

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Viabilidad de *Azospirillum* en Respuesta a la Concentración de Nitrógeno Inorgánico  
en Lechuga Romana

Por:

**MARTÍN HERNÁNDEZ SALINAS**

TESIS

Presentada como requisito parcial para  
obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Viabilidad de *Azospirillum* en Respuesta a la Concentración de Nitrógeno Inorgánico  
en Lechuga Romana

Por:

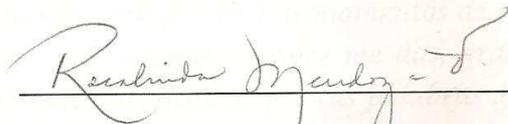
**MARTÍN HERNÁNDEZ SALINAS**

TESIS

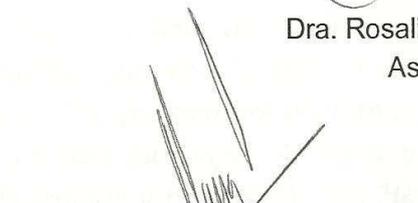
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

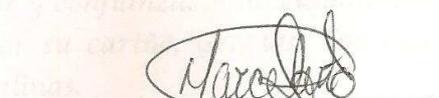
Aprobada



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal  
Asesora Principal



Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Coasesor



Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente  
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2012

## AGRADECIMIENTOS

*A dios por darme la oportunidad de vivir y disfrutar de una vida en convivencia con unos padres que lo han dado todo por sus hijos y unos hermanos que han sacrificado muchas cosas y puesto su esfuerzo para que uno de ellos logre sus metas y tener éxito en la vida.*

*Al Cristo aparecido de Totolapan, Morelos por ser mi fortaleza, mi guía, mi luz en el camino hacia el logro de mis metas y lograrlas con éxito.*

*A mi padre quien es mi ejemplo a seguir. Gracias papá por todo lo que me has enseñado en el transcurso de mi vida junto a ti. Te doy los más sinceros de los agradecimientos por haber confiado en mí y darme todo tu apoyo moral y económico para que terminara mi carrera como Ing. Agrónomo en Horticultura. Gracias padre por esos sacrificios que aun haces por mí, por esos consejos tuyos para hacerme un hombre de bien, gracias por guiar mi vida con ejemplo de sencillez, respeto, humildad y responsabilidad. A ti mamá por darme los mejores años de tu vida y enseñarme muchas cosas que han sido de mucha utilidad para mi formación profesional, gracias madre por acompañarme siempre en mis momentos de desaliento y felicidad, gracias por tu amor y cariño que siempre me das, gracias por los cuidados que me diste al estar enfermo, gracias por tus palabras de aliento al saber que tu hijo está lejos de ti, gracias por haberme dado la vida y la dicha de tenerme siempre a tu lado. A mis hermanos Valentín, Félix, Bernardo y Juan Carlos (+), que siempre me han dado su amor y confianza. A mi cuñada Delia y sobrinos Santiago, Adriana y Nayeli por su cariño, Gracias. Con amor, admiración y respeto Martín Hernández Salinas.*

*A mis amigos del CBTa 71. Álvaro, por brindarme tu amistad y comprensión en los momentos tristes de mi vida, gracias amigo por escucharme siempre y dejarme sentir como uno de tus hermanos y a tu familia por dejarme entrar y formar parte de ella, te agradezco esos momentos que compartes conmigo y esos consejos tuyos que siempre supiste darme. Gracias carnal. Lorena, gracias carnala por aconsejarme seguir con mi formación profesional y orientarme a mi llegada a nuestra alma mater, la bendita NARRO. Gracias amiga por esos ratos que siempre me dedicas para escuchar mis penas y aconsejarme, te doy toda mi gratitud y cariño por confiar en mí siempre.*

*A mis amigos de la NARRO. Yadira, gracias amiga por darme tu confianza y tus consejos, estoy muy contento por haberte conocido, y también a Henry por su amistad y confianza. Obed, gracias amigo por tu amistad ten siempre presente que en mí tendrás a un amigo que te estima. Omar (Cabrito), gracias amigo por compartir tus alegrías, experiencias y confianza conmigo. Soledad (solecito), gracias por tus consejos que me han servido en mucho y sobre todo por la confianza que me brindas. A ti chino, Jorge, Eliza de la Vega, Lupita, Emilia, T. Maricela, Wilí. Gracias por su amistad.*

*A los compañeros y amigos de la carrera Alday, Levi, Alejandro, Sócrates, Lino, Fernando, Hermelinda. Gracias por su compañerismo y amistad.*

*A mis compañeros y amigos de cuarto en el Palomar 2, Cuarto 1. Irving Giovanni, Alfonso, J. Manuel, Hugo, Saúl Ibsan, Eduardo, Roberto y Miguel a y sin olvidar a plascencia. Gracias por su compañía, amistad y cariño. A doña Licha por esos burros que siempre quitaban el hambre por las noches.*

*A mi gloriosa Alma Mater, por ser la mejor universidad agraria del país y permitirme ser un BUITRE POR SIEMPRE.*

*A la Dra. Rosalinda Mendoza V. por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y sobre todo por la confianza que ha puesto en mí.*

*Al MC. Juan Manuel Ruiz Nieves, por su asesoría en la realización de este proyecto y por su amistad gracias.*

***A TODOS MUCHAS GRACIAS***

## **DEDICATORIAS**

*A mi madre Remigia Salinas Sánchez y mi padre Pedro Hernández Moz por darme la vida y estar siempre presentes en mi mente, por confiar en mí a pesar de la distancia y circunstancias que se presentan en mi vida y ser ejemplo de humildad, sencillez, amabilidad y responsabilidad.*

*A mis hermanos Valentín, Félix, Bernardo, Juan Carlos (+), por su amor y cariño. A mi cuñada Delia y sobrinos Santiago, Adriana y Nayelí, por su cariño. A todos mis tíos y tías que creyeron en mí para lograr mis objetivos.*

*A mis abuelos Anita (+), Celso (+) y Carlos (+), Hermelinda (+). Por compartir parte de su vida conmigo, su cariño y amor.*

*A mis tíos Santiago (+), Trinidad (+), Fausto (+), por aconsejarme seguir con formación y darme su cariño y amor mientras estuvieron en este mundo para hacerlo, y solo me queda decirle tíos ¡lo hemos logrado!*

*A mi querida Alma Mater (La Bendita Narro), por formarme como ingeniero y porque en ella he pasado los momentos más felices de mi vida en compañía de mis amigos y porque también Ahí viví, comí, me prepare, estudie, y sobre todo porque he vivido alegrías y tristezas, éxitos, derrotas y triunfos como persona, estudiante y profesionalista.*

*A la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal, por compartir sus conocimientos y amistad conmigo y por la realización de este proyecto para poder finalizar una gran etapa de mi vida profesional y personal.*

*A todos los profesores Ingenieros, Doctores y Mc. Que compartieron sus conocimientos y experiencias laborales en el salón de clases y en esas salidas a prácticas donde reafirmamos nuestros conocimientos.*

*A mis amigos del alma Álvaro, Lorena, Yadira, Obed, Soledad, Omar, Saúl Ibsan, Miguel, Plascencia, Eduardo, Roberto, Chino, Jorge, Elí, Wilí, Emilia, Lupita, T. Maricela.*

**A TODOS ELLOS LES DEDICO ESTE PROYECTO.**

## INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	v
INDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Origen e importancia económica de la lechuga.....	4
Características botánicas.....	4
Producción nacional .....	5
Descripción del material (var. Great Lakes).....	5
Género <i>Azospirillum</i> .....	6
Ventajas del uso de <i>Azospirillum</i> sp y respuesta agronómica.....	6
Características de la bacteria .....	9
Distribución.....	9
Fijación de nitrógeno por la bacteria.....	10
Actividad de la bacteria .....	11
Colonización de las raíces .....	11
Asociación bacteria-planta.....	11
Aislamiento de la bacteria.....	12
Identificación .....	12
Interacción planta-bacteria.....	13
Biofertilización de diferentes cultivos con <i>Azospirillum</i> .....	13
<i>Azospirillum</i> como promotor de fitohormonas de crecimiento.....	14
Cambios morfológicos en raíz por <i>Azospirillum</i> .....	14
Inoculación y respuesta agronómica .....	15

Viabilidad de <i>Azospirillum</i> en la rizósfera de la planta .....	18
Fijadores de nitrógeno asimbióticos.....	21
Nitrógeno .....	22
Nitrógeno del suelo.....	23
Formas de nitrógeno aprovechadas por la planta .....	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
Localización geográfica.....	25
Materiales .....	25
Material biológico.....	25
Tratamientos estudiados.....	25
Medios selectivos de crecimiento.....	26
Inoculación y aislamiento.....	27
Descripción de colonias y pruebas bioquímicas .....	28
Determinación de nitrógeno en hojas de lechuga .....	28
Modelo estadístico.....	29
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>35</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Cepas de <i>Azospirillum sp</i> individuales y mezcladas a $10^9$ UFC ml <sup>-1</sup> , adicionadas con nitrógeno.....	26
<b>Cuadro 2.</b> Composición del medio de cultivo Nfb con Rojo Congo.....	27
<b>Cuadro 3.</b> Descripción de colonias desarrolladas en medio NFb.....	30
<b>Cuadro 4.</b> Cuadrados medios del ANVA para la cuantificación de bacterias del género <i>Azospirillum</i> en follaje de lechuga, inoculadas con tres cepas de <i>Azospirillum</i> . Buenavista, Coahuila, 2011.....	31
<b>Cuadro 5.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) en la interacción de cepas inoculadas en raíz de lechuga y concentración de nitrógeno para la variable Bacterias.....	31
<b>Cuadro 6.</b> Cuadrados medios del ANVA para la concentración de nitrógeno obtenida en raíces de lechuga previa inoculación con cepas de <i>Azospirillum</i> y ocho concentraciones de nitrógeno.....	32
<b>Cuadro 7.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) en la interacción de cepas y concentración de nitrógeno para la variable Nitrógeno.....	33

