

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMIA**



**Evaluación de *Azospirillum* sp. En líneas elite de maíz forrajero.**

**Por:**

**CARLOS LEONEL GOMEZ MERINOS**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRONOMO EN PRODUCCIÓN**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México**

**Diciembre del 2008**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**

**DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO**

**Evaluación de Azospirillum en líneas elite de maíz forrajero**

**Por:**

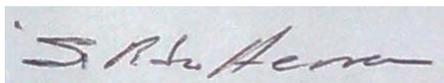
**Carlos Leonel Gómez Merinos**

**TESIS**

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador, como requisito parcial para obtener el título de ingeniero Agrónomo en Producción.

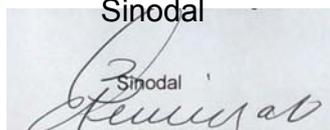
Aprobada por el comité de tesis:

Asesor principal



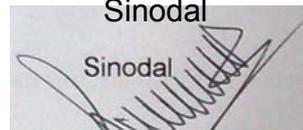
Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera

Sinodal



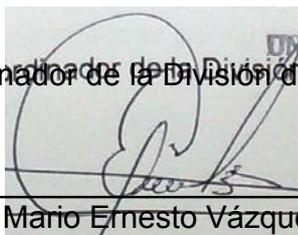
Ing. Gustavo Burciaga Vera

Sinodal



M.C Ramiro Luna Montoya

Coordinador de la División de Agronomía



Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre del 2008

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Alma Terra Mater por darme asilo toda mi carrera y por desarrollarme como alumno y como persona, siempre pondré nombre en alto.

Agradezco infinitamente al DR. SERGIO RODRIGUEZ brindarme la oportunidad de trabajar con él, en esta investigación y que tuve el gusto de tratar una persona muy sencilla y grata.

Mis más sinceras gracias a Q.F.B Marco Aurelio porque tuve la oportunidad de trabajar juntos y mas que trabajar conocernos como personas y apoyarme en esta tesis.

A Ing. Gustavo Burciaga Vera por ayudarme en los momentos críticos de mi carrera y por su disponibilidad en la presente evaluación.

A M.C Ramiro Luna Montoya por su apoyo y disponibilidad para formar parte de jurado calificador.

## DEDICATORIA

A **Dios** por darme una de las mejores oportunidades que es la vida, y por haber realizado uno de muchos mis anhelos. Y le agradezco por bendecir e iluminar siempre mi caminar.

A mis padres:

**Virginia Merino Olivares y Leonel A. Gómez Moreno** por generar la chispa que me dio la vida. Les agradezco infinitamente por todo su amor y cariño, por estar presente siempre en todas las etapas de mi vida, por todos sus consejos, experiencias y enseñarme al arte de la honestidad y trabajo para salir adelante. Nunca podré pagarles el gran sacrificio que hicieron por mí, estoy infinitamente agradecido son los mejores padres del universo, y solo puedo decirles que los amo.

A mis hermanos:

**Fanny Alejandra, Mónica Adriana y José Ángel** por su hermosa amistad de hermanos, por todos los momentos que hemos vivido juntos y porque siempre han respondido como verdaderos hermanos, a todos ustedes les agradezco por estar conmigo toda mi vida.

A mi novia:

**Irma Dolores Clemente Fuentes** a ti por darme el último impulso para concluir esta tesis y por brindarme su cariño, amor y confianza. Por esto y muchas cosas más... Gracias!

A mis abuelos:

**Fanny Moreno (†) y Leonel Gómez (†)** A ellos que en alguna parte del cielo siempre me estuvieron ayudando, observando, cuidando y deteniéndome cuando algo andaba mal, muchas gracias.

**Yolanda Olivares** Quien siempre me brindo cariño desde mi niñez y aun me lo sigue brindando, gracias abuelita.

A mis tíos:

Julio Cesar Gómez (†), José Ivan Gómez, Maria Eugenia Gómez, Luís Gonzalo cruz, Gildardo Merinos, Rosario Arrieta, Guadalupe Merinos, Viviana, José Luís Merinos, Gabriela Merinos. A todos ellos gracias por su apoyo.

A mis primos:

Rodrigo Cruz, Paola cruz, Dunia Gómez, Yahaira Gómez, Cesar Jonathan Gómez, Uriel Gómez. Muchas gracias a todos ellos.

A mis amigos:

Leticia Velasco, Rodrigo Zabadua, Oscar González, Ossiel Nicolás, Julio Cesar, Gutemberg Moreno, Mario Cervantes, Nelson, Roberto Carlos, Gabriel Guajardo, Eduardo Moreno, Efraín Barajas, Rudhy, Diana, Haydeé, Alejandra, Sra Irma y Sr. Eustacio . A todos ellos por convivir juntos desde nuestra llegada hasta el final de nuestra carrera, gracias por todo y suerte.

Por los que **no** creyeron en mí:

A todos ellos también se las dedico porque me sirvió como impulso, y no para demostrarles a ellos que si puedo, si no para demostrarme a mi mismo que si se puede y que todo en esta vida es alcanzable...

## INDICE DE CONTENIDO

<b>I.- INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II.- REVISION DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
Uso de los fertilizantes e importancias.....	4
Importancia del Nitrógeno y efectos.....	11
Azospirillum y su clasificación.....	15
Aislamiento de Azospirillum.....	16
Identificación y distribución.....	17
Fijación del Nitrógeno por la bacteria.....	20
Efectos de Azospirillum.....	21
<b>III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>V.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>32</b>
<b>VI.- LITERATURA CITADA.....</b>	<b>33</b>

## INTRODUCCION

El cultivo de maíz (*Zea mays*) ha sido utilizado por las familias mexicanas para consumo alimenticio, aunque el maíz ensilado es uno de los componentes importantes de la dieta del ganado lechero por que constituye un tercio de su ración diaria. El maíz forrajero de calidad se selecciona en base a la materia seca, no interesando tanto su calidad nutritiva (Núñez et al, 1999; Peña et al, 2002). El incremento en la materia seca y calidad nutritiva del forraje la proporciona una adecuada fertilización por que actualmente se ha convertido en la dieta diaria del ganado lechero.

Por tradición se han utilizado los fertilizantes químicos que proporcionan los nutrientes que la planta necesita, sin embargo se han detectado problemas de contaminación, y para disminuir este problema una alternativa es el uso de fertilizantes orgánicos, entre ellos se encuentran las bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico.

Las bacterias del género *Azospirillum* (Dobereiner et al, 1992) tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, dichas bacterias interactúan con las raíces de la planta, se han aislado de raíces de maíz, arroz, trigo y pastos (Paredes et al, 1988).

Se encontró que existe especificidad de especie en los cultivos, ya que el *Azospirillum lipoferum* es específico para maíz y *A. brasilense* para trigo (Baldani et al, 1980). En maíz el *A. sp* y *brasilense* tuvieron una influencia positiva en la emergencia, floración, altura de planta y madurez fisiológica (Mendoza et al, 1986). En pastos la inoculación con *A. brasilense* incrementó la emergencia a un 50 % y la sobrevivencia de 100 hasta 400 % (Esqueda et al, 2004). En trigo también se aplicaron *Azospirillum* y *Pseudomonas* en formas individuales y mezcladas, encontrando incremento en amacollamiento, altura de planta, longitud de raíces, peso seco y número de granos.

La inoculación con  $10^5$  a  $10^6$  células de *Azospirillum* causa elongación e incremento del total de la raíz, pero  $10^8$  a  $10^9$  células causan su inhibición (Kapulnik et al, 1985), aunque el *A. brasilense* también producen hormonas del crecimiento como giberelinas, citocininas y auxinas (Zimmer et al, 1988, 1991; Lucangeli y Botín, 1997).

Debido al beneficio que le proporciona la bacteria a la planta de maíz el objetivo de la investigación fue encontrar las cepas de *Azospirillum* que fijen mayor cantidad de nitrógeno y por consiguiente se incremente la altura de planta y biomasa.

