

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Viabilidad de *Azospirillum sp.* en Raíces de *Prosopis glandulosa* y *Acacia farnesiana* Inoculadas con Biofertilizante y Mejorador

Por:

ROSALINA VASQUEZ VICTOR

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO FORESTAL

Viabilidad de *Azospirillum sp.* en Raíces de *Prosopis glandulosa* y *Acacia farnesiana* Inoculadas con Biofertilizante y Mejorador

Por:

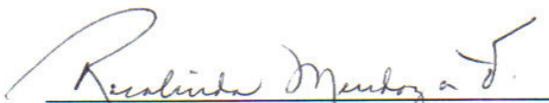
ROSALINA VASQUEZ VICTOR

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

Aprobada



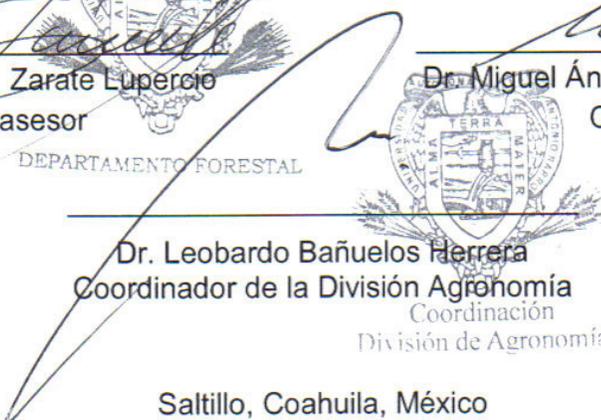
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor principal



Dr. Alejandro Zarate Luperote
Coasesor



Dr. Miguel Ángel Capó Arteaga
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División Agronomía
Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México
Diciembre de 2012

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Sra. Carmen Víctor Baltazar

Y

Sr. Federico Vásquez Gutiérrez

Con todo mi amor y cariño por que gracias a que ustedes me dieron la vida y por ser los principales formadores de mi persona he podido llegar a este momento, culminando una etapa más de mi vida, lograr ser una profesionista, porque siempre me brindaron su apoyo, por no dejar de creer en mí y porque me enseñaron a luchar por lo que uno quiere a no dejarse vencer por lo que los demás piensan.

A MI HERMANO:

David Vásquez Víctor

Por tu amor y apoyo para que yo siguiera estudiando, gracias por los mejores momentos que vivimos cuando niños.

A:

DASHA YARETZI

Llegaste para ser la única estrella que no deja de brillar en mi cielo, desde que estás conmigo me iluminas mis días y mis noches oscuras, eres mi fortaleza, el pilar que me sostiene día a día para no caer, GRACIAS, por todos esos momentos que me has regalado hasta ahora, nos esperan aun muchos. Te amo mi princesa hermosa.

A:

José Luis

Por darme el mejor regalo de mi vida, y gracias por compartir tu vida con la mía y por estar conmigo en estos momentos.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme la vida, estar conmigo en todo momento y por permitirme terminar mi carrera profesional, por poner en mi camino a todas aquellas personas que de alguna u otra manera me han apoyado a terminar con éxito esta etapa de mi vida. Gracias por mandarme a un ángel que me cuide acá en la tierra, mi Regalo de Dios (Dasha).

A mi “Alma Terra Mater” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por abrirme sus puertas y brindarme sus servicios generales que en su momento necesité y educativos a través de su profesorado formándome en sus aulas como una profesional forestal.

A la Dra. *Rosalinda Mendoza Villarreal*, por el apoyo y amistad incondicional y sobre todo por tener la disposición, paciencia y ganas de transmitir sus conocimientos a través de la dirección de este proyecto de investigación.

Al Dr. *Alejandro Zarate Lupercio*, por su orientación en la revisión de este trabajo.

Al Dr. *Miguel Ángel Capo Arteaga*. Por su valiosa colaboración en la culminación de este trabajo.

A las TLQ. *Laura Ma. Duron y Martina De la Cruz*, por su valiosa colaboración y asesoramiento para llevar a cabo cada uno de los ensayos químicos en laboratorio y cumplir con los objetivos planteados en este trabajo.

A los Ing. Juan Carlos Ramos Reyes y el Ing. Marco Antonio Escalante Díaz, por la aportación del material de estudio.

A las personas que me apoyaron para la realización de este proyecto desde la obtención de muestra (Aristeo), hasta su culminación, mis más sinceros agradecimientos.

A todos los profesores del Departamento Forestal, M.C. Celestino Flores López, M.C. José Aniceto Díaz Balderas, Dr. Alejandro Zarate Lupercio, Dr. Jorge Méndez González, Dra. Gabriela Ramírez Fuentes, M.C. José Armando Nájera Díaz, M.C. Jorge David Flores Flores, Dr. Eladio H. Cornejo Oviedo, M.C. Andrés Nájera Díaz, Ing. Sergio Braham Sabag, Dr. Miguel Ángel Capo Arteaga, gracias a sus conocimientos y experiencias me ayudaron a culminar mi formación profesional.

A mis padres, Carmen Víctor Baltazar y Federico Vásquez Gutiérrez por su amor y educación que me han hecho ser una profesionista, mis más sinceros agradecimientos.

A todos mis compañeros y amigos de la carrera y de la universidad, gracias por su apoyo y sobre todo por su amistad incondicional que me brindaron. Me es difícil nombrarlos a todos, pero sepan que los llevo en el corazón a cada uno de ustedes.

A la familia de la Sra. Laura y de Doña Estela por abrirme las puertas de su hogar y apoyarme cuando más lo necesitaba, mil gracias y Dios las bendiga.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas.
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVO GENERAL	5
1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. Mezquite (<i>Prosopis glandulosa</i>).....	7
2.1.1. Origen.....	7
2.1.2. Descripción botánica.....	8
2.1.3. Clasificación taxonómica	9
2.1.4. Importancia ecológica y económica.....	9
2.2. Huizache (<i>Acacia farnesiana</i>)	11
2.2.1. Origen.....	11
2.2.2. Descripción arbustiva.....	11
2.2.3. Clasificación taxonómica	12
2.2.4. Importancia ecológica y económica.....	12
2.3. Bacterias benéficas para las plantas	14
2.3.1. La rizósfera	16
2.3.2. Nitrógeno en la planta.....	18
2.3.3. Fijadores de Nitrógeno.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Descripción del área experimental.....	31
3.2. Selección de muestra	31
3.2.1 Aislamiento de rizobacterias	32
3.3. Aislamiento del género <i>Azospirillum</i>	33

3.4. Pruebas bioquímicas	34
3.4.1. Prueba de movilidad	35
3.4.2. Prueba de catalasa.....	35
3.5. Cuantificación de Colonias	36
3.6. Cuantificación de bacterias en raíces de plantas testigo	36
3.7. Diseño experimental	37
3.8. Análisis estadístico	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Pruebas bioquímicas	39
4.2. Cuantificación de Colonias del género <i>Azospirillum sp.</i>	42
4.3. Bacterias totales	45
4.4 Arreglo factorial.....	49
4.4.1 Cuantificación de Colonias del género <i>Azospirillum sp.</i>	49
4.4.2 Bacterias totales	51
V. CONCLUSIONES	54
VI. RECOMENDACIONES.....	55
VII. LITERATURA CITADA	56
APÉNDICE.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Páginas

Cuadro 3.1. Tratamientos aplicados en las raíces de Mezquite y Huizache.....	32
Cuadro 3.2. Composición de medio selectivo para bacterias del género Azospirillum.....	34
Cuadro 3.3. Aplicación de tratamientos de inoculación con Azospirillum sp en Prosopis glandulosa y Acacia farnesiana.....	37
Cuadro 4.1. Pruebas bioquímicas que identifican la Cepa-5 de Azospirillum en raíces de Mezquite y Huizache.....	40
Cuadro 4.2. Cuadrados medios de la cuantificación de Cepa-5 de Azospirillum en raíz de Mezquite y Huizache.....	42
Cuadro 4.3. Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) en la cuantificación de bacterias del género Azospirillum en raíz de Mezquite y Huizache.....	43
Cuadro 4.4. Cuadrados medios de la cuantificación de la Cepa5 de Azospirillum en raíz sin considerar especie de planta.....	44
Cuadro 4.5. Prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 en la cuantificación de bacterias del genero Azospirillum sin considerar especie.....	45
Cuadro 4.6. Cuadrados medios de la cuantificación de Azospirillum en bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.	46
Cuadro 4.7. Prueba de comparación de medias de Duncan ($P \leq 0.05$) en bacterias totales de Azospirillum en raíz de Mezquite y Huizache.....	47
Cuadro 4.8. Cuadrados medios de la comparación de bacterias del género Azospirillum con bacterias totales sin considerar especie de planta.....	47
Cuadro 4.9. Prueba de comparación de medias Duncan con un nivel de significancia de 0.05 en la diferencia de Azospirillum con bacterias totales.	49

Cuadro 4.10 Cuadrados medios con arreglo factorial 2 x 2 de la cuantificación de bacterias del género Azospirillum en raíz de Mezquite y Huizache.	50
Cuadro 4.11 Prueba de comparación de medias de Duncan ($P \leq 0.05$), en la cuantificación de bacterias del género Azospirillum en raíz de Mezquite y Huizache en medio NFb.....	50
Cuadro 4.12 Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) aplicando tres concentraciones de ácidos húmicos en la cuantificación de bacterias del género Azospirillum en raíz de Mezquite y Huizache.	51
Cuadro 4.13 Cuadrados medios con arreglo factorial de la cuantificación de bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.....	52
Cuadro 4.14 Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan ($P \leq 0.05$), en la cuantificación de bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.....	52
Cuadro 4.15 Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) aplicando tres concentraciones de Ácidos Húmicos en la cuantificación de bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas.
Figura 2.1. Estructura de una raíz y la rizosfera correspondiente.....	17
Figura 4. 2 Prueba de movilidad positiva en mezquite.....	41
Figura 4.3 Prueba de movilidad positiva en Huizache	41
Figura 4.4. Prueba de Catalasa positiva	41

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de analizar la viabilidad en base al crecimiento y concentración del *Azospirillum sp.*, en raíz de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) y Huizache (*Acacia farnesiana*). Ambas especies utilizadas en la reforestación requieren nutrientes que se pueden proporcionar por adición de materia orgánica, mejoradores y biofertilizantes. En esta investigación se analizaron raíces de 20 plantas de Mezquite y Huizache, con 4 repeticiones por cada una. Con pruebas bioquímicas se determinó que la bacteria analizada pertenece al género *Azospirillum sp.* Los datos se analizaron mediante diseño completamente al azar y con arreglo factorial 2 x 2, obteniendo la mayor viabilidad de la C-5 (*Azospirillum sp.*), en Mezquite con la concentración 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 3% y para Huizache con la concentración 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 1 %. Las bacterias totales presentes en la raíz se incrementan en Mezquite con concentración de 10^8 ufc ml^{-1} y ácido húmico al 3 % y en Huizache con la concentración 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 1 %. Al analizar los datos con arreglo factorial 2 x 2 el crecimiento de bacterias del género *Azospirillum sp.*, aumentaron con la concentración 10^{10} ufc ml^{-1} en ambas especies, y con ácidos húmicos al 3% en Mezquite y del 1% en Huizache y en la cuantificación de bacterias totales la interacción de los dos factores (*Azospirillum sp.* y ácido húmico), mostraron alta significancia lo cual nos dice que para el crecimiento de otras bacterias influyó el ácido húmico, pero para el crecimiento del género *Azospirillum* no se ve afectada por la aplicación de ácido húmico.

