



INTRODUCCION AL USO Y MANEJO DE LOS BIOFERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA

Gerardo Armando Aguado Santacruz
Editor



SAGARPA



Vivir Mejor

Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes --- **en la Agricultura**

INTRODUCCION AL USO Y MANEJO DE LOS BIOFERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA

Gerardo Armando Aguado-Santacruz
Editor

**Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
Campo Experimental Bajío
CIRCE-INIFAP
Celaya, Guanajuato, México**

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS
CAMPO EXPERIMENTAL BAJÍO
CELAYA, GTO. MÉX.
JULIO 2012**

inifap

**SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN**

Lic. Francisco Javier Mayorga Castañeda

Secretario

M.C. Mariano Ruiz-Funes Macedo

Subsecretario de Agricultura

Ing. Ernesto Fernández Arias

Subsecretario de Fomento a los Agronegocios

Ing. Ignacio Rivera Rodríguez

Subsecretario de Desarrollo Rural

Dr. José Arnulfo del Toro Morales

Director General de Vinculación y Desarrollo Tecnológico

Ing. Guillermo del Bosque Macías

Director General Adjunto de Bioeconomía

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES,
AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

Dr. Pedro Brajcich Gallegos

Director General

Dr. Salvador Fernández Rivera

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M.C. Arturo Cruz Vázquez

Encargado del Despacho de la Coordinación de Planeación y Desarrollo

Lic. Marcial A. García Morteo

Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL CENTRO

Dr. Eduardo Espitia Rangel

Director Regional

Dr. Alfredo Josué Gámez Vázquez

Director de Investigación

CAMPO EXPERIMENTAL BAJIO

M.C. Roberto Paredes Melesio

Jefe de Campo

www.gobiernofederal.gob.mx
www.sagarpa.gob.mx
www.inifap.gob.mx

Derechos Reservados © 2012

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS
CAMPO EXPERIMENTAL BAJÍO

Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende

Celaya, Guanajuato C.P. 38010.

Teléfono: 01 (461) 6115323 ext 135; Fax: 01 (461) 6115431

davalospedro@inifap.gob.mx, davalos@prodigy.net.mx

Ninguna parte de este libro puede ser reproducida, almacenada en cualquier medio de respaldo, o transmitida a través de cualquier medio electrónico, de fotocopiado, mecánico, microfilm, de grabación o cualquier otro tipo, sin el permiso escrito por parte de los propietarios de los derechos de esta obra.

Primera Edición

Cita correcta:

[Autor (es)]. 2012. Título del capítulo. *In*: Aguado-Santacruz, G.A. (ed). Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. INIFAP/SAGARPA. México, pp. (páginas consultadas).

Impreso en Celaya, Guanajuato, México.

ISBN: 978-607-425-807-3

El Grupo de Investigación sobre Biofertilizantes del INIFAP agradece a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación los apoyos otorgados, a través de su Dirección de Bioeconomía, a nuestro Programa y que han posibilitado la realización de algunas de las investigaciones mencionadas en este libro.

CONTENIDO

	Pág
Introducción	XIII
Prólogo	XV
1. Impacto Económico y Ambiental del Empleo de Fertilizantes Químicos	01
<i>Gerardo Armando Aguado-Santacruz, Quintín Rascón-Cruz y Agustín Luna-Bulbarela</i>	
2. La Rizósfera y las Relaciones entre las Plantas y los Microorganismos	23
<i>Blanca Moreno-Gómez</i>	
3. Uso de Microorganismos como Biofertilizantes	35
<i>Gerardo Armando Aguado-Santacruz</i>	
4. Identificación Molecular de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal Mediante el Empleo de Secuencias Ribosomales	79
<i>Francisco Luna-Martínez, Mayra Celeste Flores-Balderas y Gerardo Armando Aguado-Santacruz</i>	
5. Manejo y Calidad de los Biofertilizantes	115
<i>Blanca Moreno-Gómez y Gerardo Armando Aguado-Santacruz</i>	
6. Biofertilizantes Bacterianos Desarrollados por el INIFAP	151
<i>Gerardo Armando Aguado-Santacruz y Blanca Moreno-Gómez</i>	
7. Empleo de <i>Azospirillum</i> como Biofertilizante	171
<i>Alberto Mendoza-Herrera y Ma. Antonia Cruz-Hernández</i>	

Capítulo 7

Empleo de *Azospirillum* como Biofertilizante

Alberto Mendoza Herrera* y Ma. Antonia Cruz Hernández

Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo, Centro de Biotecnología Genómica-
IPN. Blvd. del Maestro S/N, Col. N. Mendoza
Reynosa, Tam. C.P. 88710

*Autor de correspondencia
email: amendozah@ipn.mx
Tel: (899) 9243627 ext. 87717

Actualmente está bien reconocida la importancia que tiene la producción ecológica de alimentos a través de bioproductos que contribuyan a la fertilización de los suelos para su producción. Casi todos ejercen una fuerte influencia sobre las plantas y, a su vez, ellas a través de las secreciones de su sistema radical les proporcionan sustancias alimenticias indispensables como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, distintas combinaciones minerales e incluso vitaminas (De-Bashan *et al.*, 2008). La agricultura mundial ha tendido a buscar la sustentabilidad de los cultivos a través de alternativas de origen biológico que sean más económicas, mejoren la rentabilidad de los cultivos y eviten el deterioro del ambiente. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales. La aplicación de bacterias que interaccionan con las plantas es considerada una opción viable en muchos países y en la actualidad se busca el desarrollo de biofertilizantes basados en bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en particular con bacterias del género *Azospirillum*; fijadora de nitrógeno y productora de fitohormonas.

El objetivo de las estrategias de manejo de nutrientes es lograr la producción requerida en los cultivos de una manera eficiente, económica y sustentable. Existe un consenso en todo el mundo que indica que la agricultura basada en la dependencia exclusiva de insumos químicos no es sustentable a largo plazo y que sólo involucrando la combinación de fertilizantes orgánicos, abonos verdes y biofertilizantes será posible lograr una producción sostenible de alimentos, manteniendo la biodiversidad del suelo y evitando la

contaminación del ambiente, particularmente de los mantos acuíferos y cuerpos de agua superficiales. La carga económica y el costo ambiental son altos con la utilización de fertilizantes de origen químico. Contrariamente, el nitrógeno obtenido mediante la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) el ahorro potencial es enorme, lo cual es especialmente importante para países en desarrollo en donde la agricultura continuará estando en las manos de pequeños agricultores.