**PALABRAS CLAVE:** *Azospirillum sp*, Líneas elite, Maíz Forrajero, Fijación De Nitrógeno, Fertilizantes, Bacterias.

## REVISION DE LITERATURA

Nuestro país cuenta con alrededor de 24 millones de hectáreas de superficie agrícola, de las cuales alrededor 6 millones son de riego y las restantes de temporal. Según CEA (2000) para el año agrícola de 1999 se sembraron mas de 280 mil hectáreas de maíz forrajero y 8.5 millones de hectáreas de maíz para grano, de las cuales se obtuvieron una producción de 4.7 millones de toneladas de forraje y 18.3 millones de toneladas de grano. Para el periodo 1990-1998, la superficie sembrada de maíz represento en promedio el 52.8% de la superficie nacional de los cultivos anuales en el año agrícola.

El maíz forrajero es una de las plantas que presenta ventajas que determinan su utilización en la alimentación animal, entre las cuales están: a) Presenta diversas formas de utilización, ya que el ganado lo come en verde, seco ó ensilado; b) Gran adaptabilidad a las condiciones climáticas temporáleras existentes en la mayor superficie del país; c) excelente calidad nutritiva para la producción de leche; facilidad de manejo manual y con maquinaria tanto para su cultivo como para su utilización. (FIRA, 1986, 1992).

## **El uso de los fertilizantes químicos y su impacto ambiental**

Los fertilizantes químicos fueron el insumo que más impactaron al rendimiento, su aplicación oportuna y completa permitían al inicio elevar la productividad y reducir el costo por tonelada de producto.

La aplicación de estos fertilizantes a partir de 1950 y hasta 1985 tuvo un rápido incremento en cuanto a Nitrógeno, Fósforo y potasio, su consumo aumentó de 8,442 toneladas a 1.3 millones de toneladas en 1980; y para 1983 llegó a 1.6 millones. En lo que respecta a nutrientes Nitrogenados Y Fosfatados México es casi autosuficiente, no así en potasio ya que de una manera general sus suelos contienen cantidades suficientes para los requerimientos de los macro y microorganismos. (PEF, 1985, 1988).

Como se mencionó anteriormente en las últimas décadas se ha observado un incremento en volúmenes utilizados de fertilizantes, lo que coincide con lo expuesto por las organizaciones ecologistas en relación al deterioro ecológico que resultó de la explotación no planificada de los recursos naturales. En el suelo, se han acentuado los problemas de desertificación, erosión, contaminación y como consecuencia una notoria disminución de su potencial productivo. (Onudi, 1977).

La vida microbiana en suelos agrícolas con uso continuo de fertilizantes químicos, ha presentado alteraciones importantes, ya que los

microorganismos mediante procesos bioquímicos liberan sustancias nutritivas disponibles para las plantas y al hacer aplicaciones artificiales, se provocan desequilibrios con la consiguiente disminución de la flora y fauna microbiana. (Alexander, 1980)

### **Importancia de los Abonos orgánicos**

La materia orgánica en el suelo proviene de diversas fuentes; desechos animales y vegetales están en constante reciclaje a través de los diferentes ciclos biológicos. (Burgues, 1977)

Estos desechos se descomponen por la acción de los microorganismos heterotróficos los cuales desdoblan la porción orgánica en monómeros absorbibles y asimilables tales como la celulosa, hemicelulosa, ligninas, aceites, ceras, resinas, entre otras. (Alexander, 1980) Y que obtienen su energía y por otra parte suministran el carbono necesario para su desarrollo celular.

Dentro de los organismos heterótrofos que intervienen en la descomposición de la materia orgánica se encuentran los que actúan aeróbicamente como los hongos, bacterias aerobias y bacterias anaerobias facultativas los que liberan  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , energía y biomasa (Alexander, 1980); mientras que las bacterias anaerobias estrictas u obligadas no actúan de manera tan eficiente por lo que no utilizan a la materia orgánica en su

totalidad, dejando considerables cantidades de productos intermedios útiles para el desarrollo de otros organismos. (Murguía, 1981)

### **Los abonos orgánicos**

El empleo de los abonos orgánicos en la agricultura mantuvo un lugar preponderante antes de la introducción en gran escala de los fertilizantes químicos; en la actualidad con el incremento en costos, transporte, almacenamiento y aplicación, además de los daños a la ecología, ha propiciado que nuevamente los abonos orgánicos cobren importancia, los diferentes estudios demuestran que los orgánicos tienen las ventajas siguientes sobre los de origen inorgánico: Mayor efecto residual, Aumento de la capacidad de retención de humedad del suelo a través de su efecto sobre la estructura, la porosidad y la densidad aparente, Formación de complejos orgánicos con los nutrimentos manteniéndolos disponibles para las plantas, Reducción de la erosión al aumentar la resistencia a la dispersión por el impacto de la lluvia y reducen el escurrimiento superficial, Elevan la capacidad de intercambio catiónico, Promueven la liberación de CO<sub>2</sub> que propicia la disponibilidad de algunos nutrientes, Abastecimiento de Carbono orgánico como fuente de energía y de carbono a la flora microbiana heterótrofa. (Nuñez, 1977)

Uno de los factores que han contribuido al empobrecimiento de los suelos agrícolas Mexicanos es el monocultivo tradicional, sin la incorporación

de abonos orgánicos en sus diferentes formas. Esto lógicamente tiende a disminuir el contenido de materia orgánica alterando por lo consiguiente la relación estrecha entre el Carbono y el Nitrógeno; donde en términos generales se puede afirmar que si la relación C/N es mayor a 30, no hay liberación de Nitrógeno aprovechable; por el contrario, si la relación es menor de 20, algo de Nitrógeno se mineraliza quedando disponible para las plantas y para la microflora subterránea, Tisdale, 1975. La aplicación de abonos orgánicos de ninguna manera interfiere con la adición de fertilizantes químicos y es posible la aplicación de ambos, tal como lo demuestra Núñez, 1977 quien afirma que la disponibilidad de Fósforo es mayor cuando el superfosfato se mezcla con gallinaza que cuando se aplica solo. Así como De la Garza y Cisneros 1988 encontraron que cuando se agrega la menor cantidad de superfosfato triple a la mezcla de estiércol en agua durante la fermentación anaerobia; en el biofertilizante líquido se encuentra mayor disponibilidad de Fósforo.

### **Biofertilizante líquido**

Abencerraje 1984, mencionó que en el proceso de fermentación anaeróbica de la materia orgánica por bacterias, se producen junto con el agua sustancias asimilables para un cultivo.

Mendoza 1985, concluyó que la dosis óptima de biofertilizante líquido para el cultivo de frijol ejotero fue de 300 lt/ha, tal dosis se aplicó en dos partes, la mitad al momento de la siembra y el resto antes de la floración.

Martínez (1982), indicó que para la soya, en condiciones de invernadero, la disolución óptima a usar de biofertilizante líquido es de 1:75 utilizando como diluyente el agua de riego.

Pichardo (1980), indicó que 1 m<sup>3</sup> del biofertilizante líquido producido diariamente puede fertilizar 100 m<sup>2</sup> de terreno por año, a un nivel de 200 kg/ha.

La composición química del fertilizante líquido depende de la especie del animal, edad, alimento consumido, cama utilizada y manejo del estiércol antes de aplicarse.

Arias (1978), publicó que el efluente líquido de la fermentación anaeróbica contiene una alta concentración de nutrimentos entre los cuales se citan N, P, K, elementos menores, vitaminas y hormonas para el crecimiento tanto animal como vegetal.