Palabras clave: *Prosopis glandulosa*, *Acacia farnesiana*, *Azospirillum sp.*, inoculación, concentración.

I. INTRODUCCIÓN

El Matorral xerófilo reúne las comunidades arbustivas de las zonas áridas y semiáridas de la República Mexicana, con clima seco estepario, desértico y templado con lluvias escasas. La temperatura media anual varía de 12 a 26 °C. Su flora se caracteriza porque presenta un número variable de adaptaciones a la aridez, como son la microfília, la presencia de espinas y la pérdida de hojas en temporadas desfavorables, por lo que hay numerosas especies de plantas que sólo se hacen evidentes cuando el suelo tiene suficiente humedad y materia orgánica.

Las plantas de las zonas áridas y semiáridas tienen adaptaciones especiales relacionadas con el acceso al agua del suelo, que se realiza mediante el desarrollo de raíces horizontales hasta de 30 metros y raíces verticales de 15 metros de profundidad facilitando el acceso de agua. Las especies de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) y Huizache (*Acacia farnesiana*) son freatofíticas ya que extraen agua del subsuelo mediante su gran sistema radicular; se consideran resistentes a la sequía y se presentan en áreas con precipitaciones menores de 250 a 500 milímetros o más según la región.

En México, el mezquite y el huizache son considerados como recurso maderable de importancia económica, debido al uso de su madera en la elaboración de muebles, artesanías, pisos y carbón; además se utiliza como leña en raja, brazuelo, para postes de cercos, tablas, tablones, durmientes, curtientes, corteza, trozo en rollo, prevenir o reducir la erosión de suelo, etc.; el primero se usa también como una fuente de energía y/o como alimentación (goma arábiga), y el segundo como medicinal y para curtir. Es la fuente de un aceite usado en la perfumería.

El proceso de fijación de nitrógeno es importante en los ecosistemas forestales, fijando al año entre 0,5 a 5 kg ha⁻¹ (Fisher y Binkley 2000). Los microorganismos que llevan a cabo este proceso representan aproximadamente el 5% de la población bacteriana total y se encuentran en la superficie de varios órganos de los arboles, tejidos radiculares y foliares, suelo y tubérculos de ectomicorrizas (Chanway 1999, Rosch *et al.* 2002, Paul *et al.* 2007). Además, estas bacterias al ser usadas en la regeneración artificial de bosques, incrementan el desarrollo de plántulas de diferentes especies de coníferas (Chanway 1997).

El género *Azospirillum* pertenece al grupo de las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal, fin por el cual se las emplea habitualmente como inoculante fijador de nitrógeno, productor de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citocininas, así como de producir sideróforos y bacteriocinas, *Azospirillum* es un habitante a menudo de la

rizosfera de una amplia variedad de plantas así como en diversas regiones climáticas del mundo. Aún cuando son más frecuentes en regiones tropicales, también se les encuentra en regiones, templadas, frías y desérticas.

Las condiciones ambientales (suelo, clima, fertilización, etc.) y las características de los microorganismos nativos e introducidos son factores determinantes para la sobrevivencia y actividad en la rizosfera. La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales (Levanony, *et al.*, 1991, Kapulnik *et al.*, 1985).

La aplicación de *Azospirillum* a diferentes tiempos no tienen una influencia significativa en el rendimiento aéreo y radicular del sorgo; sin embargo, a diferentes dosis (1 y 3 ml) y concentraciones (de 10^4 a 10^8 ufc ml^{-1}) los resultados difieren (Hernández *et al.*, 1996).

El Mezquite (*Prosopis glandulosa*) y el Huizache (*Acacia farnesiana*) son plantas de importancia económica en la región norte del país donde predomina el clima árido y semiárido, significan un ingreso económico para las familias de la región, por esto y porque son especies forestales que se utilizan para la reforestación en suelos degradados es importante que se realicen estudios e investigaciones sobre estas especies para aportar alternativas de tratamiento para una mejor y mayor adaptación, crecimiento y

desarrollo, en suelos pobres de nutrientes, mediante la inoculación de la bacteria del género *Azospirillum* que fija Nitrógeno en las plantas.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la viabilidad en base al crecimiento y concentración del *Azospirillum sp.*, en raíz de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) y Huizache (*Acacia farnesiana*)

1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Aislar por medio NFB y reconocer por pruebas bioquímicas bacterias del género *Azospirillum sp.* de raíces de Mezquite y Huizache.
- 2.- Reproducir y cuantificar las colonias la cepa C5 de *Azospirillum* y las bacterias totales en la raíz de Mezquite y Huizache.
3. Identificar la concentración de bacteria y ácidos húmicos que incremente la concentración de *Azospirillum*.

1.2. HIPÓTESIS

H₀: existen diferencias estadísticas entre la inoculación del *Azospirillum* y la producción de adhesinas en la raíz permite la fijación de nitrógeno y producción de hormonas de crecimiento vegetal en plantas de Mezquite y Huizache.

H_a: Las raíces de plantas de Mezquite y Huizache no producen adhesinas en la raíz inhibiendo la colonización del *Azospirillum* lo que afecta la fijación de nitrógeno y producción de hormonas de crecimiento vegetal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Mezquite (*Prosopis glandulosa*)

2.1.1. Origen

El origen del Género *Prosopis* no está claro, según Landeras y col. (2005) éste tuvo lugar hace unos 70 millones de años, antes de que Sudamérica y África se separaran. El Género es nativo de América, África y Asia y comprende 44 especies agrupadas en 5 secciones y seis series; se acepta la presencia de dos grandes centros de diversidad para *Prosopis*: el México-Texano y el Argentino- Chileno-Peruano (Bukart 1976). A pesar de ser un árbol muy común y de importancia económica en gran parte del país, existen muy pocos trabajos de investigación sobre el efecto de la inoculación con las PGPB del género *Azospirillum*. El mezquite es una planta con múltiples usos en los lugares en los que se desarrolla (Leyva, 2006).

2.1.2. Descripción botánica

El mezquite es un arbusto o árbol espinoso de hasta 10 m de altura, generalmente arbusto con varios tallos (Palacios, 2006); su sistema radical puede alcanzar más de 50 m de profundidad y hasta 15 m en sus laterales; los tallos son de corteza oscura y ramas con abundantes espinas axilares o terminales. Las hojas son compuestas, bipinnadas con 12 a 15 pares de folíolos oblongos o lineares, de 5 a 10 mm de largo. Las flores son de color amarillo verdoso, agrupado en racimos, miden de 4 a 10 mm, son bisexuales, actinomorfas, con 5 sépalos y 10 estambres. El fruto es una vaina de color paja o rojizo violáceo; con forma de lomento drupáceo, alargado, recto o arqueado y espiralado en algunos casos, indehiscente, de 10 a 30 cm de longitud, puede ser plano o cilíndrico en la madurez y contiene de 12 a 20 semillas (CONAZA e INE, 1994).

Prosopis glandulosa var. *torreyana* es un arbusto o árbol pequeño de espinas grandes que alcanza una altura de más de 9 m; tiene de 8 a 20 pares de folíolos en un par de pinnas (rara vez dos pares), de linear a oblongos de 15 a 22 mm de longitud que es de 7 a 9 veces su ancho y generalmente están espaciados de 5 a 6 mm de separación, pueden ser glabros o ciliados con vellosidades cortas en los márgenes; las vainas son de 10 a 25 cm de longitud y de 1 a 1.5 cm de ancho, de color paja cuando madura (CONAZA e INE, 1994).

2.1.3. Clasificación taxonómica

La clasificación del mezquite, *Prosopis glandulosa*, según (Bukart, 1976).

Reino: Vegetal

Phillum: Spermathophita

Subphilum: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Subfamilia: Mimosoideae

Género: *Prosopis*

Especie: *glandulosa*

2.1.4. Importancia ecológica y económica

Desde el punto de vista ecológico, los mezquiales son importantes en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, son hábitat para la fauna silvestre, mejoran la estética del paisaje y el funcionamiento de las cuencas hidrológicas. (Meza 2009).

El mezquite tuvo una crucial importancia para los primeros pobladores de las regiones áridas y semiáridas, por los usos en cada pueblo. Por ejemplo como alimento, combustible, sombra, para la elaboración de juguetes y utensilios y como planta medicinal. (CONAZA- INE 1994). Los mezquites son benéficos tanto por sus vainas como por su madera. Por lo tanto, su importancia económica es también amplia, sobre todo por el ecosistema en el que se desarrolla, ya que es una parte importante del

paisaje de lugares semidesérticos, donde las condiciones extremas de humedad y temperatura no permiten que crezcan muchos árboles; así que el mezquite proporciona muchas facilidades a los pobladores de esos lugares (Leyva, 2006). Dentro de los usos maderables de la especie se encuentra el de brazuelo, tablas y tablones, postes para cerca, trozas en rollo, durmientes, etc.; además en la elaboración de muebles artesanales, destacando los trabajos de marquetería con madera de mezquite, elaborados en Zacatecas. Uno de los principales rubros de explotación es el de la leña y el carbón, este último por sus bajos costos de producción en México han determinado el incremento de exportaciones a Estados Unidos (Meraz, *et. al.* 1998). En varias regiones de México se utiliza como alimento, las vainas tienen un 80% de carbohidratos con gran contenido de fibra, 13% de proteínas y 3% de grasas. En algunas regiones se utiliza para preparar una bebida refrescante llamada mezquitatol, y la fermentación de las vainas produce una bebida semejante al whisky (SEMARNAT, 2001).

Cuando el mezquite es herido en su corteza o ramas, produce un exudado conocido como goma, la cual se ha examinado para determinar su semejanza con la goma arábiga. Para uso medicinal, la infusión de algunas partes de la planta se usa para combatir la disentería, infecciones en los ojos, se ha utilizado como purgante. Otros beneficios de las poblaciones de mezquite es su aporte como fuente de forraje para el ganado doméstico y fauna silvestre; las flores son eventuales productoras de polen y néctar para la producción de miel y cera en las explotaciones apícolas, (Meza; 2003).

2.2. Huizache (*Acacia farnesiana*)

2.2.1. Origen

Acacia es un género de arbustos y árboles de la Familia *Leguminosae*, Subfamilia *Mimosoideae* (World Wide Wattle, 2004), compuesto por más de 1,300 especies, que se distribuyen en forma natural en todos los continentes con la excepción de Europa, Más de 900 de estas especies son nativas de Australia y las restantes de las regiones tropicales secas y templadas cálidas de África, sur de Asia y América. Estas especies se encuentran distribuidas desde el suroeste de Estados Unidos hasta Sudamérica.

2.2.2. Descripción arbustiva

Acacia farnesiana (L.) Willd., conocido comúnmente como aroma o huisache, es un arbusto o árbol pequeño caducifolio y de tallos múltiples caracterizado por una copa esparcida y densa, ramas espinosa y fragantes (Parrota, 1992).

