; Parke, 1991). La mayor parte de la investigación dirigida a mejorar la respuesta vegetal ha enfatizado el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno nativas en cereales y pastos de forraje y, recientemente, ha incluido a otras plantas de cultivo. Bajo ciertas circunstancias, la cantidad de nitrógeno fijado por estos organismos puede ser significativa, pero no explica por sí misma el incremento del crecimiento de las plantas.

Hace más de veinte años se especuló por primera vez sobre hacer extensivo el uso de bacterias del género *Rhizobium* en las plantas agrícolas más importantes, los cereales. Desde entonces la complejidad de la biología molecular del sistema nitrogenasa ha obligado a reconsiderar esa especulación (Quispel, 1991) y a explorar la posibilidad de utilizar bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas de manera natural a plantas de cultivo particulares.

En una revisión, realizada hace 12 años, Brown (1982) declaró que la única manera de obtener una respuesta positiva de inoculación bacteriana en el desarrollo y rendimiento vegetal es que la población bacteriana alcance una biomasa significativa en la raíz. Por tanto, la característica más importante que debe tener una bacteria fijadora de nitrógeno que pretenda utilizarse con fines prácticos, es que sea un colonizador agresivo de raíces. Al evaluar la capacidad de colonización radicular de bacterias de la rizosfera, es necesario distinguir entre adaptación a la rizosfera y la habilidad para continuar desarrollándose a la par con las raíces en proceso de desarrollo. Solamente aquellos organismos capaces de trasladarse de las semillas a las raíces e incrementar su biomasa en la rizosfera pueden ser considerados colonizadores de raíces competitivos (Lifshitz *et al.*, 1986). Con el objeto de encontrar esta bacteria ideal se considero importante el estudio de diferentes asociaciones entre bacterias benéficas y diferentes tipos de plantas. La investigación que en esta dirección ha sido

promovida, se ha enfocado en la interacción *Azospirillum*-planta, la cual puede servir como modelo para todas las bacterias asociativas (que constituye la primera parte de la revisión científica titulada "Interacciones entre plantas y microorganismos"). Existen algunos estudios sobre otros géneros bacterianos como *Bacillus*, *Azotobacter*, *Klebsiella* y otras bacterias no muy estudiadas del género *Acetobacter* y *Azoarcus*, la especie *Alcaligenes faecalis*, y otros grupos bacterianos tales como cianobacterias, bacterias solubilizadoras de fosfato, bacterias sulfoxidantes y bacterias diazotróficas patógenas en plantas.

La presente revisión se concentrará en bacterias asociativas, aunque sin incluir a *Azospirillum*, ni a agentes bacterianos utilizados en control biológico, las cuales tienen la capacidad potencial de promover el crecimiento vegetal (bacterias promotoras de crecimiento en plantas, BPCP o PGPR).

AISLAMIENTO

El aislamiento de bacterias asociativas es relativamente fácil. Un gran número de estudios indican que en la rizosfera hay poblaciones de microorganismos diferentes entre sí. En ocasiones el aislamiento de una especie bacteriana en especial depende de la especie vegetal, ya que en algunos casos existe cierta especificidad; sin embargo, se han llegado a aislar especies bacterianas similares independientemente de la especie vegetal de la cual se trate, tipo de suelo o condiciones climáticas. Algunas veces es difícil comprender por qué una bacteria domina en cierto lugar y no se encuentra en otro donde existen condiciones similares (Berge *et al.*, 1991a).

Los pasos más difíciles del aislamiento son: (I) la localización de sitios donde haya bacterias benéficas, y (II) la identificación de bacterias benéficas entre la gran variedad de bacterias heterótrofas que se desarrollan comúnmente en medios de cultivo. Este problema surge debido a que (i) no existe un medio selectivo para el aislamiento de bacterias benéficas, y (ii) no existe un método rápido para preveer el potencial benéfico de alguna cepa inmediatamente después de su aislamiento. De esta manera, el efecto que una bacteria pueda tener (independientemente de sus características fisiológicas) sobre la planta, será impredecible hasta que sea probada. Por lo tanto, la prueba definitiva es la respuesta vegetal. Esta prueba necesaria puede ser cara y

laboriosa si tiene que evaluarse una gran cantidad de cepas, en especial si el parámetro a medir es el incremento en rendimiento.

Se han propuesto una serie de estrategias para salvar estos obstáculos tales como producción por parte de la cepa a) de IAA, b) de la enzima ACC deaminasa (1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa) (Glick *et al.*, 1994), o longitud de la raíz principal, pero ninguna es óptima ni particularmente recomendada. El investigador deberá seleccionar el proceso más adecuado para sus necesidades y expectativas particulares. Se describen una serie de métodos y procedimientos en la sección titulada "Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas" la cual constituye la tercera parte de la revisión científica "Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos".

La mayoría de los aislamientos de bacterias asociativas han sido enfocados al grupo de bacterias diazotróficas debido a que: (i) en ocasiones estas bacterias contribuyen nitrógeno a la planta, (ii) el nitrógeno es el fertilizante más importante en plantas (Ela *et al.*, 1982), (iii) *Rhizobium*, y recientemente también *Azospirillum*, tienen una presentación comercial efectiva, y (iv) la prueba de reducción de acetileno es una técnica barata, fácil y rápida para evaluar fijación de nitrógeno a gran escala. Sin embargo, no se ha ignorado el aislamiento de otras especies bacterianas. Se ha puesto particular atención a las *Pseudomonas* fluorescentes y bacterias del género *Bacillus* con potencial como agentes de control biológico sobre muchos hongos patógenos nativos del suelo.

En seguida se mencionan varios ejemplos típicos de bacterias asociativas aisladas en la última década, las cuales son promotoras potenciales de crecimiento en plantas.

Bacterias diazotróficas

Estudios recientes sobre bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a raíces de plantas superiores han mostrado un tipo de poblaciones muy similares, compuestas por anaerobios facultativos del género *Bacillus* y de la familia Enterobacteriaceae (Nelson *et al.*, 1976; Wright y Weaver, 1981), además del aerobio *Azotobacter* y el microaerofílico *Azospirillum*. Sin embargo, esta homogeneidad bacteriana encontrada debe ser un error técnico. Probablemente sea un reflejo del uso de técnicas tradicionales de aislamiento e identificación,

las cuales favorecen el crecimiento de ciertos grupos bacterianos. Existen ejemplos que apoyan esta conjetura: (i) Se han aislado frecuentemente bacterias difíciles o imposibles de identificar, tratándose probablemente de especies nuevas. Sin embargo, muy pocos investigadores han publicado sus resultados, describiendo los aislamientos de manera apropiada, ni mucho menos almacenaron las cepas en colecciones debido a que los análisis formales requeridos para establecer una nueva especie bacteriana son laboriosos y requieren con frecuencia la colaboración interdisciplinaria entre diferentes países. Esta serie de dificultades provoca que la motivación para declarar una especie nueva como tal se vea truncada antes de que se realice un registro oficial de la cepa. (ii) Es bien sabido que la incorporación de determinada fuente de carbono en algún medio selectivo para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno estimula el crecimiento de ciertos grupos bacterianos; i.e., el empleo de manitol o glucosa conlleva al aislamiento de bacterias de la familia Azotobacteriaceae mientras que el uso de malato favorece el aislamiento de *Azospirillum*, a pesar de utilizar la misma zona radicular de la planta.

Como un esfuerzo por eliminar el efecto de la fuente de carbono sobre el aislamiento, se desarrolló el "modelo espermosfera" (spermosphere model) (Thomas-Bauzon *et al.*, 1982), en el cual la semilla germinada provee a las bacterias de exudados naturales como fuente de carbono. Las bacterias fijadoras de nitrógeno más representativas han sido aisladas de la rizosfera de plantas de arroz mediante este método. Además de un abundante número de representantes de la familia Enterobacteriaceae, los aislamientos más comúnmente obtenidos pertenecen a *Azospirillum* y *Pseudomonas paucimobilis*, un taxón relacionado con *Flavobacterium capsulatum* (Bally *et al.*, 1983). Las bacterias diazotróficas dominantes asociadas a raíces de maíz y a suelo de la rizosfera se aislaron en tres localidades diferentes en Francia; como resultado *Bacillus circulans* fue la bacteria diazotrófica dominante en dos de estas localidades; en la tercera localidad, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella terrigena* y bacterias similares a *Pseudomonas* fueron las especies de bacterias diazotróficas más abundantes, no detectándose la presencia de *Bacillus circulans*. No se logró aislar en ninguno de los tres tipos de suelos *Azospirillum*, la cual ha sido reportada como importante diazótropa asociada a rizosfera del maíz (Berge *et al.*, 1991b).

Las *Pseudomonas* diazotróficas, aunque menos frecuentes que otros grupos y mucho menos abundantes que las *Pseudomonas* fluorescentes utilizadas como

agentes de control biológico, se han aislado de habitats muy diversos, desde tropicales hasta árticos (Haahtela *et al.*, 1983; Prabha *et al.*, 1978). De raíces de arroz en los trópicos se aislaron *Pseudomonas diazotrophicus*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella planticola* (Barraquio *et al.*, 1983; Ladha *et al.*, 1983; Watanabe *et al.*, 1987). En el ártico canadiense se aislaron *Pseudomonas* fluorescentes psicrófitas fijadoras de nitrógeno a partir de varias plantas nativas. Varias de estas cepas colonizaron raíces de canola cultivada (*Brassica campestris*) en el campo. Estas bacterias demostraron poseer ventajas competitivas para colonizar raíces, sobre otras bacterias de la rizosfera a temperaturas muy bajas (4°C) (Lifshitz *et al.*, 1986).

A partir de la rizosfera de trigo sembrado en el campo y de cereales y pastos de forraje sembrados en invernadero, se lograron aislar en Suecia bacterias diazotróficas. Algunos aislamientos se lograron identificar como pertenecientes a las especies *Enterobacter agglomerans* y *Bacillus polymyxa*; se encontraron también otras bacterias de taxonomía incierta (Lindberg y Granhall, 1984; Lindberg *et al.*, 1985). En Pakistán, la especie bacteriana diazotrófica más abundante en el arbusto forrajero *Atriplex* fue *Enterobacter agglomerans*. *Atriplex* crece en suelos pobres y salinos (Bilal *et al.*, 1990). La mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de la interfase raíz-suelo de pastos de forraje en la región subtropical de Texas pertenecían a la especie *Enterobacter cloacae* o a *Klebsiella pneumoniae* (Wright y Weaver, 1981). *Rahnella acquatilis* es una nueva especie de bacteria entérica fijadora de nitrógeno asociada a la rizosfera de trigo y maíz (Berge *et al.*, 1991a).

Bacterias del género *Acetobacter* fueron aisladas por primera vez en Brasil a partir de caña de azúcar (Cavalcante y Döbereiner, 1988). A partir de raíces o rizosfera de caña de azúcar y llevando a cabo cultivos sucesivos en medio semisólido libre de nitrógeno con sacarosa, se lograron aislar cepas diazotróficas de *Acetobacter* en cuatro regiones de Queensland, Australia. No se lograron aislar los mismos microorganismos de pastos de las mismas localidades (Li y MacRae, 1991).

El género *Azotobacter*, un diazótrofo común en suelos, ha sido aislado también de la rizosfera de algunas plantas en diversas regiones del mundo, independientemente del tipo de clima presente. En Egipto, *A. chroococcum* fue la especie predominante mientras que *A. vinelandii* se encontró en menor número. Los resultados demuestran que *Azotobacter* varía en su población

dependiendo de la especie de planta, la edad de ésta, y del tipo de suelo. Es más común encontrar un mayor número poblacional en la rizosfera de plantas leguminosas, especialmente en plantas jóvenes (Shawky, 1983).

La mayoría de bacterias diazotróficas aerobias aisladas en suelos canadienses pertenecían a la especie *A. chroococcum* y a la familia Chroococcaceae. En contraste con los resultados obtenidos con suelos egipcios, el tipo de suelo (valores de pH entre 6.5 y 8.0; contenido de humedad entre 8 y 18%) pareció no influir sobre el número poblacional de estas bacterias. La presencia de trigo o tipos de césped comunes no promovió el establecimiento de las Azotobacteraceae. Sin embargo, se encontró que en rizosferas de maíz, avena y soya la densidad poblacional de estas bacterias fue significativamente mayor que en pastos (Kole *et al.*, 1988).

Se ha aislado *Bacillus* sp. a partir de ectomicorrizas tuberculadas del abeto Douglas, el cual pudo fijar nitrógeno sólo bajo condiciones microaerófilas, provocadas por el proceso de respiración del complejo tubercular (planta-bacteria-hongo) (Li *et al.*, 1992).

Phyllobacterium sp., perteneciente a la familia Rhizobiaceae, produce ácido indol-acético en cultivos *in vitro* e induce efectos similares a los producidos por la auxina al ser cultivado con callos de tabaco (Lambert *et al.*, 1990a). Estas bacterias fueron aisladas a partir de nódulos foliares de plantas tropicales, y resultaron ser el segundo grupo bacteriano más abundante en raíces de plantas jóvenes de betabel, *Beta vulgaris*. La primera especie bacteriana más abundante fue *P. fluorescens* (Lambert *et al.*, 1990a).

Listonella anguillarum y *Vibrio campbellii*, dos especies nuevas de bacterias fijadoras de nitrógeno, fueron aisladas a partir de raíces del árbol de mangle *Avicennia germinans* de una laguna costera mexicana. Al mezclarse el cultivo con *Staphylococcus* sp., bacteria no diazotrófica aislada de la misma fuente, la fijación de nitrógeno de *L. anguillarum* se incrementó (Holguin *et al.*, 1992).

Bacterias no diazotróficas

Las bacterias no diazotróficas son muy abundantes en la rizosfera y se han llevado a cabo varias búsquedas selectivas de ellas.

De una búsqueda de los grupos bacterianos más abundantes en la superficie radicular de 1100 plantas jóvenes de betabel, se obtuvieron 5600 aislamientos. Estas plantas procedían de tres parcelas diferentes en Bélgica y de una parcela en España. Las más abundantes pertenecían a las especies *Pseudomonas fluorescens*, *Xantho-*

monas maltophilia, *P. paucimobilis* y *Phyllobacterium* sp. (Lambert et al., 1990b).

De la rizosfera de plantas de trigo y cebada, y utilizando técnicas estándar, se aislaron las siguientes especies: *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *Streptomyces* spp., *Xanthomonas maltophilia*, y una saprófita corineforme (Juhnke et al., 1987).

Lalande et al., (1989) llevaron a cabo una evaluación de rizobacterias obtenidas a partir de 20 plantas de maíz híbridas, tomadas de diferentes localidades de la provincia de Quebec, y encontraron que *Pseudomonas* spp. era el grupo bacteriano más prominente en el rizoplano y en la rizosfera. *Bacillus* spp. y *Serratia* spp. se encuentran en menor cantidad. Del interior de la raíz se aislaron *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. siendo más abundante la primera. En una búsqueda de bacterias promotoras del crecimiento en plantas, los aislamientos *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas* spp. promovieron el crecimiento vegetal de manera consistente. Se aislaron poblaciones de *Xanthobacter* a partir de raíces de cultivos de arroz en campo (Reding et al., 1991). Como puede observarse, hay abundancia de rizobacterias. La pregunta clave es cual(es) tiene(n) potencial como bacteria(s) benéfica(s) para la agricultura.

APAREAMIENTO GENOTÍPICO (GENOTYPIC MATCH)

Existe un argumento que sostiene que el apareamiento genotípico (lo cual significa que determinada cepa sólo promoverá el crecimiento de determinada planta) entre las plantas y las bacterias asociativas puede determinar la naturaleza de la respuesta, ya sea la estimulación o inhibición del crecimiento de la plántula. Sin embargo, no está claro si la especificidad genotípica surge cuando la planta es sembrada y las bacterias benéficas existentes en la flora bacteriana del suelo son seleccionadas y enriquecidas en la rizosfera (Chanway y Holl, 1992). Si así fuera, no habría necesidad de llevar a cabo una inoculación artificial ya que la planta se encargaría de seleccionar y enriquecer a las bacterias benéficas ya presentes en el suelo.

Podemos proponer la hipótesis de que si se inoculan microorganismos a la misma planta de la cual se aislaron, la probabilidad de obtener efectos positivos como resultado de la inoculación bacteriana es mayor que si estos microorganismos fueran inoculados a plantas a las que nunca antes han estado asociadas. Sin embargo, esta hipótesis no se confirmó al evaluarla en plantas forestales.

Es de esperarse que la presión selectiva sobre bacterias de la rizosfera es particularmente fuerte en bosques debido a: (i) el tiempo tan prolongado que un árbol ocupa determinado sitio, y (ii) las tasas reproductivas relativamente altas de la población microbiana asociada. Sin embargo, no se encontró evidencia de que la especificidad de la interacción bacterias-abeto Douglas-suelo fuera de importancia en la promoción del crecimiento de las plántulas (Chanway et al., 1990; Chanway y Holl, 1992).

El aislamiento de cerca de 1000 cepas de bacterias asociativas a partir de cereales silvestres y su posterior inoculación en trigo cultivado, dio como resultado que una sola cepa de la especie *Pseudomonas* sp. incrementara significativamente el rendimiento de los cultivos (Bashan, resultados no publicados; Bashan, 1986).

Un caso notorio es el efecto que provoca la inoculación con *Azospirillum* spp., aislada de un cereal, sobre muchas especies vegetales que no son cereales y nunca antes habían sido expuestas a este microorganismo. Todas respondieron positivamente a la inoculación con esta bacteria (Bashan et al., 1989, 1991). Los casos más extremos son los resultados obtenidos con plántulas del cardón gigante *Pachycereus pringlei* inoculadas con cepas de *Azospirillum*, originarias de áreas tropicales húmedas (Puente y Bashan, 1993) o con la hierba de clima templado, *Arabydopsis* (Dubrovsky et al., 1994).

Sin embargo, un estudio reciente sobre la diversidad fenotípica y genética de *Bacillus polymyxa* en el suelo y la rizosfera de trigo apoya la teoría de selección. Los resultados indican que la diversidad de la población de *B. polymyxa* en suelo que no se encuentra bajo la influencia de la raíz es mayor que la población del rizoplano. Por lo tanto, parece ser que las raíces seleccionaron una subpoblación específica a partir de poblaciones naturales de *B. polymyxa* del suelo (Mavingui et al., 1992).

Parece que el apareamiento genotípico es una cuestión no resuelta y probablemente válida para algunas asociaciones planta-bacteria.

EJEMPLOS DE BACTERIAS ASOCIATIVAS QUE PROMUEVEN EL CRECIMIENTO VEGETAL

La mayoría de las especies de bacterias asociativas fueron aisladas durante la última década. Todavía es incierto si estos aislamientos ayudan al crecimiento vegetal. Sin embargo, se mencionarán a continuación asumiendo que, a menos que se pruebe que un aislamiento

bacteriano sea neutral o inocuo, puede ser benéfico ya que coexiste con la planta huésped.

Azotobacter

Después de *Azospirillum*, la mayor parte de la literatura de la última década sobre bacterias asociativas, es sobre *Azotobacter*. *Azotobacter* fue probada en los años 30 y 40 como un biofertilizante potencial, sobre todo en la antigua Unión Soviética. Los resultados de la inoculación obtenidos con esta bacteria heterótrofa y libre no justificaron su comercialización a gran escala. Por esta razón, el desarrollo de una tecnología para *Azotobacter* fue literalmente abandonada por el mundo occidental. El uso potencial de *Azotobacter* como biofertilizante ha sido revisado por Brown (1974) quien concluyó que la inoculación con *A. chroococcum* (la especie de *Azotobacter* más comúnmente utilizada) en ocasiones provocó incrementos en el rendimiento de las cosechas, probablemente a través de mecanismos alternos a la fijación de nitrógeno. Sus poblaciones alcanzan niveles generalmente bajos. El reciente interés en bacterias benéficas ha despertado el estudio de *Azotobacter*.