## RESUMEN

Esta investigación se realizó durante el periodo Ago. 2011- Feb. 2012, en el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para conocer la viabilidad de *Azospirillum* en respuesta a la concentración de nitrógeno inorgánico, al ser inoculada en plantas de lechuga romana después de un ciclo productivo. El experimento se realizó en un suelo franco arcillo limoso desinfectado, se inocularon con cepas de *Azospirillum*, C3, C5, Sp7 (*Azospirillum brasilense*) y la mezcla de la C3+C5, en concentración de  $10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>, distribuidas en 33 tratamientos los cuales contenían estas bacterias más la solución nutritiva schuartz, con ocho concentraciones de nitrógeno 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y como testigo 0 %. Para identificar y cuantificar el género *Azospirillum* se tomaron tres muestras de 2 cm de raíz por planta colocándose en solución salina de NaCl al 0.086 % e incubaron por 72 h a 32 °C, de cada tubo se tomó un ml del extracto, enseguida se realizó la siembra en tubos con medio Nfb semilíquido incubándose a 32 °C por 48 h. Pasado este tiempo los tubos presentaron el halo característico del género *Azospirillum* las cuáles fueron sembradas en medio Nfb sólido con Rojo Congo por estría. Estas se incubaron a 32 °C por 24 h. Los datos obtenidos de esta investigación se analizaron con un diseño de bloques al azar con un arreglo factorial A\*B. Se evaluó la concentración de *Azospirillum* en raíces de lechuga, por medio del método de dilución en placa y el contenido de nitrógeno en hojas de lechuga. Los resultados obtenidos de cada variable mostraron diferencia entre cepas, y la prueba de comparación de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para la concentración de nitrógeno se produjo 3.76% de N con la aplicación de 15 % de nitrógeno químico, interactuando con la cepa 3. Se concluye que después de un ciclo productivo del cultivo de lechuga romana y sin inoculación en el ciclo siguiente se mantiene viable el *Azospirillum*. E incrementa en contenido de nitrógeno en un 15 % en el follaje.

Palabras clave: Lechuga Romana, *Azospirillum*, Concentración de Nitrógeno, Cepa.

## INTRODUCCIÓN

Las hortalizas suelen ser un alimento básico en la gastronomía de cualquier país o cultura. Dentro de éstas, la lechuga es pieza fundamental en el arte culinario por su utilización en todo tipo de comida; aunado a la gran demanda que tiene en la actualidad por sus características de alto valor nutritivo y equilibrio orgánico. La lechuga se encuentra en el mercado en cualquier época del año y como el resto de las hortalizas, es un buen abastecedor de vitaminas, minerales y sales, indispensables para el organismo.

Tan amplia como la historia de la lechuga en América, es la de nuestros productores, quienes han mantenido sus tradiciones en el manejo y la comercialización, con diferencias abismales en los sistemas de producción de las diferentes regiones del país.

La importancia del cultivo de la lechuga ha ido incrementándose en los últimos años, debido a la diversificación de tipos varietales.

La necesidad de sustituir la agricultura convencional a base de agroquímicos por una agricultura sostenible menos agresiva con el medio ambiente, ha llevado a la investigación y desarrollo de nuevos productos que sean biotecnológicamente viables con un impacto mínimo para el ecosistema y para la salud humana, permitiendo aumentar la calidad nutricional y rendimiento de los cultivos dentro de tecnologías más amigables con la naturaleza.

Una alternativa viable que contribuye favorablemente con este propósito es el uso de biofertilizantes, los cuales recuperan la fertilidad y productividad del suelo y permiten darle a las plantas los nutrimentos necesarios para su crecimiento contribuyendo en este sentido a mejorar la calidad de los cultivos para su producción agrícola.

El *Azospirillum* se considera como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad debido a su

capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola.

*Azospirillum sp* es una bacteria de vida libre o en asociación con plantas, pertenece a un grupo de bacterias Gram negativas, fijador de nitrógeno en condiciones microaerofílicas, productor de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citocininas que promueven el crecimiento en muchos cultivos de importancia agronómica.

Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum sp*; se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas. En tal sentido, sabemos que cerca del 80% de las bacterias aisladas de rizósfera son capaces de producir compuestos de tipo ácido 3-indol acético (AIA) (Cheryl and Glick 1996).

Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*, esta es una bacteria mas asociada a las plantas y se dice que los mecanismos del efecto de las bacterias promotoras de crecimiento no son bien comprendidos; sin embargo, se ha sugerido un amplio rango de posibilidades que incluye efectos directos o indirectos. El efecto directo consiste en un aumento en la movilización de nutrimentos solubles, seguido por el mejoramiento de absorción de las plantas. Los efectos indirectos incluyen el aumento de fijación de N<sub>2</sub>, al mejorar la longitud de la raíz y el aumento de la actividad nitrogenasa, los cuales inducen resistencia sistémica a la planta.

En la rizósfera los exudados producidos dependen del tipo de cultivo y región, estudios revelan que al inocular lechuga con bacterias promotoras de crecimiento se incrementa el nitrógeno en follaje de lechuga, en un rango de 4.5 a 4.9 % utilizando 10<sup>9</sup> células ml (Díaz- Vargas *et al.*, 2001).

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la viabilidad de *Azospirillum sp* en raíces de lechuga romana después de un ciclo fenológico sin aplicar la bacteria en suelo franco arcillo limoso con ocho concentraciones de nitrógeno inorgánico.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Identificar por morfología y bioquímica cepas de *Azospirillum sp*.

Encontrar la cepa de *Azospirillum sp* que se mantenga viable e incremente su producción con el menor contenido de nitrógeno inorgánico en lechuga romana cv. Great Lakes.

## **HIPÓTESIS**

Al menos una de las cepas permanezca viable de un ciclo productivo a otro en lechuga romana con alguna concentración de nitrógeno inorgánico.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Origen e importancia económica de la lechuga

La lechuga tiene su centro de origen en la cuenca del Mediterráneo, los primeros indicios de su existencia datan de aproximadamente 4,500 años A. C. en grabados encontrados en tumbas egipcias, en donde se observan lechugas similares a las conocidas como tipo espárrago. También fue conocida y cultivada por los antiguos persas, griegos y romanos, desde el mediterráneo su cultivo se expandió rápidamente por Europa y fue introducida en América por los primeros colonizadores en el año 1494 y su cultivo se difundió rápidamente.

La lechuga (*Lactuca sativa L.*) es una de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial. Se utilizan fundamentalmente sus hojas tiernas, que frecuentemente tienden a formar cogollo. En algunas variedades se utiliza el tallo engrosado.

La importancia del cultivo de la lechuga ha ido aumentando en los últimos años, debido tanto a la diversificación de tipos varietales como al incremento de la superficie sembrada.

### Características botánicas

La lechuga es una planta anual de días largos y ciclo corto, que se consume en estado joven antes de llegar a floración. Desarrolla una roseta de hojas enteras, que forman cogollo. Después del acogollado, el tallo experimenta un alargamiento y el ápice evoluciona en escapo floral.

Pertenece a la familia *Asteraceae* y corresponde a la especie *Lactuca sativa*, presenta una gran diversidad genética ya que existen diferentes tipos de especies caracterizados por sus diferentes tipos de hojas y hábito de crecimiento de la planta.

**La raíz.** La raíz de la lechuga es de tipo pivotante, pudiendo llegar a medir hasta 30 centímetros. Esta hortaliza posee un sistema radicular bien desarrollado, estando de acuerdo la ramificación a la compactación de suelo; así un suelo suelto tendrá lechugas con un sistema radicular más denso y profundo que un suelo compacto.

El sistema radicular es pivotante de 25-30 centímetros de profundidad, corto y con ramificaciones.

**El tallo.** Es comprimido y en éste se ubican las hojas muy próximas entre sí, generando el hábito de roseta típico de la familia. Es cilíndrico y ramificado.

**Las hojas.** Las hojas son grandes, simples, de forma redondeada, oblonga, de superficie lisa u ondulada, de color verde.

### **Producción nacional**

De acuerdo a los datos de SAGARPA en el resumen nacional por delegación hasta abril del año 2012 en el cultivo de lechuga incluyendo los de riego y temporal, los estados con mayor superficie sembrada y superficie cosechada son: Guanajuato, Baja California, Puebla, Aguascalientes, Michoacán, Jalisco, Zacatecas y Sonora. El estado de Guanajuato es el que tiene mayor producción con 27,580 ton. Seguido por Baja California con 18,346 ton y Puebla con 12,473 ton. El estado que obtuvo mayor rendimiento promedio fue Coahuila con  $39,440 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , seguidos por Aguascalientes con  $32.694 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  y en tercer lugar San Luis Potosí con  $32,000 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ .

### **Descripción del material (var. Great Lakes)**

*Lactuca sativa* L. var. Crispa L.: corresponde a las lechugas de cabeza, Great Lakes o Batavias. Este tipo forma numerosas hojas de borde irregularmente recortado; las externas se disponen abiertamente y las más nuevas e internas forman un cogollo o grumo central compacto, llamado cabeza.

Las lechugas de este tipo son de mayor tamaño, pudiendo llegar a pesar más de 1 kg, y presentan un período siembra a cosecha largo (más de 100 días).

Por ser el tipo predominante en el principal país productor del mundo, Estados Unidos, por su utilización preferente en bares de ensaladas y hamburguesas, y por una creciente aceptación en muchos países, existe una amplia disponibilidad de cultivares, siendo los más representativos Climax, Empire, Great Lakes 659, Great Lakes 118, Merit, Mesa 659, Minetto, Salinas y Vanguard.

