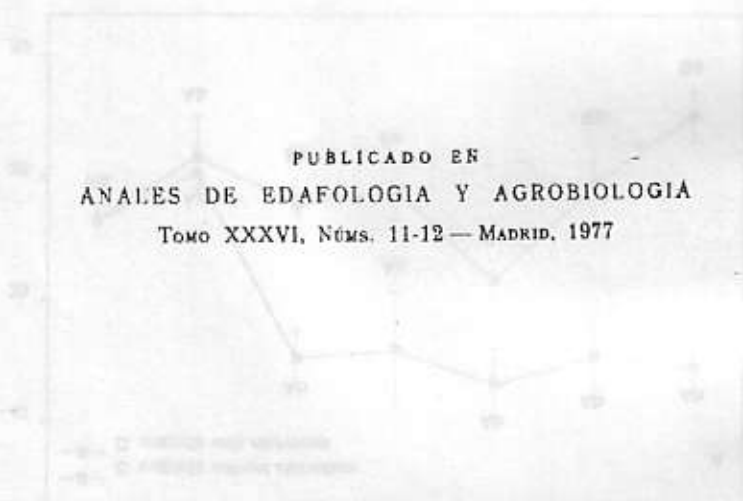


ESTUDIO CRITICO SOBRE LA UTILIZACION DE
 AZOTOBACTER Y FOSFOBACTERIAS COMO FER-
 TILIZANTES MICROBIANOS

por

J. M. BAREA, J. A. OCAMPO y E. MONTOYA



PUBLICADO EN
 ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA
 Tomo XXXVI, Núms. 11-12 — MADRID, 1977



ESTUDIO CRITICO SOBRE LA UTILIZACION DE AZOTOBACTER Y FOSFOBACTERIAS COMO FERTILIZANTES MICROBIANOS

por

J. M. BAREA, J. A. OCAMPO y E. MONTOYA

SUMMARY

A CRITICAL REVIEW ON THE USE OF AZOTOBACTER AND PHOSPHOBACTERIAS AS MICROBIAL «FERTILIZERS»

«Microbial fertilizers» is the generic name given to certain preparates containing living microorganisms, used to improve plant growth. Those prepared using free-living microorganisms (*Azotobacter* and phosphobacteria) have been the subject of much controversy.

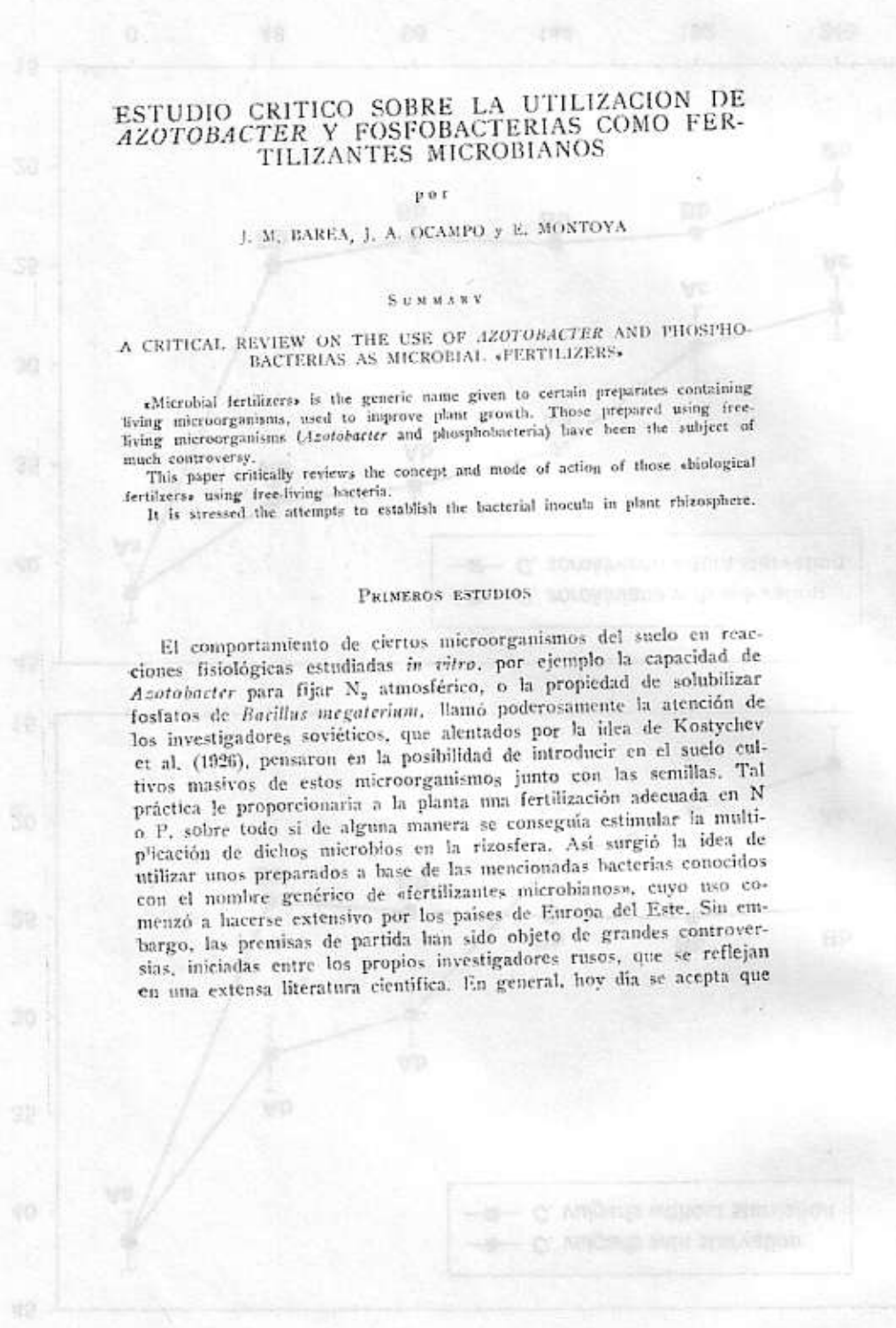
This paper critically reviews the concept and mode of action of those «biological fertilizers» using free-living bacteria.