El tronco presenta ramas armadas con espinas rectas en pares, las hojas del huizache no caen en otoño o invierno. Presentan folíolos numerosos, estos son pequeñas láminas largas y aplanadas de color verde, las flores aparecen de Marzo a Mayo. Se presentan en cabezuelos con forma de globo de color amarillo intenso y muy perfumado, el fruto es una vaina

lisa, de forma cilíndrica algo encorvada de color negro al madurar, esta no se abre, contiene de seis a doce semillas en dos hileras. (Alanís y Ballester, 2007)

2.2.3. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Phillum: Spermathophyta

Subphillum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Acacia*

Especie: *farnesiana* (L) Willd

2.2.4. Importancia ecológica y económica

El huizache se considera como una especie útil como rompevientos, en la reforestación de bosques secos y áreas de pastizales degradados (Parrota, 1992). La madera del huizache se usa principalmente para la fabricación de artesanías, así como de utensilios de cocina; para la elaboración de Implementos agrícolas, mangos para

herramientas (hacha), postes, cercas, muebles, fabricación de paraguas y marcos finos, como también para el aserrío; en las zonas rurales lo usan para la construcción y para la obtención de leña y carbón, ya que tiene combustión lenta y alto contenido calórico. El tronco emana una goma que se usa como sustituto de la goma arábiga y se utiliza como mucílago. El jugo de las vainas inmaduras se utiliza para pegar porcelana rota. El aceite esencial se obtiene de las flores por maceración en manteca de cacao o en aceite de coco. Tiene olor a violetas y se usa para perfumar pomadas, polvos, roperos, ropa. Por su aceite se cultiva extensamente en Francia, India, etc. Su principal utilidad radica en el uso del aceite o esencia en la industria de la perfumería. La corteza y vainas son ricas en tanino la cual se usa en curtidurías para curtir y teñir cueros y redes. Las vainas del fruto contienen 12 a 18 % de taninos. Las flores y frutos contienen pigmentos que se usan para teñir telas de seda y papel tapiz. La vaina pulverizada y hervida produce un líquido negro que puede ser utilizado como tinta. Las hojas, vainas, flores y vástagos se emplean como forraje para ganado vacuno y caprino, especialmente durante el invierno. Las raíces tienen olor fuerte y se usan como antídoto de venenos.

En México, el huizache tiene muchos usos en la medicina tradicional; el cocimiento de las flores se usa como remedio en casos de dispepsia. De las flores se hace un ungüento que se usa como remedio para el dolor de cabeza. Con el fruto verde, que es muy astringente, se prepara una infusión para las inflamaciones de la piel y de las membranas mucosas (fuegos,

hemorragias) y para calmar trastornos del sistema nervioso. Raíz (cocimiento): disentería, tuberculosis y dolor de abdomen. Tallo: estado bilioso, evacuaciones amarillas, ictericia, dolor de muelas. Las hojas secas y pulverizadas, se aplican como vendaje en las heridas. Planta: astringente en medicina casera, fiebre tifoidea, hemorragias, problemas menstruales, artritis y dolores reumáticos, tónico digestivo, diarrea, irritación de mucosas, conjuntivitis y malaria. (CONAFOR 2008)

2.3. Bacterias benéficas para las plantas

Los microbios que habitan en la zona de la rizósfera son organismos benéficos, neutros y dañinos para las plantas (Atlas y Bartha, 2002; Narula, *et al.*; 2005). Los microorganismos tienen funciones específicas para mejorar la productividad de la planta, incluyendo fijación de N, solubilización de P, promoción del crecimiento vegetal y control biológico de patógenos de la planta (Canbolat, *et. al.*; 2006). Las bacterias que ejercen efectos benéficos en el desarrollo y producción de la planta son llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) (Canbolat, *et. al.*; 2006; Kloepper, 1993). Este tipo de bacterias son capaces de colonizar las raíces, convertir el N atmosférico a amonio, solubilizar el P inorgánico insoluble a P soluble y disponible para las plantas (Rivera-Cruz y Trujillo, 2008). A las bacterias fijadoras de N se les llama diazotróficas y se les clasifica como *Azospirillum*, *Azotobacter* o *Pseudomonas ssp.* (Marschner, 1995).

Entre las especies de PGPB más ampliamente estudiadas se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR siglas en Inglés) las cuales colonizan la rizósfera y la superficie de las raíces. Algunas de las especies de PGPR tienen la capacidad de penetrar y proliferar en el interior de las raíces, y de este órgano trasladarse a través del sistema vascular, y sin causar daño, establecerse y desarrollar poblaciones endófitas en los tejidos internos de las plantas, ya sea en el tallo, hojas u otros órganos. Las PGPR favorecen el crecimiento de la plantas a través de diferentes mecanismos entre los que se destaca la fijación biológica de nitrógeno. La síntesis de fitohormonas como las auxinas, particularmente el ácido indol acético, promueven el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, mejorando la absorción de agua y minerales del suelo y con ello el mejor y mayor desarrollo de la planta (Caballero,2006).

Una fuente favorable de material microbiano para inoculación son las PGPB para uso agrícola (tales como *Azospirillum sp*, *Pseudomonas sp*, y *Bacillus sp*) y hongos. Muchas plantas nativas responden positivamente a la inoculación mejorando su crecimiento. Sin embargo, aquellos microorganismos nativos que crezcan y sobrevivan en suelos con alta dureza son mejores candidatos para inocular las plantas nativas. Una fuente potencial de estos microorganismos son plantas del desierto creciendo en rocas en ausencia de suelo, siendo ésta una de las condiciones que inhibe el crecimiento en la mayoría de las plantas. (Bashan y col., 2006).

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia (suelo rizosférico) son denominadas “rizobacterias” (Kloepper, 1994 y 1996). Las Rizobacterias beneficiosas conocidas en la literatura con el acrónimo PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), desempeñan funciones clave para la planta tales como: control biológico de patógenos mediante efectos antagonistas o Inducción de Resistencia Sistémica (Van Loon, *et. al.*; 1998), incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales como por ejemplo la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno o la fitoestimulación al estimular la emergencia o el enraizamiento. Las PGPR deben de cumplir tres características intrínsecas (i) ser capaces de colonizar la raíz, (ii) deben ser capaces de sobrevivir y multiplicarse en los microhábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural al menos hasta ejercer su actividad promotora del crecimiento y (iii) deben ser capaces de estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994; Collados, 2006).

2.3.1. La rizósfera

La rizósfera es una zona ecológica del suelo y ha sido utilizada por diferentes investigadores en el mundo para estudiar el comportamiento de microorganismos benéficos y patógenos para las plantas, también para las interacciones entre microorganismos-planta y microorganismo-microorganismo. En estos estudios se considera tres regiones de estudio; la rizósfera, el rizoplano y el suelo a distancia. La rizósfera es el volumen de

suelo adyacente al sistema de raíces de las plantas, es influenciado por los exudados de raíz y mide cinco milímetros (Raina, *et. al.*, 2000; Kennedy, 2005) y en el que se desarrolla una población microbiana muy superior a la del resto del suelo (Fuentes, 2007). Está constituida por dos regiones; el rizoplano y el suelo adherido (Figura 2.1). En la práctica cuando se muestrea en campo se colecta la raíz con suelo adherido a ella. El rizoplano es la raíz sin suelo adherido, en ella se establecen principalmente microorganismos que forma asociación simbiótica y mutualista con la planta. El suelo a distancia, es considerado al suelo sin influencia de raíces, puede ser más allá de los 5 mm de la raíz primaria, secundaria o terciaria.

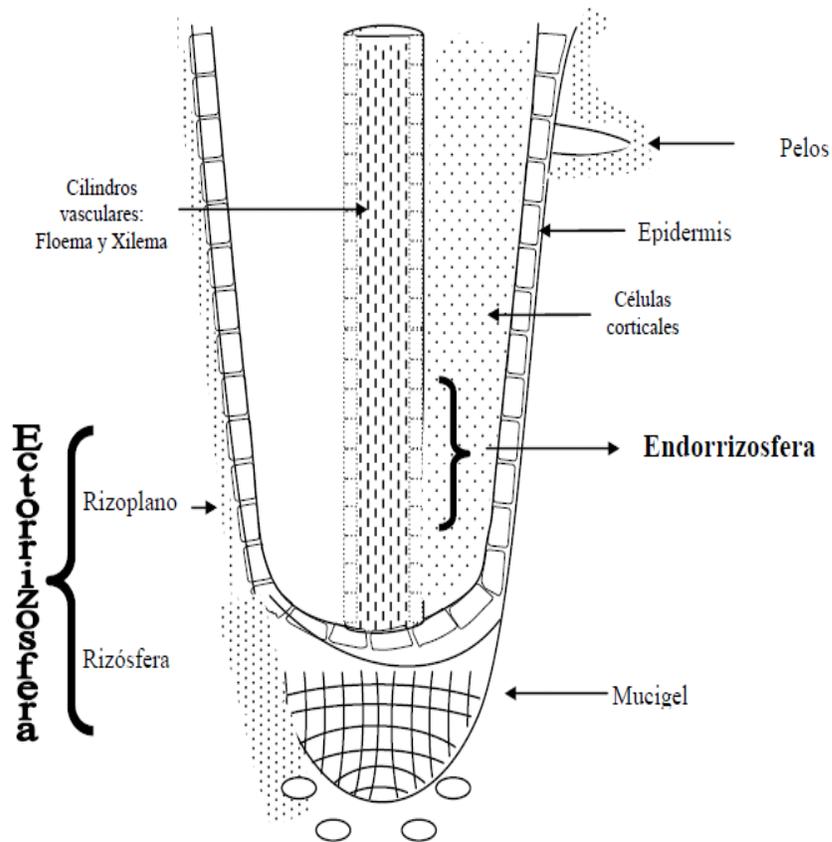


Figura 2.1. Estructura de una raíz y la rizosfera correspondiente.

Fuente: adaptado, Brimecombe, *et. al.*, 2001.

2.3.2. Nitrógeno en la planta

La planta absorbe el N en formas de compuestos amónicos, nitrosos y nítricos. Bajo estas formas, y mediante su sistema radicular, la planta absorbe el nitrógeno que le es necesario para la síntesis de sus tejidos. Aproximadamente se considera que este elemento constituye el 2 % en peso seco de las plantas. Los mayores contenidos de N en las plantas se encuentran en las hojas jóvenes, el porcentaje oscila entre 5.5 y 6.5 % en peso seco. En la planta el N se encuentra en forma orgánica (purinas, pirimidinas, porfirinas, vitaminas, alcaloides y enzimas), proteica y de compuestos más simples. (Navarro y Navarro, 2003). El 90 % del N absorbido por la planta se acumula en la parte aérea, del cual más del 41 % se encuentra en las hojas y el 20 % en el fruto, entra como componente de las proteínas, clorofila y aminoácidos (Trocme y Gras, 1979; Amorós, 2003). Es parte de las hormonas citocinina y auxinas, por lo que estimulará el crecimiento de las hojas, frutos, tallos, etcétera. Se ha establecido que entre mayor sea el contenido de N en la hoja, más alto resulta el contenido de clorofila y, por lo tanto, aumenta la capacidad fotosintética (Díaz, 2002).

2.3.3. Fijadores de Nitrógeno

El N que se localiza en el suelo procede de la atmósfera, pero el N₂ atmosférico no puede ser utilizado directamente por los seres vivos, salvo en el caso de algunos microorganismos. Para que el nitrógeno atmosférico sea

absorbido por las plantas y la mayoría de los microorganismos, éste tiene que formar parte de otros compuestos químicos, este proceso se llama fijación (Fuentes, 2002). Como las plantas no pueden metabolizar el N_2 a proteínas, antes debe transformarse a N asimilable siguiendo uno de estos caminos: fijación por microorganismos que viven en simbiosis con las raíces de leguminosas, fijación por microorganismos libres del suelo, fijación como óxidos por descargas eléctricas en la atmósfera y fijaciones como NH_3 , NO_3^- o CN^{2-} por los fabricantes de fertilizantes nitrogenados (Villalobos, *et. al.*, 2002).

Hay cuatro grupos importantes de organismos implicados en el proceso del N: bacteria, hongos, cianobacterias (algas verde-azules) y algas. Cada grupo es diverso (Loomis y Connor, 2002) y se pueden clasificar en fijadores libres y en los que se hallan en asociaciones simbióticas (Loomis y Connor, 2002; Coyne, 2000).