Efecto de *Azotobacter* sobre el rendimiento vegetal. La mayoría de la información actual concerniente al efecto que ejerce *Azotobacter* en el rendimiento vegetal, fue obtenida a partir del estudio de diversos cultivos en India. Se mencionan a continuación los resultados sobre rendimiento en cereales, mostaza y algodón. Así, experimentos realizados en macetas con suelo del campo, arena y vermiculita, bajo condiciones controladas e inoculadas con *A. chroococcum*, dieron como resultado un incremento en el peso y en el contenido de nitrógeno de las panículas en el pasto *Setaria italica*. Sin embargo, la inoculación en el campo dio como resultado un incremento en rendimiento no significativo de sólo 8% (Yahalom *et al.*, 1984).

La inoculación con *Azotobacter* sp. de plantas de avena contenidas en macetas no incrementó el rendimiento de las plantas. Sin embargo, tanto el incremento de nitrógeno total en suelo al final del experimento como el equilibrio positivo de ^{14}N en la rizosfera fueron estadísticamente significativos. La cantidad de nitrógeno acumulado en el suelo fue similar a la concentración de N adicionado como fertilizante (Shabaev *et al.*, 1991).

La inoculación de semillas de mostaza con *A. chroococcum* en presencia de urea originó un incremento tanto en rendimiento como en absorción de nitrógeno. Esto

puede ser atribuible no sólo a la capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno, sino también a la promoción del crecimiento de la raíz (Poi *et al.*, 1988).

En algodón, *Azotobacter* incrementó ligeramente el contenido de aceite de la semilla. Otros beneficios fueron: a) promoción en la germinación así como en el vigor de las plántulas germinadas, y b) reducción del número de semillas germinadas anormalmente o muertas. La inoculación incremento el rendimiento de la semilla de algodón en 19%, debido a un incremento en el número de cápsulas de algodón por planta (Pandey *et al.*, 1989a,b). Casi todos los estudios han demostrado efectos positivos como resultado de la inoculación con *Azotobacter*. Sin embargo, este panorama es probablemente subjetivo, ya que no existe un inoculante comercial de *Azotobacter*, probablemente debido a la existencia de resultados negativos nunca publicados. La mayoría de la información que existe ha sido publicada en revistas agrícolas de divulgación en la anterior Unión Soviética, las cuales no exigen el análisis estadístico de los datos, repetición de resultados, o metodología científica. Esta falta de información impide evaluar adecuadamente el potencial de *Azotobacter* como promotor del crecimiento vegetal.

Sobrevivencia en la rizosfera. Existen pocos estudios que reportan la presencia de *Azotobacter* en la rizosfera, a pesar de ser una bacteria muy común del suelo. En suelos del Este canadiense casi el 90% de las bacterias diazotróficas aerobias pertenecían a la especie *A. chroococcum* o a miembros de la familia Azotobacteraceae. El nivel poblacional varió entre 10^2 y 10^4 bacterias por gramo de suelo. Ni el tipo de suelo ni la presencia de trigo y pasto provocó un incremento en el nivel poblacional (Kole *et al.*, 1988).

En la rizosfera de plantas de algodón, sorgo y trigo, *Azotobacter* resultó ser la bacteria diazotrófica libre más común. Su población varió entre 2.0×10^3 y 1.1×10^4 bacterias por gramo de suelo (Sindhu y Lakshminarayana, 1986).

Azotobacter sobrevivió mejor en la rizosfera de cebada inoculada cultivada en suelo complementado con basura orgánica compostada que en suelos no abonados (Negi *et al.*, 1987). En cultivo de tejido de raíces de trigo invernal, *Azospirillum* y *Pseudomonas cepacia* colonizaron mejor la raíz que *Azotobacter* (De Freitas y Germida, 1990).

La evidencia acumulada hasta ahora, la cual se encuentra muy dispersa, confirma que *Azotobacter* no es una verdadera bacteria asociativa. Probablemente las condiciones de

cultivo o ambientales la obligan a trasladarse del suelo a la rizosfera de manera temporal.

Inoculación mixta de *Azotobacter* con *Rhizobium* o *Azospirillum*. Existen varios trabajos que demuestran que el inoculante compuesto por *Azotobacter* y otras bacterias fijadoras de nitrógeno, promueve el crecimiento de plantas. Cultivos mixtos de *Azotobacter* y *Rhizobium japonicum* incrementaron el número de nódulos en raíces, el peso fresco de los nódulos, el peso seco de las plantas de soya, así como la fijación simbiótica de nitrógeno (El-Bahrawy, 1983). La inoculación de *Sesbania* (leguminosa) con *R. sesbani* y *A. chroococcum* y/o *A. vinelandii*, incrementó significativamente la actividad de la nitrogenasa (El-Gamal, 1992).

Los valores más altos de actividad nitrogenasa (determinada a través del ensayo de reducción de acetileno) en raíces se registraron en tratamientos que incluían una inoculación compuesta de *Azotobacter* y *Azospirillum*. La inoculación con una sola de estas bacterias no produjo ningún efecto sobre el crecimiento de plantas de trigo y cebada; sin embargo, una inoculación mixta incrementó significativamente el crecimiento vegetal (Fayez, 1990).

Actividad hormonal. *Azospirillum* y *Azotobacter* tienen la capacidad de sintetizar hormonas vegetales reguladoras del crecimiento las cuales, a su vez, pueden alterar el metabolismo vegetal y, eventualmente, incrementar el rendimiento de los cultivos.

En el sobrenadante de un cultivo de *Azotobacter*, aislado a partir de raíces del frijol común y plantas de tomate, se encontró ácido indol acético junto con otros derivados no identificados de auxinas y giberilinas (El-Bahrawy, 1983; Mahmoud et al., 1984).

Se probó el efecto de *Azotobacter* como productor de hormonas sobre el crecimiento vegetal. La cepa de *A. chroococcum*, productora de citoquinina, se inoculó en suelo (invernadero) con plantas de maíz y precursores sintéticos de citoquinina. La combinación de precursores de citoquinina y *A. chroococcum* resultó ser la más efectiva en promover el crecimiento vegetativo del maíz, al compararse con la sola aplicación de *A. chroococcum*. El peso seco de raíces, tejidos de brotes y varios otros parámetros de crecimiento se incrementaron hasta cinco veces comparado con los controles. La promoción en el rendimiento vegetal se le atribuyó principalmente a la producción de citoquininas por parte de *A. chroococcum* (Nieto y Frankenberger, 1991).

Algunos trabajos han indicado la posibilidad de la existencia de especificidad en la asociación *Azotobacter*-

planta. *Azotobacter paspali* presenta especificidad al pasto de forraje *Paspallum*, a la vez que incrementa el crecimiento de esta planta (Abbas y Okon, 1993a,b). Se encontraron variaciones en la respuesta de algunos cultivos a la inoculación con diferentes cepas de *A. chroococcum* (Rajakumar y Lakshmanan, 1990). Los tipos de planta que se favorecieron por su asociación con *Azotobacter* tenían metabolismo C₄. Esta respuesta favorable posiblemente se debió a la producción de exudados radiculares lo cual satisface la demanda de *Azotobacter* por un sustrato orgánico para la fijación de nitrógeno (Ela et al., 1982). A pesar de esto, la poca diversidad de especies de *Azotobacter* encontrada en 200 suelos diferentes aporta evidencia contra la especificidad de la interacción *Azotobacter*-planta (Kole et al., 1988).

Pesticidas. Por razones económicas, la mayoría de las prácticas agrícolas modernas utilizan una amplia variedad de herbicidas y pesticidas, los cuales pueden afectar a otros microorganismos que contribuyen a la fertilidad del suelo. El efecto varía dependiendo del compuesto, así como de la preparación del mismo. Algunos no ejercen ningún efecto sobre los microorganismos, otros retardan procesos fisiológicos específicos, mientras que otros estimulan la actividad microbiana. En la última década se han escrito pocos estudios relacionados sobre interacciones herbicida-*Azotobacter*. En uno de ellos, el herbicida pre-emergente (adicionado antes de que la planta emerja a la superficie) "Alachlor" (2-cloro-N-(2,6-dietilfenil)-N-metoximetilacetamida) estimuló las poblaciones de *Azotobacter* bajo condiciones de campo (Mohammad, 1984). Se demostró que *A. chroococcum* y *A. vinelandii* son muy sensibles al contacto con el herbicida Sethoxydim (2-[1-(etoximino)]-5-[2-etiltio]-propil]-3-hidroxi-2-ciclohexenon-1). En general, varios parámetros fisiológicos de *A. chroococcum* se inhibieron, mientras que en el caso de *A. vinelandii* estos mismos parámetros fueron estimulados al utilizar determinadas concentraciones del herbicida. En relación a la fijación de nitrógeno Sethoxydim estimuló intensamente la actividad de *A. chroococcum* (Roslycky, 1990). Por otro lado, el herbicida "Arelon" (N-[4-isopropilfenil]-N', N'-dimetil-urea) inhibió la fijación de nitrógeno de *A. chroococcum* y de *A. vinelandii* (Gadkari, 1987).

Bacillus (no incluye cepas utilizadas como agentes de control biológico)

Generalizando, bacterias de la rizosfera del género *Bacillus* son considerados rizobacterias promotoras del

crecimiento en virtud a su actividad como agentes de control biológico de patógenos del suelo. Esta concepción errónea probablemente se originó de la información existente sobre el famoso aniquilador de insectos, *Bacillus thuringiensis*, el cual es comercialmente utilizado para el control de aquéllos. De hecho, algunas bacterias del género *Bacillus* tales *B. megaterium*, *B. polymyxa* y *B. circulans* son promotores del crecimiento a través de mecanismos diferentes al control de patógenos tales como fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato. En muchos casos, es complicado determinar los mecanismos por medio de los cuales estas bacterias promueven el crecimiento de las plantas.

Efectos de *Bacillus* sobre el crecimiento vegetal. Se estudiaron dos de los efectos que *Bacillus* puede provocar en plantas inoculadas: (i) emergencia mejorada, e (ii) incremento en el crecimiento del follaje. Para que una cepa posea potencial comercial es necesario que presente las dos, o por lo menos la última característica. Algunos ejemplos demostraron estas premisas.

Al inocular la bacteria diazotrófica *B. circulans* (aislada de la rizosfera del maíz) a plantas de maíz cultivadas en el campo en regiones templadas y bajo cultivo intensivo, se incrementó significativamente el rendimiento del grano del maíz por planta (7%), el peso seco total (3%), y el nitrógeno total del grano (4%) y de la planta (14%) (Berge *et al.*, 1990).

La inoculación de semillas de pino con *B. polymyxa* incrementó significativamente el peso seco de raíces y brotes de las plántulas. La promoción del crecimiento de la plántula de pino está en función del tamaño (alrededor de 10^6 ufc/g) de la población bacteriana en la rizosfera (Holl y Chanway, 1992).

La inoculación de semillas de abeto blanco *Picea glauca* con *B. polymyxa* bajo condiciones de vivero, incrementó significativamente (8%) el número de plántulas emergidas; sin embargo, disminuyó el peso seco de los brotes (8%) y de la raíz (16%) en plantas de cuatro meses (O'Neill *et al.*, 1992b). Estos resultados sugieren que los efectos que provoca la inoculación con *Bacillus* sobre la emergencia de plántulas y sobre el crecimiento, son independientes, y que bacterias promotoras del proceso de emergencia pueden inhibir el subsecuente crecimiento de la plántula. Esta es una gran desventaja para la tecnología de la inoculación. Sin embargo, ya que las compañías comerciales evalúan cepas de *Bacillus* como posibles agentes de control biológico, es probable que de esta búsqueda surgan otras cepas promotoras del crecimiento.

Efectos hormonales inducidos por la inoculación con *Bacillus*. Estudios preliminares demostraron que, al igual que *Azospirillum* y *Azotobacter*, *Bacillus* produce reguladores de crecimiento, afectando así el crecimiento vegetal.

B. cereus, aislada de la rizosfera de árboles de manzana, promovió significativamente el crecimiento de plántulas, posiblemente a través de la producción de sustancias análogas a IAA, en presencia y ausencia del hongo patógeno *Pythium* en las raíces (Selvadurai *et al.*, 1991). La inoculación de trigo con *Bacillus* promovió el crecimiento, bajo diferentes condiciones de cultivo tales como ensamblados estériles, macetas no estériles, y en campo. Algún factor no termoestable debe estar involucrado ya que al autoclavar las células de *Bacillus* se inhibió el crecimiento; sin embargo, el agregar el sobrenadante fue tan efectivo como el agregar células completas. No se aclaró si fue debido a la presencia de hormonas. Se pudo detectar IAA en el sobrenadante, mas la adición de IAA exógeno, no produjo ningún efecto sobre el crecimiento de las plantas (Chanway y Nelson, 1990).

La inoculación de plantas de trigo con *Bacillus* incrementó el peso de las raíces de trigo al igual que la incorporación de ácido giberélico sintético en las cámaras de crecimiento hechas de papel y plástico ("pouches"). Además, el agregar a las cámaras los filtrados celulares junto con células bacterianas muertas, provocó respuestas vegetales similares a las producidas al agregar células vivas (Kucey, 1988).

Inoculación mixta de *Bacillus* con otros microorganismos. Se ha estudiado la interacción entre *Bacillus* con los simbiontes de leguminosas, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y con hongos micorrízicos en plantas de bosque. Se han publicado muy pocos estudios relacionados con el tema.

En plántulas del pino *Pinus contorta* Douglas la inoculación con el hongo micorrízico *Wilcoxina mikolae* provocó una disminución en el número de brotes (11%) y en la biomasa radicular (4%). La inoculación única de *Bacillus* no tuvo efecto sobre la biomasa de la plántula o sobre el contenido de nitrógeno en el follaje. Al comparar la inoculación conjunta de micorrizas y *Bacillus* con la inoculación única del hongo, se observó lo siguiente: (i) un nivel de infección por micorrizas similar al obtenido con la inoculación única de los hongos, y (ii) se obtuvo, no obstante, una mayor biomasa de brotes (12%) y de raíz (11%) con la inoculación conjunta (Chanway y Holl,

1991). Estos resultados demostraron que por medio de una interacción sinergista se indujo el crecimiento vegetal, no como resultado de un mayor número de micorrizas sino que sólo parcialmente como resultado de la actividad de fijación de nitrógeno asociada.

La inoculación conjunta de hongos micorrízicos y algunas bacterias benéficas, incluyendo a *Bacillus* sp., en plántulas del abeto Douglas dio como resultado un incremento en la generación de micorrizas en raíces cortas (Duponnois y Garbaye, 1991).

La inoculación conjunta de una cepa de *Bacillus* productora de antibióticos con rizobios resistentes a esos antibióticos, ha sido propuesta como una forma de promover la colonización de los rizobios y nodulación de leguminosas. Este efecto benéfico se manifestó con el nivel de colonización alcanzado por *Rhizobium meliloti* en el incremento en el número de nódulos, así como en el rendimiento de la alfalfa. Se observaron los mismos efectos con *Bradyrhizobium japonicum* pero en plantas de soya. Debido a que los mutantes no-productores de antibióticos del género *Bacillus* no lograron promover la colonización ni la nodulación de raíces de alfalfa por *R. meliloti*, se considera que el beneficio obtenido como resultado de esta inoculación doble se debe a la producción de antibióticos de la bacteria "ayudante". Permanece incierto si el efecto es debido a la actividad de control biológico de *Bacillus* sobre organismo(s) patógeno(s), o a la inhibición generalizada de la microflora de la rizosfera (Li y Alexander, 1990). Las semillas de soya tratadas con cepas con actividad de control biológico de *B. cereus*, incrementaron su número de nódulos al desarrollarse en el campo. Se demostró que este efecto no guarda relación alguna con el control biológico, ya que este efecto también fue demostrado en suelo estéril (Halverson y Handelsman, 1991).

La inoculación conjunta de *Bacillus* con otros microorganismos es una línea de investigación prometedora que debe ser estudiada más a fondo. En esta interacción, *Bacillus* participa como "bacteria ayudante", permitiendo que el principal microorganismo benefactor lleve a cabo sus funciones de promotor del crecimiento vegetal de manera óptima.

Solubilización de fosfato por *Bacillus*. La adición de fósforo es la base de cualquier práctica agrícola, ya que el fosfato es uno de los principales iones consumidos por las plantas. Los fertilizantes fosfatados, especialmente los complejos, son relativamente caros y lejos del alcance de la mayoría de los agricultores de países en vía de desarrollo. Por otro lado, la roca fosfórica no es cara y

está a la disposición de todos. El problema es que el fósforo presente en esta roca no está disponible para las plantas; por ello la importancia de las bacterias solubilizadoras de fosfato. La mayoría de las revisiones sobre la habilidad de las especies de *Bacillus* para solubilizar fosfato insoluble y hacerlo disponible para leguminosas, arroz y sorgo provienen de India.

B. subtilis y *B. circulans* disuelven una gran cantidad de fosfato tricálcico. La inoculación de frijol con estas cepas promovió: a) la nodulación por parte de los rizobios, b) el contenido de fosfato disponible en suelos aluviales, c) la biomasa de raíces y brotes, d) el rendimiento de paja y grano, y e) la absorción de nitrógeno y fósforo por las plantas. Como fuente de fósforo, se recomienda la utilización de roca fosfórica para aquellas zonas agrícolas de bajos recursos, por ser más barata que el fertilizante comercial (Gaird y Gaur, 1991).

La inoculación de frijol Yorimon con *Rhizobium* incrementó significativamente la absorción de nitrógeno por parte de la planta; sin embargo, se obtuvo mayor respuesta al inocular simultáneamente *Rhizobium*, la bacteria solubilizadora de fosfato *B. polymyxa*, y el hongo micorrízico *Glomus fasciculatum*. Esta inoculación triple dio como resultado un incremento en la producción de materia seca y en la absorción de fosfato al compararse con los resultados obtenidos a partir de inoculaciones dobles o únicas, combinando cualquiera de los organismos ya mencionados. Las cepas *G. fasciculatum* y *B. polymyxa* fueron muy eficientes al inocularse en plantas cultivadas en suelo con fosfato insoluble (Poi et al., 1989).

En cultivo de arroz la inoculación mixta de *B. circulans* y *B. subtilis* y la aplicación de estiércol con o sin roca fosfórica, dio como resultado un incremento en el nivel de fósforo disponible en la rizosfera, así como en la absorción de fósforo y contenido de materia seca (Banik y Dey, 1985).

Una inoculación mixta de *Azospirillum brasilense* y las bacterias solubilizadoras de fosfato *B. polymyxa* o *P. striata* en plantas de sorgo cultivadas en el campo dio como resultado un incremento significativo en el rendimiento del grano (46% y 40%), materia seca (34% y 64%) y en la absorción de fósforo (52% y 47%) al compararse con los resultados obtenidos a partir de inoculaciones únicas de cualquiera de los organismos mencionados (Alagawadi y Gaur, 1988, 1992).

El gran éxito obtenido en India con la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfato (Alagawadi y Gaur, 1988, 1992) debe servir de motivación a investigadores de

otras partes del mundo para utilizar este tipo de bacterias en sus inoculantes. Debe promoverse particularmente en países en vía de desarrollo, los cuales generalmente cuentan con depósitos de roca fosfórica y carecen de fondos para comprar fertilizantes fosfatados.

OTRAS BACTERIAS ASOCIATIVAS CON POTENCIAL PARA SER BPCP

Existe poca información sobre las especies de bacterias asociativas que se describen a continuación. Sin embargo, se exponen brevemente aquellas bacterias BPCP potenciales para prácticas agrícolas futuras.