Uso de microorganismos como fertilizantes biológicos

Estudios sobre la aplicación de biofertilizantes a base de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Derxia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y otros microorganismos en la producción de diversos cultivos (maíz, trigo, remolacha y girasol) muestran que ellos pueden, dependiendo de la cepa, el modo y la forma de aplicación, reemplazar de 20 a 60 kg de N ha⁻¹. La inoculación a plantas con bacterias asociativas fijadoras de N y solubilizadoras de minerales fosfóricos incrementa significativamente la producción y biomasa de cultivos en campo (Govedarica *et al.*, 1997), la calidad productiva de la remolacha (Mrkovaki *et al.*, 2009) y la resistencia de los cultivos a diversos fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005). La aplicación de biofertilizantes facilita la asimilación de P y K por las plantas mediante la producción de sustancias activas por los microorganismos tales como algunas vitaminas y ciertas hormonas, e.g. auxinas y giberelinas. La inoculación de semillas de trigo con *Azospirillum* mostró un efecto positivo en la longitud de espiga (7-30%) y la producción de espiguillas fértiles (12-25%; Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009). La inoculación con *Azotobacter chroococcum* resultó en un incremento en la producción de maíz, aunque el efecto dependió de la cepa, el híbrido y la cantidad de fertilizante aplicado. Estudios a largo plazo sobre el efecto de diferentes cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre la producción de maíz indican la posibilidad de reemplazar una cierta cantidad de fertilizantes nitrogenados minerales (Cvijanovi *et al.*, 2005). De acuerdo a Dobbelaere *et al.* (2003), es posible reemplazar el 30% del N mineral mediante el uso de biofertilizantes.

Debido a sus efectos benéficos sobre la salud y desarrollo de las plantas,

algunos microorganismos presentes en el suelo se utilizan como base para la formulación de inoculantes (Bashan, 1998).

La aplicación práctica de los biofertilizantes comienza en 1886 cuando Hellriegel y Wilfarth, descubren la existencia de una relación simbiótica entre plantas leguminosas y bacterias que se alojaban dentro de nódulos ubicados en las raíces. Una vez aisladas dichas bacterias, Nobbe y Hiltner demuestran en 1890 la ventaja de adicionar cultivos puros de estas bacterias a las semillas de plantas leguminosas; en este momento se registra Nitragin®, la primer patente de inóculo para plantas basado en *Rhizobium* sp. A mediados de los 70's se producen dos fenómenos importantes en la tecnología de la inoculación de bacterias; por un lado se observa que el género *Azospirillum* mejora el crecimiento de plantas no leguminosas (Döbereiner y Baldani, 1979) y por otro lado se encuentra que actúa directamente sobre el metabolismo (Bashan y Holguin 1997a, b).

Desde entonces y debido a la versatilidad metabólica del género *Azospirillum* se han realizado diversos estudios en los que se analiza el efecto de co-inocular esta bacteria con otros microorganismos. La inoculación de *Azospirillum* junto con bacterias solubilizadoras de fósforo (P) ha demostrado tener efectos benéficos sobre la planta, así como un incremento en la nodulación por *Rhizobium*. A pesar de las ventajas aparentes que ofrece la co-inoculación se han comercializado muy pocas formulaciones mixtas, siendo los inóculos basados en un solo microorganismo los que más se producen. Ejemplo de éstas son Soil Implant®, Gold Coat®, Cell Tech®, Lift o Azogreen basado en *Azospirillum lipoferum* CRT1 (Fages ,1992).

A pesar del importante avance en la formulación y desarrollo de los inoculantes, la respuesta a los mismos varía considerablemente. El efecto de los biofertilizantes sobre los cultivos depende de una multitud de factores entre los cuales destacan las características del microorganismo empleado en la formulación del biofertilizante (e.g. capacidad competitiva), especie vegetal, tipo de suelo, concentración del inoculante y las condiciones ambientales. En general, al poco tiempo de introducir la bacteria en el suelo, la población

disminuye rápidamente (Van Elsas, 1986; Bashan y Levanony, 1988; Heijnen y Van Elsas, 1994). Para que el microorganismo llegue en el mejor estado al momento de su aplicación, es esencial que el soporte o sustrato empleado en la formulación del biofertilizante mantenga las características originales del inóculo el mayor tiempo posible. Se ha avanzado mucho en la formulación de inoculantes, pero no se puede hablar de un sustrato universal. Una característica común que todos deben cumplir es la capacidad para liberar el número adecuado de células viables en buenas condiciones fisiológicas al momento de la inoculación (Fages y Lux, 1991, Fages, 1992; Smith y Eady, 1992; Trevors, 1996). Actualmente se emplean diferentes sustratos con buenos resultados como turbas, carbón, arcillas, compostas, vermiculita, perlita, alginatos o cultivos bacterianos liofilizados (Iswaran *et al.*, 1972; Smith y Eady, 1992).

Inoculantes bacterianos

Los microorganismos del suelo han despertado gran interés en los últimos años por lo que han sido estudiados intensamente por diferentes científicos vinculados a la agricultura en el mundo. Entre ellos los microorganismos más estudiados por sus efectos sobre el rendimiento de los cultivos se encuentran los rizobios que establecen simbiosis nodulantes con las leguminosas y las bacterias de vida libre como *Azospirillum* que poseen la habilidad de formar asociaciones benéficas con muchas plantas no leguminosas.

Mucho se ha investigado sobre el proceso de cómo actúan estas bacterias sobre las plantas. En numerosos ensayos se ha comprobado que *Azospirillum* produce un incremento radicular altamente significativo en la etapa inicial de las plantas del cultivo. Esto se manifiesta posteriormente en incrementos en los rendimientos de los cultivos (hasta 40%) crecidos en suelos de escasa fertilidad o bajo condiciones de estrés hídrico. Por otro lado, en cultivos biofertilizados y en los cuales se han empleado menores dosis de fertilización química se han obtenido rendimientos similares, o un poco inferiores, a los alcanzados en cultivos en los cuales se han empleado las dosis químicas completas

recomendadas, efecto que es atribuible a un mejor aprovechamiento del fertilizante químico agregado por la mayor capacidad de exploración del suelo ocasionada por el incremento del crecimiento de la raíz inducido por los microorganismos.