### **Género *Azospirillum***

Esta especie fue descubierta en 1922 por Beijerinck y se le llamó inicialmente *Spirillum lipoferum*. Estas bacterias son bacilos ligeramente curvados a menudo con puntos en los extremos, Gram negativos, móviles, es microaerofilica con diámetro celular es de 1  $\mu\text{m}$  y pH de crecimiento entre 6.8 y 7.8 (Madigan y Parker, 1999). Actualmente son reconocidas siete especies en aunque las más comunes son *Azospirillum*; *lipoferum* y *A. brasilense*. (Ecker *et al*, 2001). Esta bacteria puede ser de vida libre o asociada con las raíces de los cereales, pastos y plántulas tuberosas. *Azospirillum* sp ha sido el objetivo de numerosos estudios por su capacidad de fijar nitrógeno asociado con las raíces de diversos cultivos de importancia agronómica (Dobbeleare *et al.*, 2001), son conocidas como Gram negativas del grupo de las protobacterias.

### **Ventajas del uso de *Azospirillum* sp y respuesta agronómica**

- Son una alternativa emergente a los fertilizantes químicos inorgánicos para incrementar la fertilidad y producción de los cultivos en agro ecosistemas sustentables (Wu *et al.*, 2005).
- Los efectos benéficos del *Azospirillum* en el rendimiento y la reducción de la fertilización química, incluyendo la fertilización nitrogenada es importante para la agricultura y significativo en el cuidado del ambiente (Fisher *et al.*, 2007).

- Producen reguladores de crecimiento como auxinas, ácido Indolacético (AIA), citocininas, y proteínas como poli amina, fijan nitrógeno, incrementar el crecimiento radicular, además son capaces de acelerar y potenciar el crecimiento de las plantas (Villegas *et al.*, 2010).
- Participan en la formación de los micro agregados rizosféricos ricos en metabolitos microbianos principalmente del tipo aminoácidos y polisacáridos (Caesar *et al.*, 2007).
- Favorecen la tasa de germinación (Bashan y Bashan, 2005).
- Al permanecer vivas durante años y reproducirse en el suelo, contribuyen en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono y energía (Rivera *et al.*, 2010). Además participan en diversos procesos del ecosistema, que incluyen el reciclaje, solubilización, descomposición y mineralización de compuestos orgánicos y la translocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan la movilización de los nutrientes en el ecosistema suelo planta (Bare *et al.*, 2005). Disuelven y mineralizan los fosfatos, producen sideroforos y antibióticos (Vessey, 2003).
- Se ha comprobado que fertilizando los cultivos con estas bacterias y con nitrógeno químico en un porcentaje del 20 al 50% del utilizado normalmente se consigue un aumento de producción sobre las cosechas obtenidas únicamente con fertilizante químico al 100%. Crea una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenas en la raíz de la planta, por lo que esta crece más sana y fortalecida (Russo *et al.*, 2008; Cassan *et al.*, 2009b), debido a la capacidad de producirse en grandes cantidades bajo condiciones de alta humedad relativa, desplazan a los patógenos por la competencia generada o por la fortaleza fisiológica que adquiere la planta (Bashan y Bashan, 2002).

- Produce enzimas que solubilizan los fosfatos y los hacen más accesibles a la planta, así como factores que facilitan la absorción de oligoelementos (Bashan y Bashan, 2005).
- Se ha demostrado que las bacterias resisten mejor las condiciones de sequía y los climas áridos ya que se forman alginatos en las raíces de las plantas (Bashan y Bashan, 2005; Arzanesh *et al.*, 2010)
- Aumentan la tolerancia a factores que originan estrés (Bashan y Bashan, 2005; Arzanesh *et al.*, 2010) puesto que las plantas responden a los mecanismos de estrés a nivel celular y molecular, limitando el crecimiento y rendimiento (Pereyra *et al.*, 2006).
- El efecto favorable de *Azospirillum*, produce un mayor desarrollo del sistema radical, traducido en mayor superficie de absorción de agua y nutrientes así como un mayor desarrollo de la parte aérea de la planta (Liriano *et al.*, 2005), teniendo potencial para emplearse en la producción de plántulas de interés hortícola (Díaz *et al.*, 2001).
- Promoción de la división celular en el meristemo radicular.

Existen dos problemas a resolver:

- Una población abundante compite por nutrientes con las plantas, un ejemplo de esto es la inmovilización del nitrógeno cuando se incorpora al suelo material vegetal con relación C/N alta. Esto indica que no se puede sobrepasar ciertos niveles de población y por consiguiente, de actividad microbiana (Gómez, 1996).
- La competencia con otros microorganismos y las propiedades físicas y químicas del suelo pueden afectar el potencial de *Azospirillum*, al ser inoculado en la planta hospedero (Arzanesh *et al.*, 2010).

## **Características de la bacteria**

Tarrand et al., (1978), encontraron que las bacterias del género *Azospirillum* son ligeramente curvas y de forma bacilar, con 1  $\mu$  de diámetro de longitud de 2.1 – 3.8  $\mu$  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.

Una de las características fenotípicas más ampliamente usada 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, 1982), no obstante, en este medio pueden hallarse colonias mutantes de *Azospirillum* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no identificados (Bastarrachea, 1987).

## **Distribución**

Los *Azospirilla* muestran una muy 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 (De Coninck, 1988).

En las regiones templadas del sur de Brasil, los Estados Unidos y Kenia la presencia de *Azospirillum* es menor al 10% en las muestras analizadas (Dobereiner, 1976). El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies del género *Azospirillum*. Las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, aún cuando a pH abajo de 5 se les encuentra en forma esporádica y no lográndose su aislamiento de suelos con pH menor a 4.5 (Dobereiner, 1976). Un estudio en el que se evaluaron 23 tipos de suelos con características diferentes mostró que algunos factores abióticos tales como porcentaje de arcilla, contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua y contenido de nitrógeno afectan positivamente la sobrevivencia de *A. brasilense* (Bashan, 1995), en tanto que el tamaño de las partículas de arena y especialmente la alta concentración de carbonato de calcio

afectan negativamente la sobrevivencia de esta especie en ausencia de plantas. No obstante, la sobrevivencia de *A. brasilense* en la rizósfera es independiente de la aridez del suelo.

### **Fijación de nitrógeno por la bacteria**

Considerando la capacidad de *Azospirillum* para asociarse con plantas de interés agrícola, así como su capacidad para fijar  $N_2$  en medios de cultivo, se diseñaron numerosos experimentos para evaluar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento de las plantas. No existen reportes que indiquen efectos patogénicos en las plantas causadas por la inoculación de *Azospirillum*. El único reporte existente en esta dirección indica que ninguna de las especies de *Azospirillum* causa síntomas visibles de enfermedad sobre la raíz o las hojas de plantas de trigo, algodón o tomate (Bashan, 1998).

Evans (1975) indica 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.

Requerimientos para la fijación de nitrógeno en la bacteria.

1. Un eficiente metabolismo oxidativo.
2. Un mecanismo de protección contra el oxígeno para evitar la depresión de la actividad nitrogenasa por el oxígeno.
3. Una buena fijación del nitrógeno, con asimilación de  $NH_4$  y sin crecimiento de la bacteria.
4. Una rápida excreción del ion  $NH_4$
5. Una enzima nitrito reductasa negativa (Nir<sup>-</sup>).

### **Actividad de la bacteria**

El nitrógeno en el suelo, se encuentra como  $\text{NO}_3^{-1}$ ,  $\text{NO}_2^{-1}$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_3$  libre pero, en su mayor parte, en forma de materia orgánica como restos de las moléculas nitrogenadas de animales y vegetales (mantillo y humus), como microorganismos y, también, como compuestos orgánicos solubles (aminoácidos y aminos).

El  $\text{N}_2$  que ocupa la porosidad llena de aire del suelo no es utilizable para la mayor parte de las plantas (solamente lo es para las fijadoras simbióticas), pero determinados microorganismos libres pueden fijarlo en formas utilizables, como lo es el *Azospirillum*.

### **Colonización de las raíces**

*Azospirillum* posee un flagelo polar que lo utiliza para desplazarse en medios líquidos, mediante el cual migra hacia las raíces y se adhiere a la superficie radicular. Bajo condiciones de medios sólidos se induce la expresión de múltiples flagelos laterales (Moens et al., 1995). Estas estructuras laterales están envueltas en la colonización de las raíces, permitiendo a la bacteria adherirse a ellas.

En contraste, bacterias mutantes, desprovistas de flagelos laterales y polares, pierden la capacidad de colonización (Vande Broek et al., 1998).

El éxito colonizador de *Azospirillum* depende de un proceso indispensable llamado "quimiotaxis". Este evento corresponde a una fuerte atracción entre estas bacterias con las raíces de las plantas a través de sus propios exudados radiculares. Entre estos compuestos se encuentran: malato, succinato y fructuosa (Alexandre y Zhulin, 2000).

### **Asociación bacteria-planta**

Los sitios colonizados elegidos por estas bacterias corresponden a las áreas de elongación celular de las zonas radicales y las bases de los pelos radicales (Kapulnik et al., 1985).

Los responsables de una efectiva asociación entre planta-bacteria son las proteínas y polisacáridos de la membrana exterior de *Azospirillum*. Estos, permiten una fuerte adhesión a las raíces de las plantas inoculadas (Burdman et al., 2001).

### **Aislamiento de la bacteria**

El aislamiento 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 (rizoplaneo) de numerosas plantas hospedadas.

También se le aísla del interior 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 et al., 1976). No obstante, en este medio de cultivo son aisladas predominantemente cepas de las especies *A. lipoferum* y *A. brasilense*.

El medio NFb con algunas modificaciones en su composición y pH permiten el aislamiento predominante de otras especies de *Azospirillum*.