## **Importancia del estiércol**

De acuerdo con el V Censo Agrícola, Ganadero y Ejidal en 1970. México tenía una población de 21'136,432 cabezas de ganado vacuno (Niñez, 1977); un promedio conservador supone que sería probable producir 126,818 millones de toneladas de estiércol anualmente. Salter y Schollenberger (1969) citado por Nuñez, (1977)

Los contenidos promedio de nutrimentos del estiércol de bovino son: 0.30 % de N<sub>2</sub> total, 0.50 % de N<sub>2</sub> soluble, 0.20 % de Fósforo, 0.10 % de potasio y 0.10 % de calcio en lo referente al contenido de micronutrientes se menciona que contienen de 43.8 a 217.8 ppm de Mn y de 16.4 a 82.1 ppm de Zn (Skinner, A.F 1975). Los datos anteriores se semejan a lo expuesto por Buckman (1977). De las cifras mencionadas anteriormente Fernández (1975) citado por Ramírez (1978) estimó que es posible considerar adecuadamente 48.7 millones de toneladas. Las características del estiércol varían con la edad del animal, alimentación y manejo del material. Un manejo inadecuado produce pérdidas de Nitrógeno por volatilización y otros nutrimentos por lavado; estas pérdidas se favorecen por desecación, pH alcalino y altas temperaturas.

## **Diseño de Digestores Rústicos**

Se han realizado diversos experimentos, a fin de analizar los aspectos teóricos y prácticos de modelos de Digestores Anaeróbicos que puedan procesar con eficiencia los desechos orgánicos, de manera que los productos resultantes no contengan características fitotóxicas encontrándose amplias posibilidades en digestores sencillos que procesan desechos biológicos.

Ramírez (1981) En un análisis técnico económico estableció un modelo típico para un ejidatario o comunero que cuenta con una parcela de maíz, a este nivel es sencillo el manejo usando tambos de 200 lt para adaptar los como Digestores Anaerobios; los productos líquido y sólido sirven como fertilizante Y como mejorador del suelo, se puede complementar el sistema con hornos forrajeros enriquecidos por la fracción líquida.

De la Garza, (1988) Describe al digestor empleado en diversos trabajos de Investigación para producir efluentes líquidos y sólidos; éste se construyó uniendo dos tambos con capacidad de 200 lt, con una entrada para suministrar la mezcla; dos salidas, una para los gases Y otra para obtener el biofertilizante.

## **Importancia del Nitrógeno en la Agricultura**

Jacob (1971), menciona que el nitrógeno es el elemento esencial para la vida de los vegetales, por esa razón es de suma importancia conocer en qué forma y proporción se encuentra en el suelo, para así, tener una base de la cantidad necesaria para la realización de una fertilización apropiada.

La deficiencia de nitrógeno ejerce un marcado efecto sobre los rendimientos de la planta. Las plantas permanecen pequeñas y se tornan cloróticas rápidamente, dado que no existe suficiente nitrógeno para la realización de la síntesis proteica y clorofílica. A causa de la deficiencia clorofílica la planta sufre la inhibición de su capacidad de asimilación y de formación de carbohidratos.

Ortíz y Ortíz (1984); mencionan que el papel del nitrógeno puede ser considerado como estructural y metabólico.

- a) Es un constituyente esencial de los seres vivos.
- b) Forma parte de las proteínas y de la clorofila.
- c) Imparte un color verde oscuro a las plantas.
- d) Promueve el desarrollo de hojas y tallos.
- e) Produce un desarrollo rápido en la primera etapa.
- f) Aumenta el contenido de proteínas en los cultivos alimenticios y forrajeros.

## **Efecto del Nitrógeno**

Thompson y Weiner (1962) y Vesik et al (1966), publicaron que la apariencia interna de plástidos se altera considerablemente cuando hay deficiencias de nitrógeno, ya que este elemento es el constituyente de proteínas, purinas, pirimidinas, enzimas y coenzimas. Por lo tanto, una interferencia con la síntesis de proteínas y desde luego en el crecimiento, es el efecto bioquímico, que señala la deficiencia de este elemento, la cual origina un amarillamiento de las hojas o clorosis. Además, una disminución en la fotosíntesis, inhibe la formación de aminoácidos esenciales así como al mecanismo de síntesis de carbohidratos y de esqueletos carbonados.

Lagarda (1974), dice que el nitrógeno interviene en la composición de todas las proteínas vegetales, cuando éste se agrega en altas dosis, a los cultivos, es causa aparente del aumento del protoplasma celular, ocasionando con esto, la deformación de hojas y tallos más suculentos y menos fuertes, pues aumenta la cantidad de agua en las vacuolas facilitando el ataque de plagas y enfermedades.

## **Nitrógeno en el suelo y sus asimilaciones**

Fassbender y Black (1975), establecen que las formas inorgánicas en que se presenta el nitrógeno son como óxido nitroso ( $N_2O$ ), óxido nítrico ( $NO_3^-$ ), Nitrito ( $NO_2^-$ ), amoníaco ( $NH_3$ ), los cuales son gases y no se dan en

concentraciones grandes para ser detectados, además, existen otras como Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), por lo general estas formas inorgánicas, constituyen solo hasta el 2 % del N total del suelo.

Bidwell (1979) dice que el nitrato es la forma más abundante de nitrógeno utilizable por las plantas y la fuente más importante para ellas.

El amoníaco es a veces relativamente abundante, por ejemplo, donde está ocurriendo fijación de nitrógeno o en suelos húmedos anaeróbicos.

Debido a los numerosos procesos de cambio que afectan al N del suelo, la concentración del N en la solución del suelo, puede cambiar considerablemente en períodos cortos de tiempo. Eso se aplica particularmente al nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Cuando las condiciones favorecen la nitrificación, se produce un incremento en el contenido de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en la solución del suelo.

Mengel y Kirkby (1985), establecen que en primavera cuando suben las temperaturas y la aereación del suelo se eleva, también se incrementan los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), coincidiendo con la alta demanda del cultivo, así los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) son rápidamente tomados por las raíces.

Los niveles de nitrato en la solución del suelo, pueden ser tan altos como 1,240 ppm después de una aplicación de fertilizantes nitrogenados. En

suelos fértiles existen rangos normales de 124 ppm y 1,240 ppm que es lo que toman las plantas.

### **Importancia de la Fijación del Nitrógeno en el Suelo**

Tsidale y Nelson (1982), mencionaron que existe una relación estrecha G/N y en términos generales si esta relación es mayor de 30, no hay liberación inmediata de nitrógeno aprovechable, por lo que existe fijación de las formas nítricas y amoniacales, reduciéndose la disponibilidad del nitrógeno en el suelo, si dicha relación es menor de 20, algo de nitrógeno se desmineraliza quedando utilizable para las plantas.

### **AZOSPIRILLUM**

La clasificación como género de *Azospirillum* fué hecha por Tarrand et al (1978), para subsistir al antiguo *Spirillum lipoferum* y su división en las especies *A. lipoferum*, *A. brasilense*, lo que consta en el Manual de Bergey (1984) y De Krieg (1976).

*Spirillum lipoferum* es sinónimo de *Azospirillum lipoferum*.

Según el manual de Bergey (1984) el *Azospirillum* se clasifica en:

## TAXONOMIA

Reino..... Procaryote  
División.....Gracilicute  
Clase..... Scotobacteria  
Familia..... No existe  
Género.....*Azospirillum*  
Especie.....*lipoferum brasilense*

### **Historia del Género *Azospirillum*.**

*Azospirillum lipoferum* fue primeramente aislado y descrito por Beijerinck (1952), en Holanda, pero durante casi 50 años el mismo autor permaneció ignorado, hasta que fuera redescubierto en Brasil por Bullock y Dobereiner (1975). Day y Dóbereiner, ( 1976), Dobereiner et al. (1976).

Barver y Evans (1976), Day y Dóbereiner (1976), establecen que para el crecimiento y fijación de *Azospirillum* requiere de una temperatura de 30 a 40°C y un pH de 6.0 a 7.8 dentro de cuyos límites se encuentran los valores óptimos.

En Argentina lo aislaron por primera vez por Merzari et al (1977) citado por Rodríguez (1981) Y desde entonces debido a la creciente importancia de

la fijación biológica del nitrógeno, el conocimiento sobre el mismo se incrementó enormemente.