Desde el punto de vista de una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente, el uso de biofertilizantes representa una importante alternativa para reducir el uso de abonos químicos, reduciendo sus impactos negativos ambiental y económico y mejorando la productividad de los cultivos. Asimismo, los biofertilizantes pueden ser de gran utilidad en la recuperación de terrenos degradados para su aprovechamiento con fines agrícola o forestal.

De este modo es importante la integración de esfuerzos y conocimientos entre especialistas de diferentes áreas para el adecuado desarrollo de biofertilizantes enfocados a solventar los problemas particulares que afectan las diferentes regiones agroecológicas de un país determinado.

Particularmente, el uso de *Azospirillum* constituye una forma de aumentar la productividad de los cultivos, reduciendo al mismo tiempo los efectos secundarios de la fertilización química sobre el medio ambiente y la salud. El utilizar las bacterias del género *Azospirillum* como biofertilizante tiene como propósito: 1) sustituir hasta 50% del fertilizante nitrogenado en las gramíneas y 2) incrementar los rendimientos por la acción de las sustancias activas que son capaces de sintetizar.

En los inicios de su comercialización, los biofertilizantes bacterianos eran productos importados formulados en turba. Posteriormente otros soportes, como el alginato y polvo de carbón, llegaron a ser utilizados para la formulación de biofertilizantes. La demanda de biofertilizantes en el 2011 fue estimada en 30,000 toneladas (De Bashan *et al.*, 2007).

Entre los distintos tipos de biofertilizantes se encuentran las bacterias fijadoras de N₂ (*Azospirillum*, *Rhizobium*, *Acetobacter* y las algas verde azules o cianobacterias, entre otros), bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) y los hongos micorrízicos. Las prácticas de manejo del suelo como la corrección de

deficiencias de nutrientes, el reciclamiento de los residuos de la cosecha, aplicación de composta, entre otras, son todas cruciales para asegurar el desempeño exitoso de los biofertilizantes. Los casos de éxito en respuesta a la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), principalmente *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, van en aumento. Por ejemplo, mediante el uso de estos microorganismos se ha logrado un ahorro del 25% de los nutrientes químicos aplicados normalmente. La co-inoculación de *Rhizobium*, *Azospirillum*, micorrizas arbusculares y bacterias solubilizadoras de fosfatos ha resultado ser significativamente mejor que la inoculación de un solo microorganismo. La inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos o micorrizas arbusculares resultó en un ahorro de 8-10 kg ha⁻¹ de P en arroz, trigo, cacahuate, soya y otros cultivos (De Bashan *et al.*, 2007).

Un intento de sustituir el soporte común de *Azospirillum* a base de turba con vermiculita irradiado con rayos gamma como soporte al parecer falló. La supervivencia y las pruebas de control de calidad de vida útil reveló que el número de células viables de *Azospirillum* en vermiculita disminuyó gradualmente hasta llegar a 1.3×10^7 UFC/g substrato (peso seco) al final de 44 semanas de almacenamiento. La vida útil de un inóculo de *Azospirillum* en vermiculita fue de solamente 20 semanas a temperatura ambiente, en comparación a 44 semanas para un inoculante formulado en turba (Saleh *et al.*, 2001). Un inoculante que contenía hongos MA (*Glomus fasciculatum*), *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fosfatos y que fue formulado en gránulos de arcilla para una fácil aplicación en viveros tuvo una vida útil de 60 días (Lilly y Santhanakrishnan, 1999).

Inoculantes a base de *Azospirillum*

Un inoculante a base de *Azospirillum* es una formulación que contiene una o más cepas bacterianas o especies en un material portador económico fácil de usar, ya sea de naturaleza orgánica o sintética. El inoculante es el medio de transporte bacteriano de la fábrica/laboratorio a la planta. La formulación del inoculante tiene un efecto crucial en el proceso de inoculación porque la formulación escogida determina el éxito potencial del inoculante (Bashan, 1998).

Efectos de *Azospirillum* sobre el crecimiento y rendimiento de plantas

Los estudios de campo a nivel mundial sobre *Azospirillum* indican tres conclusiones fundamentales: (i) la posibilidad de inocular exitosamente plantas que no sean cereales. Existe un diverso número de experimentos que demuestra que más de 100 especies de plantas pueden establecer una simbiosis funcional con esta bacteria. A pesar de que *Azospirillum* se aisló originalmente a partir de cereales y la mayor parte de los experimentos de inoculación se realizaron en cereales (Levanony y Bashan, 1990), actualmente existen más reportes de especies exitosamente inoculadas que no son cereales (Bashan y Holguín, 1997a). Por lo tanto, a nivel mundial, se ha propuesto que *Azospirillum* debe ser considerado una bacteria promotora del crecimiento vegetal y no un estimulador del crecimiento de cereales, (ii) en numerosos casos, la inoculación con este microorganismo redujo el uso de fertilizantes químicos, especialmente de N en 20-50% y los resultados siempre fueron mejores cuando se incorporaron fertilizantes orgánicos, (iii) en muchos países en desarrollo, la inoculación aumentó la relación beneficio-costos de los cultivos.

La evaluación a nivel mundial en las décadas pasadas referente a las inoculaciones en el campo con *Azospirillum*, sólo o en combinación con otros microorganismos fijadores de N, nos lleva a la conclusión de que estas bacterias son capaces de promover el desarrollo y la productividad de cultivos importantes en la agricultura, aún en diferentes tipos de suelo y regiones climáticas. Los datos indican entre 60-70% de éxito en las inoculaciones, con incrementos estadísticamente significativos en la producción que van del 5 al 30% dependiendo de la región y las cepas de *Azospirillum* empleadas.

Actualmente la formulación a nivel mundial de los biofertilizantes basados en *Azospirillum* utiliza turba como vehículo. Las inoculaciones de *Azospirillum* en turba resultaron en un incremento en la producción del 15% con respecto a cultivos no inoculados. El límite máximo de fertilización para la obtención de los beneficios con *Azospirillum* es de 10-30 kg ha⁻¹ de N.