Las bacterias después de ser cultivadas en medio NFb, se siembran en el agar selectivo, para bacterias del género *Azospirillum*, denominado Rojo Congo, en el cual las colonias adquieren una coloración rojo escarlata, consistencia seca y abundante crecimiento.

### **Identificación**

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las protobacterias (Young, 1992), siendo *A. lipoferum* la especie tipo (Tarrand et al., 1978).

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, 1992).

## **Interacción planta-bacteria**

Probablemente, una vez que las células de *Azospirillum* se han adaptado a las condiciones del ambiente rizosférico y han logrado llegar a la superficie de las raíces, iniciará el establecimiento de la asociación.

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; Michiels *et al.*, 1991).

La segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 h después de la inoculación, el cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum* (Michiels *et al.*, 1991).

## **Biofertilización de diferentes cultivos con *Azospirillum***

Aun cuando el uso de *Azospirillum* como bioestimulante del crecimiento de las plantas no se ha generalizado mundialmente, en México la aplicación de ésta bacteria en diferentes cultivos ha rebasado con mucho lo hecho en otros países. En el ciclo agrícola primavera-verano (PV) del año 1999 la Secretaría de Agricultura, a través de su Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y de la Fundación Mexicana para la Investigación Agropecuaria y Forestal, A.C., en colaboración con el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno-UNAM, llevó a cabo la inoculación de alrededor de 450,000 hectáreas de maíz y 150,000 hectáreas de sorgo, cebada y trigo, empleando cepas de *Azospirillum* seleccionadas por su capacidad para promover el crecimiento de las plantas e incrementar el rendimiento de los cultivos.

En maíz (*Zea mays*) en cultivo de secano fue inoculada con cepas de microorganismos fijadores de nitrógeno *Azotobacter*; *Biejerinkia* y *Azospirillum*, encontrando que la asociación más efectiva fue la de maíz-*Azospirillum* en los

tratamientos probados, cabe mencionar que no hubo fertilización y control de malezas (Jaime et al., 1999).

### ***Azospirillum* como promotor de fitohormonas de crecimiento**

Se conoce que algunos géneros de *Azospirillum* y *Azotobacter* penetran la corteza de la raíz y producen fitohormonas como giberelinas, auxinas (ácido indolacético), citocininas, ácido abscísico y fijan N<sub>2</sub> (Lynch, 1990), lo que estimula el crecimiento, la producción de raíces laterales y pelos radicales que, a su vez, favorecen la absorción de nutrientes (De Freitas y Germida, 1992) e incrementan el rendimiento en gramíneas.

El género *Azospirillum* se ha clasificado dentro del grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), habiéndose aislado diferentes especies y cepas de un amplio rango de hábitats y en asociación con numerosas especies vegetales, incluyendo hortalizas cultivables.

### **Cambios morfológicos en raíz por *Azospirillum***

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.

Sólo algunas células de *Azospirillum* llegan a adherirse a la cofia o a los pelos radicales (Kapulnik et al., 1985). Sin embargo, fue observada la presencia de *Azospirillum* dentro del mucigel que se acumula en la cofia (Umali-García et al., 1980).

La inoculación de raíces de trigo con una cepa de *Azospirillum* que expresa constitutivamente el gen reportero *gusA* mostró que en los primeros días de la asociación las células bacterianas colonizan específicamente los sitios de emergencia de las raíces laterales y las regiones de los pelos radicales, tanto de la raíz primaria como de las raíces secundarias y posteriormente la superficie de la raíz (Vande Broek et al., 1993)

## **Inoculación y respuesta agronómica**

Inicialmente *Azospirillum* fue probado para la explotación agronómica como resultado de su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y su íntima asociación con raíces de cereales y pastos.

Los biofertilizantes permiten poner al alcance de los agricultores, productos con alta efectividad, con los que se sustituye hasta el 50% del fertilizante nitrogenado industrial, en el caso de los fijadores asociativos, y hasta el 80% en el caso de los simbióticos, mientras que los organismos solubilizadores de fósforo, permiten sustituir hasta el 70% del fertilizante fosfórico.

Con respecto al efecto de las bacterias del género *Azospirillum* sobre la reducción de la dosis del fertilizante nitrogenado en el cultivo del arroz, Balasubramanian y Kumar (1987) alcanzaron el mayor incremento del rendimiento agrícola con la inoculación de *Azospirillum* en la semilla y la aplicación del 50 % N en arroz de secano. Hernández (1987) en la estación “Los Palacios” de Pinar del Río, obtuvo que el *Azospirillum brasilense* Sp. 7 permitió ahorrar el 25 % de nitrógeno y en otras ocasiones hasta el 40 %.

La inoculación de la semilla de arroz con Azofert, permite reducir la dosis de urea hasta un 50% en la variedad J-104 de ciclo medio, con incrementos significativos del rendimiento agrícola, debido posiblemente al abastecimiento del N fijado por las bacterias del género *Azospirillum* en simbiosis con la planta de arroz y por la secreción de hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal que realizan estos microorganismos (Purushothaman et al.,1987 y Lambrecht et al. 2000); todo lo cual se revierte en mayor desarrollo foliar y radical; absorción de nutrimentos; producción de fitomasa y de granos.

A demás de los rendimientos en productos agrícolas comerciales se incrementan hasta el 30 % por el efecto de las sustancias activas sintetizadas por las bacterias fijadoras y asociativas (Viñals y Villar., 1999).

Si la bacteria produce sustancias como las auxinas, observa un decremento en la longitud de la raíz y un incremento en la formación de pelos radiculares (Bashan y de Bashan., 2010). Dobbelaeres *et al.*, (1999) demostraron que la inoculación de *A. brasilense* en semillas tienen un efecto pronunciado sobre el desarrollo y la morfología de las raíces, a bajas concentraciones como  $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup> es casi tan alta como para inducir la elongación de la raíz y fuertemente inhibida a altas concentraciones celulares ( $10^{-9}$  UFC ml<sup>-1</sup>).

También se ha observado en plantas inoculadas un aumento en la absorción de minerales y agua en plantas de trigo, maíz y sorgo en invernadero y campo (German *et al.*, 2000).

Askary *et al.*, (2009) mencionan que la inoculación de la combinación de *Azospirillum brasilense* con *R meliloti* incrementan el rendimiento de grano de trigo hasta un 53 % y de un 22 % en el peso de la planta, además de un 29 % con la simple inoculación de *Azospirillum*, encontrando incrementos del 22.8 % en el contenido de nitrógeno en el grano de trigo y de 59.5 % en el contenido de fósforo y 34 % en el contenido de potasio, al ser comparados con el testigo.

Díaz *et al.*, (2003) indican que en el cultivo de lechuga, la aplicación de *Azospirillum brasilense* tiene una influencia positiva sobre este cultivo y que el mejor método de aplicación del biofertilizante es directamente al suelo en una dosis de 40 L ha<sup>-1</sup>.

Díaz *et al.*, (2001) reportó incrementos del 36.5% en la germinación al inocular semillas de lechuga en comparación con el testigo, e incrementos en el peso fresco de las hojas en 277%, peso seco de 371%, área foliar en 240% y el volumen radical en 300%. Sugiriendo que las bacterias promotoras de crecimiento tienen potencial para emplearse en la producción de plantas de interés hortícola.

El nivel de inoculación óptimo para semillas y plantas para muchos cereales, vegetales y plantas de cultivos comerciales, se ha observado que es alrededor de  $10^4 - 10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>. Mientras que para el maíz es de  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>.

Una concentración del inoculo de  $10^7$ -  $10^{10}$  UFC ml<sup>-1</sup> generalmente inhibe el desarrollo radicular (Bashan *et al.*, 1990).

Terry (2005) al seleccionar el género microbiano predominante en las rizósfera, inoculó y evaluó el efecto en respuesta del cultivo, y reporta que los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, forman parte de la comunidad microbiana de la rizosfera del tomate, en las condiciones estudiadas, y que *Azospirillum* es el género dominante.

La inoculación artificial de esta rizobacteria causó un efecto positivo sobre el crecimiento de las plántulas, así como en el estado nutricional de las plantas, con un rendimiento agrícola superior al 11 %.

Mia *et al.*, (2010) Mencionan que la inoculación en banana incrementa la fijación del contenido de nitrógeno, incrementando la producción y mejorando los atributos físicos y calidad de la fruta, además estimula la floración temprana.

Askary *et al.*, (2009) obtienen que la inoculación simple con *Azospirillum* incrementan el rendimiento de trigo en grano en 53.8% comparado con el testigo y de 22.8 % de nitrógeno, de 59.5% en fósforo y de 34% de potasio.

Elein *et al.*, (2005) Reportan que la inoculación artificial de *Azospirillum* causó un efecto positivo sobre el crecimiento y estado nutricional de las plantas de tomate, con un rendimiento agrícola superior a un 11 % con respecto a las plantas testigo. Se obtuvo un alto nivel poblacional en la rizosfera de las plantas inoculadas. Arzanesh *et al.*, (2010) encontraron que *Azospirillum* incrementa el rendimiento de avena y la tolerancia a factores de estrés.

Reyes *et al.*, (2008) encontraron que *Azospirillum* al ser inoculado a semillas de pimiento aumentó la germinación y el peso seco, además del contenido de nitrógeno. En maíz presentó una tendencia más selectiva que el pimiento en la germinación y se corroboró la promoción del crecimiento. Kim *et al.*, (2010) reportan en un trabajo de investigación para verificar la eficiencia de *Azospirillum* que esta bacteria incrementa el crecimiento y la absorción de nutrientes en pimiento rojo, tomate y

arroz bajo condiciones de invernadero, excepto para la longitud de raíz de pimiento rojo, tomate y arroz.