Klebsiella y *Enterobacter*

Algunas plantas xerófitas, colonizadoras de dunas, deben establecerse rápidamente en la arena, antes de que el viento las desprenda. Estas plantas se consideran de importancia como estabilizadoras de la conformación de costas, ya que, al crecer sobre las dunas, evitan que el viento cambie la conformación de las mismas. La inoculación de *Uniola paniculata* L. con *Klebsiella pneumoniae* no contribuyó con nitrógeno a la planta; sin embargo, se incrementó el crecimiento de raíces y el tamaño de la espiga mayor (43% y 3%, respectivamente). La inoculación bacteriana logró además incrementar el nivel de colonización radicular de los hongos micorrizicos vesículo-arbusculares (15 %) al compararse con plantas inoculadas solamente con los hongos. *K. pneumoniae* logró incrementar la germinación de esporas (15%) y el crecimiento de las hifas de *Glomus deserticola* (400%) (Will y Sylvia, 1990).

Se analizó la capacidad de algunas cepas de *Enterobacter agglomerans*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, y *K. terrigena* aisladas de plantas o humanos, para incrementar el crecimiento en pastos por la producción de auxinas y compuestos relacionados con el indol. Cada uno de los aislamientos enterobacterianos logró incrementar significativamente el número de pelos radiculares de *Poa pratensis*. No se encontró diferencia entre el efecto causado por bacterias aisladas de vegetales y las aisladas de humanos. La sustancia bioactiva resultó ser una auxina, ácido indol-3-acético. El análisis de los filtrados bacterianos demostró que los aislamientos enterobacterianos produjeron al menos 10 compuestos indol, detectándose la auxina mencionada en el 88% de los filtrados (Haahtela *et al.*, 1990).

La inoculación de plantas de arroz con *K. oxytoca* dio como resultado un incremento de un 6 % en el peso de la planta, incrementándose el contenido de nitrógeno de las plantas hasta en un 8% (You *et al.*, 1986).

Se midió la actividad de la nitrogenasa de las bacterias asociativas *K. pneumoniae* y *E. agglomerans*, aisladas de pastos finlandeses, en presencia de varios herbicidas. La actividad de la nitrogenasa de *K. pneumoniae* se inhibió en presencia de herbicidas tipo ácido fenoxi. En presencia del mismo tipo de herbicida, la actividad de la nitrogenasa de *E. agglomerans* se vio incrementada en un 10-50% (Haahtela *et al.*, 1988).

Las cepas de *Klebsiella* se adhirieron a las raíces de la gramínea norteamericana "bluegrass" (*Poa pratensis*) y al pasto *Festuca rubra* con mayor fuerza a los pelos radicales que a la superficie de la zona de elongación y a la capa mucilaginosa de la raíz. No se observó adhesión a las células epidermales localizadas entre los pelos radicales. La inoculación de *K. pneumoniae* a plántulas de *P. pratensis*, ocasionó cambios morfológicos en las raíces. Las raíces de plantas infectadas se cubrieron por completo de pelos radicales, los cuales, en muchos de los casos, se encontraban deformados y ramificados (Haahtela *et al.*, 1986). Dos tipos de fimbrias de *K. pneumoniae* y de *E. agglomerans* actuaron como intermediarios en la adhesión de las bacterias a las raíces de *P. pratensis* (Haahtela *et al.*, 1985).

Acetobacter diazotrophicus

Esta especie ha sido recientemente descrita (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989); es una bacteria endofítica asociada de manera natural a raíces, tubérculos y tallos de caña de azúcar y camote. Se cultiva en un medio de cultivo rico en sacarosa. 24 cepas de *A. diazotrophicus* fueron aisladas a partir de tejidos internos de tallos y raíces de 24 variedades de caña de azúcar obtenidas de diferentes regiones geográficas en México (Caballero-Mellado y Martínez-Romero, 1994). Después de 15 días de ser inoculada se observó colonización bacteriana externa en raíces y ramas inferiores de caña de azúcar, particularmente en cavidades de las coyunturas de las raíces laterales. Las bacterias penetraron en los tejidos radicales a través de células sueltas en las puntas radicales. Después de 15 días las bacterias se encontraban en los vasos del xilema en la base del tronco (James *et al.*, 1994). *A. diazotrophicus* en particular tiene un gran potencial a nivel comercial, ya que

aparentemente provee todos los requerimientos de nitrógeno de la caña de azúcar cultivada en Brasil. Esta área de estudio debe ser considerada con énfasis, ya que la caña de azúcar es uno de los cultivos proveedores de combustibles más prometedores del futuro. En Brasil, la caña de azúcar es el cultivo más importante, ya que se utiliza en la producción de etanol, utilizado como combustible para vehículos.

La inoculación mixta de *A. diazotrophicus* y el hongo micorrízico *Glomus clarum* en camotes micropropagados, promovió la generación de esporas en mayor cantidad que con la inoculación única del hongo micorrízico. Las plantas inoculadas con esporas de hongos, las cuales a su vez fueron inoculadas con bacterias, mostraron incremento en el número de esporas formadas dentro de las raíces. *A. diazotrophicus* colonizó (*in vitro*) las partes de las plantas de camote expuestas al aire y las de caña de azúcar (en suelo no esterilizado) sólo al ser inoculadas en conjunto con micorriza vesículo-arbuscular (MVA) o al estar presentes en esporas de MVA (Paula *et al.*, 1991). Plántulas micropropagadas de caña de azúcar inoculadas con esporas de VAM con bacterias diazotróficas, tenían un mayor número de bacterias que aquellas plántulas inoculadas solamente con bacterias. Se observó un efecto similar, con excepción de la colonización de partes aéreas, en sorgo dulce (Paula *et al.*, 1991). La producción de IAA de *A. diazotrophicus* fue 100% mayor que la producción de IAA de *Azospirillum lipoferum*. El efecto de *A. diazotrophicus* sobre el crecimiento de plantas de papa se debió a una promoción en el proceso de micorrización, dándose en consecuencia una asimilación más eficiente de los nutrimentos, más que por fijación de nitrógeno (Paula *et al.*, 1992).

Estos resultados sugieren que *A. diazotrophicus* ejerce efectos positivos sobre las plantas a través de mecanismos alternos a la fijación de nitrógeno al ser inoculado en conjunto con esporas de MVA. Esta combinación puede ser de utilidad en plantas propagadas vegetativamente o por medio de semillas. La posibilidad de introducir microorganismos diazotróficos en raíces vegetales por medio de esporas de MVA abre un nuevo campo para la biotecnología.

Serratia sp.

Cepas diazotróficas del género *Serratia* incrementaron significativamente el crecimiento de trigo en experimentos en maceta y en el campo. Se cree que este

género está bien representado en la rizosfera de trigo de climas templados (Ruppel, 1991).

Alcaligenes faecalis de la rizosfera del arroz

El arroz puede crecerse bajo condiciones aerobias o anaerobias dependiendo del sistema de cultivo utilizado (inundación de las parcelas o no-inundación). Casi todos los grupos importantes de bacterias diazotróficas pueden crecer bajo ambas condiciones. La gran mayoría de bacterias asociadas a raíces de arroz en China pertenecen a la familia Enterobacteriaceae o a los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Derxia* y *Flavobacterium*.

El diazótrofo *A. faecalis*, aislado a partir de raíces de arroz, se encuentra ampliamente distribuido en suelos inundados de China (You *et al.*, 1991). La mayor parte de la población se encontró en la capa mucilaginoso de la superficie radical. Cerca de un 10% de las bacterias acumuladas en la superficie penetraron a los espacios radicales intercelulares. Algunas bacterias penetraron dentro de las células vegetales, donde se multiplicaron y fijaron nitrógeno. Estudios de microscopía electrónica demostraron que *A. faecalis* creció dentro de la célula radical. Callos inoculados con bacterias crecieron bien en medio de cultivo sin fuente de nitrógeno; sin embargo, los callos no inoculados murieron a los treinta días, posiblemente debido a la falta de fuente de nitrógeno (You y Zhou, 1989; You *et al.*, 1991).

Azoarcus sp.

Azoarcus sp. (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) fue aislada en Pakistán a partir del pasto Kallar, el cual crece en suelos salinos de potencial agrícola marginal. Se estimó el número poblacional de bacterias diazotróficas en el interior de la raíz y en el rizoplasma del pasto Kallar. Se demostró que *Azoarcus* fija nitrógeno (Hurek *et al.*, 1987; Reinhold *et al.*, 1986, 1987) y coloniza el pasto Kallar y plantas de arroz inter- e intracelularmente.

La colonización es acompañada de una matriz extracelular. No todas las raíces fueron penetradas, y la penetración fue mayor en la zona de elongación de las partes jóvenes del sistema de raíces. El proceso de colonización aparentemente terminó con la formación de colonias grandes tanto intra- como intercelularmente. La base del tallo sirve de inóculo para raíces secundarias nuevas. Probablemente estas bacterias están emparen-

tadas con micorrizas vesículo-arbusculares (Hurek *et al.*, 1991).

Ya que toda la información que concierne a esta asociación ha sido producida por un sólo equipo de investigación, el cual no ha realizado hasta la fecha ningún experimento sobre incremento de crecimiento o rendimiento, se desconoce si se trata de un nuevo representante de BPCP, o se trata simplemente de una bacteria de la rizosfera.

Cianobacterias

Se probó la habilidad de cianobacterias heterocísticas, fijadoras de nitrógeno, de los géneros *Nostoc*, *Anabaena* y *Cylindrospermum* para asociarse con raíces de plántulas de trigo cultivadas en cultivo líquido. Se reconocieron dos tipos de asociaciones: (i) Asociaciones laxas de filamentos bacterianos creciendo entre pelos radicales, típica de aislamientos de *Anabaena*. (ii) Asociaciones firmes de microcolonias en asociación íntima con la superficie radical, exclusivas de ciertos aislamientos pertenecientes al género *Nostoc*. Las diferencias de magnitud de la actividad diazotrófica entre cianobacterias libres y asociadas, aunado a los efectos de incorporación de nitrato, indican que la actividad de la nitrogenasa puede ser influenciada por la planta y/o sus productos (Gantar *et al.*, 1991). La inoculación de plántulas del mangle negro *Avicennia germinans* con la cianobacteria *Microcoleus*, incrementó la actividad de fijación de nitrógeno de plántulas inoculadas así como su crecimiento (Toledo y Bashan, 1994).

Bacterias oxidantes del azufre

El azufre elemental es frecuentemente utilizado como fertilizante. Este fertilizante de azufre debe ser oxidado a sulfato antes de ser asimilado por las plantas.

El número de bacterias heterótrofas que oxidan azufre fue mayor en suelo de la rizosfera de trigo y canola (*Brassica campestris*) que en suelo no asociado a raíces (Grayston y Germida, 1991). 18 cepas de este grupo de bacterias incrementaron el peso seco de vainas (en más del 100%) y brotes (alrededor del 80%) en plantas maduras. Algunos aislamientos lograron incrementar el área de la hoja en presencia de sulfato e incrementar la absorción de otros elementos, mientras que otros aislamientos inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos de canola *Rhizoctonia solani* y *Leptosphaeria maculans*. De esta manera, parece ser que algunas bacterias oxidantes

del azufre estimulan el crecimiento de canola promoviendo la absorción de minerales de azufre, hierro y magnesio, mientras que en otros casos parece que también intervienen efectos de antibiosis (Grayston y Germida, 1991).

Bacterias hipersalinas de la rizosfera

A partir de plantas xerófitas de una salina española se lograron aislar varias especies de bacterias Gram positivas tales como: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, y otros aislamientos no identificados. Como representantes de bacterias Gram negativas se encontraron *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Halobacterium*. Las bacterias anaerobias facultativas encontradas fueron cepas de *Vibrio* y especies no identificadas de la familia Enterobacteriaceae (Quesada *et al.*, 1982). La mayoría de estas bacterias eran moderadamente halófilas. La explicación a este fenómeno debe estar relacionada con la heterogeneidad del habitat del suelo, en el cual la salinidad puede variar abruptamente de un microhabitat a otro en el tiempo. Como resultado de esta heterogeneidad, aquellos organismos muy especializados serían eliminados por el proceso de selección natural, o se encontrarían en bajos niveles poblacionales, favoreciéndose la presencia de organismos halófilos moderados (Quesada *et al.*, 1982). En la actualidad los ambientes salinos son poco utilizados como suelos agrícolas. Sin embargo, el potencial de estas áreas marginales no será ignorado por mucho tiempo en áreas con alto crecimiento poblacional y bajo ingreso.

Bacterias patógenas diazotróficas

Generalizando, las bacterias patógenas en vegetales son parásitos que obtienen sus nutrimentos del huésped; por lo tanto, no es de esperarse que fijen nitrógeno, actividad que requiere un gran costo energético.

Herbaspirillum seropedicae es una especie de bacteria cuyos representantes son conocidos como fijadores de nitrógeno. Fue aislada en Brasil en 1986 a partir de raíces de cereal donde en condiciones naturales coexiste con *Azospirillum* (Baldani *et al.*, 1986). *H. seropedicae* causó síntomas de la enfermedad "mottled stripe" (manchado en franjas) en sorgo y pasto Napier, mientras que con *Pseudomonas rubrisubalbicans*, patógeno débil emparentado con *H. seropedicae*, se observaron los mismos síntomas pero en caña de azúcar

(Pimentel *et al.*, 1991). Estas dos especies, junto con *Agrobacterium tumefaciens* (Kanvinde y Sastry, 1990), son los únicos agentes patógenos conocidos como fijadores de nitrógeno. Se desconocen las ventajas que su actividad diazotrófica ofrece a estos organismos, y si es posible considerarlos BPCP debido a su actividad diazotrófica.

CONCLUSIONES

El número de bacterias presentes en la rizosfera con potencial de ser BPCP, es mucho mayor que el número de azospirilos y rizobios en conjunto. Se cuenta con información fragmentada sobre diferentes especies y al generarse más información, se descubre mayor potencial para su uso en la agricultura. Se considera que el estudio de las bacterias oxidantes del azufre y las bacterias solubilizadoras de fosfato son áreas de investigación prometedoras. El potencial de *Acetobacter*, el cual reemplaza la fertilización de nitrógeno en caña de azúcar, "el cultivo energético", es de suprema importancia debido a que el etanol es un importante generador de divisas en Brasil. Lo mismo ocurre con las cepas de *Azotobacter* y *Bacillus* ya mencionadas, las cuales merecen ser consideradas de nuevo, utilizando las nuevas técnicas de inoculación desarrolladas para *Rhizobium* y *Azospirillum*.

Una de las dificultades principales que enfrenta el investigador en esta área de trabajo es la dificultad que representa el registro de una nueva especie. Este factor desalienta a los investigadores, especialmente de países subdesarrollados, a reportar sobre bacterias nuevas con potencial. Probablemente, en beneficio del descubrimiento de aislamientos nuevos y más eficientes, la comunidad científica debería aligerar los requerimientos para la publicación de especies nuevas. Ello alentaría a estudiosos de la sistemática a colaborar en la descripción de los nuevos aislamientos. Se ha publicado recientemente un ejemplo pionero de lo expuesto anteriormente (O'Neil *et al.*, 1992a).

Ya que en la actualidad la liberación al ambiente de bacterias diseñadas por la ingeniería genética está estrictamente regulada, la estrategia seguida por muchos investigadores y por las industrias de inoculantes es la búsqueda de cepas con potencial.

En conclusión, aunque no se dispone de la suficiente información científica y agronómica que pudiera atraer el interés de la industria de inoculantes, y analizando los resultados obtenidos hasta ahora, los investigadores deben asumir que pronto encontrarán BPCP con potencial

agrícola que tengan influencia positiva sobre el crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se escribió en memoria del Sr. Avner Bashan de Israel y fue parcialmente apoyado por fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México, otorgados al Dr. Bashan en el periodo 1992-93. Agradecemos la colaboración del Sr. Roy Bowers por clarificar el texto, al Sr. Horacio Goytortúa por realizar la búsqueda de información en las bases de datos, y al Dr. Felipe Ascencio por su ayuda en la corrección del castellano.

LITERATURA CITADA

- Abbass, Z., y Y. Okon. 1993a. Physiological properties of *Azotobacter paspali* in culture and the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1061-1073.
- Abbass, Z., y Y. Okon. 1993b. Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1075-1083.
- Alagawadi, A.R. y A.C. Gaur. 1988. Interaction between *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria and their influence on yield and nutrient uptake of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Zentralblatt für Mikrobiologie* 143: 637-643.
- Alagawadi, A.R. y A.C. Gaur. 1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 69: 347-350.
- Baldani, J.I., V.L.D. Baldani, L. Seldin y J. Döbereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 86-93.
- Bally, R., D. Thomas-Bauzon, T. Heulin, J. Balandreau, C. Richard y J. Deley. 1983. Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria in a rice rhizosphere. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 881-887.
- Banik, S. y B.K. Dey. 1985. Effect of inoculation with native phosphate solubilizing microorganisms on the available phosphorus content in the rhizosphere and uptake of phosphorus by rice plants, grown in an Indian alluvial soil. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 140: 455-464.
- Barraquio, W.L., J.K. Ladha y I. Watanabe 1983. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 867-873.
- Bashan, Y. 1986. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *Journal of General Microbiology* 132: 3407-3414.
- Bashan, Y., H. Levanony y R.E. Whitmoyer. 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology*. 137: 187-196.
- Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanony y A. Sade. 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of

- noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Botany 67: 1317-1324.
- Berge, O., J. Fages, D. Mulard y J. Balandreau. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. Symbiosis 9: 259-266.
- Berge, O., T. Heulin, W. Achouak, C. Richard, R. Bally y J. Balandreau. 1991a. *Rahmella acquatilis*, a new nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. Canadian Journal of Microbiology 37: 195-203.
- Berge, O., T. Heulin y J. Balandreau. 1991b. Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. Biology and Fertility of Soils 11: 210-215.
- Bilal, R., G. Rasul, K. Mahmood y K.A. Malik. 1990. Nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of *Atriplex* spp. growing in saline sodic soils of Pakistan. Biology and Fertility of Soils 9: 315-320.
- Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. Annual Review of Phytopathology 12: 181-197.
- Brown, M.E. 1982. Nitrogen fixation by free-living bacteria associated with plants—fact or fiction? In: Bacteria and plants. M.E. Rhodes-Roberts y J.A. Skinner (Eds). Academic Press, New York. pp. 25-41.
- Caballero-Mellado, J. y E. Martínez-Romero. 1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. Applied and Environmental Microbiology 60: 1532-1537.
- Cavalcante, V.A. y J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil 108: 23-31.
- Chanway, C.P. y F.B. Holl. 1991. Biomass increase and associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain. Canadian Journal of Botany 69: 507-511.
- Chanway, C.P. y F.B. Holl. 1992. Influence of soil biota on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. Canadian Journal of Botany 70: 1025-1031.
- Chanway, C.P., F.B. Holl y R. Turkington. 1990. Specificity of association between *Bacillus* isolates and genotypes of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* from a grass-legume pasture. Canadian Journal of Botany 68: 1126-1130.
- Chanway, C.P. y L.M. Nelson. 1990. Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. Soil Biology and Biochemistry 22: 789-795.
- De Freitas, J.R. y J.J. Germida. 1990. A root tissue culture system to study winter wheat-rhizobacteria interactions. Applied Microbiology and Biotechnology 33: 589-595.
- Dubrovsky, J.G., M.E. Puente y Y. Bashan. 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* sp-245 on root hair growth. Soil Biology and Biochemistry 26:1657-1664.
- Duponnois, R. y J. Garbaye. 1991. Effect of dual inoculation of Douglas fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in two bare-root forest nurseries. Plant and Soil 138: 169-176.
- Ella, S.W., M.A. Anderson y W.J. Brill. 1982. Screening and selection of maize to enhance associative bacterial nitrogen fixation. Plant Physiology 70: 1564-1567.
- El-Bahrawy, S.A. 1983. Associative effect of mixed cultures of *Azotobacter* and different rhizosphere fungi with *Rhizobium japonicum* on nodulation and symbiotic nitrogen fixation of soybean. Zentralblatt für Mikrobiologie 138: 443-449.
- El-Gamal, M.S. 1992. Interactions between *Azotobacter* spp. and *Rhizobium sesbani* into the rhizosphere of *Sesbania sesbani* (L.) Merrill plants and its efficiency on growth and symbiotic nitrogen fixation. Zentralblatt für Mikrobiologie 147: 112-118.
- Fayez, M., 1990. Untraditional N₂-fixing bacteria as biofertilizers for wheat and barley. Folia Microbiologica 35: 218-226.
- Gaind, S., A.C. Gaur. 1991. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. Plant and Soil 133: 141-149.
- Gadkari, D. 1987. Influence of the herbicides stom and arelon on N₂-fixation and nitrification. Zentralblatt für Mikrobiologie 142: 283-291.
- Gantar, M., N.W. Kerby, P. Rowell y Z. Obrecht 1991. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria: I. A survey of soil cyanobacterial isolates forming associations with roots. New Phytologist 118: 477-483.
- Gaskins, M.H., S.L. Albrecht y D.H. Hubbell. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. Agriculture, Ecosystems and Environment 12: 99-116.
- Gillis, M., K. Kerters, B. Host, D. Janssens, R.M. Kroppenstedt, M.P. Stephan, K.R.S. Teixeira, J. Döbereiner y J. Deley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. International Journal of Systematic Bacteriology 39: 361-364.
- Glick, B.R., C.B. Jacobson, M.M.K. Schwarze y J.J. Pasternak. 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Canadian Journal of Microbiology 40: 911-915.
- Grayston, S.J. y J.J. Germida. 1991. Sulfur-oxidizing bacteria as plant growth promoting rhizobacteria for canola. Canadian Journal of Microbiology 37: 521-529.
- Haahtela, K., I. Helander, E.L. Nurmiho-Lassila, V. Sundman. 1983. Morphological and physiological characteristics and lipopolysaccharide composition of N₂-fixing (C₂H₂ reducing) root-associated *Pseudomonas* sp. Canadian Journal of Microbiology 29: 874-880.
- Haahtela, K., S. Kilpi y K. Kari. 1988. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. FEMS Microbiology Ecology 53: 123-127.
- Haahtela, K., T. Laakso y T.K. Korhonen. 1986. Associative nitrogen fixation by *Klebsiella* spp.: Adhesion sites and inoculation effects on grass roots. Applied and Environmental Microbiology 52: 1074-1079.
- Haahtela, K., R. Ronkko, T. Laakso, P.H. Williams y T.K. Korhonen. 1990. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: Characterization of an iron-scavenging system and a substance stimulating root hair production. Molecular Plant-Microbe Interactions 3: 358-365.
- Haahtela, K., E. Tarkka y T.K. Korhonen. 1985. Type 1 fimbria-mediated adhesion of enteric bacteria to grass roots. Applied and Environmental Microbiology 49: 1182-1185.
- Halverson, L.J. y Y.J. Handelsman. 1991. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth

- chamber. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2767-2770.
- Holguin, G., M.A. Guzmán y Y. Bashan. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and *in vitro* interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 101: 207-216.
- Holl, F.B. y C.P. Chanway. 1992. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 303-308.
- Hurek, T., B. Reinhold y E.-G. Niemann. 1987. Effect of oxygen on NH_4^+ -grown continuous cultures of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 919-922.
- Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. Van Montagu y E. Kellenberger. 1991. Infection of intact roots of Kallar grass and rice seedlings by *Azoarcus*. In: Nitrogen fixation. Developments in plant and soil sciences. Vol. 48. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini (Eds). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 235-242.
- James, E.K., V.M. Reis, F.L. Olivares, J.I. Baldani, y J. Döbereiner. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* 45: 757-766.
- Juhnke, M.E., D.E. Mathre y D.C. Sands. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2793-2799.
- Kanvinde, U. y G.R.R. Sastry. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* is a diazotrophic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2087-2092.
- Kole, M.M., W.J. Page y I. Altosaar. 1988. Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 815-817.
- Kucey, R.M.N. 1988. Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus C-11-25* on two wheat cultivars. *Journal of Applied Bacteriology* 64: 187-196.
- Ladha, J.K., W.L. Barraquio y I. Watanabe. 1983. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 1301-1308.
- Lalande, R., N. Bissonnette, D. Coutlée y H. Antoun. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil* 115: 7-11.
- Lambert, B., H. Joos, S. Dierickx, R. Vantomme, J. Swings, K. Kersters y M. Van Montagu. 1990a. Identification and plant interaction of a *Phyllobacterium* sp., a predominant rhizobacterium of young sugar beet plants. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1093-1102.
- Lambert, B., P. Meire, H. Joos, P. Lens y J. Swings. 1990b. Fast-growing, aerobic, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3375-3381.
- Li, C.Y., H.B. Massicote y L.V.H. Moore. 1992. Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil* 140:35-40.
- Li, D.M. y M. Alexander. 1990. Factors affecting co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to enhance rhizobial colonization and nodulation. *Plant and Soil* 129: 195-201.
- Li, R.P. y I.C. Macrae. 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 999-1002.
- Lifshitz, R., J.W. Kloepper, F.M. Scher, E.M. Tipping, M. Laliberté. 1986. Nitrogen-fixing pseudomonads isolated from roots of plants grown in the Canadian high arctic. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 251-255.
- Lindberg, T. y U. Granhall. 1984. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 683-689.
- Lindberg, T., U. Granhall y K. Tomenius. 1985. Infectivity and acetylene reduction of diazotrophic rhizosphere bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under gnotobiotic conditions. *Biology and Fertility of Soils* 1: 123-129.
- Mahmoud, S.A.Z., E.M. Ramadan, F.M. Thabet y T. Khater. 1984. Production of plant growth promoting substances by rhizosphere microorganisms. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 139: 227-232.
- Mavingui, P., G. Laguerre, O. Berge y T. Heulin. 1992. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1894-1903.
- Mohammad, G. 1984. Effect of herbicides on the population of total bacteria, *Azotobacter*, *Rhizobium* and root nodules associated with rhizosphere of soybean crop variety Bragg. *Comparative Physiology Ecology* 9: 260-262.
- Negi, M., K.V. Sadasivam, y K.V.B.R. Tilak. 1987. Establishment of *Azotobacter* and *Azospirillum* in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) in organic-amended soils. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 142: 149-154.
- Nelson, A.D., L.E. Barber, J. Tjepkema, S.A. Russell, R. Powelson, H.J. Evans y R.J. Seidler. 1976. Nitrogen fixation associated with grasses in Oregon. *Canadian Journal of Microbiology* 22: 523-530.
- Nieto, K.F. y W.T. Frankenberger, Jr. 1991. Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the vegetative growth of *Zea mays*. *Plant and Soil* 135: 213-221.
- O'Neill, G.A., C.P. Chanway, P.E. Axelrood, R.A. Radley y F.B. Holl. 1992a. An assessment of spruce growth response specificity after inoculation with coexistent rhizosphere bacteria. *Canadian Journal of Botany* 70: 2347-2353.
- O'Neill, G.A., R.A. Radley y C.P. Chanway. 1992b. Variable effects of emergence-promoting rhizobacteria on conifer seedling growth under nursery conditions. *Biology and Fertility of Soils* 13: 45-49.
- Pandey, A., S.T. Shende y R.G. Apte. 1989a. Effect of *Azotobacter chroococcum* seed inoculation on its establishment in rhizosphere, on growth and yield and yield attributing parameters of cotton (*Gossypium hirsutum*). *Zentralblatt für Mikrobiologie* 144:595-604.
- Pandey, A., S.T. Shende y M. Singh. 1989b. *Azotobacter chroococcum* seed inoculation for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect on seed quality. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 144: 605-610.
- Parke, J.L. 1991. Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: The rhizosphere and plant growth. D.L. Keister y P.B. Cregan (Eds). Kluwer Academic Pub. The Netherlands, pp. 33-42.

- Paula, M.A., V.M. Reis y J. Döbereiner. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biology and Fertility of Soils* 11: 111-115.
- Paula, M.A., S. Urquiaga, J.O. Siqueira y J. Döbereiner. 1992. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biology and Fertility of Soils* 14: 61-66.
- Pimentel, J.P., F. Akiba, R.M. Pitard y J. Döbereiner. 1991. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil* 137: 61-65.
- Poi, S.C., G. Ghosh y M.C. Kabi. 1989. Response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to combined inoculation with *Rhizobium*, phosphobacteria and mycorrhizal organisms. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 144: 249-253.
- Poi, S.C., T. Kabi y M.C. Kabi. 1988. Response of mustard *Brassica niger* to inoculation with *Azotobacter chroococcum* mutant Str⁶ at different regimes of nitrogenous fertilizer. *Environmental Ecology* 6: 653-655.
- Prabha, S., S.K. Nair, K.R. Dadarwal y P. Tauro. 1978. *Pseudomonas azotogenesis*-an associated symbiont of Bajra (*Pennisetum americanum*). *Plant and Soil* 49: 57-65.
- Puente, M.E. y Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15: 9-60.
- Quesada, E., A. Ventosa, F. Rodríguez-Valera y A. Ramos-Cormenzana. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *Journal of Applied Bacteriology* 53: 155-161.
- Quispel, A. 1991. A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. *Plant and Soil* 137: 1-11.
- Rajakumar, K. y M. Lakshmanan. 1990. Strain specificity of *Azotobacter chroococcum* to crop plants. *Indian Journal of Microbiology* 30: 221-224.
- Reding, H.K., P.G. Hartel, J. Wiegel. 1991. Effect of *Xanthobacter*, isolated and characterized from rice roots, on growth of wetland rice. *Plant and Soil* 138: 221-229.
- Reinhold, B., T. Hurek y I. Fendrik. 1987. Close-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of Kallar grass. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 889-891.
- Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. VanCanneyt, K. Kersters, y J. Deley. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth.), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp.nov. and *Azoarcus communis* sp.nov. *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 43: 574-584.
- Reinhold, B., T. Hurek, E.-G. Niemann y I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 520-526.
- Roslycky, E.B., 1990. Effect of sethoxydim on some properties of *Azotobacter* and *Azospirillum* spp. *Oyton* 51: 111-123.
- Ruppel, S., 1991. *Serratia rubidea* - an associative plant growth promoting nitrogen fixing microorganism. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 146: 297-303.
- Selvadurai, E.L., A.E. Brown y J.T.G. Hamilton. 1991. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 401-403.
- Shabaev, V.P., V.Y. Smolin y V.I. Strekozova. 1991. The effect of *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Azotobacter chroococcum* on nitrogen balance in soil under cropping with oats (*Avena sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils* 10: 290-292.
- Shawky, B.T. 1983. Studies on the occurrence of *Azotobacter* and *Azomonas* species in the soils and rhizosphere of plants in Egypt. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 138: 195-204.
- Sindhu S.S. y K. Lakshminarayana. 1986. Distribution of *Azotobacter* in the Haryana soils and effect of bacteriostasis on *Azotobacter* survival. *Environmental Ecology* 4: 536-540.
- Subba Rao, N.S. 1983. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 863-866.
- Thomas-Bauzon, D., P. Weinhard, P. Villecourt y J. Balandreau. 1982. The spermosphere model. I. Its use in growing, counting and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal of Microbiology* 18: 922-928.
- Toledo, G. y Y. Bashan. 1994. Nitrogen fixation in black mangroves (*Avicennia germinans*) by associative cyanobacteria. In: *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*. M.H. Ryder, P.M. Stephens y G.D. Bowen (Eds). pp. 59-60. CSIRO Division of Soils, Adelaide.
- Watanabe I., R. So, J.K. Ladha, Y. Katayama-Fujimura y H. Kuraishi. 1987. A new nitrogen-fixing species of pseudomonad: *Pseudomonas diazotrophicus* sp. nov. isolated from the roots of wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 670-678.
- Will, M.E. y D.M. Sylvia. 1990. Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer, and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2073-2079.
- Wright, S.F. y R.W. Weaver. 1981. Enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 97-101.
- Yahalom, E., Y. Kapulnik y Y. Okon. 1984. Response of *Setaria italica* to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to *Azotobacter chroococcum*. *Plant and Soil* 82: 77-85.
- You, C. y F. Zhou. 1989. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 403-408.
- You, I.D., T. Fujii, Y. Sano, K. Komagata, T. Yoneyama, S. Iyama y Y. Hirota. 1986. Dinitrogen fixation of rice-*Klebsiella* associations. *Crop Science* 26: 297-301.
- You, C.B., W. Song, H.X. Wang, J.P. Li, M. Lin y W.L. Hai. 1991. Association of *Alcaligenes faecalis* with wetland rice. *Plant and Soil* 137: 81-85.

INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS BENEFICOS: III. PROCEDIMIENTOS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE HONGOS MICORRIZICOS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS

Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms III. Techniques for isolation and characterization of mycorrhizae fungi and plant growth-promoting bacteria

Gina Holguin¹, Yoav Bashan¹, Ronald Ferrera-Cerrato²

RESUMEN

Se describen a) técnicas de aislamiento para hongos endomicorrizicos, ectomicorrizicos y para bacterias promotoras de crecimiento en plantas BPCP, b) medios de cultivo para los diferentes grupos bacterianos, y c) técnicas tradicionales y modernas de caracterización e identificación de BPCP.

Palabras clave: Análisis del perfil proteico, bacterias diazotróficas, bacterias halofílicas, espermosfera, fragmentos de restricción, homología, hongos ectomicorrizicos, hongos endomicorrizicos, rizosfera, sideróforos.

SUMMARY

This review describes the details of: (i) techniques for isolation of endo- and ectomycorrhizae fungi and for Plant Growth-Promotion Bacteria. (ii) Culture media for the different types of bacteria. (iii) Traditional and modern techniques for identification and characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

Index words: Diazotrophic bacteria, ectomycorrhizic fungi, fingerprinting, halophylic bacteria, homology, restriction fragments, rhizosphere, siderophores, spermosphere.

¹Departamento de Microbiología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB), Apartado Postal 128, 23000 La Paz, BCS, México.

²Sección de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillo, Edo. de México, México.

Correspondencia. Fax: +52 (682) 54710 ó 53625

Aceptado: Enero de 1996.

INTRODUCCION

La biotecnología ha abierto nuevas posibilidades para la introducción de microorganismos benéficos en suelos con el fin de promover el crecimiento de plantas y llevar a cabo un control biológico de patógenos presentes en suelos (Bashan y Levanony, 1990; Kloepper *et al.*, 1989). Dada la actual posición legislativa del mundo occidental, es poco probable que en un futuro cercano se lleve a cabo la liberación al ambiente de microorganismos producidos por la ingeniería genética. Por lo tanto, el aislamiento y selección de microorganismos (con actividad promotora de crecimiento en plantas, con alta capacidad de sobrevivencia en suelo y de colonización radical, versatilidad metabólica, etc.) presentes de manera natural, continúa interesando a institutos biotecnológicos y a la industria de inoculantes. Además de simbioses del grupo de los rizobios, se ha encontrado que algunos grupos de bacterias asociadas a raíces, llamadas "Bacterias Promotoras de Crecimiento en Plantas, BPCP" (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), también promueven el crecimiento de ciertas plantas. Las BPCP comprenden a los siguientes géneros: (i) *Pseudomonas* y *Bacillus* los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos o deletéreos (control biológico) (Kloepper *et al.*, 1988; Kloepper *et al.*, 1989) y, (ii) bacterias que promueven directamente el crecimiento de plantas, tales como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Bashan y Levanony, 1990; Cavalcante y Döbereiner, 1988; Kole *et al.*, 1988) así como muchos otros aislamientos obtenidos de la rizosfera, los cuales todavía no han sido identificados. La capacidad de los hongos micorrizicos para promover el crecimiento de plantas está bien documentada (Ferrera-Cerrato, 1993).

En general, no hay algún sitio específico para localizar BPCP, ya que todas las raíces vegetales se

asocian con numerosas especies de microorganismos, ya sea patógenos o benéficos. Además, los requerimientos nutricionales y ambientales de estos microorganismos son tan diversos, que no existe un método generalizado que permita aislar cualquier especie de BPCP o de hongos micorrízicos. Por lo tanto, se han desarrollado una variedad de métodos, sobre todo en los últimos veinte años. Para este trabajo se han seleccionado una serie de estrategias útiles y prácticas: (i) El mejor lugar para buscar un agente de control biológico es en el mismo nicho ecológico donde se localiza el patógeno que se quiere combatir (Kloepper *et al.*, 1988; Tipping *et al.*, 1989); (ii) Se pueden aislar BPCP a partir de antecesores silvestres de la planta de interés y utilizar estos aislamientos para inocular plantas cultivadas (M. Feldman, sin publicar); (iii) Cuando se introduce al suelo alguna planta de interés, se puede enriquecer artificialmente la población de BPCP en la rizosfera y así facilitar su recuperación (Y. Bashan, sin publicar); (iv) BPCP con potencial para el control biológico son seleccionadas con base en su producción de sideróforos o antibióticos observada *in vitro* (Kloepper *et al.*, 1988); (v) De las miles de bacterias aisladas al azar de la rizosfera de diversos habitats, muchas son seleccionadas por su capacidad para incrementar el crecimiento de plantas sin tomar en cuenta su posición taxonómica. Este tipo de enfoque es común en programas industriales llamados R&D, investigación y desarrollo, (Research and Development) (Kloepper *et al.*, 1989).

Habitats de hongos micorrízicos

La asociación mutualista que se lleva a cabo entre las raíces de las plantas superiores y los hongos, lo que se conoce como micorriza, posibilita mediante mecanismos bioquímicos, una mayor absorción de nutrimentos, principalmente fósforo, y además magnesio, calcio, potasio, azufre, hierro, cobre, boro y manganeso. La asociación también permite tolerancia al estrés hídrico. Las micorrizas se dividen en ectomicorriza (micorriza en vaina, la que se caracteriza por tener un manto compacto de hifas que cubre las raíces cortas con una red micelial, que crece entre las células corticales llamada Red de Hartig) y endomicorrizas cuyo tipo más común es la vesículo-arbuscular (V-A) la cual forma sus estructuras dentro de las células corticales de la raíz (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

La endomicorriza V-A está ampliamente distribuida en todo el reino vegetal (98%) por lo que es muy difícil encontrar plantas que no estén colonizadas con este tipo de hongos. Propágulos endomicorrízicos pueden colectarse en cualquier época del año en raíces de plantas hospederas anuales, perennes o herbáceas, o leñosas y en todo tipo de suelo (Ferrera *et al.*, 1993).

La asociación micorrízica tiene una amplia distribución por lo que puede hallarse frecuentemente en diversas áreas ecológicas tales como campos cultivados, campos vírgenes, bosques, pantanos, etc. (González-Chávez, 1993).

AISLAMIENTO DE BPCP

Fundamento: Las bacterias que colonizan el interior de las raíces son distintas a las que colonizan la superficie de las raíces (Van Peer *et al.*, 1990). Por esta razón, para el aislamiento de cada grupo se siguen estrategias diferentes.

