

INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS BENEFICOS

II. BACTERIAS ASOCIATIVAS DE LA RIZOSFERA

Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms

II. Associative rhizosphere bacteria

Yoav Bashan¹, Gina Holguin¹, Ronald Ferrera-Cerrato²

RESUMEN

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

Aceptado: Enero de 1996.

INTRODUCCION

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

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

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

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

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

AISLAMIENTO

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

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

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

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

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

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

Bacterias diazotróficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bacterias no diazotróficas

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

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

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

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

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

APAREAMIENTO GENOTÍPICO (GENOTYPIC MATCH)

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

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

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

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

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

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

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

EJEMPLOS DE BACTERIAS ASOCIATIVAS QUE PROMUEVEN EL CRECIMIENTO VEGETAL

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

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

Azotobacter

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OTRAS BACTERIAS ASOCIATIVAS CON POTENCIAL PARA SER BPCP

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

Klebsiella y *Enterobacter*

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

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

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

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

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

Acetobacter diazotrophicus

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

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

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

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

Serratia sp.

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

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

Alcaligenes faecalis de la rizosfera del arroz

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

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

Azoarcus sp.

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

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

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

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

Cianobacterias

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

Bacterias oxidantes del azufre

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

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

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

Bacterias hipersalinas de la rizosfera

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

Bacterias patógenas diazotróficas

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

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

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

CONCLUSIONES

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

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

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

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

agrícola que tengan influencia positiva sobre el crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTOS

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

LITERATURA CITADA

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

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

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

- Paula, M.A., V.M. Reis y J. Döbereiner. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biology and Fertility of Soils* 11: 111-115.
- Paula, M.A., S. Urquiaga, J.O. Siqueira y J. Döbereiner. 1992. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biology and Fertility of Soils* 14: 61-66.
- Pimentel, J.P., F. Akiba, R.M. Pitard y J. Döbereiner. 1991. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil* 137: 61-65.
- Poi, S.C., G. Ghosh y M.C. Kabi. 1989. Response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to combined inoculation with *Rhizobium*, phosphobacteria and mycorrhizal organisms. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 144: 249-253.
- Poi, S.C., T. Kabi y M.C. Kabi. 1988. Response of mustard *Brassica niger* to inoculation with *Azotobacter chroococcum* mutant Str⁶ at different regimes of nitrogenous fertilizer. *Environmental Ecology* 6: 653-655.
- Prabha, S., S.K. Nair, K.R. Dadarwal y P. Tauro. 1978. *Pseudomonas azotogenesis*-an associated symbiont of Bajra (*Pennisetum americanum*). *Plant and Soil* 49: 57-659.
- Puente, M.E. y Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15: 9-60.
- Quesada, E., A. Ventosa, F. Rodriguez-Valera y A. Ramos-Cormenzana. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *Journal of Applied Bacteriology* 53: 155-161.
- Quispel, A. 1991. A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. *Plant and Soil* 137: 1-11.
- Rajakumar, K. y M. Lakshmanan. 1990. Strain specificity of *Azotobacter chroococcum* to crop plants. *Indian Journal of Microbiology* 30: 221-224.
- Reding, H.K., P.G. Hartel, J. Wiegel. 1991. Effect of *Xanthobacter*, isolated and characterized from rice roots, on growth of wetland rice. *Plant and Soil* 138: 221-229.
- Reinhold, B., T. Hurek y I. Fendrik. 1987. Close-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of Kallar grass. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 889-891.
- Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. VanCanneyt, K. Kersters, y J. Deley. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp.nov. and *Azoarcus communis* sp.nov. *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 43: 574-584.
- Reinhold, B., T. Hurek, E.-G. Niemann y I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 520-526.
- Roslycky, E.B., 1990. Effect of sethoxydim on some properties of *Azotobacter* and *Azospirillum* spp. *Oyton* 51: 111-123.
- Ruppel, S., 1991. *Serratia rubidea* - an associative plant growth promoting nitrogen fixing microorganism. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 146: 297-303.
- Selvadurai, E.L., A.E. Brown y J.T.G. Hamilton. 1991. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 401-403.
- Shabaev, V.P., V.Y. Smolin y V.I. Strekozova. 1991. The effect of *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Azotobacter chroococcum* on nitrogen balance in soil under cropping with oats (*Avena sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils* 10: 290-292.
- Shawky, B.T. 1983. Studies on the occurrence of *Azotobacter* and *Azomonas* species in the soils and rhizosphere of plants in Egypt. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 138: 195-204.
- Sindhu S.S. y K. Lakshminarayana. 1986. Distribution of *Azotobacter* in the Haryana soils and effect of bacteriostasis on *Azotobacter* survival. *Environmental Ecology* 4: 536-540.
- Subba Rao, N.S. 1983. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 863-866.
- Thomas-Bauzon, D., P. Weinhard, P. Villecourt y J. Balandreau. 1982. The spermosphere model. I. Its use in growing, counting and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal of Microbiology* 18: 922-928.
- Toledo, G. y Y. Bashan. 1994. Nitrogen fixation in black mangroves (*Avicennia germinans*) by associative cyanobacteria. *In: Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*. M.H. Ryder, P.M. Stephens y G.D. Bowen (Eds). pp. 59-60. CSIRO Division of Soils, Adelaide.
- Watanabe I., R. So, J.K. Ladha, Y. Katayama-Fujimura y H. Kuraishi. 1987. A new nitrogen-fixing species of pseudomonad: *Pseudomonas diazotrophicus* sp. nov. isolated from the roots of wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 670-678.
- Will, M.E. y D.M. Sylvia. 1990. Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer, and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2073-2079.
- Wright, S.F. y R.W. Weaver. 1981. Enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 97-101.
- Yahalom, E., Y. Kapulnik y Y. Okon. 1984. Response of *Setaria italica* to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to *Azotobacter chroococcum*. *Plant and Soil* 82: 77-85.
- You, C. y F. Zhou. 1989. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 403-408.
- You, I.D., T. Fujii, Y. Sano, K. Komagata, T. Yoneyama, S. Iyama y Y. Hirota. 1986. Dinitrogen fixation of rice-*Klebsiella* associations. *Crop Science* 26: 297-301.
- You, C.B., W. Song, H.X. Wang, J.P. Li, M. Lin y W.L. Hai. 1991. Association of *Alcaligenes faecalis* with wetland rice. *Plant and Soil* 137: 81-85.