### **Características de la Bacteria**

Pérez. (1996), menciona que la cepa C2 es resistente a estreptomicina a (400 ppm) y su temperatura óptima es de 30°C, mientras que la cepa C3 no es tan resistente a estreptomicina, su temperatura optima de 30° C.

### **Aislamiento**

Para llevar acabo el asilamiento de las bacterias del género *Azospirillum* resulta en lo general muy simple, ya sea a partir de suelo rizosférico o de la superficie de las raíces, o tallos de algunas plantas. El medio de cultivo usado por excelencia para el enriquecimiento de las especies de *Azospirillum* ha sido el NFb semigelificado “libre” de nitrógeno y con malato como fuente de carbono (Döbereiner J, 1976). El cultivo puro se logra en diferentes medios de laboratorio, siendo comúnmente utilizado un medio al que se le añade colorante rojo congo (Rodríguez et al, 1982), en el cual *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, toman un color rojo escarlata que permite la diferenciación de otros géneros bacterianos.

## Identificación

Existen diversas pruebas para el reconocimiento de las especies de *Azospirillum* entre ellas las bioquímicas y las inmunológicas. Algunas características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral (Döbereiner J. 1992). Las células contienen gran cantidad de de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50 % del peso celular (Okon et al, 1976), observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes gránulos refringentes. En cultivos semigelificados y gelificados con más de 24 hrs. de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes (Lamm R et al, 1981). Una de las características fenotípicas más ampliamente utilizada como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum* es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante rojo congo (Rodríguez et al, 1982). Sin embargo, en este medio pueden hallarse colonias mutantes de *Azospirillum* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no identificados (Bastarrachea, F et al, 1987)

## Distribución

Los *Azospirillum* muestran una amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Aún cuando son más abundantes en las regiones tropicales, también se les encuentra en las regiones templadas, frías y desérticas (Tyler

M et al 1979). En las regiones templadas del sur de Brasil, los Estados Unidos y Kenia, la presencia de *Azospirillum* es menor al 10 % (Marriell et al, 1976) El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies del género *Azospirillum*. Las especies *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, aún cuando a pH menor a 5 se les encuentra en forma esporádica y no se logra su aislamiento de suelos con un pH menor a 4.5 (Elshanshoury, A. R. 1995)

Las bacterias del genero *Azospirillum* han sido aisladas de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas y de su rizosfera, incluyendo cereales como maíz, trigo, sorgo, arroz, avena, (Wong, P y Stenberg, 1979), pastos forrajeros, algunas especies de henequén y plantas cactáceas ( Mascarúa E et al,1988)

### **Ambiente rizosférico**

La adaptación de *Azospirillum* al futuro ambiente rizosférico probablemente se inicia con la germinación de la semilla, la cual exuda infinidad de compuestos orgánicos. Aún cuando las especies de *Azospirillum* difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno, estas bacterias usan para su crecimiento unos pocos mono y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico, succínico y algunos aminoácidos. (Tarrand J. et al,1978)

Tanto *Azospirillum brasilense* como *Azospirillum lipoferum* tienen la capacidad de crecer autotróficamente con H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Además una respuesta hacia el oxígeno (aerotaxia) fue observada en *Azospirillum brasilense* (Barak, R. et al, 1982). Zonas de baja concentración de oxígeno fueron preferidas por las células bacterianas para su crecimiento y multiplicación, siendo repelidas por altas concentraciones de oxígeno y condiciones anaeróbicas (Barak, R., et al, 1982). La colonización de la rizosfera y la superficie o interior de las raíces será el resultado del enriquecimiento selectivo de los microorganismos mejor adaptados a estos ambientes. Por ejemplo, la capacidad para producir bacteriocinas por algunas cepas de *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* (Oliveira, R. A. Drozdowicz. 1987) podría ser una ventaja competitiva sobre las cepas de estas especies o intimamente relacionadas que sean sensibles a estas biomoléculas.

Es posible que en el ambiente rizosférico las especies de *Azospirillum* puedan ser antagonizadas. Alrededor de 400 actinomicetos aislados de la rizosfera del centeno fueron reportadas como antagonistas de *Azospirillum spp.* y *Azospirillum lipoferum* (Ladha, J. et al, 1982). Esta actividad antagonista correlaciona con alta sensibilidad de *Azospirillum brasilense* a los antibióticos estreptomicina, tetraciclina y cloranfenicol (López-Reyes et al, 1989) producidos por actinomicetos del suelo en comparación a la elevada resistencia a los antibióticos β-lactámicos producidos por hongos.

Diversas condiciones tales como el envejecimiento celular y la presencia de metales pesados provocan que las células vibroides de *Azospirillum* cambien su morfología y tomen la forma de “quistes” (conocidos como formas C), conduciendo a la agregación celular y formando grumos visibles de gran tamaño (Bashan, Y., G. Holguin. 1997). La agregación y la formación de quistes mejora la sobrevivencia de *Azospirillum*, situación en la que la acumulación de poli-  $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) parece desempeñar una función importante al servir como almacén de carbono y energía (Albrecht, et al, 1976), Además, diversas funciones fisiológicas son atribuidas al PHB, destacándose la mayor resistencia a la desecación (Lamm et al 1981), a la luz ultravioleta y al choque osmótico (Tal S. et al 1985) Se ha sugerido que la formación de quistes pudiera desempeñar una función importante en la sobrevivencia de *Azospirillum* en el ambiente rizosférico, por ejemplo, cuando los nutrientes son limitados, previo a la asociación con las raíces de la planta (Tal S. et al 1985).

### **Fijación del Nitrógeno por la Bacteria**

Evans (1975) y Brown et al. (1975), publicaron que es importante entender la bioquímica, la genética, la fisiología y la biología de estas bacterias, si se quiere obtener la mayor ventaja del nitrógeno fijado biológicamente y dirigir el trabajo básico hacia el campo.

La fijación del nitrógeno, es un proceso clave para que continúe la vida sobre este planeta, por ella se recobra el nitrógeno que se pierde por la vía de la desnitrificación microbiana en el suelo.

Existe también la esperanza de que el conocimiento del mecanismo de la fijación del  $N_2$  por la nitrogenasa puede estimular el desarrollo de catalizadores que pueden reducir la demanda energética para el nitrógeno fijado industrialmente.

Cada  $N_2$  que se fija requiere aproximadamente de 12 a 24 moléculas de ATP. La estequiometría exacta depende de la relación de los componentes proteínicos, así como la disponibilidad de ATP y de electrones (Shah et al, 1975). Este requisito de energía tan alto, presumiblemente es la razón de que la mayoría de los organismos no fijan al  $N_2$ .

### **Efectos de *Azospirillum* en Diferentes Cultivos**

Danneber, et al (1986), señalan que después del descubrimiento desde hace algunos años de la asociación entre cereales y la bacteria del género *Azospirillum* es necesaria su identificación y distribución en los suelos de estas regiones áridas. Esta ha sido en general la esperanza, para la fijación del nitrógeno, la bacteria vive en y dentro de la superficie de las raíces y proporciona nitrógeno disponible a la planta. A su vez puede reducir la demanda de fertilizantes nitrogenados e incrementar la cosecha.