Aislamiento de bacterias que colonizan la superficie radicular

i) Después de lavar perfectamente las raíces con agua corriente y después con agua destilada estéril varias veces, se embeben las raíces por un periodo de 10 minutos en una solución amortiguadora de fosfatos y sal (PBS, phosphate-buffered saline) K_2HPO_4 - KH_2PO_4 10mM, NaCl 0.14 M, pH 7.2. Después se cortan las raíces en pedazos pequeños (3 cm), se colocan en el medio o medios de enriquecimiento seleccionados (descritos posteriormente) y se incuban a 25-30°C por una o dos semanas hasta que el crecimiento sea evidente (Kremer *et al.*, 1990).

ii) Las bacterias colonizadoras de la superficie radical pueden también ser aisladas agitando los pequeños pedazos de raíz durante 10 minutos, en un agitador girador mecánico o vortex. Las raíces deben estar suspendidas en PBS o en una solución amortiguadora de fosfatos y peptona la cual contiene, por litro: peptona, 1.0 g; K_2HPO_4 , 1.21 g; KH_2PO_4 , 0.34 g (Lalande *et al.*, 1989). Otros diluyentes que se pueden utilizar como alternativa son: PBS mas Tween 20 al 0.025%, Tween 40 al 0.01%, (Kremer *et al.*, 1990) o caldo de soya tripticasa al 0.1% (TSB, tryptic soy broth) (Hagedorn *et al.*, 1989; Lalande *et al.*, 1989). Las muestras diluidas se colocan en el medio apropiado y se incuban a la temperatura seleccionada.

Aislamiento de bacterias que colonizan la parte interna de la raíz

Se esteriliza la superficie radicular embebiendo las raíces en etanol 95% (v/v) durante 1 min y posteriormente en HgCl_2 al 0.1% (p/v) acidificado y después se lavan con agua destilada estéril mínimo diez veces (De Freitas y Germida, 1990). Otros procedimientos de desinfección que se ofrecen como alternativa son: i) Se embeben las raíces en alcohol etílico al 70% durante 5 min, después en hipoclorito de sodio al 6.25% durante 10 min y por último se enjuagan varias veces con agua destilada estéril (Lalande *et al.*, 1989) o ii) se embeben las raíces en H_2O_2 (10%; 15 s) y se enjuagan tres veces con solución acuosa de MgSO_4 (0.1 M) (Van Peer *et al.*, 1990).

Posteriormente se suspende el material vegetal en PBS 0.05 M o solución acuosa de MgSO_4 0.1 M y se muele en un mortero o se homogeneiza con un homogenizador a velocidad alta durante 1-3 min, (100 ml de PBS por cada 5 g de peso fresco de raíces). El homogeneizado se puede filtrar con una tela de algodón estéril (Lindberg y Granhall, 1984). Se preparan alícuotas diluidas o no diluidas para ser colocados en el medio de enriquecimiento previamente seleccionado.

Un método de aislamiento alternativo, es tomar las raíces ya estériles y colocarlas sobre agar nutritivo suplementado con glicerol al 1% para verificar si la superficie radicular está estéril. Se cortan las raíces longitudinalmente y se colocan en el medio de enriquecimiento seleccionado, preferentemente suplementado con glucosa (las bacterias productoras de ácidos que metabolizan la glucosa parecen dominar en la parte interna de la raíz) y se incuban hasta que el crecimiento sea evidente (Lalande *et al.*, 1989). Después del periodo de incubación, 0.1 ml del medio rico en bacterias se dispersa en el medio sólido que ha sido seleccionado y se incuban de nuevo a la misma temperatura. Los cultivos aislados se deben de estriar varias veces en el mismo medio sólido hasta obtener crecimientos bacterianos puros.

Aislamiento de BPCP diazotróficas

Modelo espermosfera (Thomas-Bauzon *et al.*, 1982).

Fundamento: El modelo espermosfera consiste en germinar una semilla en la obscuridad la cual libera exudados en un medio sin fuentes de carbono y de nitrógeno. La plántula es después inoculada con diluciones

de suelo e incubada bajo una atmósfera con acetileno. Este sistema es interesante por lo siguiente: i) La plántula provee a las bacterias de fuentes de carbono útiles impidiendo así la presencia de fuentes de alimento indeterminadas y ii) la plántula en crecimiento consume la fuente de nitrógeno disponible a través de la actividad diazotrófica bacteriana, manteniendo un medio altamente selectivo y libre de fuentes de nitrógeno.

Procedimiento:

1. Se muelen 10 g de suelo de la rizosfera (raíces y el suelo que se les adhiere) en un mortero y se afora a 100ml con PBS procurando mantener un margen no mayor de dos horas después del muestreo. Se deben preparar diluciones decimales adicionales del homogeneizado en PBS.
2. Las semillas desinfectadas se colocan en tubos de 35 ml conteniendo 5 ml de medio semi-sólido al 0.3% agar, sin fuentes de nitrógeno y de carbono (el medio se describe en la sección sobre medios de cultivo). Los tubos espermosfera se guardan en la obscuridad a 28°C (o a otra temperatura que se considere conveniente) durante una semana. Los tubos con un brazo adyacente conteniendo 2 ml de NaOH 1 N, se pueden utilizar como trampa de CO_2 cuando sea necesario.
3. Cuando los coleóptilos miden 1 cm o más de altura, los tubos se inoculan con las diluciones obtenidas en el paso #1, utilizando alícuotas de 0.5 ml. Una inoculación más temprana resulta en muerte prematura de las plántulas. Una inoculación oportuna permite percatarse de contaminación ocasionada por una desinfección inadecuada de las semillas.
4. El número de bacterias diazotróficas se determina por el Método del Número Más Probable (MPN) (Postgate, 1969). La estimación se basa en el número de tubos nitrogenasa-positivos (diez réplicas para cada dilución) detectados por el ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968).
5. El contenido de los diez tubos que resultaron ser etileno-positivos en las diluciones más altas, se combina, se homogeneiza, se diluye en series decimales (10^{-5} - 10^{-9}) y se siembra en medio sin fuente de nitrógeno (Omar *et al.*, 1988; Rennie, 1981) en botellas de suero planas (120 ml o más). Se incuban en acetileno al 1% durante 4-8 días (el proceso de combinar todos los tubos y la homogeneización, evitan los problemas que puede ocasionar el transferir un pedazo pequeño de raíz a un tubo de dilución alta). Las colonias que se desarrollen en el medio sólido deben de ser escogidas individualmente, purificadas de manera convencional en medio sin fuente de nitrógeno y

su capacidad para fijar nitrógeno debe ser examinada como arriba se describe. En algunos casos es necesario hidrolizar parcialmente el material capsular utilizando NaOH 0.5 ó 0.1N para la eliminación de contaminantes.

Limitaciones de la técnica: Esta técnica no da un panorama completo de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera y sólo nos proporciona un bosquejo de la concentración y naturaleza de las bacterias diazotróficas más abundantes.

Medios de enriquecimiento semi-sólidos para el aislamiento de bacterias diazotróficas microaerofilicas (Döbereiner, 1988; Döbereiner y Day, 1976).

Fundamento: Los medios semi-sólidos sin fuente de nitrógeno son la clave para el aislamiento de algunas bacterias diazotróficas microaerofilicas asociadas a raíces. Las técnicas que utilizan estos medios son muy sencillas y útiles cuando hay abundancia de bacterias diazotróficas asociadas a raíces. Se pueden obtener cultivos puros con sólo algunos pasos de purificación y sin muchas dificultades. Esta técnica se utilizó en el descubrimiento de cuatro cepas de *Azospirillum*, *Campilobacter nitrofigilis*, *Herbaspirillum seropedicae*, algunas *Pseudomonas* diazotróficas, *Acetobacter diazotrophicus* y *Bacillus azotofixans*.

Procedimiento:

1. Se colocan pedazos de raíz intactos (0.5-1.0cm) en los medios semi-sólidos (agar al 0.05% o menos) NFb, OAB o BL (descritos posteriormente) y se incuban sin agitación durante 2-5 días a 25-35°C. (A temperaturas más bajas se debe prolongar el tiempo de incubación.) Al término del periodo de incubación se podrá observar una película blanca bacteriana formada 2-10 mm abajo de la superficie. Se debe evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno del cultivo de enriquecimiento por medio del ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968). Hay que tener especial cuidado en mantener intacta la película, ya que de lo contrario se interfiere con la actividad de la nitrogenasa. Se logra obtener cultivos casi puros después de 1-3 subcultivos en el mismo medio, seguidos de la siembra por estría de cultivos de 24 horas sobre el mismo medio sólido (Döbereiner y Day, 1976).
2. (Para el aislamiento de la bacteria diazotrófica *Acetobacter* asociada a la caña de azúcar): Las raíces y tallos de la caña de azúcar se lavan en agua corriente, se maceran en una licuadora y se preparan diluciones seriadas en una solución de sacarosa al 5% y se incuban en medio semi-sólido (descrito después). Continúe como se indica en el procedimiento 1 (Cavalcante y Döbereiner, 1988).

MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE BPCP

Medios no selectivos para el aislamiento de bacterias de la rizosfera

Fundamento: El medio común TSA descrito posteriormente recupera una amplia variedad de bacterias aerobias y anaerobias facultativas Gram-positivas y Gram-negativas (Hagedorn *et al.*, 1989). Sin embargo, se recomienda llevar a cabo el proceso de aislamiento utilizando simultáneamente diferentes medios de cultivo, ya que un solo medio no-selectivo permitirá recuperar sólo una pequeña porción de la población de BPCP presentes.

1. Medio TSA (agar soya tripticasa) diluido diez veces (1/10) para bacterias heterótrofas. Contiene caldo de soya tripticasa, 3 g; y agar, 15 g (Hagedorn *et al.*, 1989). Se puede aislar una población más diversa de bacterias de suelo o de otros sitios utilizando el mismo medio pero diluido 100 veces (1/100; 0.3g TSA) (Tipping *et al.*, 1989).

2. El medio TSA contiene (g/l): extracto de carne 3.0; extracto de levadura 3.0; peptona de caseína 15.0; peptona de carne 5.0; lactosa 10.0; sacarosa 10.0; glucosa 1.0; citrato $\text{NH}_3^+\text{Fe}^{3+}$ 0.5; NaCl 5.0; tiosulfato de sodio 0.5; rojo fenol 0.024; agar 12.0; agua destilada 1000 ml; pH=7.4 (Stolp y Gadkari, 1986). La eliminación de bacterias Gram-positivas en TSA al 1/10 se logra agregando 2 µg/l de cristal violeta (Tipping *et al.*, 1989) ó 1.2 g/l de lauril sarcosinato de sodio (SLS) al medio S1 (descrito en la sección sobre aislamiento de pseudomonas fluorescentes).

Los medios de cultivo siguientes pueden utilizarse simultáneamente para lograr una recuperación de las poblaciones más comunes de BPCP.

1. El medio selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas* (Stolp y Gadkari, 1986) se basa en el medio TSA suplementado con (µg/ml): fucsina básica, 9; nitrofurantoina, 10; ácido nalidixico, 23; y con (mg/ml): ciclohexamida, 0.9; TTC (cloruro de trifeniltetrazolium), 1.4. El medio base TSA es suplementado con fucsina básica y TTC antes de esterilizarse. El ácido nalidixico y la nitrofurantoina se esterilizan por filtración, utilizando filtros de membrana de 0.45 µm y se agregan asépticamente al medio TSA estéril. La ciclohexamida se puede esterilizar por filtración o agregarse directamente como polvo no estéril.
2. Las bacterias corineformes y otras bacterias Gram-positivas se aíslan en el medio D-2 (Kado y Heskett,

1970) el cual se suplementa con dicromato de potasio (50 mg/l) y ciclohexamida (100 mg/l) para promover la selectividad del medio ó sobre agar rojo de metilo para bacterias Gram-positivas.

3. El medio King B para *Pseudomonas* contiene: (g/l): proteosa peptona no. 3 (Difco), 20; glicerol, 10 ml; asparagina, 2.25; K_2HPO_4 , 1.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5; agar, 15 (King *et al.*, 1954). La temperatura de incubación es 30°C.

Todos los medios arriba mencionados pueden ser suplementados con benomyl, 20 mg/ml (Benlate, 50% PA Dupont, USA) o Nistatina y actidiona (50 mg de cada uno por litro) para reducir el crecimiento de hongos.

Medios para el aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes

Fundamento: Las *Pseudomonas* fluorescentes (*P. putida* y *P. fluorescens*) son un grupo de bacterias muy amplio que se encuentran en la rizosfera de varias plantas de cultivo. Pueden ser aisladas fácilmente en los siguientes medios de cultivo:

1. Medio B de King modificado, suplementado con los antibióticos (mg/l): cloramfenicol, 5; ciclohexamida, 75; novobiocina, 45; y penicilina G, 75000 unidades (Klopper *et al.*, 1988)

Comentarios: i) La resistencia a los antibióticos recomendados no es únicamente en *Pseudomonas*. ii) El medio B de King original es aceptado como un medio de diagnóstico para la detección de fluorescencia, sin embargo, no es muy apropiado para el aislamiento de estas bacterias ya que no es selectivo.

2. El medio D4 (Kado y Heskett, 1970) contiene (g/l): glicerol, 10.0 ml; sacarosa, 10.0; hidrolizado de caseína, 1 g; NH_4Cl , 5.0 g; dodecil sulfato sódico (SDS), 0.6 g (para eliminar no-pseudomonas); Na_2HPO_4 (anhidro); agar, 15g. Este medio es el más ampliamente utilizado, sin embargo, muchas otras bacterias Gram-negativas pueden crecer en él y no se puede observar fluorescencia.

3. El medio S1 (Gould *et al.*, 1985) contiene (g/l): agar, 18; sacarosa, 10; glicerol, 10 ml; casamino ácidos (Difco), 5.0; $NaHCO_3$, 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0; K_2HPO_4 , 2.3; lauril sarcosinato de sodio (SLS), 1.2; y 20 mg de trimetropima, (5-[(3,4,5-trimetoxifenil) metil]-2,4-pirimidina-diamina)(Sigma). El pH final del medio es entre 7.4 y 7.6.

Comentarios: i) Se agrega la trimetropima después de esterilizar por autoclave y dejar enfriar el medio. ii) Este medio tiene varias ventajas sobre otros medios utilizados

para el aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes ya que provee consistentemente de una alta selectividad y buen porcentaje de recuperación al procesar muestras obtenidas de diferentes habitats. Se puede observar fluorescencia al inicio del aislamiento.

Medio para el modelo espermosfera (Omar *et al.*, 1988).

Solución A (mg/l): H_3BO_3 , 750; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 550; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 350; $CuSO_4 \cdot 4H_2O$, 22; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10; agua destilada 1000 ml.

Solución B (g/l): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.8; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.0; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.118; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4.0; EDTA, 0.8; solución A, 4 ml; agua destilada 996 ml.

Solución final (g/l): KH_2PO_4 , 1.8; K_2HPO_4 , 2.7; solución B, 50 ml; Agar nobel, 5; agua destilada, 950 ml; pH ajustado a 6.8 con KOH; esterilizar en el autoclave.

El medio sin fuente de nitrógeno utilizado para el modelo espermosfera contiene: (g/l): extracto de levadura como iniciador de crecimiento, 0.1; almidón, 5; glucosa, 5; manitol, 5; ácido málico, 3.5; más el medio basal descrito anteriormente (Berge *et al.*, 1991) o el medio descrito a continuación, el cual contiene varias fuentes de carbono.

Medio para el aislamiento de bacterias diazotróficas (Rennie, 1981)

Fundamento: Este medio combinado fue diseñado para incorporar los componentes químicos comunes de los medios sin fuente de nitrógeno más utilizados, ya que la composición básica de estos medios es muy similar. Se incluyó manitol para favorecer el crecimiento de *Azotobacter* sp., biotina y ácido p-aminobenzoico para *Bacillus* sp. Se agregó el extracto de levadura para proveer a las bacterias de una fuente de nitrógeno con factores de crecimiento orgánicos misceláneos iniciadores del crecimiento sin llegar a inhibir la reducción de acetileno.

Solución A: K_2HPO_4 , 0.8 g; KH_2PO_4 , 0.2 g; NaCl, 0.1 g; $Na_2FeEDTA$, 28 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 25 mg; extracto de levadura, 100 mg; manitol, 5 g; sacarosa, 5 g; lactato de sodio, 0.5 ml (60%, v/v) agua destilada, 900 ml.

Solución B (g): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $CaCl_2$, 0.06; agua destilada 100 ml. Las soluciones se esterilizan por separado, se dejan enfriar y se mezclan. A esta nueva solución se agrega biotina (5µ/l) y ácido p-aminobenzoico (10µ/l) esterilizados por filtración y el pH final se ajusta a 7.0.

Medios para el aislamiento de *Azospirillum*

Fundamento: El medio más comúnmente utilizado para el aislamiento de *Azospirillum* es el medio NFb semi-sólido (Döbereiner y Day, 1976; Döbereiner *et al.*, 1976). Se han desarrollado varias modificaciones útiles y se mencionan a continuación.

1. Medio NFb

(g/l): DL-ácido málico, 5; KOH, 4; K_2HPO_4 , 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $CaCl_2$, 0.02; NaCl, 0.1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; (mg/l): $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 2; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10; solución de azul de bromotimol al 0.5% (disolver en etanol o en solución acuosa de KOH 0.2N); utilizar 2 ml por litro de medio de cultivo; agar, 0.0175-0.5%; 1000 ml agua destilada, pH 6.8 (Döbereiner y Day, 1976). Aún suplementado con extracto de levadura a bajas concentraciones (0.002-0.005%), este medio previene el crecimiento de contaminantes y permite la formación de colonias bajo condiciones aerobias (Döbereiner, 1988). En algunos casos donde el ácido málico-KOH inhibe el crecimiento de las bacterias, éste puede reemplazarse con 10 g/l de succinato de sodio o sacarosa al 0.5% (Tyler *et al.*, 1979). El azul de bromotimol se puede sustituir con púrpura de bromocresol al 0.001% (New y Kennedy, 1989).

2. Medio OAB (Okon *et al.*, 1977)

Fundamento: Este medio modificado es más apropiado para el crecimiento de *Azospirillum* que para su aislamiento. No es muy selectivo para este género, pero provee mayor capacidad amortiguadora que el medio original. Incluye en su composición química microelementos, una concentración limitada de NH_4 para iniciar el crecimiento en condiciones aerobias y una pequeña cantidad de extracto de levadura para acortar la fase de latencia (lag phase) del crecimiento y contribuir a un crecimiento vigoroso. Se puede utilizar en forma líquida, semi-sólida (0.05% agar) o sólida. Para el crecimiento óptimo de *Azospirillum* (esto no es estrictamente necesario) en medio líquido, se debe mantener el cultivo a una presión de oxígeno constante de 0.005-0.007 atm bajo una atmósfera de N_2 mezclada con aire.

Solución A: (g/l) DL-ácido málico, 5; NaOH, 3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $CaCl_2$, 0.02; NaCl, 0.1; NH_4Cl , 1; extracto de levadura, 0.1; $FeCl_3$, 0.01; (mg/l) $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 2; $MnSO_4$, 2.1; H_3BO_3 , 2.8; $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, 0.04; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.24; disolver en 900 ml agua destilada.

Solución B: (g/l) K_2HPO_4 , 6; KH_2PO_4 , 4; agua destilada, 100 ml.

Después de esterilizar y enfriar, se mezclan las dos soluciones. El pH del medio es 6.8.

Comentarios: El $FeCl_3$ puede ser reemplazado por 10 ml de Fe(III)-EDTA (0.66%, P/V, en agua). Este medio puede ser suplementado con 10 ml de una solución de vitaminas para mejorar su capacidad para aislar bacterias microaerofílicas heterótrofas fijadoras de nitrógeno. La solución de vitaminas contiene por litro: D- biotina (200 mg), pantotenato de calcio (40 mg), mioinositol (200 mg), niacinamida (40 mg), ácido p-aminobenzoico (20 mg), hidrocloreuro de piridoxina (40 mg), riboflavina (20 mg), dicloruro de tiamina (4 mg) y son esterilizados por filtración (Reinhold *et al.*, 1986).