2.3.3.1. Género *Azospirillum*

Spirillum lipoferum fue aislado y descrito por Beijerinck (1925) en Holanda pero durante 50 años el autor fue ignorado, hasta que fue descubierto en Brasil por Bulow y Dobereiner (1975); Day y Dobereiner (1976).

En Argentina lo aislaron por primera vez Mezari, *et. al.* (1977), y debido a la creciente importancia de la fijación biológica del nitrógeno, el conocimiento sobre este género se incremento más.

2.3.3.1.1. Características de la bacteria

Azospirillum (α -subclase de las proteobacterias) es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizosfera de plantas. Tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico. Como fuentes nitrogenadas, *Azospirillum* puede utilizar un amplio rango de sustratos, amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, puede enquistarse, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de β -hidroxibutirato, que sirven a la bacteria de reserva de fuente carbonada. (Collados, 2006).

Es una bacteria móvil, que muestra gran variabilidad en el número y posición de sus flagelos. En medio líquido produce un solo flagelo mientras que en medio sólido se inducen diversos flagelos laterales, siendo diferente la cantidad y posición de estos flagelos para cada una de las especies del género *Azospirillum*. (Collados, 2006).

La presencia de flagelos proporciona la movilidad necesaria para dirigirse hacia lugares donde la presencia de nutrientes sea más favorable. Presenta quimiotaxis positiva hacia ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, compuestos aromáticos y hacia exudados radicales. Esta capacidad de migración se ha visto que es altamente dependiente de la humedad del

suelo. Este género además tiene tendencia a dirigirse hacia lugares donde la concentración de oxígeno sea la adecuada (denominada aerotaxia). Este comportamiento permite a la bacteria dirigirse hacia un nicho ecológico apropiado en la rizósfera donde poder producir la fijación biológica del nitrógeno y sustancias estimuladoras del crecimiento. (Collados, 2006).

La prueba de movilidad sirve para determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles. El medio manitol en movilidad permite la realización de esta prueba gracias a ser semisólido ya que presenta solamente 3.5 g/l de agar. En estas condiciones, las bacterias móviles produzcan un enturbamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por el contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron Benavides y Hermida, (2008).

La prueba de catalasa se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, Benavides y Hermida, (2008).

Tarrand, *et. al.*, (1978), encontraron que las bacterias del género *Azospirillum* son ligeramente curvas y de forma bacilar, de diámetro y

longitud de 2.1-3.8 μm son móviles en medio líquido con un flagelo polar, en medio sólido a 30°C presenta numerosos flagelos laterales cortos y fijan el nitrógeno atmosférico. Se asocian a las raíces de cultivos de cereales, pastos y plantas tuberosas, no son formadoras de nódulos en las raíces.

Pozdnyakova y Kanevskaya, (1989), aislaron de cereales, bacterias del género *Azospirillum*, las cuales fueron identificadas a nivel de especies por estudios morfológicos, así como por sus propiedades fisiológicas. De acuerdo a la composición del ADN y de un homólogo de ADN, aislaron dos tipos de cepas *Azospirillum brasilense* sp7 (ATCC 29145) y *lipoferum* sp29b (ATCC 29707).

2.3.3.1.2. Clasificación taxonómica

La clasificación como género de *Azospirillum* fue hecha por Tarrand et al (1978), para sustituir el antiguo nombre *Spirillum* y su división en las especies A.

Reino: Procaryote

División: Gracillicute

Clase: Scotobacteria

Familia: No existe

Género: *Azospirillum*

Especie: *Sp.*

lipoferum

brasileense

amazonense

haloproferenses

irakenses

2.3.3.1.3. Fijación del nitrógeno por la bacteria

Jena et al (1992), aislaron seis cepas de *Azospirillum* y estudiaron la respuesta a la fijación de nitrógeno después de la aplicación de agroquímicos. Al aplicar carbofurano (250 gr. /frasco) hubo una estimulación significativa en la fijación de nitrógeno. La concentración de nitrógeno varió debido a las cepas aisladas. La aplicación combinada de nitrógeno causó un decremento en la fijación neta de nitrógeno particularmente con *Azospirillum sp.*

Evans (1975) y Brown, *et. al.*, (1975), mencionan que la fijación de nitrógeno es un proceso clave para llevar un equilibrio en la vida de este planeta, por ésta razón se recobra el nitrógeno que se pierde por la desnitrificación microbiana en el suelo. Existe también la posibilidad de que la

fijación del nitrógeno por la nitrogenasa estimula el desarrollo de catalizadores que pueden reducir la demanda energética para el nitrógeno fijado industrialmente.

Cada nitrógeno que se fija al suelo requiere aproximadamente de 12 a 24 moléculas de ATP. Alcalde (1981), presentó cuatro requerimientos para la fijación de nitrógeno en la bacteria:

- a) Un eficiente metabolismo oxidativo.
- b) Un mecanismo de protección contra el oxígeno para evitar la depresión de la actividad nitrogenasa por el oxígeno.
- c) Una buena fijación del nitrógeno, con asimilación del NH^{+4} y sin crecimiento de la bacteria.
- d) Una rápida excreción del ion NH^{+4}

2.3.3.1.4. Actividad de la bacteria

Gamo y Toriyama (1989), mencionan que la fijación de la bacteria *Azospirillum sp.*, es microaerofílica, ésta fue aislada de la raíz de varios cereales y forrajes de pasto en Nagano, Okinawa, Filipinas y Tailandia. La mayoría de las especies de *Azospirillum sp.*, aislados mostraron ser del tipo *A. brasilense*, el cual no puede utilizar al carbón como única fuente de glucosa. Cuando se usaron éstos inoculos en las raíces de maíz, arroz o plantas de trigo, algunos de los inoculos aislados promovieron notablemente el desarrollo de las raíces y brotes de maíz.

2.3.3.1.5. Formas de Inoculación con *Azospirillum*

Álvarez (1983), aislaron por siembra *Azospirillum sp.*, a partir de un trozo pequeño de raíz, en medio semisólido y para reconocer las colonias de ésta bacteria, Rodríguez (1981), agregó rojo Congo a los medios de cultivo y observó al microscopio, encontrando la bacteria mencionada anteriormente.

Freitas y Germia (1990), desarrollaron un procedimiento para el crecimiento de raíces de trigo de invierno. Este sistema se usó para estudiar las interacciones, raíz-bacteria y la colonización de raíces por cepas de *Pseudomonas Cepacia* R55 y R88, *Azospirillum brasilense* ATCC 29729 y *Azotobacter chroococcum* ATCC 9043. El cultivo de tejido axénico de raíces se inoculó con bacterias e incubó a 25°C en un agitador rotatorio mecánico a (150 rpm) durante 3 semanas. Se determinó en diferentes intervalos, la morfología de la raíz y el desarrollo de pelos radiculares, colonización de la bacteria en la superficie de la raíz y la actividad nitrogenasa. El recuento de las bacterias se realizó por la técnica de conteos bacterianos en placa, la concentración de las bacterias varió de 7.5×10^4 a 3.2×10^7 formando unidades de colonias en cm. El examen con microscopía electrónica de raíces inoculadas reveló que aumenta significativamente el desarrollo de pelos radiculares y otros sitios de exudados colonizados en raíces.

2.3.3.1.6. Suelos inoculados con *Azospirillum* sp

Álvarez y Lemus (1980), encontraron una alta incidencia de *Azospirillum lipoferum* y de *Azospirillum brasilense* en suelos donde éstas bacterias son autóctonas por ser atraídas por exudados radiculares, en gramíneas (maíz, trigo y sorgo) el análisis de los exudados se realizó en las tres semanas de crecimiento en las plantas en condiciones estériles y en medio hidropónico.

Aparentemente, *Azospirillum* puede mantenerse viable bajo condiciones severas: ha sido recobrada de agar disecado después de varios años lo que probablemente se deba a su capacidad de enquistación. Sin embargo, se debería tener en cuenta su habilidad para sobrevivir en número suficiente para asegurar la colonización y proliferación sin la planta hospedera, al ser usada como inoculante en experimentos de campo (Del Gallo y Fendrik, 1994).

2.3.3.1.7. Aplicación y concentración de inoculación con *Azospirillum*

El medio de cultivo utilizado universalmente para obtener un óptimo crecimiento de este género bacteriano corresponde a un sustrato denominado NFb (nitrogen free broth) utilizando malato como fuente de carbono (Döbereiner *et al.*, 1976).

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, pero resulta inadecuado puesto que el tiempo de sobrevivencia de *Azospirillum* en suelo es relativamente corto en ausencia de un acarreador. 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. 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-toxica, que contiene una población bacteriana basta y uniforme, permite la liberación gradual de las bacterias durante periodos largos hasta un mes y puede ser producido a gran escala. (Bashan *et al*, 1996).

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 inoculo; cuando este 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, en vegetales y plantas de cultivos comerciales es de alrededor de 10^5 y 10^6 ufc/ml. Una concentración de inoculo de $10^8 - 10^9$ ufc ml^{-1} generalmente inhibe el desarrollo radicular (Bashan 1986, Bashan et al 1989, Kapulnik et al 1985, Okon y Kapulnik 1986, Smith et al 1984, citados por Bashan *et al* 1996). Al agregar *Azospirillum* en concentraciones mayores a 10^8 ufc ml^{-1} se inhibió el proceso de elongación de las raíces. La inoculación de *Azospirillum* a una concentración de 10^9 ufc ml^{-1} provocó un incremento en la producción endógena de etileno por las raíces (Bashan *et al*, 1996).

Mendoza *et al* (2004) Encontraron que la cinética de crecimiento de *Azospirillum* en biorreactores de 3 y 20 litros. Empleando el sistema Fed-batch se logró la concentración máxima de biomasa bacteriana, de 9 unidades de densidad óptica, equivalente a 7.2×10^{10} ufc ml^{-1} , y el mínimo fue 7.5 de densidad óptica equivalente a 6×10^{10} bacterias/ml logrado en sistema batch. El máximo número de bacterias capaces de invadir el tejido interno por gramo de tejido fue de 1×10^3 ufc ml^{-1} . Esta concentración fue decayendo mientras que las plantas llegaban a la madurez.

La inoculación con *Azospirillum* a diferentes tiempos no tienen una influencia significativa en el rendimiento aéreo y radicular del sorgo; sin embargo, a diferentes dosis (1 y 3 ml) y concentraciones (de 10^4 a 10^8 ufc ml^{-1}) los resultados difieren (Hernandez *et al.*, 1996).

En un estudio realizado en *Prosopis glandulosa* Ramos (2012),

encontró que la concentración 10^8 con 1% ácidos húmicos, presento un mayor incremento radicular que los demás tratamientos aplicados, siendo las concentraciones 10^9 y 10^{10} , las que presentaron menor fijación de la bacteria de acuerdo con sus parámetros en la rizósfera. Por otro lado Escalante (2012) encontró en raíz de *Acacia farnesiana* que el mayor incremento en diámetro de planta lo obtuvo la concentración 2% de ácidos húmicos y 10^{10} de *Azospirillum sp*, mientras que longitud de raíz lo causaron los Ácidos Húmicos al 1% y 10^{10} ufc mil-1 de *Azospirillum sp*.

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales (Levanony, *et al.*, 1991, Kapulnik *et al.*, 1985).

La asociación de *Azospirillum* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes, (Michiels *et al.*, 1991). La primera consiste en una adsorción rápida débil y reversible, la cual es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas en conjunto con la participación del flagelo polar. (Croes *et al.*, 1993). La segunda fase consiste en un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 horas después de la inoculación, el cual parece ser independiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum*. (Michiels *et al.*, 1991).