Los Consejos de Agricultura de diferentes países han recomendado el uso de *Azospirillum* como inoculante en diferentes cultivos para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados. Asimismo, en la producción de trigo a nivel mundial se han encontrado incrementos significativos del 10 al 40% en parcelas biofertilizadas con esta bacteria en comparación con parcelas no inoculadas. Sin embargo, en algunos experimentos la ganancia absoluta debido a la inoculación fue inconstante e independiente de los niveles de fertilización nitrogenada. La promoción del crecimiento vegetal no siempre puede verse reflejada en un aumento de la producción. Diferentes cepas de *Azospirillum* han sido aisladas alrededor del mundo tanto de la rizósfera como del interior de la raíz, encontrándose que estas últimas son más eficientes en promover el desarrollo de la planta y su producción cuando son usadas con su hospedero original (Caballero-Mellado *et al.*, 2007).

Efectos de la co-inoculación de *Azospirillum* con otros microorganismos sobre el crecimiento y la producción de plantas

El fenómeno más notable del empleo de *Azospirillum* es que sus efectos son más eficaces y rentables cuando otros microorganismos son co-inoculados (Bashan y Holguín, 1997a, b). Los consorcios aparentemente funcionan mejor cuando se incluyen bacterias solubilizadoras de fosfatos, *Azotobacter*, *Rhizobium*, bacilos y hongos MA. Esto se explica por los efectos sinérgicos de cada uno de ellos sobre el aumento en la disponibilidad de nutrientes y la inactivación de compuestos inhibitorios, actividades que conllevan a un mejor crecimiento de las plantas.

Aunque la mayoría de los mecanismos por los cuales una co-inoculación resulta en un efecto aditivo sobre el crecimiento vegetal son todavía desconocidos, se sabe que en muchos casos algunas mezclas de microorganismos mejoran la nutrición y la absorción de nutrientes por las plantas. Los resultados más notables que se reportan son un incremento en la absorción de minerales, reducción de las dosis de fertilizantes nitrogenados y fosfatados en 25-50% y un incremento de la disponibilidad de N, P y K del suelo, lo cual, su vez, repercute en aumento en la cantidad y calidad de los

productos agrícolas cosechados y una mejora de la relación costo-beneficio. Especialmente en países en desarrollo, la co-inoculación ha resultado ser el método de elección en la última década. Con una mejor caracterización de las cepas y mejores soportes para la formulación de inoculantes, esta alternativa de inoculación podría ser la elección futura de aplicación de *Azospirillum* a nivel de campo.

Aspectos agrotecnológicos: *Azospirillum* y su interacción con pesticidas

Una poderosa razón para entender la interacción *Azospirillum*-planta, es la aplicación comercial de la bacteria en sistemas agrícolas de países desarrollados y en vías de desarrollo. De manera sorprendente, muy poco se ha publicado acerca de los aspectos agrotecnológicos del sistema, *i.e.*, efectos potenciales de la inoculación con *Azospirillum* en conjunto con diferentes compuestos químicos aplicados en sembradíos de interés comercial. Cuando esta información existe, no es accesible ya que las compañías que la han generado se niegan a publicar sus resultados (Fages, 1992; Bashan, 1998).

Aún después de haber establecido la mejor combinación planta-*Azospirillum* para la producción comercial de los cultivos persiste el problema de lograr una aplicación exitosa de las bacterias. Las bacterias tienen que llegar a la raíz para cumplir con su cometido, por lo que la inoculación bacteriana debe realizarse en el momento requerido por la planta (Bashan, 1986b). Las técnicas de inoculación deben ser prácticas, económicas y fáciles de manejar por el agricultor, el producto formulado debe proveer inóculo suficiente para la planta, además de que el biofertilizante requiere ser competitivo con las normas comerciales vigentes y poseer una larga viabilidad de almacenamiento (Fages, 1992; Sabaratnam y Traquair, 2002; De Bashan *et al.*, 2007).

Aunque en la actualidad se utilizan diversos métodos para inocular *Azospirillum* el más simple consiste en aplicar las bacterias en suspensión líquida, ya sea directamente al suelo o a las semillas. Esta técnica se ha utilizado en numerosos experimentos de invernadero y de campo (Albrecht *et al.*, 1981; Reynders y Vlassak, 1982; Smith *et al.*, 1984), pero resulta

inadecuada puesto que el tiempo de supervivencia de *Azospirillum* en suelo es relativamente corto en ausencia de un acarreador; formulaciones más confiables utilizan diversos acarreadores orgánicos (Sadasivan *et al.*, 1986).

Los mejores resultados en rendimiento se han obtenido a partir de suspensiones de turba que son vertidas, aplicadas por goteo al surco o distribuyendo el inoculante al momento de la siembra. Al comparar la viabilidad de *Azospirillum* con diferentes acarreadores, la turba superó a la vermiculita, polvo de talco, gránulos de basalto y a la bentonita (Fallik y Okon, 1996). Estos inoculantes no poseen ninguna de las características que requiere un buen inoculante como la liberación controlada de bacterias y facilidad de almacenamiento (Bashan, 1986a), lo que ha dado como resultado inconsistencias en los efectos del biofertilizante sobre el rendimiento de los cultivos. El encapsulamiento de células en polímeros como el alginato protege a las células de las tensiones ambientales y permite una liberación gradual de las bacterias en el suelo (Bashan, 1986a; Bashan, 1998). La supervivencia de las células microbianas dependerá de variables tales como la cepa utilizada, la composición del medio en que se suspenden las células y las condiciones de secado. Paul *et al.* (1993) encontraron que la viabilidad de células de *Azospirillum lipoferum* encapsuladas en macroesferas de alginato es mayor cuando se utiliza una tasa baja de secado ($1.18 \text{ g g peso seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Otra opción es la formulación de bacterias en microesferas de alginato. Mediante esta formulación se satisfacen los requerimientos de un inoculante eficiente y práctico. Este es un acarreador químicamente inerte similar a polvo de mármol, arena o carbonato de calcio, seco, fácil de usar, uniforme, biodegradable por organismos del suelo, de naturaleza no-tóxica, capaz de retener una población bacteriana alta y uniforme y permitir la liberación gradual de las bacterias durante periodos de hasta un mes, además de que posibilita la producción a gran escala de biofertilizantes (Bashan, 1986a; Bashan y Levanony, 1987; Paul *et al.*, 1993).