3. Medio semi selectivo NFb-rojo congo (Rodríguez Cáceres, 1982)

Este medio es básicamente el medio NFb suplementado con 15 ml/l de solución acuosa de rojo congo (1:400) esterilizada por separado.

Comentarios: Este medio permite reconocer las colonias de *Azospirillum* facilitando el aislamiento, ya que las colonias se tiñen de rojo oscuro o escarlata, con características coloniales típicas; otras bacterias de suelo no absorben el rojo congo.

4. Medios BL y BLCR (Bashan y Levanony, 1985)

Estos dos medios semiselectivos se basan en el medio OAB. El medio BL es medio OAB suplementado con (mg/l) de sulfato de estreptomina, 200; ciclohexamida, 250; deoxicolato de sodio, 200, y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, 15. El medio BLCR es medio BL suplementado con una solución acuosa de rojo congo (1-4 g/l).

Comentarios: Estos medios son apropiados para el aislamiento de *Azospirillum* a partir de la rizosfera, ya que las colonias son fáciles de reconocer, especialmente en el medio BLCR. Sin embargo, algunas cepas de *A. brasilense* no pudieron crecer en este medio (Horemans *et al.*, 1987) y, en general, el crecimiento de *Azospirillum* en el medio BLCR, es significativamente más lento que en el medio OAB original (aproximadamente 10 días de incubación).

Medio para el aislamiento de bacterias diazotróficas halofílicas (Reinhold *et al.*, 1986; 1987)

(g/l) ácido DL-málico, 5; KOH, 4.8; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25; $CaCl_2$, 0.22; NaCl, 1.2; Na_2SO_4 , 2.4; $NaHCO_3$, 0.5; K_2SO_4 , 0.17; Na_2CO_3 , 0.09; Fe(III)-EDTA, 0.077; K_2HPO_4 , 0.13; extracto de levadura, 0.02; (mg/l) biotina,

0.1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2; H_3BO_3 , 0.2; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02; ZnCl_2 , 0.15; agar 2-8 g; 1000 ml de agua destilada. El pH del medio es 8.5. El ácido málico, KOH y el agar se disuelven en la mitad del volumen total y se esterilizan. La solución de sales se esteriliza por filtración después de disolver los ingredientes en la mitad del volumen total. Después de centrifugar el medio, se descarta el precipitado. La fórmula permite pequeñas alteraciones en las concentraciones de los reactivos (Reinhold *et al.*, 1987).

Medio para el aislamiento de bacterias halofílicas (Quesada *et al.*, 1982)

Fundamento: Las bacterias de la rizosfera de plantas xerófitas en suelos hipersalinos (5.0-10.7% NaCl) pueden ser aisladas alterando la concentración total de sales del medio a 9, 50, 100, 200 y 250 g/l.

El medio base contiene 200 g/l de sales totales y se compone de (g/l): NaCl 158.9; MgCl_2 13.8; MgSO_4 20.9; CaCl_2 1.5; KCl 4.2; NaHCO_3 0.2; NaBr 0.5.

Estas mezclas básicas de sales pueden ser suplementadas con alguno de los tres medios descritos a continuación (g/l): i) Peptona P (Oxoid), 10. ii) Extracto de levadura, 10; Proteosa Peptona (Difco), 5; glucosa, 1. iii) Extracto de levadura, 5; glucosa, 1; y extracto de suelo. El extracto de suelo se prepara esterilizando volúmenes iguales de suelo de jardín con su correspondiente mezcla de sales; después de decantar, se filtra a través de papel de filtro y se agrega al filtrado el resto de los nutrientes. Los valores de pH se ajustan a 7.5 con KOH.

Medio para el aislamiento de *Acetobacter* (Cavalcante y Döbereiner, 1988)

Fundamento: Este medio semi-sólido está basado principalmente en el medio NFb al cual se le hicieron algunas modificaciones para crecer *Acetobacter* la cual tolera condiciones ácidas en el medio.

Solución A: (g/l) caña de azúcar (o sacarosa o glucosa), 100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01; agar, 2.2 (mg/l) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2; solución al 0.5% (disuelta en 0.2 N KOH) de azul bromotimol, 5 ml; agua destilada, 900 ml.

Solución B: (g/l) K_2HPO_4 , 0.2; KH_2PO_4 , 0.6; agua destilada, 100 ml.

Comentarios: Se recomienda esterilizar las dos soluciones por separado y mezclarlas después de enfriarse. Después

se acidifica el medio con ácido acético a un pH de 4.5. Para la purificación de los aislamientos, se suplementa el medio con 0.02 g de extracto de levadura y 15 g de agar. El proceso de aislamiento puede ser más eficiente adicionando jugo de caña al 1%. Las colonias presentan un color anaranjado oscuro.

Medio para el aislamiento de bacterias diazotróficas marinas (HGB)

Fundamento: El medio HGB se basa en el medio OAB (Okon *et al.*, 1977) modificado para el aislamiento de bacterias marinas. Se considera útil para el aislamiento de vibrios diazotróficos (Holguin *et al.*, 1992).

Solución A: (g/890 ml de agua destilada) ácido DL-málico, 5; NaOH, 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; CaCl_2 , 0.02; NaCl, 20; extracto de levadura, 0.1.

Solución B: (solución concentrada o "stock", g/500 ml agua destilada) FeCl_3 , 0.5; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1; MnSO_4 , 0.105; H_3BO_3 , 0.14; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0014; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.012.

Solución C: 100 ml PBS 0.39 M, pH 7.6.

10 ml de la solución (B) se agregan a la solución (A) y se esterilizan. Después de enfriarse, se mezcla esta solución con la solución amortiguadora (C), la cual debe esterilizarse por separado.

Medios para el aislamiento de *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* se seleccionan sometiendo las diluciones bacterianas a tratamientos de calor (100°C) por periodos de 15 minutos antes de proceder con la siembra sobre medio TSA sólido diluido diez veces (Tipping *et al.*, 1989).

Medio para el aislamiento de *Azotobacter* (Kole *et al.*, 1988).

Fundamento: El medio no contiene fuente de nitrógeno y se basa en la utilización de extracto de suelo y de manitol como fuente de carbono.

Composición (g/l): KH_2PO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; NaCl, 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; extracto de suelo, 100 ml; agua destilada, 900 ml; agar, 15; y manitol, 20. El pH se ajusta a 7.6 con NaOH antes de esterilizar. El manitol y el FeSO_4 se esterilizan por separado y se agregan al resto del medio al enfriarse. El extracto de suelo se prepara de la siguiente manera (Page, 1986): El material que no es suelo se descarta mediante tamizado y el suelo se

pulveriza asépticamente. El suelo pulverizado (10g) se agita con 90 ml de agua destilada estéril durante 15 min. Un mililitro de esta suspensión se diluye en 9 ml de NaCl al 0.85% y un mililitro de ella se siembra en medio libre de nitrógeno. Las placas se incuban durante 4-5 días a 26°C.

AISLAMIENTO DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS

Fundamento: Las esporas producidas por los hongos endomicorrízicos V-A y localizadas en el suelo son de gran importancia ya que al no poder crecer éstos en cultivos axénicos, es necesario inocularlos a una planta hospedero. Para lograr este fin, se requiere la separación de esporas del suelo, tratando de obtener una muestra que contenga la máxima cantidad de ellas (98-100% de extracción). Previo a la inoculación es necesaria llevar a cabo la identificación del hongo, la cual también sólo es posible mediante sus esporas o esporocarpos. La colonización producida también puede identificarse por medio de la observación microscópica, por ejemplo, unas especies producen sólo colonización arbuscular, otras vesículas lobuladas y otros rasgos anatómicos de un hospedero específico. Sin embargo, la identificación de las distintas especies en cada género está basada en la caracterización morfológica de las esporas, en donde se considera tamaño, color, forma, estructura citoplasmática, estructura superficial, número de paredes, grosor de éstas, entre otros caracteres.

Para describir las especies de los hongos endomicorrízicos o probar su efectividad, se deben de propagar las esporas aisladas con el fin de obtener cultivos puros en cantidades masivas de una sola cepa. La inoculación de plantas hospederas es la única forma de asegurarse que se aislaron esporas de hongos que forman la endomicorriza vesículo-arbuscular.

Muestreo

Para determinar la población de esporas en el suelo se toman muestras de la rizosfera de la planta o de la capa de material orgánico. Se puede utilizar un tubo de metal de 3 cm de diámetro interno, el cual se introduce en forma vertical al suelo. La muestra está integrada por la zona correspondiente a 4-8 cm de profundidad, aunque en especies vegetales con raíces profundas pueden ser más de 20 cm. Dicha muestra se conserva en bolsas de plástico almacenada a 4-10°C hasta su procesamiento.

Extracción de esporas

El método de tamizado y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) permite la extracción de esporas en un buen porcentaje y es un método muy utilizado. La desventaja es que no ofrece una buena separación de esporas del material orgánico.

El método de centrifugación en sacarosa (Jenkins, 1964) tiene como objetivo la mejor separación de las esporas del suelo y del material orgánico, ya que facilita el aislamiento y la identificación. Su desventaja es que el decantado, agua y material orgánico puede contener muchas esporas que se pierden, y la solución de sacarosa puede dañar a las esporas si no se elimina rápidamente.

Identificación de esporas

La identificación de las esporas se basa en: extracción de esporas, examen de las esporas al microscopio estereoscópico, preparación de laminillas, observación microscópica y el uso de guías tentativas y finales.

Preparación de laminillas.- En cada preparación se colocan de 20 a 25 esporas intactas y otro tanto de esporas rotas sutilmente, para observar su tipo de pared. El medio de montaje que se recomienda es la mezcla de alcohol polivinilo-ácido láctico (PVL) compuesta por alcohol Polivinilo, 56 ml; ácido láctico, 22 ml; glicerol, 22 ml, ya que es el que menos afecta la morfología de las esporas. El medio de montaje utilizado puede provocar cambios trascendentales en las esporas y en su identificación final, lo que afecta notablemente la observación de la morfología de la pared.

Observación microscópica.- Se caracteriza la superficie de la espóra, la presencia de sáculo esporífero, la forma de la hifa sustentora, color y forma de la espóra. Los diferentes tipos de pared que existen en una espóra han sido esquematizados por Morton (1986).

Uso de guías tentativas y finales.- Schenck y Pérez (1990) publicaron información acerca de la identificación de especies de hongos formadores de endomicorriza V-A, conjuntando todas las especies identificadas y un resumen con características recién incluidas de cada una de ellas.

Técnicas de propagación

Para la propagación del inoculante se recomiendan plantas de crecimiento rápido (ciclo vegetativo corto), que desarrollen un sistema radical amplio con un peso fresco de más de 50 g, que el follaje tenga cobertura mínima para

que la densidad de plantas por unidad de área sea mayor, exigencia moderada en el riego y que sea altamente susceptible a la colonización micorrízica. En la Sección de Microbiología de Suelos del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, México, se utilizan plantas como cebolla (*Allium cepa*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), alfalfa (*Medicago sativa*) y maíz (*Zea mays*).

Todas las técnicas para la propagación de cepas micorrízicas se basan en la inoculación de esporas, raíces colonizadas o mezclas de ambas:

1.- Método de embudo (Gerdemann, 1955). Se hace un embudo de aluminio y se coloca algodón en la parte terminal de un embudo de vidrio. Se llena el embudo con arena de cuarzo y se colocan de 20 a 50 esporas iguales. Se siembran semillas desinfectadas superficialmente y se agrega agua destilada y esterilizada. Cuando germina la semilla en el embudo, se coloca en un matraz Erlenmeyer con agua destilada. 15 días después, el embudo se sumerge en una solución nutritiva (Long Ashton) por un periodo de 24 horas la cual contiene los siguientes ingredientes: NaNO_3 , 0.808g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.944g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.184g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.368g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0022g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00025g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00029g; H_3BO_3 , 0.00310g; NaCl , 0.00590g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.000088 g; citrato férrico al 1%, 2ml; agua destilada, 1000 ml. Después de 24 horas se vuelve a colocar el embudo en agua destilada. Al mes de crecimiento, se evalúa la colonización.

2.- Método de inoculación en invernadero. El suelo fumigado se coloca en una maceta desinfectada con formaldehído al 0.1% y posteriormente con alcohol. La maceta se llena hasta tres cuartas partes de su capacidad total. El inóculo endomicorrízico se coloca en una capa homogénea, en la parte superior de la maceta debajo de una capa pequeña de suelo fumigado. Las macetas se llenan hasta su capacidad total con suelo fumigado. Se procede a la siembra con semillas desinfectadas. Se mantiene bajo condiciones de invernadero de tres a cinco meses.

3.- Método utilizado en el CIAT-proyecto Micorriza (Sieverding, 1991). Este método se utiliza para propagar cepas aisladas. Se usan vasos con capacidad de 200 g que contienen suelo, cuyas condiciones químicas correspondan en forma aproximada con las del sitio original de donde proviene la cepa. Dicho suelo se esteriliza en autoclave. Se hace un hoyo de 2 a 3 cm de profundidad en el suelo y se colocan en él de 25 a 50 esporas. Se tapa el hueco y se siembra la semilla desinfectada de *Pueraria phaseoloides*.

Posteriormente se agrega el equivalente a 12.5 kg P, 40 kg N y 25 kg Mg ha^{-1} . La solución de fertilizante utilizada tiene además un inóculo de *Rhizobium*. Las plantas se dejan crecer seis semanas y después se transplantan a macetas de 3 kg de capacidad que contienen el mismo suelo al puesto en los primeros vasos.

Evaluación de la colonización micorrízica

La evaluación de la colonización puede ser una simple observación de la presencia de hongos endomicorrízicos que colonizan las raíces de las plantas. A menudo se requiere una cuantificación para correlacionar el efecto de los tratamientos con los niveles de colonización. En ocasiones se requiere la evaluación de la colonización micorrízica simplemente para observar un inóculo establecido en suelo esterilizado.

Metodología. Se considera aceptable tomar al azar como muestra representativa las raíces de cinco plantas en una superficie de 12m^2 . Las muestras radicales pueden procesarse inmediatamente o fijarse en FAA (90 ml de alcohol al 50%, 5 ml de ácido acético y 5 ml de formaldehído) para su examen posterior.

Tinción de raíces.- Involucra los pasos de a) clareo, b) blanqueo, c) acidificación, d) tinción, e) decoloración.

a) Las raíces libres de suelo se colocan en cápsulas esterilizables, en un vaso de precipitados al que se agrega suficiente KOH al 10% para cubrir las raíces. Después se calientan 10 minutos bajo 10 libras de presión en el autoclave. Se retira el KOH y las cápsulas con las raíces se enjuagan con agua destilada.

b) Se agrega H_2O_2 al 10% para cubrir las raíces durante tres minutos y se enjuaga con agua destilada.

c) Las raíces se cubren con HCl al 10% por tres minutos, se elimina el ácido y sin enjuagar se procede a la tinción.

d) Las cápsulas con raíces se cubren con una solución de azul tripano al 0.05% en lactoglicerol (ácido láctico-glicerol) y se calientan por 10 minutos a 10 libras de presión en el autoclave.

e) Se elimina el colorante y se decoloran las raíces con lactoglicerol limpio.

Después de la tinción se procede a la determinación del porcentaje de colonización micorrízica V-A en raíces lo cual se realiza por microscopía óptica por varios métodos. Uno de ellos es el método de Phillips y Hayman (1970), el cual requiere el montaje de raíces teñidas en portaobjetos. La desventaja de este método es, que no se toma en consideración la longitud del sistema radica o volumen de suelo, los cuales intervienen en el valor real de

la colonización. Marsh (1971) utiliza el método de intersección de cuadrantes. Por este método se evalúa porcentaje de raíces colonizadas. Es útil cuando se cuenta con un número grande de muestras, sin embargo, por medio de este método sólo es posible cuantificar colonización total.

AISLAMIENTO DE HONGOS ECTOMICORRIZICOS (Ferrera-Cerrato, 1993)

Fundamento: Estos hongos pueden aislarse de tejido del cuerpo fructífero (esporóforo, esclerocios, rizomorfos y esporas). Una vez aislados y estudiados desde el punto de vista morfológico a nivel macroscópico y microscópico, se propagan para que sirvan de inóculo en las pruebas de micorrización *in vitro* en los medios escogidos.

Aislamiento de los hongos ectomicorrízicos a partir de los cuerpos fructíferos. a) Una vez localizado el espécimen, se escarba el suelo para sacarlo totalmente y se envuelve cuidadosamente en papel encerado. b) Se limpia el cuerpo fructífero con lavados abundantes con agua destilada y esterilizada. c) Se parten a la mitad y se toman fragmentos de la parte carnosa para sembrar en los medios de Hagem (Palmer, 1969), PDA (papa dextrosa agar) y el medio Melin-Norkrans modificado (MNM) (Marx, 1969).

Medio Hagem: KH_2PO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; NH_4Cl , 0.5 g; FeCl_3 (solución acuosa al 1%), 10 gotas; glucosa, 5 g; extracto de malta, 1000 g; pH, 5.

Medio Melin-Norkrans modificado: Extracto de malta, 0.3 g; glucosa, 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.25 g; KH_2PO_4 0.5 g; MgSO_4 0.15 g; CaCl_2 , 0.05 g; FeCl_3 (solución acuosa al 1%), 10 gotas; NaCl , 0.025 g; clorhidrato de tiamina, 1000 mg; agua destilada 1000 ml; pH después de esterilizar, 5.5 a 5.7. Los medios inoculados se incubarán a 28°C a temperatura ambiente.

Aislamiento a partir de las estructuras micorrízicas. Las raíces se lavan y se selecciona la micorriza más sencilla. Se corta la raíz con micorriza en fragmentos de 1 a 2 cm y se colocan en un vial o tubo de centrifuga con perforaciones. Después se toman los viales con la muestra y se colocan en un recipiente conteniendo 1 litro de agua destilada más 2-3 gotas de Tween 20 y se agita uno o dos minutos con fuerza.

Se ponen los viales con las muestras a un recipiente de 1 litro que contenga una solución acuosa de HgCl_2 (100 ppm) durante 1-4 minutos.

En condiciones estériles se pasan los viales con las muestras:

- 1) A agua destilada estéril (1 minuto).
- 2) A nueva agua destilada y estéril (5 minutos).
- 3) A nueva agua destilada y estéril (10 minutos).

Se separa la micorriza y se transfiere a medio de Melin y Norkrans, Hagem o PDA. Se recomienda poner sólo una estructura por tubo de ensayo. Las colonias que se forman se siembran a cajas individuales.

Pruebas de micorrización *in vitro*

Se usan para estas pruebas las semillas de pino. Este método es el utilizado por el Servicio Forestal de los Estados Unidos.

a) Semillas de buena calidad se colocan en viales de plástico perforados y el vial con las semillas se lava durante una hora con agua de la llave.

b) El vial con las semillas se pasa a una solución de Tween 20 con agitación durante hora y media y después se lava abundantemente con agua durante el mismo tiempo.

c) Se sumerge el vial a una solución de H_2O_2 al 30% con agitación durante una hora y después se lava con dos litros de agua destilada en condiciones asépticas.

d) Se escurre el agua destilada y se pasa la semilla a una caja de Petri estéril y vacía.

e) Se colocan las semillas sobre PDA (papa dextrosa agar al 1%) o agua-agar, cuidando que la tercera parte de la semilla quede clavada en el medio y se ponen a germinar.

f) De acuerdo al método implementado por Zak (1976), en un matraz de dos litros se mezclan 840 ml de vermiculita en 60 ml de turba molida, se humedece con 550 ml en solución mineral de medio de MNM. Se esteriliza una hora a 120°C con un pH final entre 5 y 5.5.

g) Se propaga el hongo en tubo inclinado. Cuando éste ha crecido, se suspende homogéneamente y se inoculan 5-10 ml en el sustrato donde crece la planta que se transplantó.

h) Las plantas inoculadas se colocan en una cámara de crecimiento con luz incandescente y fluorescente a una temperatura de 22-25°C con un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

La micorriza puede tardar en formarse de cuatro, seis a ocho meses. Después se puede proceder a la evaluación de la micorriza, lo que incluye evaluar forma, color, formación de rizomorfos y porcentaje de colonización.