López *et al* (2010) obtuvo que los contenidos de materia orgánica aumentan con la mezcla de las cantidades bajas de los ácidos húmicos de leonardita experimentales y las concentraciones altas de la bacteria *Azospirillum*. En la materia orgánica, hay efecto altamente significativo de los tratamientos. Así, de forma particular se puede establecer que al adicionar la mezcla de 2 ml. litro⁻¹ de agua de los ácidos húmicos de leonardita experimentales, con la bacteria *Azospirillum* a la concentración de 10⁹ unidades formadoras de colonias, se presentó la cantidad superior de materia orgánica y aventajó al testigo absoluto en 34 por ciento.

Pérez (2010) encontró que Las dosis bajas de ácido húmico (2 ml.Lt⁻¹) de leonardita y bacterias *Azospirillum*(10⁷ UFC), tienen efecto positivo en la distribución radicular del chile jalapeño, aumentando el área y ancho de raíz. Para el peso fresco de la raíz se elevó al aplicar las dosis de 2 ml.Lt⁻¹ de ácido húmico más 10⁷ UFC de bacterias *Azospirillum* y 4 ml.Lt⁻¹ de ácido húmico más 10⁹ de *Azospirillum* superando al testigo y el tratamiento que presentó mayor área radical fue la combinación de 2 ml.Lt⁻¹ de ácido húmico más 10⁷ UFC de *Azospirillum*, superando al testigo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área experimental

El estudio se realizó en el laboratorio de minerales del Departamento de Horticultura, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista Saltillo, Coahuila. México, se ubica en las coordenadas geográficas 25° 21' 20" latitud N y 101° 02' 07" longitud W, a una altitud de 1763 msnm.

3.2. Selección de muestra

Este trabajo es continuación de dos estudios realizados por alumnos de la carrera de Ingeniero Forestal que presentaron el proyecto de tesis como requisito para su titulación con los siguientes títulos; "Aplicación de ácidos húmicos y *Azospirillum sp.* en mezquite (*Prosopis glandulosa*)." Y "Aplicación de ácidos húmicos y *Azospirillum sp.* en huizache (*Acacia farnesiana*)." Esta investigación tiene como objetivo demostrar la sobrevivencia de la bacteria en raíces de Mezquite y Huizache, para lo cual se realizaron los siguientes procedimientos.

El experimento se inició con plantas de Mezquite (*Prosopis glandulosa*) y de Huizache (*Acacia farnesiana*), de seis meses, seleccionando 500 plantas homogéneas en altura. Se establecieron parcelas experimentales de 10 plantas, obteniendo 50 unidades experimentales (UE). En dónde se inoculó con tres concentraciones de *Azospirillum* Sp., cepa 5 aislada de raíces de trigo (Mendoza, 2009) y tres concentraciones de ácidos húmicos, los tratamientos se describen en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Tratamientos aplicados en las raíces de Mezquite y Huizache.

Tra	C. A. H.	CA (ufc ml ⁻¹)
T1	1%	10 ⁸
T2	1%	10 ⁹
T3	1%	10 ¹⁰
T4	2%	10 ⁸
T5	2%	10 ⁹
T6	2%	10 ¹⁰
T7	3%	10 ⁸
T8	3%	10 ⁹
T9	3%	10 ¹⁰
T10	S AH	SA

Dónde: Tra= tratamientos, C.A.H.= concentración de ácidos húmicos, A= concentración de *Azospirillum*, SAH= sin ácidos húmicos, SA= Sin *Azospirillum*

3.2.1 Aislamiento de rizobacterias

Las muestras se obtuvieron de 10 plantas de Mezquite y 10 de Huizache, de las cuales fueron obtenidas 4 repeticiones por cada una, de las raíces secundarias, se lavaron con agua destilada para eliminar el resto de

tierra, se colocaron en tubos de ensaye que contenían 5 ml de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.86 %, previamente esterilizadas.

3.3. Aislamiento del género *Azospirillum*.

Para aislar el género *Azospirillum* de otras bacteria que contiene la raíz se utilizó el medio de cultivo selectivo NFb Dobereiner y Day (1976), cuya composición se describe en el cuadro 2 y se prepara de la siguiente manera.

Las sales se disolvieron en 500 ml de agua destilada se añade azul de Bromotimol (5 gotas) ajustando el pH a 6.8 con hidróxido de sodio (0.1N) y posteriormente se incorpora el Agar disuelto previamente en agua destilada completándose a volumen de un litro, posteriormente el medio se coloca en una parrilla de calentamiento y agitación mecánica para mezclar todos los componentes, después se procede a esterilizar en olla de presión a 15 lb por 15 minutos; ya esterilizado el medio se reparte en cajas de petri previamente esterilizadas, y se espera a que solidifique para ser utilizado.

Cuadro 3.2. Composición de medio selectivo para bacterias del género *Azospirillum*.

Composición	g/lt
KH ₂ PO ₄	0.04
K ₂ H PO ₄	0.06
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
CaCl ₂	0.02
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.02
FeCl ₃	Trazas
Malato de Sodio	5
Agar	20
Azul de Bromotimol	0.5 (Alcohol)

Para aislar el género *Azospirillum* se realiza la siembra de las cepas en el medio de cultivo NFB de la siguiente manera:

Los tubos que contienen la solución salina y las raicillas se agitan manualmente y se toma una pequeña cantidad con el asa de platino y se siembra por estría en las cajas petri que contiene el medio NFb (Cuadro 3.2.), dichas cajas se incuban a 28°C ± 2°C por 72 horas. Transcurrido este tiempo las colonias que se desarrollaran en el medio NFb son las de las bacterias del género *Azospirillum*.

3.4. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a

partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no. Para realizar las pruebas bioquímicas se dispone de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio.

3.4.1. Prueba de movilidad

Para realizar esta prueba se preparó NFb líquido que se colocó en tubos de ensaye, en los cuáles se sembró por el método de picadura la colonia de *Azospirillum*, se incubo por 72 horas, pasado este tiempo se observó cada tubo de ensaye, si este presentaba crecimiento en forma de espiral la prueba es positiva, si el crecimiento es a lo largo de la picadura el resultado es negativo.

3.4.2. Prueba de catalasa

Con esta prueba se busca la presencia de la enzima catalasa, se utilizó el peróxido de hidrógeno, se realizó esta prueba con la ayuda de portaobjetos por medio del asa de platino para recoger el centro de una colonia y colocarla sobre el portaobjetos limpio de vidrio, en dónde fue depositada una gota de H₂O₂ al 33% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo, para la lectura de resultados. Prueba positiva: liberación de oxígeno (burbujeo) y negativo sin liberación de oxígeno.

3.5. Cuantificación de Colonias

Para la cuantificación de colonias se realizaron diluciones en tubos de ensaye que contenían 4.5 ml de agua destilada previamente esterilizada adicionando 0.5 ml de medio NFb semilíquido, a partir de la cual se realizaron diluciones de 10^1 ufc ml⁻¹ hasta la 10^{10} 10^{11} y 10^{12} ufc ml⁻¹, en estas últimas se contó número de colonias que compone cada muestra y repetición tomada de las raíces; y para las raíces testigo se contaron bacterias en diluciones de 10^6 10^7 y 10^8 ufc ml⁻¹.

3.6. Cuantificación de bacterias en raíces de plantas testigo

Para la cuantificación de las colonias se utilizó como medio de cultivo el agar nutritivo al 2 % posteriormente se colocó en el matraz Erlenmeyer con un agitador en una parrilla, donde se calentó hasta que se transparentara, después se esterilizó a 1.5 lb.

El medio de cultivo ya preparado se vació en cajas petri, para así poder sembrar en ellas, las muestras se tomaron directamente de los tubos de ensaye que contiene las raíces de las plantas testigo correspondientes a mezquite y a huizache, después de sembrar por estría en las caja petri se dejo en la incubadora por 72 hrs, pasadas estas horas se contabilizó el numero de colonias presentes.

Para obtener la concentración de bacterias del género *Azospirillum* se realizó una diferencia de unidades del género *Azospirillum* menos las unidades de bacterias totales que contenía la raíz. Teniendo el número de bacterias totales en cada repetición para cada tratamiento se procedió a obtener un número promedio de bacterias totales encontradas en raíz de Mezquite y Huizache, el valor obtenido se le restó a cada valor cuantificado de bacterias del género *Azospirillum* en raíz de Mezquite y Huizache.

3.7. Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue el de completamente al azar, con 10 tratamientos y 4 repeticiones cada una.

Cuadro 3.3. Aplicación de tratamientos de inoculación con *Azospirillum* sp en *Prosopis glandulosa* y *Acacia farnesiana*

T	DC.	Raíces			
		R1	R2	R3	R4
T1	1% - 10 ⁸	1	2	3	4
T2	1% - 10 ⁹	1	2	3	4
T3	1% - 10 ¹⁰	1	2	3	4
T4	2% - 10 ⁸	1	2	3	4
T5	2% - 10 ⁹	1	2	3	4
T6	2% - 10 ¹⁰	1	2	3	4
T7	3% - 10 ⁸	1	2	3	4
T8	3% - 10 ⁹	1	2	3	4
T9	3% - 10 ¹⁰	1	2	3	4
T10	TESTIGO	1	2	3	4

T= Tratamiento; DC= Dosis de concentración de Ácidos Húmicos y *Azospirillum* sp;

R1...R4=Repeticiones (raíces) que recibieron tratamiento.

3.8. Análisis estadístico

La captura de datos se efectuó mediante una base numérica utilizando una hoja de cálculo electrónica, anotando los números de colonias encontradas en cada respectiva medición, para realizar un análisis de varianza con las medias de crecimiento de colonias de bacterias, con la finalidad de determinar si existe diferencia o diferencias significativas entre los tratamientos y repeticiones.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software Statical Analysis System (SAS 9.1) el cual se utilizó para correr los datos con diseño completamente al azar y con arreglo factorial 2 x 2, este último para analizar el efecto de cada factor y la interacción de ambas (*Azospirillum* y ácidos húmicos) sobre la variable respuesta (crecimiento de la bacteria). Para la comparación de medias se utilizó el método de Duncan.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

$i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ (tratamientos)

$j=1, 2, 3, 4$ (repeticiones)

En donde:

Y_{ij} = Valor observado en las diferentes variables

μ = Efecto de la Media poblacional

T_i = Efecto verdadero del i -ésimo tratamiento

E_{ij} = Error experimental en la e -ésima repetición

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas bioquímicas

En el Cuadro 4.1 se reflejan las pruebas bioquímicas realizadas, donde todos los tratamientos resultaron catalasa positiva para las dos especies estudiadas, lo cual es común para el género *Azospirillum*. En la prueba de movilidad, el tratamiento 3 (10^8 ufc ml⁻¹ y 1 %) de ácido húmicos para Mezquite y Huizache presentaron solo el 50 % de *Azospirillum* ya que la bacteria presenta flagelos, igual que el 7 (10^8 ufc ml⁻¹ y 3 %) en Mezquite, esto significa que al disminuir la concentración de *Azospirillum* se debe a la competencia que existe con otras bacterias que existen en el ecosistema radicular. Características principales de *Azospirillum* que menciona Collados (2006): Es una bacteria móvil, que muestra gran variabilidad en el número y posición de sus flagelos. Y las pruebas bioquímicas descritas por Benavides y Hermida (2008).

Cuadro 4.1. Pruebas bioquímicas que identifican la Cepa-5 de *Azospirillum* en raíces de Mezquite y Huizache.