Di Barbaro *et al.*, (2005) obtienen como respuesta que *Azospirillum* inoculado a semillas de pimiento pimentonero cv. Trompa de elefante mostraron un mayor porcentaje sobre la germinación, emergencia y desarrollo de las plantas, considerando que la bacteria constituye una metodología económica para optimizar la germinación y producir una mejor respuesta en el desarrollo de las plantas. Villegas *et al.*, (2010) reportan que en condiciones in vitro, el porcentaje y tasa de germinación disminuyen conforme la salinidad se incrementa. Sin embargo al ser inoculadas con *Azospirillum halopraeferens* y *B. amyloliquefaciens*; la altura de la plántula y longitud de raíz fueron incrementadas con la bacteria *B amyloliquefaciens*, en las salinidades. Y los resultados obtenidos en invernadero, muestran que el porcentaje y tasa de emergencia, fueron afectados positivamente por la inoculación de las dos bacterias en *P. chilensis*, como también presentó un buen desarrollo de la altura de planta, longitud radicular, peso fresco y seco.

Creus *et al.*, (2004) mencionan que el inocular *Azospirillum* en el cultivo de avena el contenido de calcio en granos incrementa en 125 % y magnesio a 130 % en comparación con las plantas no inoculadas.

### **Viabilidad de *Azospirillum* en la rizósfera de la planta**

La colonización de la raíz por BPCPs inicia con la multiplicación de estas en la rizósfera, como respuesta a los exudados Kloepper *et al.*, (1991), Por tanto, si la colonización determina el efecto de la bacteria, se debe asegurar la permanencia del microorganismo (Bashan, 1998) la adhesión de esta bacteria a las raíces está determinada por la cantidad de sales existentes en el suelo, (Söderberg y Baath, 2004).

La unión de *Azospirillum* a superficies es una parte esencial del ciclo de vida de la bacteria, éstas pueden unirse a partículas del suelo, superficies de la raíz, así como a superficies inertes y al poliestireno hidrofóbico (Castellanos *et al.*, 2000).

Los factores que controlan una colonización exitosa no son bien conocidos pero se ha sugerido que tanto el flagelo polar, la superficie de los polisacáridos y las proteínas tipo lectinas están involucradas en el proceso (Katupitiya *et al.*, 1995).

La capacidad de movimiento es una propiedad taxonómica del género *Azospirillum*, lo cual le permite trasladarse del sitio de inoculación a la raíz, siendo esencial para que la colonización ocurra, y esta depende tanto de la detección de los exudados de la raíz en un ambiente de competición con la microflora, así como la cualidad para detectar y responder tácticamente a parámetros físicos que están involucrados en la generación de energía, como son la luz, el oxígeno y sustratos oxidables (Alexandre *et al.*, 2000). El factor que más afecta el movimiento de *A. brasilense* en trigo es la humedad del suelo, la cual debe situarse cerca de la capacidad de retención del suelo; en segundo término está la textura.

Además *Azospirillum* posee mecanismos específicos para interactuar con el interior de las raíces y colonizar la capa mucigel o células corticales de una raíz dañada (Alexandre *et al.*, 2000).

Esta bacteria presenta pleomorfismo, por lo que cambia sus actividades metabólicas en respuesta a los cambios en el ambiente. En condiciones microaerofílicas son móviles (Pereg *et al.*, 2000), lo cual se debe a la presencia de dos tipos de flagelos:

1) un solo flagelo polar que es sintetizado en medio líquido responsable del nado de las bacterias, y 2) numerosos flagelos laterales, además del polar, sintetizados en medios sólidos y semi-líquidos, los cuales sirven para coordinar el movimiento a lo largo de la superficie sólida/semisólida (Katzy *et al.*, 2001).

Bajo condiciones aeróbicas, particularmente en cultivos viejos, pasan de la forma vibroide a una forma redonda encapsulada (quiste) no móvil, formando agregados que por adhesión floculan en cultivos líquidos (Katzy *et al.*, 2001).

Bashan (1998), reporta viabilidad del microorganismo inmovilizado en macroperlas de alginato hasta por cinco años, mientras que Fravel *et al.* (1985)

indican que la concentración de microorganismos inmovilizados se mantiene en tanto el polímero sea degradable por el microorganismo como es el caso del alginato de sodio. Se han aislado en numerosos cultivos alimenticios, cereales y hierbas silvestres, de regiones tropicales, subtropicales y templadas en todo el mundo (Eckert *et al.*, 2001).

Una de las grandes barreras a enfrentar es el poder predecir la respuesta a la inoculación, porque se carece de conocimiento del tiempo de vida del organismo de interés en las condiciones de producción de un cultivo, ya que un microorganismo funciona óptimamente bajo condiciones de laboratorio; sin embargo, bajo condiciones de campo puede dar resultados poco consistentes, por lo que se debe maximizar la probabilidad de una inoculación exitosa dirigiendo los conocimientos en los sustratos que afectan la viabilidad del organismo (Stephens y Rask, 2000).

Por otro lado Kadouri *et al.*, (2003) concluyeron que la producción de polibeta hidroxíburato es un factor crítico para prolongar la vida de la célula, lo que comprueba su eficiencia y confiabilidad para usarse como un inoculante comercial. Yanez *et al.*, (2004) reportaron que al inocular con *Azospirillum* turba de Chimborazo a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>, reduce el número de UFC ml<sup>-1</sup> de *Azospirillum*, en un mes de almacenamiento a  $2.01 \times 10^6$ , mientras que en turba importada aumento de 1 a  $2.67 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>, por otro lado López *et al.*, (2008) señalan que la multiplicación de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo depende en gran medida de la disponibilidad de fósforo y potasio, la deficiencia de estos elementos reduce los niveles de biomasa bacteriana y en consecuencia, disminuye la fijación de nitrógeno, lo cual comienza cuando la concentración de fósforo en el medio es de 0.004% y se inhibe cuando alcanza 0.8%.

Rodríguez (2006), quien observó que las poblaciones de bacterias diazotróficas difirieron de acuerdo con las variedades de arroz cultivadas y los tipos de suelo donde se realizaron sus estudios. Así mismo, Reis (2000) aisló bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* y *Herbaspirillum* en cuatro genotipos de

caña de azúcar, y encontró variaciones en las poblaciones de estos microorganismos de acuerdo con el genotipo en estudio. Esto permite señalar que tanto la especie como sus variedades influyen directamente en las poblaciones de microorganismos, lo que favorece el crecimiento de diferentes géneros, de acuerdo con las características del micro hábitat desarrollado en una planta, según su eficiencia fotosintética, la disponibilidad de los nutrientes, la resistencia a las condiciones desfavorables, la producción de exudados, el pH del suelo y la materia orgánica, entre otras características (Bürgmann, 2005).

Garrido *et al.* (2010) observaron que las poblaciones de bacterias microaerófilas disminuyeron significativamente en la época de sequía, en tres pastos evaluados.

### **Fijadores de nitrógeno asimbióticos**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecen a varios grupos fisiológicos que incluyen aerobios, anaerobios, bacterias fotosintéticas y especialistas, tales como algunas de las bacterias reductoras de sulfato.

Existe una asociación entre las raíces de algunas especies de plantas superiores y bacterias heterótrofas no simbióticas fijadoras de nitrógeno.

A diferencia de *Rhizobium*, estas bacterias no se localizan en nódulos especializados o protuberancias de las raíces, sino que crecen en la superficie radical (Alexander, 1980).

Entre las bacterias diazotróficas no simbióticas asociadas con zacates se encuentran *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Balandreau, 1986).

Entre las bacterias aerobias se encuentran *Beijerinckia indica* aislada de raíces de caña de azúcar, *Azospirillum lipoferum* de las raíces de *Digitaria decumbens* y *Azotobater paspalum notatum*.

De las bacterias facultativas anaerobias se puede citar *Bacillus polymyxa*, *B. macerans*, y *Enterobacter cloacaceae* en trigo y sorgo el género *Beijerinckia* es más común en suelos arenosos en climas cálidos; *Azospirillum* tiende a ser menos común en suelos templados y ácidos que en suelos tropicales y neutros;

*Enterobacteraceae* se encuentra en cualquier lugar mientras que *Bacillus* y *Clostridium* tienen a predominar en suelos ácidos.

Los cultivos perennes como el aguacate, informan de plantas más altas en vivero, cuando son inoculadas con micorriza-arbuscular, en condiciones de suelo tratado con microorganismos, el mayor crecimiento radical se indujo con la simbiosis doble, en papaya, en limón, al combinar la inoculación de *Azospirillum* y otros microorganismos, como *Azotobacter* se consiguieron incrementos en el desarrollo de las plantas como es vigor en el tronco y frutos de buen tamaño.

Sin embargo, en diversas situaciones, los efectos sinérgicos parecen estar más relacionados con la producción de hormonas por parte de las bacterias, que con su capacidad para fijar N<sub>2</sub>.

La importancia de incluir al menos dos microorganismos en el sistema radicular de las plantas, ha sido una estrategia que ha resultado en incrementos importantes en rendimientos de algunos cultivos en México.

## **Nitrógeno**

El papel más importante del nitrógeno en las plantas es su participación en la estructura de la molécula proteica. Además, el nitrógeno se encuentra en moléculas tan importantes como las *purinas*, *pirimidinas*, *porfirinas* y *coenzimas*. Las purinas y pirimidinas se encuentran en los ácidos nucleicos, RNA y DNA, esenciales para la síntesis de proteínas.

Con la excepción de las especies capaces de fijar nitrógeno molecular, la mayor parte de las plantas absorben nitrógeno existente en el suelo en forma fijada.

Las formas de nitrógeno que se encuentran a disposición de la planta pueden distribuirse en cuatro grandes grupos: nitrógeno en forma de nitrato, nitrógeno en forma amoniacal, nitrógeno en forma orgánica y nitrógeno molecular.