Durante el proceso de optimización para la producción de microesferas de alginato se logró una mayor supervivencia de las células bacterianas al agregar

leche descremada y posteriormente llevar a cabo una deshidratación controlada por aire. Al final se obtuvo un inoculante en polvo fácil de almacenar y manejar con más de 10 billones de células g^{-1} (Fages, 1990; Fages, 1992; Carrillo y Bashan, 1997).

Debido a las ventajas de supervivencia que presentan las células enquistadas de *Azospirillum* sobre las células vegetativas, se sugiere la generación de inoculantes compuestos por agregados masivos o floculados de *Azospirillum* o *Rhizobium*, los cuales consisten en una mezcla de quistes y células vegetativas rodeados por una red de polisacáridos. La inoculación de frijol con formas floculadas de *R. leguminosarum* o coagregadas con *A. brasilense*, promovió la nodulación y el crecimiento de las plantas al compararse con inoculaciones con *Rhizobium* no floculado (Smith *et al.*, 1984; Neyra *et al.*, 1995). Además, se encontró que el cultivo continuo en condiciones anaerobias aumenta la actividad de la nitrato reductasa en células enquistadas de *A. brasilense* (Sp-7) y (Sp-245) inmovilizadas en esferas de alginato. Los mejores resultados en crecimiento de plantas de maíz se obtuvieron al utilizar como inóculo células de *Azospirillum brasilense* con 40% de polihidroxitirato (Fallik y Okon, 1996).

El desarrollo comercial de inoculantes de *Azospirillum* a escala industrial depende de tres factores principales, interrelacionados entre sí: 1) avances en la investigación básica relacionada con el entendimiento de la asociación planta-bacteria; 2) una formulación y una tecnología de aplicación optimizadas, y 3) un cambio de actitud favorable por parte de las industrias agroquímicas y semilleras hacia los inoculantes microbianos y la constitución de normas legislativas en cada país para el uso de biofertilizantes. El desarrollo de inoculantes avanzados es una tarea esencial para lograr la consolidación de la biofertilización con *Azospirillum* como una práctica esencial dentro de las labores agrícolas rutinarias. El desarrollo de un acarreador bacteriano adecuado (sintético, orgánico o inorgánico) determinará si la interacción *Azospirillum*-planta tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro (Bashan, 1998; Bashan y González, 1999; Bashan *et al.*, 2002).

Efectos de formulaciones polimicrobianas para aumentar la productividad de los cultivos

Enfrentando un fuerte aumento en el precio de la energía, una creciente preocupación sobre el calentamiento global y un rápido crecimiento de la población mundial (estimada en 6.9 miles de millones en 2010), la necesidad de un aumento de productividad de los cultivos a largo plazo con bases ecológicas y sustentables nunca había sido mayor (Grandy *et al.*, 2006). Desde esta perspectiva, los biofertilizantes ofrecen una alternativa tecnológica viable. En este sentido será importante desarrollar formulaciones microbianas estables, eficaces y amigables con el ambiente que contengan diversos grupos de microorganismos, con funciones complementarias, y que estén diseñadas para mejorar la productividad de un amplio espectro de plantas, incluyendo leguminosas, no leguminosas, cereales, plantas ornamentales y cultivos forrajeros con dosis mínimas de fertilizantes y pesticidas químicos.

Se espera que las formulaciones mejoradas futuras proporcionen los efectos benéficos observados por múltiples mecanismos que incluyen: el mejoramiento de la fijación de nitrógeno, control de patógenos de plantas (ya sea directamente por la segregación de antibióticos o indirectamente mediante la inducción sistemática de resistencia en plantas frente a los patógenos), solubilización y movilización de minerales como fósforo y hierro, y la producción de compuestos estimuladores del crecimiento.

Si bien la idea de los inoculantes microbianos para estimular la producción de cultivos no es nuevo, el cuidadoso y deliberado diseño de una formulación que contenga microorganismos de múltiples grupos filogenéticos con funciones complementarias, que mantenga una alta viabilidad en el tiempo a temperatura ambiente y que posibilite el uso de cantidades mínimas de fertilizantes químicos y pesticidas si es innovador.

Por tal razón, una de las tendencias a nivel mundial en el uso de biofertilizantes es la implementación de proyectos de investigación para el desarrollo de formulaciones microbianas estables, eficaces y amigables con el ambiente y sobre todo que contengan diversos microorganismos con funciones

complementarias destinadas a mejorar la productividad de un amplio espectro de cultivos. Por ejemplo, la inoculación de cepas autóctonas (silvestres) incrementó en 65% la altura de maíz, 41% en berenjena, 40% en frijol arbustivo, 91% en tomate, 96% en soya, 50% en chícharo y 16% en okra; estos aumentos en la altura de las plantas estuvieron acompañados por incrementos en los rendimientos de los cultivos (Caballero-Mellado *et al.*, 1992). Resultados similares fueron encontrados por Shaheen *et al.* (2007) y Pedraza *et al.* (2009), quienes mencionan que a través de la inoculación de cepas nativas de *Azospirillum*, la media de rendimiento de tomate aumentó en 88%, la de okra en 50% y la de arroz en 40%. En general, las plantas tratadas fueron en apariencia más sanas, mostraron una floración y fructificación más tempranas y desarrollaron una buena nodulación radical en el caso de leguminosas. Los rendimientos obtenidos en ensayos de campo han sido en ocasiones consistentes con los obtenidos en condiciones de invernadero. Los resultados indican que las formulaciones polimicrobianas reducen el uso de fertilizantes nitrogenados y pesticidas, mejoran la productividad de un amplio espectro de cultivos, no contaminan y contribuyen a la conservación del suelo.

Inoculantes bacterianos genéticamente modificados

La implementación de aplicaciones técnicas innovadoras basadas en desarrollos biotecnológicos para la promoción del sector agroalimentario es un tema de interés creciente y vigente que no se considera de forma totalmente favorable por la sociedad. Una de las principales razones por las que no existe una aceptación generalizada de los productos biotecnológicos es el hecho de que no ofrezcan beneficios obvios y tangibles a través de su empleo. Sin embargo, algunos productos comienzan a ser aceptados ya que han demostrado su capacidad para solventar demandas específicas de la sociedad ante situaciones particulares que son motivo de preocupación.