Tratamiento	Repetición	Movilidad		Catalasa	
		M	H	M	H
T1	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	-	+	+
T2	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	-	+	+	+
	4	+	-	+	+
T3	1	+	-	+	+
	2	-	+	+	+
	3	+	-	+	+
	4	-	+	+	+
T4	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
T5	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	-	+	+
T6	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	-	+	+
	4	+	+	+	+
T7	1	-	+	+	+
	2	-	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
T8	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
T9	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	-	+	+
T10	1	+	-	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+

Donde: M= Mezquite y H= Huizache; + = positivo y - es negativo



Figura 4. 2 Prueba de movilidad positiva en mezquite (*Prosopis glandulosa*)



Figura 4.3 Prueba de movilidad positiva en Huizache (*Acacia farnesiana*)

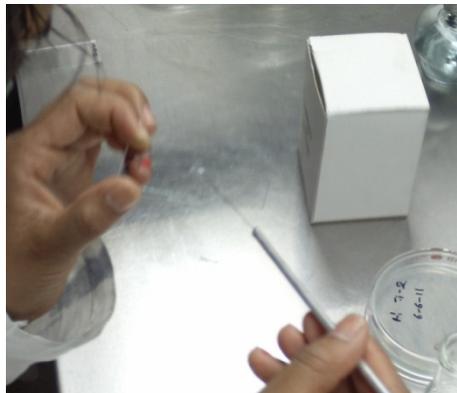


Figura 4.4. Prueba de Catalasa positiva

4.2. Cuantificación de Colonias del género *Azospirillum* sp.

El ANVA de la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* a un nivel de confianza del 95 % indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.05$) para las dos especies, como se puede observar en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2. Cuadrados medios de la cuantificación de Cepa-5 de *Azospirillum* en raíz de Mezquite y Huizache.

Fuente de variación	GL	CM		F	
		Mezquite	Huizache	Mezquite	Huizache
TRATAMIENTOS	9	4613560289.2	87750537577	2.29*	2.37*
ERROR	30	2016925009.2	37080000008		
TOTAL	39				
CV (%)		121.29	216.35		

Dónde: GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor estadístico de prueba, CV= Coeficiente de Variación y *=Significativo

La presentación de los resultados en la prueba de comparación múltiple de Duncan, indica que los mejores tratamientos son para Mezquite (*Prosopis glandulosa*) el tratamiento 9 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 3 %) incrementó el *Azospirillum* 5694 veces, y para Huizache (*Acacia farnesiana*) el tratamiento 3 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 1 %) incremento 71428 veces, como se muestra en el Cuadro 4.3, Toniutti y Fornasero (2008) la cuantificación de *A. brasilense* del inoculante fue $3 \cdot 10^8$ ufc ml^{-1} en *Setaria lachnea* (nees) Kunth. Sin embargo Kapulnik et al., (1985) determinaron que la concentración 10^5 y 10^6 ufc ml^{-1} presentan aumento de la superficie total de la raíz; mientras que la

concentración 10^8 y 10^9 ufc ml^{-1} causan la inhibición del desarrollo de esta en cultivos agrícolas, en su caso el arroz. Por otro lado Mendoza *et al.*, 2004 en un estudio realizado en Tamaulipas, encontraron que el máximo número de bacterias capaces de invadir el tejido interno por gramo de tejido fue de 1×10^3 ufc ml^{-1} . Esta concentración fue decayendo mientras que las plantas llegaban a la madurez.

Cuadro 4.3. Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) en la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* en raíz de Mezquite y Huizache.

Tratamiento	Mezquite x 10^6		Huizache x 10^6	
T1	32500	A B C	65000	B
T2	42500	B C	27500	B
T3	42500	A B C	500000	A
T4	17500	B C	42500	B
T5	27500	B C	20000	B
T6	77500	A B	85000	B
T7	60000	A B C	12500	B
T8	5500	B C	32500	B
T9	102500	A	105000	B
T10	18	C	7	B

Números seguidos por la misma letra en columna, no muestran diferencia significativa (DMS, 0.05)

Por otro lado, el ANVA de la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* sin considerar especies hospederas, mostró diferencia ($P \leq 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Cuadrados medios de la cuantificación de la Cepa5 de *Azospirillum* en raíz sin considerar especie de planta.

FV	GL	CM	F
TRATAMIENTOS	18	48255021890	2.35*
ERROR	57	20577328948	
TOTAL	75		
CV (%)	216.99		

Dónde: FV= Fuente de variación, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor estadístico de prueba, CV= Coeficiente de Variación y *= Significativo

Al realizar la prueba de comparación múltiple de Duncan en la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* sin considerar especies (Cuadro 4.5.) se encontró que el tratamiento 12 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml⁻¹ y ácido húmico al 1 %) mostró mayor crecimiento de bacterias con una media de 500000×10^6 ufc ml⁻¹ y un incremento de 38461 veces, aunque los tratamientos 9 y 18 sin mostrar estadísticamente una significancia, pero si valores altos al resto de los tratamientos, fueron inoculadas con 10^{10} ufc ml con el 2 % de ácido húmico, y los tratamientos 6 y 15 con 10^{10} ufc ml con el 3% de ácido húmico.

Cuadro 4.5. Prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 en la cuantificación de bacterias del genero *Azospirillum* sin considerar especie.

Tratamiento	Media x 10 ⁶	
T1	32500	B
T2	4750	B
T3	42500	B
T4	17500	B
T5	27500	B
T6	77500	B
T7	60000	B
T8	5500	B
T9	102500	B
T10	65000	B
T11	27500	B
T12	500000	A
T13	42500	B
T14	20000	B
T15	85000	B
T16	12500	B
T17	32500	B
T18	105000	B
T19	13	B

Números seguidos por la misma letra en columna, no muestran diferencia significativa (DMS, 0.05)

4.3. Bacterias totales

El ANVA realizado para la cuantificación de la comparación de bacterias del género *Azospirillum* con bacterias totales presentes en la raíz mostró diferencia ($P \leq 0.05$) entre tratamientos de acuerdo al Cuadro 4.6. Indicando que el numero de bacterias encontradas en la raíz es significativamente diferente entre los tratamientos.

Cuadro 4.6. Cuadrados medios de la cuantificación de *Azospirillum* en bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.

FV	GL	CM		F	
		Mezquite	Huizache	Mezquite	Huizache
TRATAMIENTOS	9	1398467200	14111461136	31.24*	164.64*
ERROR	30	44758713	85710205.24		
TOTAL	39				
CV		26.42	16.76		

Dónde: FV= Fuente de variación, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor estadístico de prueba, CV= Coeficiente de Variación y *=Significativo

Dado que se encontraron diferencias altamente significativas en el número de bacterias la prueba de comparación de medias de Duncan (Cuadro 4.7). Para el caso de Mezquite se encontró que el tratamiento 7 (C-5 con *Azospirillum* 10^8 ufc ml^{-1} y ácido húmico al 3 %) es el que presenta el mayor numero de bacterias con 51880×10^6 ufc ml^{-1} , con un incremento de 159 veces sobre el testigo, en Huizache el tratamiento 3 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 1 %) presentó 199842×10^6 ufc ml^{-1} incrementando 1323 veces con respecto al testigo.

El segundo mejor tratamiento para el Mezquite fue el 6 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml^{-1} con el 2 % de ácido húmico) seguido del 5 (C-5 con *Azospirillum* 10^9 ufc ml^{-1} con el 2% de ácido húmico) y para Huizache el tratamiento 9 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml^{-1} con el 3% de ácido húmico) seguido del 1 (C-5 con *Azospirillum* 10^8 ufc ml^{-1} con el 1% de ácido húmico). Estos resultados coinciden con los reportados por Escalante (2012) al realizar el análisis del incremento radicular en Huizache encontró que la concentración de ácidos húmicos al 2% y *Azospirillum sp* de 10^9 ufc ml^{-1} influyeron en el mayor crecimiento del diámetro radicular, mientras que longitud de raíz lo causaron

los ácidos húmicos al 1% y 10^{10} ufc ml⁻¹ de *Azospirillum sp.* Por otro lado Ramos (2012) al evaluar el incremento radicular del Mezquite, presentó aumento en la concentración 10^8 , siendo las concentraciones 10^9 y 10^{10} , las que presentaron menor fijación de la bacteria de acuerdo con sus parámetros en la rizósfera. El mayor incremento en longitud, y diámetro radicular se produjo con el 1% de ácidos húmicos y 10^8 ufc ml⁻¹ de *Azospirillum sp.*

Cuadro 4.7. Prueba de comparación de medias de Duncan ($P \leq 0.05$) en bacterias totales de *Azospirillum* en raíz de Mezquite y Huizache.

Tratamiento	Mezquite x 10^6		Huizache x 10^6	
T1	32991	B	76509	B C
T2	4408	C D	33175	D
T3	29658	B	199842	A
T4	12991	C	42342	D
T5	37436	B	13175	E F
T6	49658	A	73175	C
T7	51880	A	9842	E F
T8	5325	C D	16509	E
T9	28547	B	87620	B
T10	325	D	151	F

En el Cuadro 4.8 se muestra el ANVA para la cuantificación de la comparación de bacterias del género *Azospirillum* con bacterias totales presentes en la raíz sin considerar especie de planta mostró diferencia ($P \leq 0.05$) entre tratamientos, indicando que existen diferencias significativas entre tratamientos, o que cuando menos uno es diferente.

Cuadro 4.8. Cuadrados medios de la comparación de bacterias del género *Azospirillum* con bacterias totales sin considerar especie de planta.

Fuente de variación	GL	CM	F
TRATAMIENTOS	18	8374083519.1	121.95*
ERROR	57	68667843.737	
TOTAL	75		
CV	19.55		

Dónde: GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor estadístico de prueba y CV= Coeficiente de Variación, *= significativo.

El análisis de la prueba de comparación de medias de Duncan (Cuadro 4.9), realizado con la diferencia entre *Azospirillum* con bacterias totales indica que el tratamiento 3 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 1%) es el que presenta el mayor numero de bacterias con 199842×10^6 ufc ml^{-1} , con un incremento de 839 veces sobre el testigo, el segundo mejor tratamiento fue el 9 (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml^{-1} y 3 % de ácido húmico) aumentando 368 Veces, seguido del tratamiento 1 (C-5 con *Azospirillum* 10^8 ufc ml^{-1} y 1% de ácido húmico) Con un aumento de 321 Veces sobre el testigo. Considerando los tres mejores tratamientos se coincide con lo reportado por Ramos (2012) y por Escalante (2012).

Cuadro 4.9. Prueba de comparación de medias Duncan con un nivel de significancia de 0.05 en la diferencia de *Azospirillum* con bacterias totales.

Tratamiento	Media x 10 ⁶				
T1	76509	B C			
T2	33175			F G	
T3	199842	A			
T4	42342		D E F		
T5	13175				H I
T6	73175	B C			
T7	9842				H I
T8	16509				H
T9	87620	B			
T10	32991			F G	
T11	4408				H I
T12	29658			F G	
T13	12991				H I
T14	37436			F G	
T15	49658		D E		
T16	51880		D		
T17	5325				H I
T18	28547			G	
T19	238				I

4.4 Arreglo factorial

4.4.1 Cuantificación de Colonias del género *Azospirillum* sp.

El análisis de varianza para la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* a un nivel de confianza del 95%, indica que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para Huizache y altamente significativas ($P \leq 0.01$) para Mezquite, en ambas especies es solo la inoculación de *Azospirillum* la que presenta esta significancia, además, no existe diferencia del ácido húmico aplicado a diferentes concentraciones (Cuadro 4.10).

Cuadro 4.10 Cuadrados medios con arreglo factorial 2 x 2 de la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* en raíz de Mezquite y Huizache.