Devlin (1982), cita que las raíces de la mayor parte de las plantas, absorben nitrógeno en forma de nitrato. Sin embargo, el nitrógeno en esta forma no puede ser directamente empleado por las plantas, sino que debe ser reducido hasta amoníaco antes de que pueda ser incorporado a los compuestos nitrogenados de la planta. Si admitimos que el nitrato debe ser reducido a amoníaco para que el nitrógeno pueda entrar en el sistema metabólico, deberíamos observar una asimilación de nitrógeno más rápida cuando se emplea como fuente de nitrógeno amoníaco en lugar de nitrato.

### **Nitrógeno del suelo**

El nitrógeno orgánico ingresa al suelo por los tejidos y órganos de los vegetales y animales, y constituye más del 85% del nitrógeno total existente en el suelo.

Las transformaciones importantes para la nutrición vegetal son predominantemente microbianas, como la mineralización, nitrificación, desnitrificación y fijación de nitrógeno. La materia orgánica es atacada por los organismos del suelo transformándola en sustancias asimilables por las plantas.

El nitrógeno orgánico es transformado por bacterias amonificantes en amoníaco y éste es luego convertido en nitrato por las bacterias nitrificadoras.

La materia orgánica contiene un cinco por ciento del nitrógeno total en toda su constitución. Según las condiciones de clima y suelo, las plantas utilizan de este total sólo del uno al cinco por ciento.

## Formas de nitrógeno aprovechadas por la planta

El nitrógeno existe bajo formas oxidantes que son compuestos de naturaleza reductora. Las plantas lo pueden emplear en sus procesos sintéticos tomándolo en diferentes grados de oxidación o de reducción, por ejemplo, como ácido nitroso, como ácido hiponitroso, como amoníaco o hidrolamina y hasta como elemento libre, en el caso de las plantas inferiores.

Los caminos principales por los que el nitrógeno es convertido en formas aprovechables para las plantas superiores son las siguientes:

- ❖ Fijación por rhizobia y otros microorganismos que viven simbióticamente en las raíces de las leguminosas.
- ❖ Fijación por los microorganismos que viven libremente en el suelo y quizá por organismos que viven en las hojas de las plantas tropicales.
- ❖ Fijación, como algunos de los óxidos de nitrógeno, por descargas eléctricas atmosféricas.
- ❖ Fijación como aminoácidos ( $\text{NH}_3$ ),  $\text{NO}_3^{-1}$ , o por alguno de los diferentes procesos industriales para la fabricación de los fertilizantes nitrogenados sintéticos (Tisdale y Nelson, 1989).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización geográfica

El experimento se realizó durante el periodo Ago. 2011- Feb. 2012, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro que se encuentra situado a 25° 22' latitud Norte y 101° latitud oeste a una altura de 1742 msnm. En Sa Itillo, Coahuila, México.

### Materiales

Cajas petri, tubos de ensayo, micro pipeta, puntillas para micro pipeta, vasos de precipitado, matraz erlenmeyer, agitador de vidrio, mecheros, cinta selladora, campana de flujo laminar, incubadora, parrilla, autoclave, papel aluminio, balanza, analítica, reactivos

### Material biológico

Se utilizó raíz de lechuga romana var. Great Lakes inoculada con la bacteria *Azospirillum sp.* Después de un ciclo productivo en el mismo suelo inoculado con la bacteria.

### Tratamientos estudiados

En un experimento anterior, en suelo franco arcillo limoso desinfectado se inocularon dos cepas de *Azospirillum*, aisladas por Mendoza, (2009) C3, C5 y Sp7 proporcionada por Caballero (2010) y la mezcla de la C3+C5, a  $10^9$  UFC ml<sup>-1</sup> distribuidas en 33 tratamientos los cuales contenían estas bacterias más la solución nutritiva, con ocho concentraciones de nitrógeno 25, 50, 75 y 20, 15, 10, 5, y como testigo 0 %.

**Cuadro 1.** Cepas de *Azospirillum sp* individuales y mezcladas a  $10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>, adicionadas con nitrógeno.

TRATAMIENTOS					
T1	Testigo 100 % F. Q	T12	Sp7+50%N	T 23	C3+0%N
T2	C3+25%N	T13	Sp7+75%N	T 24	C3+C5+20%N
T3	C3+50%N	T14	C5+20%N	T 25	C3+C5+15%N
T4	C3+75%N	T15	C5+15%N	T 26	C3+C5+10%N
T5	C5+25%N	T16	C5+10%N	T 27	C3+C5+5%N
T6	C5+50%N	T17	C5+5%N	T 28	C3+C5+0%N
T7	C5+75%N	T 18	C5+0%N	T 29	Sp7+20%N
T8	C3+C5+25%N	T 19	C3+20%N	T 30	Sp7+15%N
T9	C3+C5+50%N	T 20	C3+15%N	T 31	Sp7+10%N
T10	C3+C5+75%N	T 21	C3+10%N	T 32	Sp7+5%N
T11	Sp7+25%N	T 22	C3+5%N	T 33	Sp7+0%N

### Medios selectivos de crecimiento

Se utilizaron los siguientes medios para la selección de cultivos puros, a partir de muestras rizosféricas de plantas de lechuga var.

- Medio de cultivo Nfb carente de nitrógeno, que permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente N<sub>2</sub>. Además tiene ácido málico, principal fuente de carbono para las bacterias del género *Azospirillum*.
- Agar Rojo Congo. Medio selectivo para el crecimiento de bacterias del genero *Azospirillum*.

**Cuadro 2.** Composición del medio de cultivo Nfb con rojo congo.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl <sub>2</sub>	0.02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0.02 g
FeCl <sub>3</sub>	Trazas
Acido Málico	5 g
Rojo Congo (1:400)	15 ml
Azul de Bromotimol	1 ml
Agar	1 g

En la preparación de medio de cultivo Nfb semilíquido, se pesan los reactivos antes mencionados; en seguida se mezclan en un matraz erlenmeyer con ayuda de un agitador y se aplica calor para que se diluya el agar.

Posteriormente se colca en cada tubo de ensayo 10 ml de medio trasladándose a la autoclave para esterilizar por 20 minutos a una temperatura de 120 °C. Para el medio sólido se pesan las mismas cantidades a excepción del agar 20 g de igual manera se esteriliza por el mismo tiempo, temperatura y se mezcla con la solución de rojo congo, una vez esterilizado el medio se coloca en cajas petri y se espera a que solidifique, se sellan las cajas con cinta plantica.

### **Inoculación y aislamiento**

Se inocularon raíces de lechuga romana var. Great Lakes con *Azospirillum sp.* Después de la cosecha se establecieron en las mismas macetas pero sin inocular nuevamente los 33 tratamientos solo aplicando las concentraciones de nitrógeno y los nutrientes que la planta necesita.

A la cosecha se lavaron las raíces de cada tratamiento para eliminar el suelo adherido y trasladarse al laboratorio de cultivo de tejidos. Para el aislamiento de cepas del género *Azospirillum sp* se tomaron tres muestras de 2 cm de raíz por planta colocándose en solución salina de NaCl al 0.086 % e incubaron por 72 h a 32 °C, de cada tubo se tomó un ml del extracto, enseguida se realizó la siembra en tubos con medio Nfb semilíquido incubándose a 32 °C por 48 h. Pasado este tiempo los tubos presentaron el halo característico del género *Azospirillum* las cuáles fueron sembradas en medio Nfb sólido con rojo congo. Se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{10}$  de cada raíz y se realizaron recuentos en cajas petri. Estas se incubaron a 32 °C por 24 h.

### **Descripción de colonias y pruebas bioquímicas**

Después de aisladas las bacterias se desarrollaron en medio Nfb sólido, las cuales se describen en el cuadro 3.

Para identificación de las cepas aisladas se utilizaron las siguientes pruebas.

- Prueba de la catalasa, permite la identificación de bacterias del género *Azospirillum*.
- Prueba de movilidad, se utiliza para el reconocimiento del crecimiento lateral en siembras por picadura en caldo de agar, para género *Azospirillum*.
- Prueba de tinción de Gram, este sistema de identificación de bacilos Gram negativos específicos para el género *Azospirillum*.

### **Determinación de nitrógeno en hojas de lechuga**

El Método desarrollado por Kjeldahl consta de tres etapas:

1. Digestión: conversión del Nitrógeno (proveniente de las proteínas, por ejemplo) en ion amonio.

2. Destilación: separación por arrastre con vapor del amoníaco y posterior solubilización en una solución ácida de concentración conocida.

3. Valoración: medición de la cantidad de ácido neutralizado por el amoníaco disuelto, lo que indica la cantidad de Nitrógeno presente en la muestra inicial.

La determinación de nitrógeno por este método, consiste en digerir la muestra en ácido sulfúrico concentrado con catalizadores, esto convierte los compuestos orgánicos en dióxido de carbono, agua y el nitrógeno de aminas se convierte en Sulfato Acido de Amoniacó  $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ , Esta sal se le agrega una solución de hidróxido de sodio esto libera el amoniacó de la sal y se destila en una solución de Ácido bórico con algún indicador.

### **Modelo estadístico**

El proyecto se realizó bajo un diseño de bloques al azar con un arreglo factorial A x B, donde A son las Cepas y B es la Concentración de Nitrógeno.

Los datos obtenidos, fueron sometidos a un análisis de varianza con pruebas de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Con el programa Statistical Analysis System versión 9.00 (SAS, 2002)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se confirmó la presencia de *Azospirillum* en las raíces de lechuga por medio selectivo NFb y pruebas bioquímicas como catalasa, movilidad y tinción de Gram.