Entre los productos conocidos como “amigables con el ambiente” se encuentran los inoculantes microbianos, reconocidos por su capacidad para mejorar el vigor de los cultivos, hacerlos más resistentes al ataque de patógenos y a diferentes estreses y, en suma, para incrementar su productividad.

La sociedad está consciente de que el uso indiscriminado de pesticidas, fungicidas y fertilizantes químicos puede acarrear serios problemas ambientales. En este contexto, dentro del proyecto ECO-SAFE de la Unión Europea se desarrollan proyectos orientados a evaluar las consecuencias ecológicas de la utilización de nuevos productos biotecnológicos, entre ellos los inoculantes microbianos desarrollados con base en *Azospirillum* para contribuir a lograr una sustentabilidad de la agricultura europea.

Debido a que se ha demostrado que los efectos de *Azospirillum* como fitoestimulante pueden ser mejorados mediante su manipulación genética (microorganismos genéticamente modificados o MGM) de aislados nativos (WT), ECO-SAFE se ha enfocado en la obtención de inoculantes mejorados a base de bacterias GM. En consecuencia, en este proyecto también se pretende desarrollar estrategias que proporcionen información clave para determinar el impacto ecológico de la liberación de bioinoculantes GM y predecir su destino en el ambiente. ECO-SAFE propone liberar aislados WT y GM de *Azospirillum*, formulados como bioinoculantes, con una vida media aceptable, en ensayo de campos manejados según las prácticas de agricultura habitual y en interacción con diferentes niveles de fertilización de nitrógeno. Ya que *Azospirillum* es una bacteria particularmente adaptada a la rizósfera de los cereales, los cultivos propuestos para estas evaluaciones son trigo y maíz, cultivos claves en muchas aéreas de la Unión Europea (Basaglia, 2003).

Argentina como ejemplo del empleo de bioinoculantes a base de *Azospirillum*

Argentina es uno de los países a nivel mundial que ha adoptado más fuertemente los biofertilizantes a base de *Azospirillum*. La gran variabilidad en la respuesta de los cultivos a los inoculantes formulados con base en *Azospirillum*, la cual fluctúa entre valores negativos hasta superiores al 100% con relación a parcelas control, ha sido escasamente mencionada con anterioridad (Baldani *et al.*, 1987; Kaushik *et al.*, 2002; Mantelin y Touraine, 2004). Los efectos positivos son mencionados frecuentemente, pero también existen referencias sobre efectos neutros y negativos atribuidos a la

especificidad cepa-planta y a una posible competencia por nutrientes con la planta (Dobbelaere *et al.*, 2003; Kozdrój *et al.*, 2004). Existen numerosas referencias sobre variaciones en la colonización de las plantas en condiciones controladas (laboratorio e invernadero) atribuidas a: a) contenido de humedad del suelo (El-Komy *et al.*, 2003), b) distribución de las bacterias sobre la raíz con relación a las zonas con mayor tasa de crecimiento que producen más exudados promotores la colonización (Fischer *et al.*, 2003), c) especificidad cepa-planta (Ramey *et al.*, 2004) y d) competencia con microorganismos nativos (Saubidet *et al.*, 2002). Las agrupaciones de microorganismos que se han detectado para interpretar los factores que regulan la colonización en condiciones de campo indican que la alta variabilidad detectada a nivel general se mantiene en todos los agrupamientos microbianos (Abril *et al.*, 2006). La única excepción la constituye la duración del ciclo de los cultivares de trigo para una misma zona de cultivo y en un mismo ciclo. Estos resultados muestran que no existe diferencia en el grado de colonización según el origen de la cepa utilizada. Sin embargo, es de destacar que fueron pocos los casos considerados en los cuales se evaluaron las cepas nativas aisladas de la región semiárida de Córdoba, Argentina. Merece destacarse la gran diferencia encontrada en maíz en el Campo Escuela durante el ciclo 2003-2004 (Abril *et al.*, 2006). En este caso la colonización con una cepa nativa fue casi 70 veces más alta que con una cepa aislada en la Pampa Húmeda (INTA Az 39). Probablemente estos resultados se deban a que las cepas nativas poseen mayor competitividad en condiciones de estrés ya que durante el ciclo 2003-2004 las condiciones de humedad fueron limitantes para el crecimiento de maíz (precipitación= 247 mm). Numerosos autores mencionan que bajo condiciones de estrés la planta cancela la emisión de exudados a la raíz, lo que ocasiona la falta de alimento para las bacterias rizosféricas (Fischer *et al.*, 2000; Schulze y Pöschel, 2004). Cuando la fuente carbonada es escasa se produce una fuerte competencia entre los microorganismos cuyo resultado es la sobrevivencia de los mejor adaptados (Fischer *et al.*, 2000; Edge y Wyndham, 2002; Ramey *et al.*, 2004). La alta variabilidad en la colonización detectada entre diferentes cultivares de trigo en un mismo sitio y año de cultivo podría deberse a factores

de índole genético (Schulze y Pöschel, 2004). Sin embargo, la diferencia encontrada entre los cultivares según la duración de su ciclo, estaría indicando una interacción entre factores fenológicos y climáticos. Probablemente, las diferencias en la colonización entre cultivares de ciclo corto y largo dentro del mismo año de cultivo de trigo podrían deberse a las condiciones de estrés hídrico durante el período de antesis. Los cultivares de ciclo corto sembrados temprano pueden haber tenido mejores condiciones de humedad que los tardíos. En la región semiárida central de la Argentina la cantidad de agua para el cultivo de trigo depende más del agua almacenada en el suelo que de las precipitaciones registradas durante el cultivo que son escasas e impredecibles. Durante 2003, los cultivos se iniciaron con escasa humedad en el perfil del suelo y las primeras lluvias se registraron a inicios de octubre con sólo 18 mm. Probablemente los cultivares de ciclo largo soportaron déficit hídrico en antesis. No se detectó un patrón definido que permita explicar la alta heterogeneidad de los resultados, sin embargo se podría especular que los principales factores que pueden haber afectado el grado de colonización son: el estrés hídrico y el origen de las cepas del inoculante (Abril *et al.*, 2006). Bajo condiciones de estrés puede existir una fuerte competencia entre las poblaciones rizosféricas, situación en la cual las cepas nativas tienen ventaja por su mayor adaptación al medio.