Fuente de variación	GL	CM		F		Pr > F	
		M	H	M	H	M	H
AZO	3	9734180868	115229390508	4.83	3.11	0.0074**	0.0411*
AH	2	2596861111	87519444444	1.29	2.36	0.2908	0.1117
AZO*AH	4	1781444444	67256944444	0.88	1.81	0.4858	0.1522
ERROR	30	2016925009	37080000008				
TOTAL	39						
C.V. %		121.29	216.36				

Dónde: GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor estadístico de prueba, CV= Coeficiente de Variación, AZO= *Azospirillum*, AH= ácidos húmicos AZO*AH= interacción de *Azospirillum* y ácidos húmicos, *=significativo y **=Altamente Significativo.

La prueba de comparación de medias de Duncan, indica que la mejor concentración de *Azospirillum* para las dos especies estudiadas *Prosopis glandulosa* y *Acacia farnesiana* es la de (C-5 con *Azospirillum* 10^{10} ufc ml⁻¹, ya que en relación al testigo se incrementó 4120 veces más la población en Mezquite y en Huizache 32857 veces más, como se observa en el Cuadro 4.11.

Cuadro 4.11 Prueba de comparación de medias de Duncan (P≤ 0.05), en la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* en raíz de Mezquite y Huizache en medio NFb.

Concentración de <i>Azospirillum</i> Ufc ml ⁻¹	Mezquite X 10 ⁶		Huizache X 10 ⁶	
10 ⁸	36667	A B	4000	A B
10 ⁹	12583	B	26667	A B
10 ¹⁰	74167	A	230000	A
SA	18	B	7	B

Donde: SA = Sin *Azospirillum*

En el Cuadro 4.12 se observa la aplicación de ácidos húmicos donde, para *Prosopis glandulosa* la concentración con mejores resultados fue la de 3% con un incremento de 3111 veces más que el testigo y en *Acacia farnesiana* la concentración al 1% con 28214 veces más la cantidad de bacterias.

Cuadro 4.12 Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) aplicando tres concentraciones de ácidos húmicos en la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* en raíz de Mezquite y Huizache.

Concentración de ácidos húmicos	Mezquite X 10 ⁶		Huizache X 10 ⁶	
1 %	26583	A B	197500	A
2 %	40833	A B	49167	A B
3 %	56000	A	50000	A B
SAH	18	B	7	B

Donde: SAH = Sin Ácidos Húmicos

4.4.2 Bacterias totales

El Anva en la cuantificación de bacterias totales con un nivel de confianza del 95%, el Cuadro 4.13 muestra que la aplicación de ácidos húmicos, inoculación con *Azospirillum* sp., y la interacción de ambas, indica que existen diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en las dos especies.

Cuadro 4.13 Cuadrados medios con arreglo factorial de la cuantificación de bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.

Fuente de variación	GL	CM		F		Pr > F	
		M	H	M	H	M	H
AZO	3	1867025464	26243761480	41.71	306.19	<.0001**	<.0001**
AH	2	365724630	15813210130	8.17	184.5	0.0015**	<.0001**
AZO*AH	4	1563419787	4161361380	34.93	48.55	<.0001**	<.0001**
ERROR	30	44758713	85710205.24				
TOTAL	39						
C.V. %		26.42	16.76				

Dónde: GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, F= Valor estadístico de prueba, CV= Coeficiente de Variación, AZO= *Azospirillum*, AH= ácidos húmicos AZO*AH= interacción de *Azospirillum* y ácidos húmicos y **=Altamente Significativo.

La prueba de comparación múltiple de Duncan del Cuadro 4.14 para bacterias totales, indica que la mejor concentración de *Azospirillum* fue la de 10^{10} ufc ml⁻¹ para las dos especies estudiadas, en *Prosopis glandulosa* la población de bacterias la cual incremento 110 veces y para *Acacia farnesiana* incremento 796 veces en relación al testigo.

Cuadro 4.14 Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan (P≤ 0.05), en la cuantificación de bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.

Concentración de <i>Azospirillum</i> Ufc ml ⁻¹	Mezquite X 10 ⁶		Huizache X 10 ⁶	
10 ⁸	32621	A	42898	B
10 ⁹	15723	B	20953	C
10 ¹⁰	35954	A	120212	A
SA	325	C	151	D

Donde: SA = Sin *Azospirillum*

El Cuadro 4.15 muestra la concentración de ácidos húmicos, la mejor para *Prosopis glandulosa* fue al 2% con un incremento de 102 veces y para

Acacia farnesiana la mejor concentración fue al 1% con incremento de 683 veces sobre el testigo.

Cuadro 4.15 Prueba de comparación de medias de prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) aplicando tres concentraciones de Ácidos Húmicos en la cuantificación de bacterias totales en raíz de Mezquite y Huizache.

Concentración de ácidos húmicos	Mezquite X 10 ⁶		Huizache X 10 ⁶	
1 %	22352	B	103175	A
2 %	33362	A	42898	B
3 %	22352	A B	37990	B
SAH	325	C	151	C

Donde: SAH = Sin Ácidos Húmicos

Los resultados que presentados anteriormente difieren con las concentraciones de ácido húmicos y *Azospirillum* reportado por López *et al* (2010) que obtuvo efecto altamente significativo al adicionar la mezcla de 2 ml litro⁻¹ (0.2 %) de agua de los ácidos húmicos de leonardita experimentales, con la bacteria *Azospirillum*) a la concentración de 10⁹ ufc, se presentó la cantidad superior de materia orgánica y aventajó al testigo absoluto, por otro lado Pérez (2010) encontró que las dosis bajas de ácido húmico (2 ml.Lt⁻¹ ó 0.2%) de leonardita y bacterias *Azospirillum*(10⁷ ufc) , tienen efecto positivo en la distribución radicular del chile jalapeño, aumentando el área y ancho de raíz.

V. CONCLUSIONES

Mediante las pruebas bioquímicas realizadas se determinó que la bacteria analizada pertenece al género *Azospirillum sp.*

La mayor viabilidad de la C-5 (*Azospirillum sp.*), en Mezquite (*Prosopis glandulosa*) fue con la C-5 (*Azospirillum sp.* 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 3%) y para Huizache (*Acacia farnesiana*) fue de la C-5 (*Azospirillum sp.* 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 1 %).

Las bacterias totales presentes en la raíz se incrementan en Mezquite con la C-5 de *Azospirillum sp.*, con 10^8 ufc ml^{-1} y ácido húmico al 3 % y en Huizache con la C-5 de *Azospirillum sp.* 10^{10} ufc ml^{-1} y ácido húmico al 1 %.

VI. RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio es recomendable inocular *Azospirillum sp.*, en raíces de Mezquite y Huizache, ya que presentó alta viabilidad, y crecimiento.

Las especies estudiadas son altamente utilizadas para reforestación en zonas áridas y semiáridas, donde los nutrientes que requiere la planta para su desarrollo están muy escasos o muy profundos, por lo que se recomienda realizar más estudios de estas bacterias con interacción de otras especies forestales.

VII. LITERATURA CITADA

- Alanís, G.J. y Ballester C.** 2007. El valor de nuestras plantas. Fondo editorial de Nuevo León. México. 157 p. Disponible en línea books.google.es/books/.../El_Valor_de_Nuestras_Plantas.html
- Alcalde, S.** 1981. Curso de nutrición vegetal. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Álvarez, R. y Lemus, A.** 1980. Quimiotaxis de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* hacia exudados radiculares en gramíneas. Actividad de raíz, sorgo y trigo. Revista Latinoamericana de Microbiología. 22: 131,135. México.
- Álvarez, R.** 1983. Presencia de *A. lipoferum* y *A. brasilense* en la rizósfera de algunas plantas cultivadas y silvestres. Rev. Facultad de Agronomía. UNAM. México. 4(3): 271-276.
- Amorós, C.M.** 2003. Producción de Agrios. 3a. edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 352 p.
- Atlas R. y Bartha, R.** 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª ed. Trad. Español. Addison Wesley, Prentice Hall, Madrid España.
- Bashan, Y., Holguin G., Ferrera-Cerrato R.** 1996 Interacciones entre plantas y microorganismos beneficios I. *Azospirillum*, Terra, 14: (2) 159-194.
- Bashan, Y.; Puente, M.E. y Salazar, B.** 2006. Uso de los microorganismos del desierto como recurso para recuperar suelos erosionados. Revista Latinoamericana de Microbiología, México. 48(2):157-158.
- Benavides G. D. y Hermida A.M.** 2008. Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los Páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca) Tesis de licenciatura de la Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C. p 118.

- Brown, A.W.A., T.C., Gibbs, M., and San Pietro, A.** 1975. "Crop productivity-research imperatives" Nat. Sci. Found. U.S.A.
- Bukart, A.** 1976. A Monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae Subfam. Mimosoidae). *mJourn. Arnolld Arbor.* 57: 219-249 450-455. Disponible en <http://www.biodiversitylibrary.org/pdf2/001767900041448.pdf>
- Bulow J.W.F. and Dobereiner J.** 1975 Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nati. Acad. Sci. Usa.* 72 2389-2393
- Caballero J.**, 2006, Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, México. 48(2):154-155.
- Canbolat, Y., Barik, M.K., Çakmakçi, R. and Sahin, F.** 2006. Effects of mineral and biofertilizers on barley growth on compacted soil. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science.* 56: 324-332.
- Chanway, C.P.** 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science (USA)* 43(1): 99-112.
- Chanway, C.P.** 1999. Nitrogen fixing pine Faculty of Forestry-Newsletter- The University of British Columbia. Consultado agosto 2012. Disponible en www.forestry.ubc.ca/brchline/99dec/fs.htm
- Collados, C.** 2006, Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizosfera de trigo y maíz. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Editorial de la Universidad de Granada. Granada. p 7-11.
- CONAZA e INE.**1994. Mezquite *Prosopis sp.* Cultivo Alternativo para las Zonas Áridas y Semiáridas de México. Consultado julio 2012 Folleto. En: www.ine.mx. 31 p.

- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal).** 2008. *Acacia farnesiana*. Publicado en: Species Plantarum. Editio quarta 4(2): 1083-1084. Disponible en www.cnf.gob.mx:8080/snif/portal/.../UsosPDF.php
- Coyne, M.** 2000. Micorrizas. En: Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Madrid. ISBN: 84-283-2648.
- Croes, C. L., Moens S., Van Bastelaere E., Vanderleyden J., and Michiels K. W.** 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 139:2261-2269.
- Day, J.M. and Döbereiner, J.** 1976. Physiological aspects of nitrogen fixation by *Azospirillum* from Digitaria roots soil Biol. Biochem 8: 45-50. U.S.A. Consultado marzo 2012. Disponible en <http://www.sciencedirect.com>.
- Del Gallo. M., and Fendrik, I.** (1994) "The rhizosphere and *Azospirillum*", in: *Azospirillum/plant associations*, Okon, Y., Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida USA., p. 57-65.
- Díaz M., D. H.** 2002. Fisiología de árboles frutales. Editor AGT, S.A. México D. F. 390 p.
- Döbereiner, J., Marriel, I.E. and Nery, M.** 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Manual of determinative Bacteriology. Williams y Wilkins. Estados Unidos. p 40-42.
- Escalante M.A.** 2012. Aplicación de Ácidos Húmicos y *Azospirillum* sp., en Huizache (*acacia farnesiana*). Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento Forestal, Saltillo Coahuila México. 57 p.
- Evans, H.J.** 1975. "Enhancing Biological Nitrogen Fixation". Nati. Sci, Found. U.S.A.
- Fuentes, C., R.** 2007. Agrosistemas sostenibles y ecológicos: La reconversión agropecuaria. Editorial Univ. Santiago de Compostela. España. 250 p.