**Cuadro 3.** Descripción de colonias desarrolladas en medio NFb

Tratamientos	Color	Forma	Catalasa	Movilidad	Tinción de Gram
T1	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T2	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T3	Amarillas	Redonda	(-)	(+)	(-)
T4	Crema	Redonda	(-)	(+)	(-)
T5	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T6	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T7	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T8	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T9	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T10	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T11	Amarillas	Redonda	(+)	(+)	(-)
T12	Crema	Redonda	(-)	(+)	(-)
T13	Amarillas	Redonda	(-)	(+)	(-)
T14	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T15	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T16	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T17	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T18	Crema	Redonda	(-)	(+)	(-)
T19	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T20	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T21	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T22	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T23	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T24	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T25	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T26	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T27	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T28	Crema	Amorfa	(+)	(+)	(-)
T29	Crema	Amorfa	(-)	(+)	(-)
T30	Naranja	Redonda	(+)	(+)	(-)

T31	Crema	Redonda	(+)	(+)	(-)
T32	Amarillas	Redonda	(+)	(+)	(-)
T33	Crema	Redonda	(-)	(+)	(-)

En el Cuadro 4 se muestra el análisis de varianza el cual indica que existe diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ) para la variable cepas, contenido de nitrógeno (CN) y la interacción cepa y CN.

Cuadro 4. Cuadros medios del ANVA para la cuantificación de bacterias del género *Azospirillum* en follaje de lechuga, inoculadas con tres cepas de *Azospirillum*. Buenavista, Coahuila, 2011.

FV	GL	CM	F
CEPA	3	32025786	7.6573**
CN	7	24492138	5.856**
CEPA*CN	21	25244880	6.036**
ERROR	62		
TOTAL	93		
C.V. %	303.67%		

Dónde: GL= Grados de Libertad, CM= Cuadros Medios, CV= Coeficiente de Variación, CEPA= Cepas, CN= Concentración de Nitrógeno, CEPA\*CN= interacción de Cepa y Concentración de Nitrógeno, \*\* Altamente significativo, \* Significativo.

Al realizar la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.01$ ) en el Cuadro 5 realizado para la variable bacterias que en este caso se identificaron como CEPA mostró que hay diferencias altamente significativas entre las cepas evaluadas.

Cuadro 5. Prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) en la interacción de cepas inoculadas en raíz de lechuga y concentración de nitrógeno para la variable Bacterias.

CEPAS	0%	5%	10%	15%	20%	25%	50%	75%
1	67 A	20 A	13.33 A	3.33B	26.67 A	26.67 A	23.33 A	233.33 A
2	133.33 A	43.33 A	133.33A	50 B	333.33 A	36.37 A	40 A	466.67 A
3	133.33 A	80.33 A	70 A	30 B	133.33 A	26.67 A	53.33 A	133.33 A
4	366.67 A	40.33 A	166.67 A	16666.67 A	166.67 A	133.33 A	366.67 A	1333.33 A

La prueba de comparación de medias de Tukey, indica que la mejor cepa de *Azospirillum* es la mezcla de C3+C5, en comparación con el testigo (*Azospirillum brasilense*) con un incremento de 555 veces en su población interactuando con una concentración de nitrógeno (CN) al 15%, como se observa en el Cuadro 5.

Molina *et al.*, (2009) sugiere que la mezcla de diferentes cepas de *Azospirillum* también es una buena alternativa al inocular semillas de tomate cherry a una concentración de  $10^9$  UFC  $ml^{-1}$  cómo se realizó en el experimento. Po otro lado, Díaz *et al.*, (2003) indican que en el cultivo de lechuga, la aplicación de *Azospirillum brasilense* tiene una influencia positiva sobre este cultivo y que el mejor método de aplicación del biofertilizante es directamente al suelo en una dosis de 40 L  $ha^{-1}$ , aunque en este experimento se utilizó la dosis de 10 L  $ha^{-1}$

El Cuadro 6 muestra el análisis de varianza realizado para la variable CN encontrando que hay diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre cepas, CN y la interacción cepa y CN.

**Cuadro 6.** Cuadrados medios del ANVA para la concentración de nitrógeno obtenida en raíces de lechuga previa inoculación con cepas de *Azospirillum* y ocho concentraciones de nitrógeno.

FV	GL	CM	F
CEPA	3	2.10497	174.4368**
CN	7	0.611224	50.6515**
CEPA*CN	21	1.021611	84.6599**
ERROR	62		
TOTAL	93		
C.V. %	4.94%		

Dónde: GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, CV= Coeficiente de Variación, CEPA= Cepas, CN= Concentración de Nitrógeno, CEPA\*CN= interacción de *Cepa* y Concentración de Nitrógeno, \*\* Altamente significativo, \* Significativo.

Al realizar la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) presentado en el cuadro 7, se encontró que sin aplicar nitrógeno químico la cepa Sp 7 (*Azospirillum brasilense*) incrementa el contenido de nitrógeno en el follaje de lechuga, con el 5 % de nitrógeno químico la cepa 5 de *Azospirillum* junto con la Sp7

producen el mismo contenido, con el 10 % la mezcla de C3+C5 incrementan el contenido de nitrógeno, al 15 % se nota un incremento considerable resultando la C3 como la mejor.

Cuadro 7. Prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) en la interacción de cepas y concentración de nitrógeno para la variable Nitrógeno.

CEPAS	0%	5%	10%	15%	20%	25%	50%	75%
1	2.30 B	2.20 B	2.21 B	3.76 A	1.63 C	2.03 B	2.40 B	2.64 A
2	1.29 D	2.44 A	1.68 C	2.46 B	2.08 B	2.14 B	1.20 C	0.96 C
3	3.22 A	2.35 AB	1.91 C	2.20 C	1.47 C	2.83 A	2.61 A	2.27 B
4	2.06 C	1.74 C	2.99 A	2.50 B	2.60 A	1.95 B	2.19 B	2.87 A

Con respecto al efecto de las bacterias del género *Azospirillum* sobre la reducción de la dosis del fertilizante nitrogenado en el cultivo del arroz, Balasubramanian y Kumar (1987) alcanzaron el mayor incremento del rendimiento agrícola con la inoculación de *Azospirillum* en la semilla y la aplicación del 50 % N en arroz de secano. Al respecto, Hernández (1987), obtuvo que el *Azospirillum brasilense Sp 7* permitió ahorrar el 25 % de nitrógeno y en otras ocasiones hasta el 40 %. Por lo tanto, reducir el costo de fertilización nitrogenada de acuerdo a García *et al.*, (2007) quien fertilizó con *Azospirillum*, con el incremento en la rentabilidad del maíz (36% en promedio) al reducir los costos de fertilización.

Lo obtenido en el presente estudio, indica que al inocular las plantas de lechuga con la cepa 3 incrementa el contenido de nitrógeno en el follaje en un 15%, con incremento del rendimiento agrícola, debido al abastecimiento del N fijado por las bacterias del género *Azospirillum* en asociación con la planta de lechuga y por la secreción de hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal que realizan estos microorganismos (Purushothaman *et al.*, 1987 y Lambrecht *et al.* 2000); todo lo cual se revierte en mayor desarrollo foliar y radical, absorción de nutrimentos y producción de biomasa.

## CONCLUSIONES

- La bacteria *Azospirillum sp* se mantiene viable después de un ciclo de cultivo.
- La inoculación con la mezcla de las cepas C3 y C5 incrementa la población de *Azospirillum sp* en el cultivo de lechuga, cuando la fertilización nitrogenada es de 15 %.
- Al inocular con la cepa C3 a  $10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  en las plantas de lechuga incrementa el contenido de nitrógeno en el follaje en un 15 %

## LITERATURA CITADA

- Alexandre G, S Greer, L Zhulin. 2000. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 182(21): 6042-6048.
- Alexander, M. 1980, Introducción a la Microbiología del Suelo. 2ª edición. AGT. México, D.F. P. 491.
- Arzanesh M, H Alikhani, K Khavazi, H Rahimian, M Miransari. 2010. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. Under drought stress. Springer. World Journal Microbiol Biotechnol. 1-9.
- Ascary M, A Mostajeran, R Amooaghaei, M Mostajeran. 2009. Influence of the Co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2, 4 D on Grain Yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). American Eurasian. Journal. Agriculture. & Environment. Science., 5(3): 296-307.
- Bare J, M Pozo, R Azcon, A Aguilar, 2005. Microbial co-operation in the rizosphere. Journal of experimental Botany 56(417): 1761-1778.
- Bastarrachea, F., M. Zamudio, and R. Rivas. 1987. Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol. 34: 24-29.
- Balasubramanian, A. y Kumar, K. 1987. Performance of Azospirillum biofertilizer in irrigated and rainfed upland rice. Int. Rice Res. Newsletter. 12 (2):43-44.
- Bashan, Y., and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-608.
- Bashan Y, L de Bashan 2005. Bacteria / Plant growth – promotion. En Hillel D (Ed). Encyclopedia of soils in the environment. Vol. 1. Elsevier. Oxford. RU. Pp. 103-115.

- Bashan Y, L Bashan. 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv tomato by using the plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (6): 2637-2643.
- Bashan Y, L de-Bashan 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-critical assessment. *Adv Agronomy* 108:77–136
- Bashan Y. 1998. Inoculant of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16, 729-770.
- Bürmann H. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ. Microbiol.* 7 (11):1711.
- Bashan, Y., M. E. Puente, M. Rodríguez- Mendoza, G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato, and S. Pedrin. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bula soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1938-1945.
- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44:168-174.
- Burdman, S., Dulguerova, G., Okon, Y., y Jurkevitch, E. 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *American Phytopath. Soc.* 14: 551-561.
- Caballero J, J Onofre, A Wong, R Castro, P Estrada, J Rodriguez, R Suarez, Iturriaga G, L Martinez. 2010. Uso de *Azospirillum* en México como Biofertilizante y potencial de nuevas especies bacterianas como biofertilizantes, agentes de biorremediación y biocontrol de fitopatógenos. XIII Congreso Nacional de biotecnología y Bioingeniería. P. 235.