Para más información sobre producción de inóculo con hongos ectomicorrízicos y su manejo en la

inoculación a nivel de vivero forestal, consultar a Ferrera-Cerrato (1993).

CARACTERIZACION DE BPCP

Pruebas *in vitro* de actividad antimicrobiana

Fundamento: La selección de BPCP en ocasiones se fundamenta en el antagonismo bacteriano hacia patógenos vegetales. Las principales dificultades a las que se enfrenta el investigador al identificar aislamientos microbianos útiles como agentes de control biológico, es el gran número de cepas que hay que examinar para encontrar candidatos potenciales. No existen reportes que identifiquen con éxito características útiles asociadas con la inhibición de patógenos que ayuden a desechar a aquellos aislamientos prometedores dentro de cualquier colección (Hagedorn *et al.*, 1989).

1. Ensayos en agar. i) Las cepas bacterianas aisladas se inoculan en el centro de una placa con papa-dextrosa-agar y se incuban a 28°C. El crecimiento bacteriano concluye después de cuatro días si se exponen las cajas a vapores de cloroformo. Las esporas de los patógenos fúngicos se suspenden en agua destilada estéril y se rocían en aspersiones sobre las placas que contienen los crecimientos bacterianos. Las zonas de inhibición se miden después de 36 horas de crecimiento a 28°C (Juhnke *et al.*, 1987). ii) Las esporas en suspensión se obtienen cubriendo por completo o "inundando" el cultivo de la placa con Tween 40 estéril. Las suspensiones de esporas (0.5 ml) se plaquean sobre el mismo medio que se utilizó para el aislamiento y se dejan secar por dos o tres horas. Los aislamientos bacterianos se inoculan (a través de picaduras en cuadrantes) en las placas con agar conteniendo el hongo patógeno y se incuban (en el caso de *Fusarium oxysporum* la incubación es por siete días a 27°C). La producción de antibióticos se observa como una zona de inhibición de crecimiento alrededor del lugar donde se inoculó la rizobacteria (Kremer *et al.*, 1990).

Desventajas: A pesar de que muchos estudios han utilizado los ensayos en agar para determinar la inhibición a patógenos inducida por aislamientos de BPCP, esta práctica es controversial. El ensayo en agar, aunque sencillo de realizar, presenta la desventaja de no contar con la presencia de la planta, la cual puede ser determinante para la supervivencia, colonización, y actividad inhibidora de la bacteria hacia el hongo patógeno.

2. El ensayo en plantas. El ensayo "en planta" es representativo de las condiciones a las cuales se exponen las bacterias, una vez que se inician las pruebas de campo (Hagedorn *et al.*, 1989). El siguiente es sólo un ejemplo de los numerosos ensayos "en plantas" utilizados para identificar aislamientos para control biológico de enfermedades.

El patógeno fúngico se hace crecer en papa-dextrosa-agar por 72 horas; después, una de las placas se macera con 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.8. El homogeneizado se utiliza como inóculo para 4 kg de una mezcla estéril de arena y vermiculita estéril (1:1, v/v), suplementada con carbonato de calcio (10 g/kg), y empacada en tubos de ensayo de vidrio estériles (200 mm x 25 mm). Los tubos se llenan hasta los 15 cm de altura y se humedecen con 18 ml de solución nutritiva de Hoagland al 50%. Se colocan las semillas, las cuales ya han sido esterilizadas, sobre la superficie del suelo y se inoculan con aproximadamente 50 µl de 10⁷ ufc/ml de la suspensión bacteriana deseada. Después se cubren las semillas con una capa de 2 cm de mezcla de suelo infestada, y se agregan 3 ml de solución nutritiva. Como controles positivos se utilizan cepas de referencia de BPCP, así como semillas no tratadas en mezclas de arena y vermiculita inoculadas y no inoculadas con el patógeno. Si alguna de las cepas de prueba indica tan buenos resultados como la cepa de referencia, se le considera un agente de control biológico prometedor.

3. Capacidad antagonica de BPCP regulada por sideróforos. Un gran número de bacterias tales como *Vibrio cholerae*, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas fluorescens*, y muchos hongos ascomicetos y basidiomicetos son productores de sideróforos, las cuales son moléculas muy diversas con receptores para fierro que participan en el transporte de fierro a la célula bacteriana. Estos sideróforos agotan de manera eficiente el fierro del ambiente, convirtiéndose en un elemento limitante para ciertos microorganismos, incluyendo los patógenos vegetales (Glick, 1995; Kremer *et al.*, 1990). La actividad antagonica de *Pseudomonas* promotoras de crecimiento vegetal puede ser determinada de acuerdo a su habilidad para inhibir el crecimiento de *Erwinia agricola* y *F. oxysporum* en medios pobres en fierro tales como el medio SR y el medio SR-Fe³⁺ (20 g de FeCl₃/ml). Supuestamente, las rizobacterias capaces de inhibir microorganismos patógenos en medio SR pero no en medio SR-Fe³⁺, producen sideróforos quelantes de fierro extracelulares. Cuando la inhibición de la enferme-

dad es duplicada por el sideróforo purificado y la inhibición es revertida al agregar el hierro, se puede inferir la participación del sideróforo en el control de la enfermedad (Hamdan *et al.*, 1991).

Caracterización de BPCP a nivel de especie

La detección de BPCP nuevas se puede abordar de dos maneras: (i) a través del aislamiento de cepas diferentes de especies conocidas y (ii) aislando especies nuevas, proceso que requiere de tiempo y esfuerzo considerable. En algunos casos es difícil saber cual abordar, debido a que no se puede saber de antemano qué especies encontraremos. Sin embargo, es importante considerar las dos posibilidades, ya que en el caso de que el investigador solamente desee encontrar cepas mejores que las que tiene, pero de la misma especie, el tiempo y dinero invertido en el proceso se ve sustancialmente reducido.

Sondeo inicial (screening)

Este sondeo debe realizarse de acuerdo con características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales de los aislamientos, considerando que mientras más pruebas se realicen, es mejor. Muchas de estas pruebas, listas y tablas existen en las referencias bibliográficas. Debido a la falta de espacio, sólo se citarán aquellos trabajos que estén disponibles en la literatura. Aunque obsoleto para algunas especies, debe consultarse el manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Bergey's Manual for Systematic Bacteriology, 1984), por lo menos para la descripción a nivel género. Las fuentes de información para la descripción de especies son: para *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 1989; Bashan *et al.*, 1991; Döbereiner *et al.*, 1976; Magalhães y Döbereiner, 1984; Reinhold *et al.*, 1987; Tarrand *et al.*, 1978); para *Herbaspirillum* (Baldani *et al.*, 1986), y para *Acetobacter* (Cavalcante y Döbereiner, 1988). En cuanto a *Pseudomonas*, muchas especies aisladas del campo son muy heterogéneas, están vagamente definidas y no encajan de manera precisa dentro de las subdivisiones taxonómicas establecidas (Lifshitz *et al.*, 1986). Miembros del género *Pseudomonas* pueden clasificarse dentro de diferentes grupos con base en i) características fenotípicas (Stanier *et al.*, 1966); ii) características bioquímicas y de cultivo (Holding y Collee, 1971; Hugh y Gilardi, 1974); iii) homología rRNA-DNA (Palleroni *et al.*, 1973); iv) composición de ácidos grasos celulares con énfasis en

ácidos grasos hidroxilados (Ikimoto *et al.*, 1978; Oyaizu y Komagata, 1983; Watanabe *et al.*, 1987).

Homología de DNA y RNA

Para relacionar taxonómicamente alguna cepa con alguna especie conocida después de haber completado los primeros pasos de identificación, se cuenta con las pruebas de homología del RNA y DNA, las cuales constituyen herramientas muy útiles para estos propósitos. Estas pruebas no son específicas para BPCP. Por lo tanto, cualquier metodología general sobre homología del DNA y RNA puede ser utilizada para caracterizar nuevas especies tales como los métodos de Johnson (Johnson, 1981) empleados para caracterizar cepas de *Azospirillum* (Falk *et al.*, 1985; 1986). El principal inconveniente que encierran estos métodos es que para llevar a cabo la comparación de los nucleótidos, se requieren cepas de referencia provenientes de una colección.

Análisis del perfil proteico en una o dos dimensiones (fingerprinting)

Fundamento: Estos métodos tan fidedignos utilizan un gel de poliacrilamida para electroforesis con dodecil sulfato sódico en una o dos dimensiones (SDS-PAGE). En ellos se emplean las proteínas solubles o totales de las cepas de prueba para compararlas con las proteínas respectivas de las cepas de referencia. Estas técnicas permiten diferenciar con exactitud las cepas de referencia y en muchos casos son sensibles a nivel especie. De esta manera se pueden caracterizar y comparar un gran número de cepas problema en periodos relativamente cortos. El análisis de proteínas totales en dos dimensiones es adecuado para la caracterización de cepas, diferenciando aún aquellas estrechamente relacionadas; aquellas cepas que produzcan una imagen "fingerprinting" idéntica en dos dimensiones, están estrechamente relacionadas, si no es que son idénticas (De Mot y Vanderleyden, 1989; Lambert *et al.*, 1990). Estas técnicas son útiles para procedimientos de patente.

Cada uno de estos métodos consta de dos etapas: la etapa que comprende la extracción de proteínas es crucial. **Extracción de proteínas solubles** (Bally *et al.*, 1990; Kersters y De Ley, 1975). Las proteínas solubles pueden obtenerse sometiendo la suspensión bacteriana a sonicación fuerte. Las proteínas presentes en la mezcla se concentran mezclando con acetona a una proporción de 1:5 (v/v). Después de centrifugar a 15 000 x g, se descarta

el sobrenadante y la acetona remanente se evapora del aglomerado o "pellet" bajo condiciones de vacío. El aglomerado que se obtuvo se suspende en solución amortiguadora Tris-HCl 62 mM, pH 6.8 suplementada con 2.3% de SDS (dodecil sulfato sódico) (p/v) y 5% de β -mercaptoetanol (v/v). Se hierven las muestras por tres minutos antes de realizar la electroforesis. Otros métodos de extracción de proteínas solubles descritos en un principio para *Bradyrhizobium* (Kamicker y Brill, 1986) y *Bacillus* (Shivakumar et al., 1986) han sido utilizados con éxito para la caracterización de *Azospirillum* (Bilal et al., 1990; Sundaram et al., 1988).

Extracción de proteínas totales.

Método # 1 (De Mot y Vanderleyden, 1989).

Los aglomerados de células en fase estacionaria son lavadas en solución salina de fosfato, pH 7.2, se suspenden en 0.75 ml de solución amortiguadora de extracción que está compuesta por: sacarosa 0.7 M; Tris 0.5 M, HCl 30 mM, EDTA 50 mM, KCl 0.1 M y dithiothreitol 40 mM e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se agrega un volumen equivalente de fenol (saturado con solución Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). La mezcla se mantiene en agitación continua. Después de obtener separación de fases por centrifugación, la fase que contiene el fenol se recupera y se vuelve a extraer por dos ocasiones con un volumen equivalente de la solución amortiguadora de extracción. Las proteínas se precipitan de la fase fenólica adicionando cinco volúmenes de acetato de amonio 0.1 M disuelto en metanol. Se incuba la mezcla durante varias horas a -20°C . El precipitado se lava dos veces con solución fría de acetato de amonio y finalmente con acetona fría al 80%. El aglomerado se seca al aire y se disuelve en 75 μl de la siguiente solución lítica (que provoca lisis), compuesta de urea 9.8 M, 2% (v/v) Nonidet P-40 (LKB), dithiothreitol 100 mM y 2% (v/v) de una mezcla de anfólicas (ampholytes) de pH 5-7 y de pH 3.5-10 (LKB) a una proporción de 5:1. Las muestras se almacenan a -80°C .

Método # 2 (Lambert et al., 1987).

Cada una de las cepas de prueba se transfiere a cada uno de los pozos colocados en dos placas de cultivo de tejidos que contienen 48 pozos (Costar Europe). Los pozos deben contener 500 μl de caldo de soya triptica (TSB). Las bacterias se incuban en los pozos por un periodo de exactamente 48 horas a 28°C . Después se agrega glicerol (concentración final, 25% [v/v]) a los cultivos bacterianos ya desarrollados. Una placa se almacena a -70°C y la otra se utiliza para caracterización posterior de la célula.

Las placas de cultivo de tejidos conteniendo las cepas completamente desarrolladas se centrifugan durante 30 min a 300 X g (ángulo fijo) utilizando un adaptador especial. Se descartan los sobrenadantes. Se preincuba cada aglomerado durante 15 min a 37°C en una solución de lisozima conteniendo 2 mg de lisozima por ml de polietilenglicol al 12%. Las proteínas celulares totales se extraen hirviendo cada aglomerado a 95°C durante 10 min en 50 μl de una mezcla de solución amortiguadora compuesta de 2.5% dodecyl sulfato sódico, 0.125 M β -mercaptoetanol, 150 mM Tris a pH 8.8, 4 mM EDTA, 0.75 M sacarosa, 0.075% azul de bromofenol) y se sonica por 10 segundos. Después de enfriarse en hielo, se le agregan 7 μl de una solución de yodoacetamida, 0.5 M.

Análisis monodimensional del perfil de proteínas solubles (Kamicker y Brill, 1986; Sundaram et al., 1988).

Las muestras se someten a la técnica de electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) en una dimensión utilizando gel de resolución al 12% y gel concentrador al 5%. Se ponen 10 μl de muestra en geles conteniendo 50-100 g de proteína por pozo, una vez que se llevó a cabo la estimación de proteína por medio de la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Después de una electroforesis estándar, se tiñen con azul de Coomassie R-250, 0.2% (p/v) durante una hora. Se enjuagan durante toda la noche en ácido acético al 7% y se decoloran en una solución de metanol absoluto, ácido acético glacial y agua (9:2:9, v/v/v). Después de fotografiar los geles, se detectan las bandas por medio de un densitómetro o "scanner" en su hendidura más angosta para lograr una resolución máxima.

Se comparan las fotografías de las huellas proteicas de las cepas microbianas, marcando con un mismo número aquellas huellas que sean correspondientes o iguales y marcando con diferente número aquellas que no coincidan. La numeración de los tipos de huella se realiza secuencialmente. Se logra la identificación de la composición química de los tipos de huella por medio de pruebas bioquímicas clásicas en combinación con estuches o "kits" comerciales para identificación (Lambert et al., 1987). Este tipo de caracterización puede también utilizarse para comparar proteínas de envolturas celulares así como para el análisis de lipopolisacáridos (Van Peer et al., 1990).

Análisis bidimensional del perfil proteico total (De Mot y Vanderleyden, 1989).

La resolución de todas las proteínas presentes en la célula pueden conseguirse en un gel bidimensional que separa las proteínas primero por carga y después por tamaño. La separación por carga se logra mediante enfoque

isoelectrico (IEF), la cual se lleva a cabo con geles dentro de un tubo IEF (8 X 0.1 cm) conteniendo urea 9.8 M, Nonidet P-40 2% (v/v), anfolinas 6.4% (v/v) pH 5-7, anfolinas 1.3% (v/v) pH 3.5-10, N,N'-methylene-bisacrylamida 0.23%, y acrilamida 4%. Posterior al pre-enfoque (15 min a 200 V, 30 min a 300 V y 60 min a 400 V) se cargan 10 µl de muestra en el extremo básico de los geles y se cubren con 10 µl de una solución conteniendo: urea 8 M, anfolinas 1% (v/v), Nonidet P-40 5% (v/v) y dithiothreitol 100 mM. La solución amortiguadora de la parte superior (cátodo) consiste en NaOH 20 mM; la solución de la parte inferior (ánodo) consiste en H₃PO₄ 10 mM. El enfoque hacia el equilibrio se lleva a cabo durante 20 h a 400 V.

La segunda dimensión (SDS-PAGE) se lleva a cabo en geles en placa (5% del gel concentrador, 15% del gel de separación, 0.1% SDS). Los geles IEF se extraen del tubo, se corta la parte correspondiente a cada banda y se coloca cada banda por separado en el gel concentrador. Se cubren con una solución amortiguadora de equilibrio (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, SDS 2%, dithiothreitol 100 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.002%). Se deben utilizar estándares de intervalos bajos. Después de equilibrar por un periodo de 10 min, se corren los geles a 15 mA. Se tiñen con azul de Coomassie R-250 y se deshidratan en un secador de geles en placa. Los resultados se analizan a partir de las fotografías de los geles.

Identificación de cepas por medio del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism) (RFLPs) (Brown *et al.*, 1990)

Fundamento: Esta técnica es particularmente útil para la identificación de cepas específicas. Por medio de este procedimiento se aísla todo el genoma y se divide con una o varias endonucleasas. Los fragmentos de DNA resultantes se separan por tamaño por electroforesis en gel de agarosa y se prueban o sondan (probe) con un fragmento de DNA clonado. Se determina la especificidad por medio de la secuencia de la sonda y de los patrones de digestión de las endonucleasas de restricción. Las secuencias de la sonda son muchas veces repetitivas, lo que incrementa la sensibilidad de la detección. Las enzimas de restricción utilizadas con mayor frecuencia

tienen sitios de reconocimiento a seis pares de bases. Estos dos factores, (i) secuencias repetitivas y (ii) sitios cortos de reconocimiento de la enzima, eliminan factores de variación debidos a pérdida de secuencias o rearrreglos. También generan un perfil de RFLP, que al compararse con el perfil estándar RFLP de alguna cepa, confirma o anula la identidad de la cepa.

Procedimiento:

1. Extracción del genoma. Los aglomerados celulares obtenidos de 20 ml de una suspensión de células bacterianas en fase estacionaria se suspenden en solución Tris 50 mM, pH 8.0, con 20% de sacarosa. Se tratan con 1 mg/ml de lisozima después de haber agregado 100 ml de EDTA 25 mM, y de haberse lisado en SDS al 0.5% (agregado al 10%). Después del proceso de digestión con RNasa A (40g/ml) y proteinasa K (20 g/ml), se separa el DNA en gradientes de CsCl₂ con la presencia de bromuro de etidio, precipitado con isopropanol, lavado con etanol al 70%, y liofilizado. Los aglomerados se suspenden en agua destilada. La concentración de DNA se determina a 260 nm.

2. Obtención de los fragmentos de digestión y sondeo. Se incuban 3 µg de DNA genómico con 15 unidades de la enzima de restricción apropiada (e.g. *EcoRI*, *PstI* or *PvuII*) en un volumen total de 28 µl durante 2 horas. Se marca un plásmido sonda (pAM141) utilizando ya sea el estuche "Oligo Labelling Kit" (no. 27-9250-01, Pharmacia) o el estuche de marcaje y detección de DNA (no-radioactivo, No. 1093-625, Boehringer Mannheim).

3. Electroforesis y "blots" (se denomina blot a lo que resulta de transferir el DNA de los geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa). Las muestras del DNA genómico digeridas se someten a electroforesis en agarosa al 1% (Maniatis *et al.*, 1982) y se blotan al vacío a GeneScreen Plus (NEN Research Products), de acuerdo con el fabricante (Pharmacia). Los marcadores de tamaño se producen al cortar el fago lambda DNA (BRL) con *HindIII* y con *BglIII*. La pre-hibridación y la hibridación se realizan en una mezcla de 50% de formamida, 5% de sulfato de dextrano, 5% de agente bloqueador (Boehringer Mannheim), 5XSSC (1X:0.15 M NaCl más 0.015 M citrato de sodio), N-laurilsarcosina al 0.1%, y SDS al 0.02%, a 42°C. Los blots son hibridados por lo menos durante 6 h a 42°C y se lavan a temperatura ambiente durante 2 X 5 min en 2 X SSC, SDS al 0.1%, y a 68°C durante 2 X 15 min en SSC al 0.1%, SDS al 0.1%.