Consideraciones finales

Actualmente la explicación más empleada para explicar el efecto estimulador de *Azospirillum* sobre el crecimiento de las plantas es la producción de fitohormonas, principalmente ácido indol acético (IAA), las cuales alteran el metabolismo y la morfología de las raíces para mejorar la absorción de agua y minerales y, consecuentemente, el rendimiento de las plantas. La contribución de *Azospirillum* a la fijación de N₂ es más controversial y a pesar del creciente aumento de la literatura sobre otros posibles mecanismos, éstos son en gran parte ignorados en revisiones sobre el tema de la promoción del crecimiento vegetal.

En un análisis global sobre la fisiología, vías metabólicas y mecanismos moleculares a través de los cuales ejerce *Azospirillum* su promoción de crecimiento en las plantas, aparentemente el IAA en conjunto con otras hormonas producidas por la bacteria juegan un papel fundamental. Se desconocen muchos aspectos fundamentales de la interacción bacteria-planta y, por ejemplo, nuestro conocimiento sobre su participación en la mitigación del estrés o control biológico de patógenos es casi nulo.

Desafortunadamente, con frecuencia el conocimiento sobre el metabolismo bacteriano se extrapola para explicar los posibles efectos sobre las plantas sin aportar evidencia sólida de que tal actividad es inexistente en la planta. En este campo de la investigación se emplean mutantes que son defectuosas en varios rasgos, pero en mucho menor grado que en campos relacionados como el control biológico de patógenos.

Para una determinación más precisa del papel de las fitohormonas en la promoción del crecimiento de plantas en general, y del IAA en particular, se requiere la generación de mutantes que estén totalmente afectadas en la producción de IAA y que conserven inalterados los otros caracteres de la cepa parental. Aunque se han obtenido diversos mutantes IAA-atenuadas, el objetivo primordial no se ha logrado todavía. Además, para establecer claramente si las hormonas son el principal mecanismo para promover el crecimiento de las plantas se necesita demostrar que otros mecanismos alternativos tienen un papel menor en la promoción de crecimiento. Sin embargo, hay mucha evidencia en contra de este supuesto derivada de experimentos de invernadero y campo (Van Dommelen *et al.*, 2003). La evidencia acumulada en los últimos años y que ha llevado a proponer que la teoría que la fijación de N_2 juega un papel secundario en la actividad promotora de crecimiento de *Azospirillum*, es prematura y debe ser reconsiderada. Adicionalmente, el papel de las moléculas de señal que inician la cascada de eventos y que inducen la respuesta en la planta, particularmente en las membranas de la raíz, también amerita reevaluación. Igualmente, muchos casos en los cuales la inoculación resulta en un aumento de la tolerancia de las plantas al estrés ambiental, merecen ser

evaluados en función de mecanismos no considerados hasta ahora, tales como el control de patógenos en las plantas. La diversidad de opciones para incrementar el crecimiento vegetal mediante la inoculación con *Azospirillum* nos llevó a proponer la “Teoría de Mecanismos Múltiples”, basada en el supuesto de que no es sólo un mecanismo, sino una combinación de éstos, el fundamento de la promoción del crecimiento en las plantas mediado por *Azospirillum*. Estos mecanismos pueden variar con las especies de las plantas, las cepas de *Azospirillum* y las condiciones ambientales prevalecientes durante la interacción. Este efecto puede ser acumulativo, como se propone por la “hipótesis aditiva” (Bashan y Levanony, 1990), donde los efectos de pequeños mecanismos, operando al mismo tiempo o consecutivamente, resultan en un efecto mayor en la planta.

El efecto en el crecimiento de las plantas también puede ser el resultado de mecanismos en tándem, o en cascada, en el que un mecanismo estimula otro para que finalmente resulten en un efecto promotor de crecimiento final en las plantas (como sería el caso de las posibles relaciones entre las hormonas de la planta, propiedades de la membrana y la proliferación de la raíz). Finalmente, la promoción del crecimiento puede ser el resultado de una combinación de mecanismos independientes que operan de acuerdo a las condiciones ambientales o de manejo agrícola en un determinado lugar. Estos incluyen la mitigación del estrés (sal, sequía, toxicidad) y el control biológico de microflora patógena. Esta teoría es inclusiva y puede cerrar los huecos entre las teorías propuestas y podría conducir a nuevo conocimiento acerca de la superposición y la cooperación entre los diferentes mecanismos que afectan el crecimiento de las plantas y que han sido estudiados hasta la fecha.

Bibliografía Citada

- Abril, A., Biasutti, C., Maich, R., Dubbini, L. and Noe, L. 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la region semiárida-central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *Ci. Suelo* 24:11-19.
- Albrecht, S.L., Okon, L., Lonquist, Y. and Burris, R.H. 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Sci.* 21:301-306.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. and Döbereiner, J. 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol. Fertil. Soils.* 4:37-40.
- Basaglia, M. 2003. Field released of genetically marked *Azospirillum brasilense* in association with *Sorghum bicolor*. *Plant Soil* 256:281-290.
- Bashan, Y. 1986a. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* 18:297-301.
- Bashan, Y. 1986b. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.* 132:3407-3414.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729-770.
- Bashan, Y. and González, L.E. 1999. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:262-266.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997a. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43:103-121.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997b. Short- and medium term avenues for *Azospirillum* inoculation *In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects.* Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. (eds.). Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Bashan, Y. and Levahony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36:591-608.

- Bashan, Y. and Levanony, H. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.* 133:3473-3480.
- Bashan, Y. and Levanony, H. 1988. Interaction between *Azospirillum brasilense* Cd and wheat root cells during early stages of root colonization. *In: Azospirillum IV, Genetics, Physiology, Ecology.* Klingmüller, W. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Bashan, Y., Hernández, J.P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 35:359-368.
- Caballero-Mellado, J., Carcano, M., Montiel, M.G. and Mascarua-Esparza, M.A. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* 13:243-253.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-de los Santos, P. and Martínez-Aguilar, L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5308-5319.
- Carrillo, A. and Bashan, Y. 1997. Microencapsulation as a potential carrier for plant growth-promoting bacteria. *In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects.* Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. (eds.) Faculty of Agriculture, Hokkaido University Sapporo, Japan.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Essaid, A.B. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4951-4959.
- Cvijanovi, G., Jovanovic, Z., Govedarica, M., Milosevic, N. and Cvijanovic, D. 2005. Ecological and economic effects of the bacterization application within a system of sustainable agriculture. *Savremena poljoprivreda* 54:115-119.
- De-Bashan, L.E., Antoun, H., and Bashan, Y. 2008. Involvement of indole-3-acetic-acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *J. Phycol.* 44:938-947.
- De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* Ferrera-Cerrato, R. and Alarcón, A. (eds). Editorial Trillas, México.