- Caesar T, A Caesar, J Gaskin, U Sainju, W Busscher. 2007. Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil in vitro. *Applied Soil Ecology* 36 (1): 10-21.
- Castellanos T, F Ascencio, Y Bashan. 2000. Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 33: 1-9.
- Creus C, R Sueldo, C Barassi. 2004. Water reation and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field. *Candian Journal of Botany.* 82: 273-281.
- Cheryl, P. and Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Croes, C.L., S.Moens, E.VanBastelaere, J.Vanderleyden, and K.W.Michiels.1993.The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots.*J.Gen.Microbiol.*139:2261-2269.
- Devlin, R. M. 1982. *Fisiología Vegetal*. 4ª edición. Ed. Omega Barcelona, España. 16:319-333
- Di Barbaro G, S Pernasetti, A Stegmayer 2005. Evaluación del efecto de *Azospirillum brasilensis* en la germinación y emergencia del pimentonero (*Capsicum annum* L. Var. Trompa de elefante). *Cizas.* 6:75-85.
- De Coninck, K., S. Horemans, S. Randoz, K. Vlassak. 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp, in temperate regions. *Plant Soil* 110:213-218.
- De Freitas, J.R. y J.J. Germida.1992. Growth promotion of winter wheat by *Pseudomonas fluorescens* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.*24:1127-1135.
- Díaz V., P.; Ferrara C., R.; Almaraz S., J.; Alcantar G., G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19:327-335.

- Díaz C, E González, J Alvarez, M Silva. 2003. Estudio preliminar de diferentes técnicas de aplicación de un biofertilizante a base de *Azospirillum* sp. En el cultivo de la lechuga. (*Lactuca sativa* L.) Centro Agrícola. Jardín Botánico de Villa Clara. 30: 18-22.
- Dobbelaere S, A Croonenborghs, Thys D, Ptacek D, Labandera C, Caballero J , Aguirre J, Burdman S, Sang S, Okon J 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust. Journal. Plant physiology. 28 (9):871-879
- Dobbelaeres A. A Thys, S Vande. J Vanderleyden. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant and Soil. 212, 155-164.
- Döbereiner J. 1992. The genero *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Springer-Verlag. New York. p. 2236 2253.
- Dübereiner, J., I. E. Marriel, and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22:1464-1473.
- Evans, H. J. 1975, "Enhaancing Biological Nitrogen fixation". Natl. SC1, found. U.S.A
- Eckert B, O Baller, G Kirchhof, A Halbritter, M Stoffels, A Hartman. 2001. *Azospirillum doebereineraespp.* nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4 – grass *Miscanthus*. Internat. J. Sistem. Evolut. Microbiol.51: 17-26.
- Elein T, A Leyva, A Hernandez. 2005: Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. 7: (2). 47-54.
- Fisher S E, S I fisher, S Magris, G Mori. 2007. Isolation and Characterization of bacteria from the rizosphere of wheat. World Journal Microbiology Biotechnology. 23: 895-903.

- Fravel D, J Marois, R Lumsden, W Connick. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology*. 75: 774-777.
- Garrido M, D Cárdenas, R Bonilla, L Vera. 2010. Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria. *Pastos y Forrajes*. 33: (4) 122-129.
- German M, S Burdman, Y Okon. 2000. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes *Biology. Fertilices. Soil*. 32: 259-264.
- Gómez J. 1996. Sustitutos de la fertilización. Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. P.23- 28.
- Hernández Ana, N. 1996. Selección de rizobacterias para la biofertilización en el cultivo del maíz. Tesis de maestría en Ciencias biológicas. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 48 p.
- Jaime M; Martín G. O (h); Fernández RR y Martínez Pulido L.1999. Incremento de la productividad en maíz, mediante inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno. II Reunión científico técnica- biológica del suelo- fijación biológica del nitrógeno. Universidad Nacional de Catamarca-facultad de ciencias Agrarias. Pp. 197-199.
- Kapulnik, Y., M. Feldman, Y. Okon, and Y Henis.1985. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil Biol.Biochem*.17:509-515.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. y Henis, Y. 1985b. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol*. 31: 881-887.
- Kim K, H Deka, C Woo, C Shagol, M Tong. 2010, Isolation and evaluation of inoculation effect of *Azospirillum* sp. On growth, colonization and nutrient uptake of crops under green hause condition. 19<sup>th</sup> World congress of soil science, Soil solutions for changing world. Brisbane, Australia. 20-24 Pp.

- Kloepper J, R Zablotowicz. B Tipping, R Lifshitz. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: The Rhizosphere and Plant Growth. D.L. Keister and P.B. Cregan (eds.). Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. 315-326.
- Katupitiya S, J Millet, M Vesk, L Viccars, A Zeman, Z Lidong, C Elmerich, L Kennedy . 1995. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1987-1995.
- Katzy E, L Borisov , A Scheludko. 2001. Effect of the integration of vector pJFF350 into plasmid 85-Mda of *Azospirillum brasilense* Sp245 on bacterial flagellation and motility. Russ. J. Genet. 37 (2): 183-189.
- Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y. 2003. Poly  $\beta$ -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phaZ mutant. Arch. Microbiol. 180, 309-318.
- López M, R Martínez, M Brossard, A Bolívar, N Alfonso, A Alba y H Abreo. 2008. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. Agronomía Trop. 58(4):391-401.
- Lynch, J.M. 1990. The rhizosphere. Ed. John Wiley & Sons. New York. 99-128 Pp.
- Lambrecht, M.; Okon, Y; Vande, A and Vanderleyden, J. 2000. Indole -3 -acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria – plant interactions. Trends in Microbiology 8: 298-300.
- Madigan M, J Martinko, Parker J. 1999. Biología de los microorganismos. Ed. Prentice Hall Iberia. 8<sup>va</sup> edición. Madrid, España. P 986.
- Mendoza R, F Martínez, V Rodríguez, A Benavidez 2009. Biofertilización con *Azospirillum* en trigo. En: Artículos en extenso. 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. 16-614 Pp.

- Mia B, Z Shamsuddin, M Mahmood. 2010. Use of Plant Promoting Bacteria in Banana: A new insight for Sustainable Banana Production. International. Journal of Agriculture & Biology. Vol. 12: (3) 459-467.
- Michiels, K.W., C.L. Croes, and J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of Attachment OF *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137:2241-2246.
- Moens, S.; K. Michiels; V. Keijers; F. Van leuven; y Vanderleyden, J. 1995. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 177: 5419-5426.
- Pereg L, K Gilchrist, L Kennedy. 2000. Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense*- wheat associations. Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 2175-2184.
- Pereyra M, C Zalazar, C Barassi 2006. Root phospholipids in *Azospirillum*-inoculated wheat seedling exposed to water stress. Plant Physiology Biochemical. 44:873-879.
- Purushothaman, D.; Gunasekaran, S. y Oblisami, G. 1987. Response of *Azospirillum* inoculation. Int. Rice Res. Newsletter. 12 (1):30.
- Rivera C, A Trujillo, D Alejo 2010. Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de Nitrógeno, Solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranjo Agrio. (*Citrus aurantium* L.). Interciencia. 35: 2.
- Rodriguez C. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Environ. Microbiology. 44: 990-991.
- Rodrigues L. 2006. Diversidade de bacterias diazotróficas endofíticas dos generos *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. Pesq. Agropec. Bras. 41 (2):275.
- Reyes I, L Álvarez, H Ei-youbi, A Valery 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimiento y maíz. 37-48 Pp.

- Reis F. 2000. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesq Agropec Bras.* 35 (5):985.
- SAGARPA-SIAP 2011. Servicio de Información Agroalimentario y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo. P. 1.
- Stephens J, H Rask. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.* 65, 249-258.
- Söderberg K, E Baath. 2004. The influences of nitrogen fertilisation on bacterial activity in the rhizosphere of barley, *Soil Biology & Biochemistry.* 36: 195-198.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg. and J. Dúbereiner.1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species. *Azospirillum brasilense* sp. Nov.*Can.J.Microbiol.*24: 967-980.
- Tisdale, S.L. Y L.W. Nelson 1989. *Fertilidad de los suelos y fertilizantes.*2ª edición Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. P. 161
- Terry A, A Leyva, A Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como Biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Rev. Colomb. Biotecnol.*7:( 2) 47-54
- Umali-Garcia,M.,D.H.Hubbell,M.H. Gaskins,and F.B.Dazzo.1980.Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:219-226.
- Vande Brock,A.,J.Mchiels.A.Van Gool,and J. Vanderleyden.1993. Spatial temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:592-600.
- Vande Broek A.; Lambrecht, M. y Vanderleyden, J. 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *microbiol.* 144: 2599-2606.

- Villegas J, E Rueda, A Murillo, M Puente, O Grimaldo, S Avilés, J Ponce. Efecto en la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *prosopis chilensis*. 2010. Tropical and subtropical Agroecosystems. 12 (1): 19-32.
- Viñals M, Villar 1999. Avances en la formulación y aplicación de inoculantes bacterianos de uso agrícola. Cultivos Tropicales. 20 (4): 9-17.
- Vessey K. 2003. Plant growth promoting rizobacterias as biofertilizers. Plant and soil. 255: 571- 586.
- Wu S, Z Cao, Z Li, M Cheung, W Wong. 2005. Effects of biofertilizers containing N-fixers, P y K solubilizers and AM on maize growth: a greenhouse trial. Geoderma. 125:155-166.
- Yanez G, M Caicedo, J Zambrano, C Heredia, C Mora, L Espinoza. 2004. Evaluación de sustrato local como alternativa de inoculantes para *Azospirillum* spp Informe Técnico Anual - INIAP (Ecuador). 56-57 Pp.
- Young.J.P.W. 1992 Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En G Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans (ed.), Biological Nitrogen Fixation, Chapman and Hall, New York, N.Y. 43-86 Pp.