Identificación de bacterias por medio del análisis de ácidos grasos celulares por cromatografía de gases (Sasser, 1990)

Este método es muy útil y preciso y puede identificar cepas a nivel de especie. Sin embargo, para realizar un trabajo manual apropiado, el investigador debe tener acceso a una colección de cepas ya identificadas. Además, el análisis manual de patrones obtenidos a través de cromatografía de gases es extremadamente laborioso, especialmente cuando no contamos con ningún indicio sobre la identidad de la cepa aislada en cuestión. El programa para computadoras que relaciona la cepa aún no identificada con los ceparios de bacterias clínicas y no clínicas están disponibles en el mercado. Si no se cuenta con la infraestructura apropiada, se recomienda el utilizar servicios de identificación comerciales. Por esta razón los detalles técnicos para la identificación de BPCP por medio de este método, no se incluyen en este trabajo.

ALMACENAMIENTO

Las cepas aisladas pueden ser almacenadas por periodos de tiempo cortos, en tubos de agar inclinado con TSBA al 1/10. Para bacterias diazotróficas se recomienda el medio OAB (Okon *et al.*, 1977) o este medio en combinación con varias fuentes de carbono (Rennie, 1981) a 2°C. Para periodos prolongados, las cepas pueden ser almacenadas en soluciones de glicerol al 30% a -15 y -70°C. Para almacenamiento indefinido, se recomienda liofilizarlas utilizando cualquier técnica de liofilización convencional.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. Yoav Bashan participó en este trabajo en memoria del Sr. Avner Bashan de Israel. Parte de este manuscrito fue originalmente publicado en inglés en: "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" y es presentado aquí con permiso de CRC Press, USA.

LITERATURA CITADA

- Baldani, J.I., V.L.D. Baldani, L. Seldin y J. Döbereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 86-93.
- Bally, R., A. Givaudan, J. Bernillon, T. Heulin, J. Balandreau y R. Bardin. 1990. Numerical taxonomic study of three N₂-fixing yellow-pigmented bacteria related to *Pseudomonas paucimobilis*. *Can. J. Microbiol.* 36: 850-855.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1985. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 31: 947-952.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R.E. Whitmoyer y H. Levanony. 1991. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant Soil* 132: 73-83.
- Bashan, Y., M. Singh y H. Levanony. 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.* 67: 2429-2434.
- Berge, O., T. Heulin y J. Balandreau. 1991. Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. *Biol. Fertil. Soils* 11: 210-215.
- Bergey's Manual for Systematic Bacteriology. 1984. Williams and Wilkins, USA.
- Bilal, R., G. Rasul, J.A. Qureshi y K.A. Malik. 1990. Characterization of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 46-52.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, G., Z. Khan y R. Lifshitz. 1990. Plant growth promoting rhizobacteria: strain identification by restriction fragment length polymorphisms. *Can. J. Microbiol.* 36: 242-248.
- Cavalcante, V.A. y J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- De Freitas, J.R. y J.J. Germida. 1990. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Can. J. Microbiol.* 36: 265-272.
- De Mot, R. y J. Vanderleyden. 1989. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 35: 960-967.
- Döbereiner, J. 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110: 207-212.
- Döbereiner, J. y J.M. Day. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *In: Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen Fixation*. W.E. Newton y C.J. Nyman (Eds). Washington State University Press, Pullman, USA. 518-538.
- Döbereiner, J., I.E. Marriel y M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
- Falk, E.C., J. Döbereiner, J.L. Johnson y N.R. Krieg. 1985. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 117-118.
- Falk, E.C., J.L. Johnson, V.L.D., Baldani, J. Döbereiner, y N.R. Krieg. 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 80-95.
- Ferrera-Cerrato, R. 1993. Ectomicorriza. *In: Manual de Agromicrobiología*. R. Ferrera Cerrato (Ed.). Editorial Trillas, México D.F. 53-91.
- Ferrera-Cerrato, R., M.C. González-Chávez, y M.N. Rodríguez-Mendoza. 1993. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas, Mexico D.F.

- Gerdemann, J.W. 1955. Relation of large soil-borne spore to *Phycomycetus* mycorrhizal infections. *Mycologia* 47: 619-632.
- Gerdemann, J.W. y T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- González-Chávez, M.C. 1993. La endomicorriza vesículo arbuscular. *In: Manual de Agromicrobiología*. R. Ferrera Cerrato (Ed.). Editorial Trillas, México D.F. 93-120.
- Gould, W.D., C. Hagedorn, T.R. Bardinelli y R.M. Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 28-32.
- Hagedorn, C., W.D. Gould y T.R. Bardinelli. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2793-2797.
- Hamdan, H., D.M. Weller y L.S. Thomashow. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces-graminis* var *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3270-3277.
- Hardy, R.W., R.D. Holsten, E.K. Jackson y R.C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43: 1185-1207.
- Holding, A.J. y J.G. Collee. 1971. Routine biochemical tests. *In: Methods in microbiology*. Vol 6A. J.R. Norris and D.W. Ribbons (Eds). Academic Press Inc. New York. 1.
- Holguin, G., M.A. Guzman y Y. Bashan. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and *in vitro* interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 101: 207-216.
- Horemans, S., S. Demarsin, J. Neuray y K. Vlassak. 1987. Suitability of the BLCR medium for isolating *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 33: 806-808.
- Hugh, R. y G.L. Gilardi. 1974. *Pseudomonas*. *In: Manual of clinical microbiology*. 2nd ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 250.
- Ikimoto, S., H. Kuraishi, K. Komagata, M. Azuma, T. Suto y H. Murooka. 1978. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24: 199-205.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease* 48: 692-694.
- Johnson, J.L. 1981. Genetic characterization. *In: Manual of methods for general bacteriology*. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.B. Phillips (Eds). American Society for Microbiology, Washington. 450.
- Juhnke, M.E., D.E. Mathre y D.C. Sands. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2793-2799.
- Kado, C.I. y M.G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-972.
- Kamicker, B.J. y W.J. Brill. 1986. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 487-492.
- Kerstens, K. y J. De Ley. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 87: 333-340.
- King, E.D., M.K. Ward y D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kloepper, J.W., R. Lifshitz y M.N. Schroth. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *In: ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences* 60-64.
- Kloepper, J.W., R. Lifshitz y R.M. Zablotowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
- Kole, M.M., W.J. Page y I. Altosaar. 1988. Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. *Can. J. Microbiol.* 34: 815-817.
- Kremer, R.J., M.F. Begonia, L. Stanley y E.T. Lanham. 1990. Characterization of rhizobacteria associated with weed seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1649-1655.
- Lalande, R., N. Bissonnette, D. Coutlee y H. Antoun. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil* 115: 7-11.
- Lambert, B., F. Leyns, F. Van Rooyen, F. Gossele, Y. Papon y J. Swings. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1866-1871.
- Lambert, B., P. Meire, H. Joos, P. Lens y J. Swings. 1990. Fast-growing, aerobic, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3375-3381.
- Lifshitz, R., J.W. Kloepper, F.M. Scher, E.M. Tipping y M. Laliberte. 1986. Nitrogen-fixing pseudomonads isolated from roots of plants grown in the Canadian high arctic. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 251-255.
- Lindberg, T. y U. Granhall. 1984. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 683-689.
- Magalhães, F.M.M. y J. Döbereiner. 1984. [Occurrence of *Azospirillum amazonense* in some amazonian ecosystems]. *Rev. Microbiol. São Paulo* 15: 246-248 (en Portugués).
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marsh, B.A. 1971. Measurement of length in random arrangement of lines. *J. Appl. Ecol.* 8: 265.
- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-165.
- Morton, J.B. 1986. Effects of mountants and fixatives on wall structure and Melzer's reaction in spores of two *Acaulospora* species (Endogonaceae). *Micologia* 78: 787-794.
- New, P.B. y I.R. Kennedy. 1989. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in eastern Australia. *Microb. Ecol.* 17: 299-309.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4011.
- Omar, A.M.N., C. Richard, P. Weinhard y J. Balandreau. 1988. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. *Biol. Fertil. Soils* 7: 158-159.
- Okon, Y., S.L. Albrecht y R.H. Burris. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 85-88.

- Oyaizu, H. y K. Komagata. 1983. Grouping of *Pseudomonas* species in the basis of cellular fatty acid composition and their quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29: 17-26.
- Page, W.J. 1986. Sodium-dependent growth of *Azotobacter chroococcum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 510-514.
- Palleroni, N., J.R. Kunisawa y R. Contopoulou. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333-346.
- Palmer, J.G. 1969. Technique and procedures for culturing ectomycorrhizal fungi in mycorrhizae. In: E. Hacskaylo (Ed.). *Musc. Pub.* 1189. US Department of Agriculture. Forest Service, Beltsville, Maryland.
- Phillips, J.M. y D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Postgate, J.R. 1969. Viable counts and viability. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 1. Norris, F.N. y Ribbons, D.W. (Eds). Academic Press, New York. 610-628.
- Quesada, E., A. Ventosa, F. Rodriguez-Valera y A. Ramos-Cormenzana. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 155-161.
- Reinhold, B., T. Hurek, E.G. Niemann y I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520-526.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans y J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14.
- Rodriguez Caceres, E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: *Methods in Phytobacteriology*. Klement, Z., K. Rudolph y D.C. Sands (Eds). Akademiai Kiado, Budapest, 199.
- Schenck, N.C. y I. Perez. 1990. Manual for the identification of VA Mycorrhizal fungi. Gainesville, Florida. Tercera edición.
- Shivakumar, A.G., G.J. Gundling, T.A. Benson, D. Casuto, M.F. Miller y B.B. Spear. 1986. Vegetative expression of the delta-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis*, sub-species Kurstaki in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 166: 194-204.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation Federal Republic of Germany. Eschborn, Alemania. pp. 192-196.
- Stanier, R.Y., N.J. Palleroni y M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiology* 43: 159-173.
- Stolp, H. y D. Gadkari. 1986. Nonpathogenic members of the Genus *Pseudomonas*. In: *The Prokaryotes*. Vol. 1, 2nd ed. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (Eds). Springer Verlag, New York. 722
- Sundaram, S., A. Arunakumari y R.V. Klucas. 1988. Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.* 34: 212-217.
- Tarrand, J.J., N.R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- Thomas-Bauzon, D., P. Weinhard, P. Villecourt y J. Balandreau. 1982. The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 28: 922-928.
- Tipping, E.M., E.E. Onofriechuk, R.M. Zablotowicz, J.W. Kloepper y R. Lifshitz. 1989. Screening of bacteria isolated from peat for biocontrol of *Pythium ultimum*. In: *Proceedings Symposium Peat and Peatlands*, Vol. II. Overend R.P. y J.K. Juglum (Eds). Canadian Society of Peat and Peatlands, St. Foy Quebec.
- Tyler, M.E., J.R. Milam, R.L. Smith, S.C. Schank y D.A. Zuberer. 1979. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. *Can. J. Microbiol.* 25: 693-697.
- Van Peer, R., H.L. Punte, L.A. De Weger y B. Schippers. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere *Pseudomonads* in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2462-2470.
- Watanabe I., So. Rolando, J.K. Ladha, Y. Katayama-Fujimura y H. Kuraishi. 1987. A new nitrogen-fixing pseudomonad: *Pseudomonas diazotrophicus* sp. nov. isolated from the root of wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 33: 670-678.
- Zak, B. 1976. Pure culture synthesis of pacific madrone ectomycorrhizae. *Mycologia* 68: 362-369.

SEP INSTITUTO TECNOLÓGICO agropecuario No. 10 CENTRO DE INVESTIGACION Y GRADUADOS AGROPECUARIOS

Introducción

El centro de Investigación y Graduados Agropecuarios (CIGA) de Torreón, Coahuila es una Institución de la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria (DGETA), que depende directamente de la Secretaría de Educación Pública (SEP). Tiene como función principal educación científica y tecnológica de alto nivel y realizar investigación en las áreas de suelos e irrigación.

Actualmente se encuentra incorporado al padrón de programas de excelencia de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología en la Maestría en Suelos y en la Maestría en Irrigación.

Integración Académica de las Maestrías

Las maestrías con especialidad en Suelos e Irrigación, están integradas por un total de 90 créditos distribuidos con un 70 % en materias de la especialidad y 20 % en actividades de investigación.

Duración

Dos años, divididos en 4 semestres y un curso de verano.

Infraestructura

Recursos humanos: El CIGA, cuenta con recursos humanos altamente capacitados en ambas especialidades, de tiempo completo y con niveles de maestría y doctorado.

Infraestructura física

Cuenta con instalaciones exclusivas para el posgrado debidamente equipados así como una superficie agrícola de 60 has de riego y maquinaria agrícola e implementas necesarios.

Recepción de documentos

Se reciben solicitudes todo el año, emitiendo el dictamen de selección durante la segunda quincena del mes de junio de cada año.

Inscripciones

El periodo de inscripción sera la última semana del mes de agosto de cada año.

Informes

Centro de Investigación y Graduados Agropecuarios
Carr. Torreón-San Pedro Km. 7.5 Anna, Torreón, Coah., México
Apartado Postal 3F Tel. 91(17)21-46-81

FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA DE LA UJED

En 1986 la antes Escuela Superior de Agricultura y Zootecnia fundada en mayo de 1972 pionera de la educación agrícola superior de la Comarca Lagunera se eleva a rango de Facultad de Agricultura y Zootecnia (FAZ) de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED). La División de Estudios de posgrado de la F.A.Z.-U.J.E.D. ha llevado a la Institución a conseguir metas muy importantes como el ser el primer posgrado de la UJED con el grado de excelencia en el padrón de CONACYT.

La División ofrece dos maestrías, la primera en SISTEMAS DE PRODUCCION AGROPECUARIA la cual inicia en el año de 1986, siendo una excelente opción para profesionistas nacionales e internacionales con carreras afines a la agronomía para especializarse en el enfoque sistemático, el cual le permitirá entender e identificar los Sistemas de Producción existentes en base a un diagnóstico, derivado de un marco de referencia, a fin de que sea capaz de identificar problemas, jerarquizarlos y plantear alternativas para hacer un uso mas eficiente de los recursos.

La segunda opción de esta división es la Maestría en AGRICULTURA ORGANICA SUSTENTABLE ya que bajo el contexto del marco referencial la producción agronómica a nivel regional nacional y mundial la agricultura orgánica sustentable está en función de diferentes estrategias que condicionan el uso eficiente y eficaz para la optimización de recursos naturales agua-suelo-planta y productos orgánicos e inorgánicos.

Para mayores informes favor de dirigirse a:

FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA

APARTADO POSTAL No.142

GOMEZ PALACIO, DGO.

TELS: 90-17-27-04-64

FAX: 90-17-27-21-25

**UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
UNIDAD REGIONAL UNIVERSITARIA DE ZONAS ARIDAS
BERMEJILLO, DGO.**

La Universidad Autónoma Chapingo, a través de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, conciente de la importancia que implica la difusión de la ciencia, la tecnología y la cultura, se une al esfuerzo realizado por los organizadores de la prestigiada revista TERRA, con el único objeto de coadyuvar a la noble labor de los objetivos de esta revista.

Es necesario recapacitar en el uso de los recursos con que contamos, estos no son interminables, solo con la investigación es posible encontrar la forma más viable para que estos puedan mantenerse en el espacio y tiempo, y que el conocimiento generado, pueda llegar a los productores, con la intervención de las instituciones de educación agrícola superior.

El personal académico y de investigación de esta casa de estudios, desea que los artículos científicos y tecnológicos que aquí se publicaran contribuyan al desarrollo de la agricultura nacional y en particular a la región en que nos encontramos. Solo con la conjunción de esfuerzos entre los investigadores y entre las instituciones involucradas en esta tarea será posible lograr el objetivo común *"desarrollar un tipo de agricultura que sea ecológicamente estable, culturalmente aceptable y que permita satisfacer la demanda básica de alimentos para la población sin comprometer nuestros recursos para las futuras generaciones"*

Finalmente, enviamos un fraternal saludo a todas las instituciones y personas que hicieron posible la edición regional de esta revista. Deseamos un sinnúmero de logros que finalmente repercutan en el engrandecimiento de esta tierra en particular y de México.

**ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE LA TIERRA
NO LA DEL HOMBRE**

DIRECCION REGIONAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA (POSGRADO)

El Posgrado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, nace en 1971. Actualmente se ofrecen 13 programas, de los cuales 11 de ellos se desarrollan en la sede de Buenavista, Saltillo, Coah., y dos en la Unidad Laguna sede en Torreón, Coah.

En agosto de 1993, el H. Consejo Universitario autoriza la creación del Posgrado en la Unidad Laguna, el cual inicia formalmente en enero de 1994, con los programas **PRODUCCION AGRONOMICA** y **REPRODUCCION ANIMAL**. Actualmente ambos programas pertenecen al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT.

Los programas, tienen como objetivo la formación de recursos humanos capacitados para la investigación y tecnologías relacionadas con la Producción Agrícola y la Reproducción Animal, lo cual se sustenta en las líneas de investigación respectivas.

El programa de Reproducción Animal, está enfocado a la biotecnología de la producción y reproducción de pequeños rumiantes. El primero se basa en el proceso productivo de los animales domésticos; y el segundo está orientado a la contribución de alcanzar una alta eficiencia en la producción y reproducción de cabras y ovejas.

Para mayores informes, deberá dirigirse a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, periférico y carretera a Santa Fé, en Torreón, Coahuila, México, C.P. 27000 Apdo. Postal 940. Teléfono (91-17) 33-00-67, 32-12-70, ext. 129., FAX 33-12-10.

CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

El Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT) fue creado en enero de 1996, el cual coordina a los diferentes órganos que realizan, promueven y utilizan la investigación científica y tecnológica, así como aquellas que preparan investigadores en la entidad.

Su objetivo principal es establecer las bases para promover el desarrollo científico y tecnológico en el Estado, fijando mecanismos de coordinación y asesoría entre el Gobierno del Estado y las diferentes instancias que desarrollen investigación, así como fortalecer la formación de recursos humanos de alto nivel académico.

Para el cumplimiento de este objetivo el COECYT deberá planear, promover y evaluar las actividades relativas a la Ciencia y Tecnología en el Estado de Coahuila, su vinculación con el desarrollo nacional y sus relaciones con el exterior.

OBJETIVOS ESPECIFICOS DEL COECYT-UNIDAD LAGUNA.

Los objetivos son muchos y variados que van desde la creación del Programa Regional de Ciencia y Tecnología, así como la vinculación de las diferentes instancias involucradas con la ciencia y tecnología, estatal, nacional e internacional, promoción y trámite de servicios del CONACYT, así como promover el intercambio de investigadores entre las diferentes instancias, dar seguimiento a programas de desarrollo social, productivo y buscar la transferencia de tecnología generada por las diferentes instituciones de educación e investigación, también realizará la promoción de foros para presentar avances y resultados de los diferentes proyectos, establecer sistemas de conformación para dar a conocer las instituciones que forman recursos humanos a nivel estatal y nacional, a fin de establecer la capacidad que se tiene en cada una para responder a las necesidades y demandas prioritarias, que requiere la sociedad en general y por último la promoción de un programa regional de difusión científica y tecnológica, con el objetivo de rescatar a sujetos precalificados para integrarlos a un programa de capacitación de alto nivel.

DIVISION II

Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera

YOAV BASHAN
GINA HOLGUIN
RONALD FERRERA-CERRATO 195

Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas

GINA HOLGUIN
YOAV BASHAN
RONALD FERRERA-CERRATO 211