- Díaz-Zorita, M. and Fernández-Canigia, M.V. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 45:3-11.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Rev. Plant Sci.* 22:107-149.
- Döbereiner, J. and Baldani, V.L.D. 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25:1264-1269.
- Edge, T. and Wyndham, C. 2002. Predicting survival of a genetically engineered microorganism, *Pseudomonas chlororaphis* 3732RN-L11, in soil and wheat rhizosphere across Canada with linear multiple regression models. *Can. J. Microbiol.* 48:717-727.
- El-Komy, H.M., Hamdia, M.A. and El-Baki, G.K.A. 2003. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol. Plant.* 46:281-287.
- Fages, J. 1990. An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotech.* 32:473-478.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: Formulation and application technology. *Symbiosis* 13:15-26.
- Fages, J. and Lux, B. 1991. Identification of bacteria isolated from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivated in a French Soil. *Can. J. Microbiol.* 37:971-974.
- Fallik, E. and Okon, Y. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28:123-126.
- Fischer, S., Rivarola, V. and Mori, G. 2000. Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. *Plant Soil* 225:187-191.
- Fischer, S.E., Miguel, M.J., and Mori, G.B. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:53-62.
- Govedarica, M., Milosevic, N., Jarak, M., Milosev, D. and Djuric, S. 1997. Diazotrophs and their activity in pepper. *Acta Hort.* 462:725-732.
- Grandy, A.S. and Robertson, G.P. 2006. Do productivity and environmental trade-offs justify periodically cultivating no-till cropping systems?. *Agron. J.* 98:1377-1383.

- Heijnen, C.E. and Van Elsas, J.D. 1994. Metabolic activity of bacteria introduced into soil. *In: Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. Ryder, M.H., Stephens, P.M., Bowen, G.D. (eds). CSIRO, Adelaide, South Australia.
- Iswaran, V. 1972. Growth and survival of *R. trifolii* in coir dust and soybean meal compost. *Madras Agric. J.* 59:52-53.
- Kaushik, R., Saxena, A.K. and Tilak, K.V.B.R. 2002. Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils* 35:92-95.
- Kozdrój, J., Trevors, J.T. and Van Elsas, J.D. 2004. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 36:1775-1784.
- Levanony, H. and Bashan, Y. 1990. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. *Curr. Microbiol.* 20:91-94.
- Lilly, S.S. and Santhanakrishnan, P. 1999. Granulation of VA mycorrhizal inoculum. *Madras Agric. J.* 86:256-259.
- Mantelin, S. and Touraine, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55:27-34.
- Mrkovaki, N., Cacic, N., Mezei, S., Kovaev, L. and Nagl, N. 2009. Effect of biofertilizer application in sugar beet. *Zbornik Radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 46:175-179.
- Neyra, C.A., Atkinson, A. and Olubayi, O. 1995. Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity. *In: Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology*. Fendrik, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J., De Zamaroczy, M. (eds). Springer Verlag, Nato ASI Series/Ecological Sciences. Berlin, Heidelberg.
- Paul, E., Fages, J., Blanc, P., Goma, G. and Pareilleux, A. 1993. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:34-39.

- Pedraza, R.O, Bellone, C.H., de Bellone, S.C., Sorte, P.M.F.B. and Teixeira, K.R.S. 2009. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur. J. Soil Biol.* 45:36-43.
- Ramey, E.B., Koutsoudis, M., von Bodman, B.S. and Fuqua, C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Op. Microbiol.* 7:602-609.
- Reynders, L. and Vlassak, K. 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil* 66:217-223.
- Sabaratnam, S. and Traquair, J.A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Control* 23:245-253.
- Sadasivan, K.V., Negi, M. and Tilak, K.V.B.R. 1986. Survival of *Azospirillum brasilense* and *Azotobacter chroococcum* in organic-amended soil-based carriers. *Zentralbl. Mikrobiol.* 141:567-570.
- Saleh, S.A., Mekhemar, G.A.A., Abo El-Soud, A.A., Ragab, A.A. and Mikhaeel, F.T. 2001. Survival of *Azorhizobium* and *Azospirillum* in different carrier materials: inoculation of wheat and *Sesbania rostrata*. *Bull. Fac. Agric. Univ. Cairo* 52:319-338.
- Saubidet, I.M., Fatta, N. and Barneix, A.J. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil* 245:215-222.
- Schulze, J. and Pöschel, G. 2004. Bacterial inoculation of maize affects carbon allocation to roots and carbon turnover in the rhizosphere. *Plant Soil* 267:235-241.
- Shaheen, A.M., Fatma, A., Rizk, O., Sawan, M. and Ghoname, A.A. 2007. The integrated use of bio-inoculants and chemical nitrogen fertilizer on growth, yield and nutritive value of two Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) cultivars. *Aust. J. Bas. Appl. Sci.* 1:307-312.
- Smith, B.E. and Eady, R.R. 1992. Metalloclusters of the nitrogenases. *Eur. J. Biochem.* 205:1-15.
- Smith, R.L., Schank, S.C. and Littell, R.C. 1984. The influence of shading on associative N₂ fixation. *Plant Soil* 80:43-52.
- Trevors, J.T. 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J. Microbiol. Met.* 26:53-59.
- Van Dommelen, A., Keijers, V., Wollebrants, A. and Vanderleyden, J. 2003. Phenotypic changes resulting from distinct point mutations in the *Azospirillum brasilense* glna gene, encoding glutamine synthetase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5699-5701.

Van Elsas, J.D., Dijkstra, A.F., Govaert, J.M. and Van Veen, H.A. 1986. Survival of *Pseudomonas fluoresces* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. FEMS Microbiol. Ecol. 38:150-160.