Sashan, et al (1990), evaluó la capacidad del *Azospirillum brasilense* para mejorar la acumulación de  $K^+$ , P,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $S^{-2}$ ,  $Na^+$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ , B,  $Cu^{+2}$ , y  $Zn^{+2}$  en plantas inoculadas de trigo y frijol de soya, utilizando dos diferentes métodos analíticos con cinco cepas de *A. brasilense* originarias de cuatro diferentes regiones geográficas. Se incluyó como control un aislado de *Pseudomonas* de la rizósfera de plántulas de *Zea mays*. Todas las cepas de *A. brasilense* mejoraron significativamente el crecimiento de trigo y frijol de soya al incrementar el peso seco de la raíz y el tallo, y el área de superficie de la raíz. El grado de respuesta de la planta a la inoculación varió entre las diferentes cepas de *A. brasilense*. Todas las cepas pudieron colonizar las raíces, pero el mejor colonizador de raíz, la especie *Pseudomonas* no tuvo efecto sobre el crecimiento de la planta. Las cantidades de organismos de cepas brasileñas Sp-245 y Sp-246 que colonizaron raíces fueron similares sin importar la planta anfitriona. Las cantidades de organismos para las otras cepas dependieron directamente de la planta anfitriona. El elemento principal que caracterizó la acumulación mineral en plantas inoculadas fue que todos los tratamientos de inoculación cambiaron el balance mineral de las plantas, pero en forma inconsistente. La mejoría del incremento mineral en las plantas también varió en gran medida entre las cepas, y dependió directamente de la combinación entre cepa y planta. Una cepa capaz de incrementar la acumulación de un ión en particular en una especie o cultivo de una planta frecuentemente carecía de la capacidad de hacer lo mismo en otra. Los minerales en las plantas inoculadas no se distribuyeron en forma

igual en diferentes tejidos de la planta, y los cambios variaron entre los grupos de plantas dentro de cada tratamiento de inoculación de cepa bacterial. Sugerimos que, aunque las cepas de *A. brasilense* son capaces de cambiar el balance mineral y el contenido de las plantas, es poco probable que esta habilidad sea el mecanismo general responsable de que el *A. brasilense* mejore las plantas.

Gallo, et al (1991), reportan el efecto, en pruebas de campo, del *Azospirillum brasilense* Cd sobre las producciones de triticale en dos experimentos diferentes. los experimentos se llevaron a cabo en la "Azienda Presidenziale di Castelporziano " cerca de Roma. El cultivo Rigel de Triticum x Secale se inoculó con bacteria *A. brasilense* Cd a una concentración de  $1 \times 10^6$  bacterias por planta. Se establecieron ocho repeticiones para cada tratamiento, 60 kg/ha. de N (50%), 120 kg/ha. de N (100%), 60 kg/ha. más *Azospirillum* y 120 kg/ha. más *Azospirillum*. Los resultados confirmaron datos que se habían obtenido previamente cuando se inocularon otros granos y pastos de forraje. Los tratamientos inoculados con *Azospirillum* a niveles intermedios de nitrógeno mostraron una producción similar a la de aquellos no inoculados; los tratamientos totalmente fertilizados y los tratamientos inoculados enriquecidos con 120 kg/ha. de N, mostraron un incremento en la producción de aproximadamente 53 % sobre los testigos.

Mokadem, et al (1992), estudió el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* a 30, 60 Y 90 días sobre el contenido de aminoácidos ligados a proteínas de trigo, chícharo y lupina, así como la de *Rhizobium spp.* en leguminosas, tanto solo como mezclado con *Azospirillum*. Independientemente de la edad de las plantas, el contenido de aminoácidos siempre fue más alto en las raíces y los retoños después de inocular con *Azospirillum*. En los tejidos de las leguminosas se obtuvo la concentración más alta de aminoácidos al infectarlas con la mezcla; le siguieron la inoculación con *Rhizobium* y después la inoculación con *Azospirillum*. Las diferencias más claras se presentaron en las fases tempranas del crecimiento. No se encontraron diferencias cualitativas entre los aminoácidos más importantes. El favorecimiento de la acumulación de aminoácidos en los tejidos vegetales se debió a una reacción fisiológica específica de las plantas, causada por la colonización con *Azospirillum* en la región radicular.

## MATERIALES Y METODOS

Se colectaron raíces de maíz de tres localidades (Torreón, Bienvista, Coahuila y Celaya, Gto.) y se obtuvieron 40 cepas nativas de *Azospirillum* sp, las cuáles se reprodujeron y aplicaron a la semilla a concentración de  $10^6$  bacterias mL<sup>-1</sup> en dos genotipos de maíz forrajero, en el laboratorio de apoyo a investigación del Departamento de Ciencias Básicas. Los genotipos son una línea seleccionada con bajo contenido de nitrógeno (CML- 384) y otra seleccionada con contenido normal de nitrógeno (CML-321).

Por otro lado se esterilizó suelo de bosque, tamizó pasando por malla de 2 mm y depositó en botes de cartón de 1 kg de capacidad, en el invernadero 4 de Buenavista en la UAAAN se realizó la siembra con 4 semillas de maíz por bote (la semilla se inoculó un día antes de la siembra) y tres repeticiones de cada cepa, en un diseño completamente al azar.

Se tomaron datos de altura de planta durante cuatro semanas y después se cortó la base del tallo, separando también la raíz, pesando el follaje y raíz por separado, obteniendo el peso fresco, posteriormente se secaron ambas en la estufa a 65 ° C y se obtuvo el peso seco o biomasa por diferencia de peso.

Se utilizó en el programa estadístico el programa SAS, en el que se incluirán líneas, cepas, repeticiones, fechas de muestreo, peso fresco y seco de follaje y raíz.

## **Resultados y discusión**

El análisis de varianza para altura de planta indica diferencia ( $P \leq 0.01$ ) en la interacción de líneas por cepas, fechas de muestreo, y fechas por líneas (Cuadro 1), pero entre líneas sucedió lo contrario. Por otro lado el análisis de comparación de medias de Tukey (Cuadro 2), en la línea CML-321 muestra que la mejor cepa nativa de *Azospirillum* sp corresponde a Celaya, Gto., con el número 22, aunque también son estadísticamente iguales la 20, 18, 1, 17, 26, 39, 21, 28, 37, y 29. Para la línea CML-384 la que incrementó en mayor medida la altura de planta fue la 7 aislada de Torreón Coahuila, aunque son estadísticamente iguales la 36,23, 3 y 26. Al comparar con el testigo con cada línea, se encontró mayor diferencia en la CML-384, quizá por que es una línea con bajo contenido de nitrógeno. Es importante señalar que las cepas antes mencionadas inducen la síntesis de hormonas del crecimiento como auxinas y giberelinas por ello la respuesta en altura de planta como lo reporta Lucangeli y Botín, 1997.