- Fisher, R.F. and Binkley D.** 2000. Biology of forest soils. Chapter 6. Consultado abril 2012. Disponible en www.for.nav.edu/courses/hart/for521/fisher%20and%20Binkley%20000/Chapter06.doc
- Freitas, J.R. and Germia, J.J.** 1990. A root tissue culture system winter wheat-rizobacteria interaction. *Appl-Microbiol-Biothec.* 33(5). pp. 589-595. Alemania.
- Gamo, T. and Toriyama, S.** 1989. Isolation of *Azospirillum sp.*, from the roots of graminuos plants and growth-promoting effect. *Bulletin of the National Institute of Agrobiological Resources.*Japan. No 5. p 37-58.
- Hernández, Y., Sarmiento, M. y García O.** 1996. Influence of *Azospirillum* inoculation model on grass performance. *Cuban Journal of Agricultural Science.* 30: 219-226.
- Jena, P.K., Adhya, T.K. and Rajaramamo, H.R.V.** 1992. Nitrogen fixation in *Azospirillum sp.* isolated ; from rice roots and soils as influenced y carbofuran and combined nitrogen. *Zentral Mikrobiology.* India.147(5): 340-344.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. and Henis, Y.** 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.
- Kennedy A., C.** 2005. Rhizosphere, in: *Principles and Applications of Soil Microbiology*, D.M., Sylvia, J.J., Fuhrmann, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2nd ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey, pp. 242-262.
- Kloepper W., J.** 1993. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents. *In* Metting, Blaine F. Jr. *Soil Microbial Ecology. Aplications in Agricultural and Environmental Management.* editado por Marcel Dekker. p 646.
- Kloepper, J.W.** 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria: other systems. *In: Azospirillum/plant associations.* Y. Okon (ed.): CRC Press, Boca Raton.111-118.

- Kloepper, J.W.** 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience* 46: 406-409
- Landeras, G., Alfonso, M.; Pasiecznik, N.M.; Harris, P.J.C. and Ramírez, L.** 2005. "Identification of *Prosopis juliflora* and *Prosopis pallida* accessions using molecular markers". *Biodiversity and Conservation*. Publicado en línea en mayo del 2006.
- Levanony, H., and Y. Bashan.** 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil*. 137:91-97.
- Leyva, L. A.** 2006. Efecto del ácido glucónico sobre la actividad de las enzimas encargadas de su metabolismo, en la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum brasilense* Cd asociada a plantas de mezquite (*Prosopis articulata* S. Watson). Tesis de maestría en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Biotecnología). La Paz B.C.S., México. 80 p.
- Loomis, R.S., D.J. Connor.** 2002. Ecología de cultivos. Productividad y manejo en sistemas agrarios. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 591 p.
- López R. Zúñiga M.A. Peña E., Zúñiga L. y González G.** 2010. Efectividad de ácidos húmicos de leonardita y *azospirillum* en la estabilidad de agregados de un calcisol humic. *Agricultura orgánica – agrofaz*. Durango 10:2 107-113.
- Marschner, H.** 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2a. Ed. Academic Press. USA 889 p.
- Mendoza H. A., Cruz M. A., Jacques-Hernández C.** 2004. Aislamiento, selección, producción y evaluación de un inoculante basado en cepas nativas de *Azospirillum* en el norte de Tamaulipas. Memoria de Simposio de Biofertilización "La Biofertilización como Tecnología Sostenible", Reynosa Tamaulipas México.

- Mendoza R, F Martínez, V Rodríguez, A Benavidez.** 2009. Biofertilización con *Azospirillum* en trigo. Avances en la ciencia del suelo. XXXIV Congreso Nacional de la ciencia del suelo. Edición de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del suelo, A.C. 16-61 p.
- Meraz, S.; Orozco, J.; Lechuga, J. A.; Cruz, F. y Vemon, J.** 1998. El Mezquite, árbol de Gran Utilidad. Revista de Cultura Científica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Primera edición. 20-21 p.
- Meza, R.** 2009 Guía para la colecta y beneficio de semilla de mezquite, Folleto para Productores Núm. 2, INIFAP -Campo Experimental Todos Santos. La Paz, B.C.S. México. 30 p.
- Meza, R. y Osuna, L. E.** 2003. Estudio Dasométrico del Mezquite en la Zona de Pocitas, B.C.S. Folleto Científico Núm. 3, INIFAP-Campo Experimental Todos Santos. La Paz, B.C.S. México. 49 p.
- Michiels, K.W., Croes C.L., and Vanderleyden J.** 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137:2241-2246.
- Narula, N., Saharan B.S., Vivek K., Ranjana B., Bishnoi L.K., Lather B.P.S. and Lanksmingarayana.** 2005. Impact of the use of biofertilizers on cotton (*Gossypium hirsutum*) crop under irrigated agro-ecosystem. Archives of Agronomy and Soil Science. Taylor and Francis Group. 51(1): 69 – 77.
- Navarro, S. y Navarro G.** 2003. Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. 2a. edición. Mundi-Prensa Libros. España. 487 p.
- Palacios, R.A.** 2006. Los Mezquites Mexicanos: Biodiversidad y Distribución Geográfica, Bol. Soc. Argent. Bot. 41 (1-2):113-115. Consultada agosto 2012. Disponible en <http://www.scielo.org.ar/pdf/bsab/v41n1-2/v41n1-2a10.pdf>.
- Paul, L.R., Chapman, B.K. and Chanway, C.P.** 2007. Nitrogen fixation associated with *Suillus tomentosus* tuberculate ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. latifolia. *Annals of Botany* 99 (6): 1101-1109.

- Parrota, J.A.** 1992. *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Aroma, huizache. SO-ITF-SM-49. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 6 p.
- Pérez, M.R.** 2010. Efectividad de ácidos húmicos de leonardita y *Azospirillum* en la estabilidad de agregados y distribución radicular de chile jalapeño. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio narro. p 63.
- Pozdnyakova, L.I., Kanevskaya, S.V., Levanova, G.F., Barysheva, N.N., Pilopenko, T.Y., Bogatyrev, V.A. and Ledorova, L.** 1989. Taxonomic Studies of *Azospirillum* Isolated from Cereals in the Saratov region (USSR). Microbiology. Rusia. 57(2): 275-278.
- Ramos J.C.**, 2012, Aplicación de Ácidos Húmicos y *Azospirillum* sp., en Mezquite (*Prosopis glandulosa*).Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento Forestal, Saltillo Coahuila México. 60 p.
- Raina, M.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P.** 2000. Environmental Microbiology. Academic Press. USA. 583 p.
- Rivera-Cruz, M. del C. y Trujillo, N.A.** 2008. Uso de biofertilizantes en el crecimiento de limón dragón volador y naranja criolla. Agro Región. 2:10-12.
- Rodríguez, C.E.A.** 1981 Nuevo medio para aislar *Azospirillum* sp. 1^a Reunión Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Argentina.
- Rosch, C., Mergel, A. and Bothe, B.** 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. Applied and Environmental Microbiology 68 (8): 3818-3829.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales).** 2001. Especies Forestales No Maderables y Maderables No Tradicionales de Zonas Áridas y Semiáridas en los Estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca” (2001). Editado por SEMARNAT.DISPONIBLE EN: http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/prosopis_glandulosa.htm

- Tarrand, J.J., Krieg, N.R and Dóbereiner, J.** 1978. A taxonomic study of the *S. lipofenim* grup. with description of a new genus *A. lipoferum* Beijerinck. Con nov. and *A. brasilense*. Can. J. Microbiol. (24): 967-980. Canadá.
- Trocme S. and R. Gras.** 1979. Suelo y Fertilización en Fruticultura. 2a. ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 377 p.
- Toniutti M.A. y Fornasero L.V.** 2008. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria Lachnea* (NEES) Kunth. Revista FAVE Ciencias Agrarias. 7:(1-2) 33-41.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse, C.M.J.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 453–483.
- Villalobos F., Mateos J. I., Orgaz F. y Fereres E.** 2002. Fitotecnia Bases y Tecnologías de la producción Agrícola. Ediciones Mundi-Prensa. p496.
- WorldWideWattle.** 2004. Species Number. Disponible en line <http://www.worldwidewattle.com/infogallery/species>, actualizada en 2006, consultada agosto 2012.

APÉNDICE

Apéndice 1. Base de datos de la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* en raíz de Mezquite

Tratamiento	Repetición	Concentración x 10 ⁶
1	1	10000
1	2	30000
1	3	60000
1	4	30000
2	1	4000
2	2	6000
2	3	6000
2	4	3000
3	1	20000
3	2	80000
3	3	40000
3	4	30000
4	1	20000
4	2	10000
4	3	30000
4	4	10000
5	1	30000
5	2	10000
5	3	50000
5	4	20000
6	1	160000
6	2	40000
6	3	90000
6	4	20000
7	1	100000
7	2	30000
7	3	50000
7	4	60000
8	1	5000
8	2	11000
8	3	5000
8	4	1000
9	1	270000
9	2	20000
9	3	100000
9	4	20000
10	1	10
10	2	30
10	3	20
10	4	10

Apéndice 2. Base de datos de la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* en raíz de Huizache.

Tratamiento	Repetición	Concentración x 10 ⁶
1	1	70000
1	2	30000
1	3	100000
1	4	60000
2	1	20000
2	2	30000
2	3	50000
2	4	10000
3	1	200000
3	2	200000
3	3	1400000
3	4	200000
4	1	30000
4	2	40000
4	3	50000
4	4	50000
5	1	10000
5	2	20000
5	3	40000
5	4	10000
6	1	80000
6	2	80000
6	3	160000
6	4	20000
7	1	10000
7	2	10000
7	3	10000
7	4	20000
8	1	30000
8	2	80000
8	3	10000
8	4	10000
9	1	200000
9	2	30000
9	3	90000
9	4	100000
10	1	2
10	2	1
10	3	6
10	4	20

Apéndice 3. Base de datos de la comparación de bacterias del género *Azospirillum* con bacterias totales en raíz de Mezquite.

Tratamiento	Repetición	Concentración x 10⁶
1	1	39658
1	2	29658
1	3	32991
1	4	29658
2	1	3658
2	2	5658
2	3	5658
2	4	2658
3	1	19658
3	2	29658
3	3	39658
3	4	29658
4	1	19658
4	2	9658
4	3	12991
4	4	9658
5	1	29658
5	2	32991
5	3	49658
5	4	37436
6	1	49658
6	2	39658
6	3	49658
6	4	59658
7	1	46325
7	2	51880
7	3	49658
7	4	59658
8	1	4658
8	2	5325
8	3	4658
8	4	6658
9	1	46325
9	2	19658
9	3	28547
9	4	19658
10	1	332
10	2	312
10	3	322
10	4	332

Apéndice 4. Base de datos de la comparación de bacterias del género *Azospirillum* con bacterias totales en raíz de Huizache.

Tratamiento	Repetición	Concentración x 10⁶
1	1	69842
1	2	76509
1	3	99842
1	4	59842
2	1	19842
2	2	29842
2	3	49842
2	4	33175
3	1	199842
3	2	199842
3	3	199842
3	4	199842
4	1	29842
4	2	39842
4	3	49842
4	4	49842
5	1	9842
5	2	19842
5	3	13175
5	4	9842
6	1	79842
6	2	79842
6	3	59842
6	4	73175
7	1	9842
7	2	9842
7	3	9842
7	4	9842
8	1	29842
8	2	16509
8	3	9842
8	4	9842
9	1	73175
9	2	87620
9	3	89842
9	4	99842
10	1	156
10	2	157
10	3	152
10	4	138