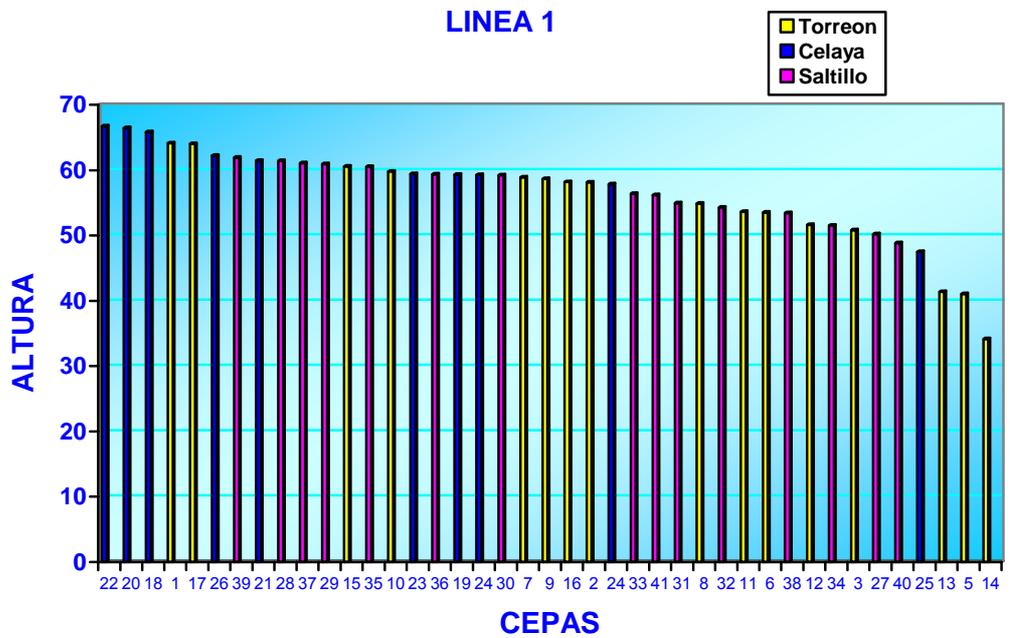
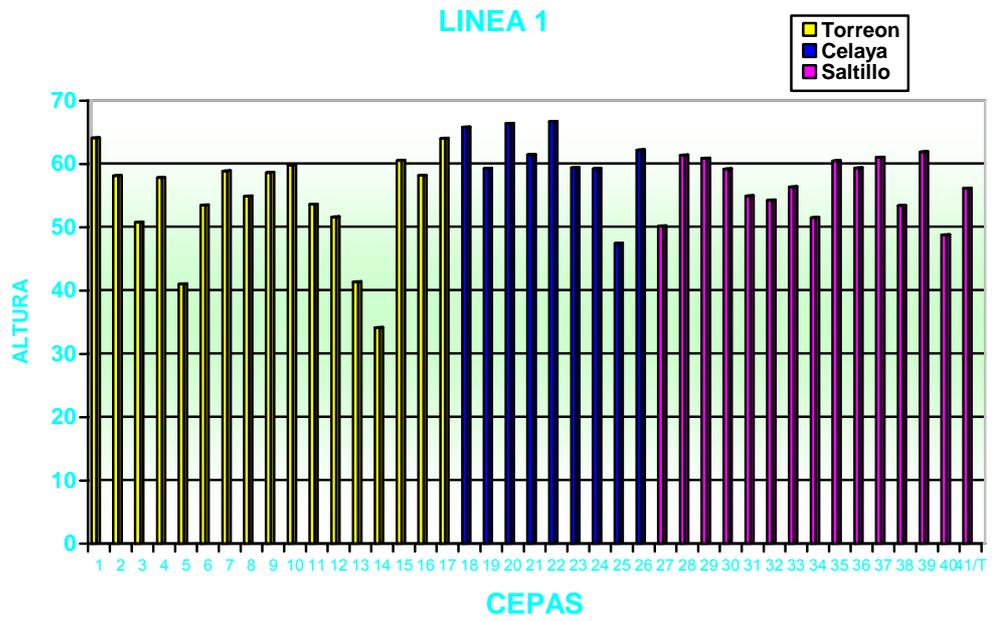
Cuadro 1. Cuadrados medios del ANVA para altura de planta en dos líneas de maíz forrajero inoculadas con 40 cepas de *Azospirillum* sp de tres localidades en Buenavista, Coahuila, 2005.

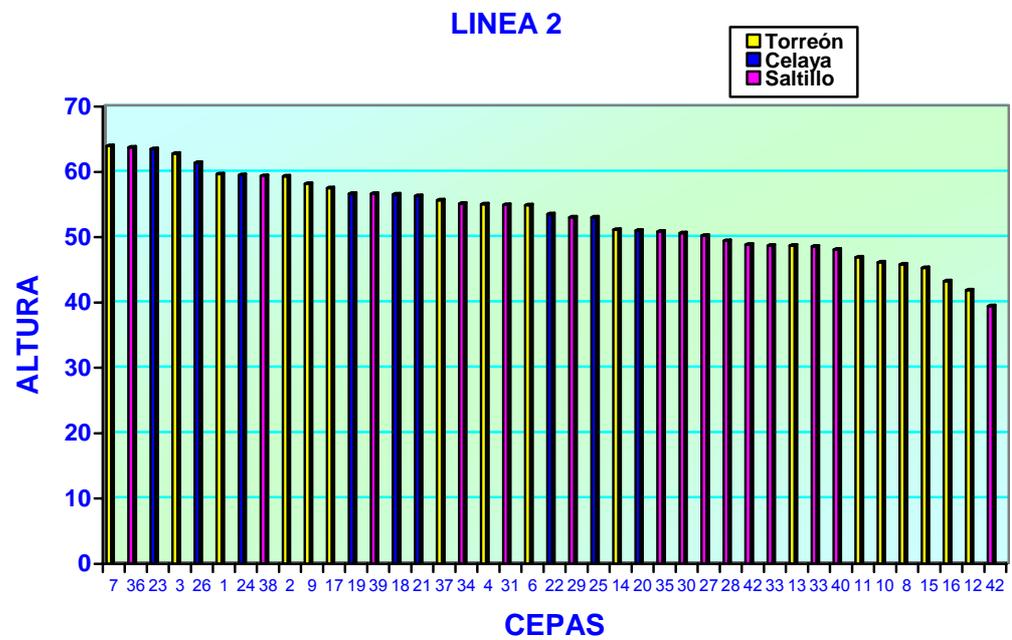
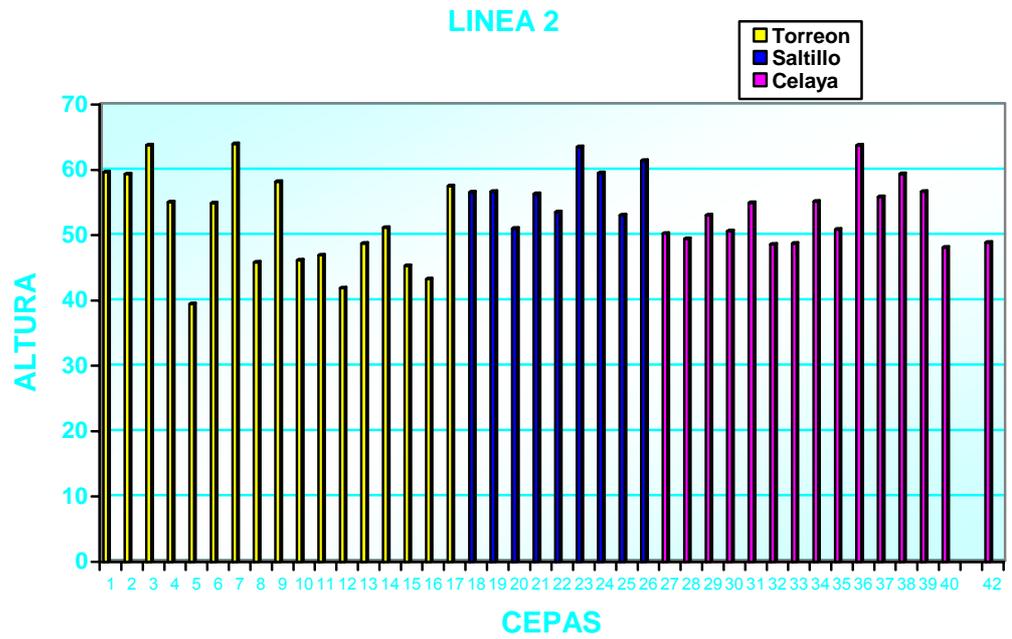
FV	GL	CM	F
Línea	1	1.90	0.1683 NS
Cepa (línea)	79	2.88	0.0001**
Fecha	3	3094.00	0.0001**
Línea *fecha	3	3.80	0.0101**
Error	237	0.95	

Cuadro 2. Comparación de medias de Tukey para altura de planta en línea CML- 321 (1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26) y Buenavista, Coahuila (27-40).

Línea	Cepa	altura	Línea	Cepa	Altura
1	22	66.71 a	2	7	63.98 a
1	20	66.42 a	2	36	63.72 a
1	18	65.83 a	2	23	63.51 a
1	1	64.10 a	2	3	62.77 a
1	17	64.02 a	2	26	61.39 a
1	26	62.21 a	2	1	59.63 b
1	39	61.91 a	2	24	59.50 b
1	21	61.46 a	2	38	59.38 b
1	28	61.39 a	2	2	59.34 b
1	37	61.06 a	2	9	58.17 b
1	29	60.92 a	2	17	57.49 b
1	15	60.55 a	2	19	56.67 b
1	35	60.51 a	2	39	56.65 b

1	10	59.80 a	2	18	56.56 b
1	23	59.43 b	2	21	56.32 b
1	36	59.36 b	2	37	55.64 b
1	19	59.30 b	2	34	55.14 b
1	24	59.27 b	2	4	55.02 b
1	30	59.24 b	2	31	54.95 b
1	7	58.87 b	2	6	54.88 b
1	9	58.63 b	2	22	53.53 b
1	16	58.17 b	2	29	53.06 c
1	2	58.13 b	2	25	53.03 c
1	4	57.83 b	2	14	51.14 c
1	33	56.39	2	20	51.01 c
1	Testigo 41	56.17 b	2	35	50.88 c
1	31	54.95 b	2	30	50.63 c
1	8	54.90 b	2	27	50.24 c
1	32	54.27 c	2	28	49.45 c
1	11	53.61 c	2	Testigo 42	48.88 c
1	6	53.50 c	2	33	48.74 c
1	38	53.42 c	2	13	48.71 c
1	12	51.62 c	2	32	48.58 c
1	34	51.53 c	2	40	48.12 c
1	3	50.80 c	2	11	46.93 c
1	27	50.19 c	2	10	46.17 c
1	40	48.80 c	2	8	45.81 c
1	25	47.47 d	2	15	45.31 d
1	13	41.36 e	2	16	43.25 d
1	5	41.03 e	2	12	41.91 d
1	14	34.14 f	2	5	39.48 d





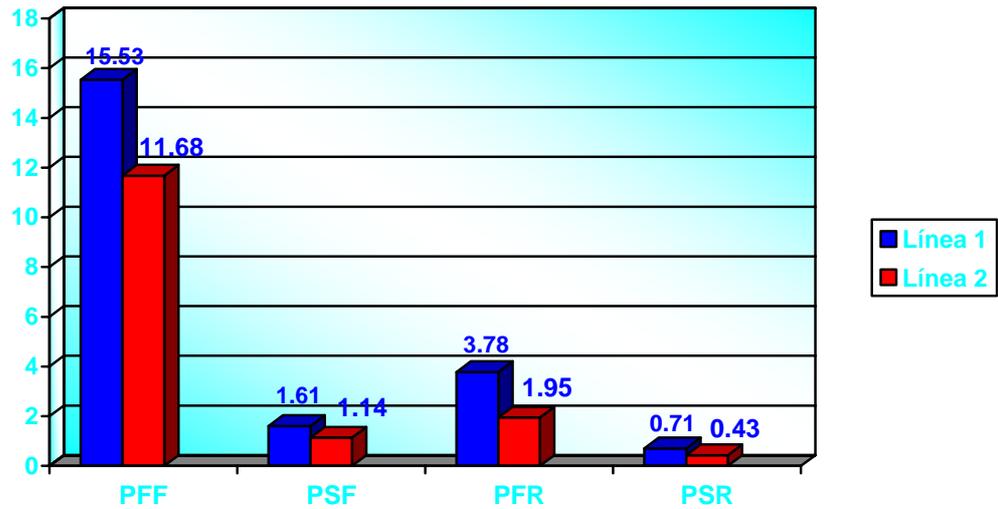
También se analizó el peso fresco y seco de follaje y raíz, el cuál indicó diferencia solo entre líneas, como se muestra en el Cuadro 3, y al comparar las medias por la prueba de Tukey la línea con mayor peso fresco y seco fue la CML- 321, como lo indica el Cuadro 4. Aparentemente solo la línea (genotipo) es el responsable del incremento en el peso de follaje y raíz, sin embargo estos resultados se obtuvieron en el invernadero y no se llevó a hasta la cosecha para evaluar las diferentes etapas fenológicas del maíz forrajero.

Cuadro 3. Cuadrados medios de peso fresco y seco con 40 cepas de *Azospirillum* sp en dos líneas de maíz forrajero, CML- 321 (contenido de nitrógeno normal) y CML – 384 (contenido bajo de nitrógeno) en invernadero, UAAAN, Saltillo, Coahuila., 2005.

		<b>PFF</b>		<b>PSF</b>		<b>PFR</b>		<b>PSR</b>	
<b>FV</b>	<b>GL</b>	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Línea	1	1386.242	51.08**	13.968	49.29**	202.033	50.74**	4.056	47.90**
Cepa	41	35.099	1.29NS	0.379	1.34NS	5.436	1.37NS	0.072	0.85NS
Línea*cepa	39	36.720	1.35NS	0.352	1.24NS	5.021	1.26NS	0.102	1.20NS
Error	164	27.137		0.283		3.982		0.085	

Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey para peso fresco y seco de follaje y raíz en línea CML-321(1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de *Azospirillum* sp

PFF		PSF		PFR		PSR	
Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media
1	16.53 a	1	1.61a	1	3.78a	1	0.71a
2	11.68 b	2	1.14b	2	1.95b	2	0.43b



## Conclusiones

La cepa 22 de *Asospirillum* sp aislada de Celaya, Gto. Obtuvo la mayor altura de planta con relación al testigo en la línea con bajo contenido de nitrógeno CML-384, y la cepa 7 aislada de Torreón, Coahuila lo fue para la CML-321 (contenido normal).

La línea CML-321 obtuvo el mayor peso fresco y seco de follaje y raíz.

## LITERATURA CITADA

Abencerraje, R.F. 1984. Respuesta del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Bajo Condiciones de Riego al Biofertilizante Líquido Obtenido por Biodegradación Anaeróbica del Estiércol de Bovino en la Región de derramadero, Coah. Tesis M.C. Especialidad de Suelos. Programa de Graduados. UAAAN. Saltillo, Coah. Méx.66 p.

Albrecht, S. L., Y. Okon, J. Lonquist, and R. H. Burris. 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in temperate climate. *Crop Science* 21:301-306.

Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo 2<sup>a</sup>. Ed. AGT editores, S.A Méx.

Arias, Ch.J. 1978. Digestión anaeróbica de desechos orgánicos Prioridad Estratégica para el desarrollo. Reunión Nacional sobre Energía no Convencional. palmira, Mor. México.

Baldani V., Lucía D. y Döbereiner, J. 1980. Host-plant specificity infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil. Biol. Biochem.* 12: 433-439.

Barak, R., I. Nur, Y. Okon, and Y. Henis. 1982. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 152:643-649.

Barver, L. E. and Evans, H. J. 1976. Characterización of nitróge – fixing bacterial strain from roots of *Digitaria sanguinalis*. Canadian Journal of Microbiology (22) : 254 - 260. Canadá.

Bashan, Y., G. Holguin. 1997. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances. Can. J. Microbiol. 43:103-121.

Bastarrachea, F., M. Zamudio, and R. Rivas. 1987. Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol. 34:24-29.

Bergey's, Manual. 1984, Bacteriología Sistemática. E.d. I. vol 1, sección 2. pp. 527 - 529. U.S.A.

Beijerinck, M: W. 1925. Ueber in *Spirillum* Welches frein stickstoff binden kan zen tralbl. Bakteriol Parasitenkd Infektionskr. (63) : 353 - 359. Rusia.

Buckman, H.O. y B.N.C. 1977. Naturaleza y Propiedades de los Suelos. La Montaner y Simon, S.A. España.

Büllow, J. F. W. Van e Döbereiner, J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes, in Brazil, Proc. Natl. Acad. Sci. (72) : 2389 - 2393. U.S.A.

Burgues, A. y F.R 1977. Biología del suelo Edit. Omega, S.A. España.

CEA. 2000. Situación actual y perspectiva de la producción de maíz en México 1990 – 1999 Centro de estadística Agropecuaria, SAGAR México. Pp. 10 - 19.

Cracogna M. F., Iglesias M. C., Díaz I., Gonzáles N. y Carvajal M. L. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2003. Resumen: A-045

Day, J. M., and J. Dobereiner, 1976. Physiological aspects of N<sub>2</sub> fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biology and Biochemistry* (8) : 45 - 50. U.S.A.

De la Garza, C. y C.L.R. 1988. Influencia de la Flora Bacteriana en la Biodegradación Anaeróbica del Estiércol de Bovino sobre la Disponibilidad del Fósforo. Resumen en el VII Congreso Nal. de Ingeniería Bioquímica. Esc. Nal. de C. Biol. I.P.N. p. 114. 30 años de la Investigación de Biotecnología en México.

Dobereiner, J. , Y. E. Marriol and M. Nery 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum*, Beijerinck. *Canadian Journal Microbiology* (22) : 1464 – 1473. Canadá.

Elshanshoury, A. R. 1995. Interactions of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* and *Streptomyces mutabilis*.in relation to their effect on wheat development. *J. Agron. Crop. Sci.* 175:119-127.

Evans, H. J. 1975. " Enhancing Biological Nitrogen Fixation ". *Natl. Sci. Found.* Washington D. C. U.S.A.

Fasshendder, Hans W. 1980. *Química de Suelos con énfasis en suelos de América Latina*. Turrialba, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. pp. 219 - 231, 251 - 262. San José Costa Rica.

FIRA, 1986. *El cultivo de Maíz Forrajero*. Boletín informativo 18 – 178. Secretaría de Agricultura y desarrollo Rural. México, D.F.

FIRA, 1999. *Oportunidades de desarrollo del Maíz Mexicano*. Secretaria de la Agricultura y Desarrollo Rural. México, D.F.

Gallo, M. del, Mosconi, C. Rossi, L. 1991. Inoculating triticale with *Azospirillum brasilense*. *CIMMYT*. pp. 241 - 243. El Batan, México.

Jacob, A. U.H. 1973. *Fertilización*.Ed. Euroamericana. pp 47 - 50, 139 - 143. U.S.A.

Krieg, N. R. 1976. Biology of the cherna - heterotropic Spirilla. Bacteriology. Rev. (40) : 55 - 115. U.S.A.

Ladha, J., W. L. Barraquio, and I. Watanabe. 1982. Immunological techniques to identify Azospirillum associated with wetland rice. Can. J. Microbiol. 28:478-485.

Lagarda, G.; R. A. 1974. Fertilización en trigo para diferentes rotaciones de cultivo en la Delta del río Mayo. Tesis profesional, Escuela de Agronomía. UACH, México.

Lamm, R. B., and Neyra, C. A. 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. Can. J. Microbiol. 27:1320-1325.

López-Reyes, L., L. Soto-Urzúa, M. A. Mascarúa-Esparza, I. Herrera-Camacho, and J. Caballero-Mellado. 1989. Antibiotic resistance and b-lactamase activity in Azospirillum. Soil Biol. Biochem. 21:651-655.

Martinez, A.H. 1981. Comportamiento de VAN-361 Lucio Blanco bajo Diferentes Niveles de Fertilización, Densidad y Métodos de Siembra. Tesis de licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coah. Méx.

Martínez, P.J.F. 1982. Respuesta de la soya (*Glycine max* L.) variedad Tamazula S-80 al fertilizante líquido obtenido por fermentación anaeróbica del estiércol de bovino. Tesis M.C. Especialidad de Suelos. Programa de Graduados. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Mascarúa-Esparza, M.A., R. Villa-González, and J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant Soil* 106:91-95.

Mendoza, G.O. 1985. Respuesta de la Fenología y el Rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al Biodegradado Anaeróbico Líquido del Estiércol de Bovino en la Aurora Coah. Tesis M.C. Especialidad de Suelos. Programa de Graduados. UAAAN. Saltillo, Coah. Méx. 69 p.

Mendoza V. R. 1986. Respuesta del maíz (*Zea maíz* L) variedad Lucio Blanco (AN-361) a la inoculación de *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum* sp en Derramadero Coahuila. Tesis de Maestría. UAAAN. México. 81 p.

Murguía, T.L.A. 1981 Análisis Técnico Económico de la adaptación de digestores anaeróbicos de estiércol a la agricultura y Ganadería Mexicana, Esc. Nal. De C. Biol. I.P.N.

Mokadem, M. T. el, Badawi, A. M. 1992. Effect of Azospirillum inoculation on the amino acid content in roots and shoots of wheat, barley, peas and lupino Zentralblatt - fuer - Mikrobiologie 147 (1-2). ( Germany, F.R. ).

Núñez H.G., E. F. Contreras G, R. Faz C y R Herrera.1999. Selección de híbridos para obtener mayor rendimiento y alto valor energético en maíz para ensilaje. In: Componentes tecnológicos para la producción de ensilados de maíz y sorgo. SAGAR-INIFAP-CIRNOC-CELALA. P.2-5

Nuñez, E.R. 1977. Principios de fertilización Agrícola de Abonos Orgánicos. Apuntes del curso de Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. U.N.A.M. Méx.

Okon, Y., S. L. Albrecht, and R. H. Burris. 1976. Carbon and ammonia metabolism of Spirillum lipoferum. J. Bacteriol. 128:592-597

Oliveira, R. G. B., and A. Drozdowicz. 1987. Inhibition of producing strains of Azospirillum lipoferum by their own bacteriocins. Zentralbl. Mikrobiol.. 142:387-391.

Onudi. 1997. Industria de los fertilizantes. New York

Ortiz V. 8., Ortiz S. C. A. 1982. Edafología. Editorial Limusa, 3 ed pp. 129 - 135. México.

Peña R. A.,G. Núñez H y F. Gonzáles C. 2002. Potencial forrajero de poblaciones de maíz y relación entre atributos agronómicos con la calidad. *Téc. Pecu. Mex.* 40:215-228

Peréz ,Ch., A.. 1996. Respuesta a temperatura y Estreptomina de 10 cepas de *Azospirillum* del Bajío, UAMN y Navidad N.L. Tesis profesional UAMN, Buenavista, Saltillo Coahuila.

Pichardo, E.J. 1980. Obtención de energía mediante la digestión de estiércol de vaca. Tesis profesional. ENEP, UNAM, Cuautitlán, Estado de México.

Poder Ejecutivo Federal. 1985 – 1988. Programa nacional del desarrollo rural integral. Méx.

Skinner, S.F 1975. I Anaerobic Bacteria and their Activities in soil. *Soil Microbiology*, Ed. By Walker. Rothamsted exp. Station, Harpenden, Herts. Britain.

Tal, S. and Y. Okon. 1985. Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31:608-613.

Tarrand, J. J., Krieg, N. R. and Dóbereiner, J. 1978. A Taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* grupo with description of a new genus *Azospirillum lipoferum* Beijerinck. Con nov. and *Azospirillum brasilense*. Canadian Journal Microbiology. (24) : 967 - 980. Canadá.

Thompson, W. W. and T. E. Weiner, 1962. The fine structure of chloroplast from mineral deficient on the structure of the leaf cells of tomato, spinach, maize. Australian. J. Bot. (14) : 1 - 18. Australia.

Tisdale, S. Y. W., Nelson, 1982. Fertilidad de Suelos y Fertilizantes. ed. UTHEA, 1 era ed. en Español, pp. 147. México.

Tisdale, S.L y W.L 1975. Soil fertility and fertilizers. Ed. The MacMillan publ. Co. Inc. N. York.

Tyler, M.E., J. R. Milam, R. L. Smith, S. C. Schank, and D. A. Zuberer. 1979. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. Can. J. Microbiol. 25:693-697.

Vesk, M. J. V. Possingham and F. V. Mercer, 1966. The effect of mineral nutrient deficiencies on the structure of the leaf cells of tomato, spinach, and maize. Austral Journal Botanical (14) : 1 - 18. Australia.

Wong, P.P., and N. E. Stenberg. 1979. Characterization of *Azospirillum* isolated from nitrogen-fixing roots of harvested sorghum plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:1189-1191.