It is stressed the attempts to establish the bacterial inocula in plant rhizosphere.

PRIMEROS ESTUDIOS

El comportamiento de ciertos microorganismos del suelo en reacciones fisiológicas estudiadas *in vitro*, por ejemplo la capacidad de *Azotobacter* para fijar N_2 atmosférico, o la propiedad de solubilizar fosfatos de *Bacillus megaterium*, llamó poderosamente la atención de los investigadores soviéticos, que alentados por la idea de Kostychev et al. (1926), pensaron en la posibilidad de introducir en el suelo cultivos masivos de estos microorganismos junto con las semillas. Tal práctica le proporcionaría a la planta una fertilización adecuada en N o P, sobre todo si de alguna manera se conseguía estimular la multiplicación de dichos microbios en la rizosfera. Así surgió la idea de utilizar unos preparados a base de las mencionadas bacterias conocidos con el nombre genérico de «fertilizantes microbianos», cuyo uso comenzó a hacerse extensivo por los países de Europa del Este. Sin embargo, las premisas de partida han sido objeto de grandes controversias, iniciadas entre los propios investigadores rusos, que se reflejan en una extensa literatura científica. En general, hoy día se acepta que

mg/L PO₄³⁻



el poder fertilizante nitrogenado o fosforado de estos preparados, al menos ejercido de forma directa, en el sentido estricto del término «fertilizante», es bastante bajo y por tanto el uso de dichas bacterias como tal abono no está justificado. No obstante, hay un gran número de estudios en los que se ha puesto de manifiesto que la «bacterización» de las semillas o de las raíces de las plántulas proporciona beneficios de distintos tipos al desarrollo de los vegetales. Tal hecho puede deberse a que las bacterias ensayadas poseen otros mecanismos de acción, mecanismos que además de su actividad primaria más o menos efectiva actúan de forma indirecta y pueden proporcionarle a la planta un incremento en su capacidad para captar elementos minerales del suelo.

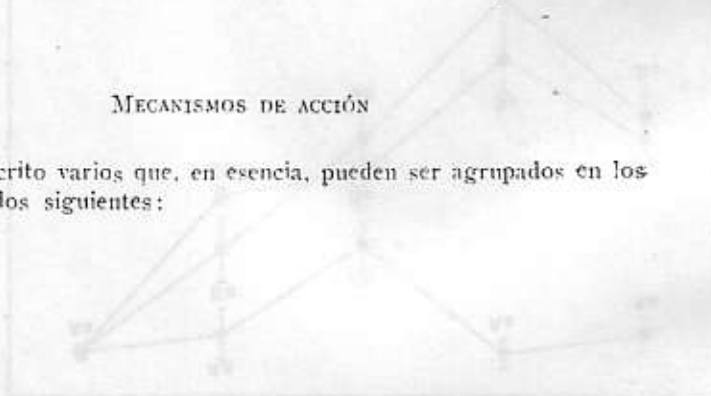
Un caso particular de la bacterización: el tratamiento de las semillas de leguminosas con *Rhizobium* no va a ser tratado aquí, puesto que la efectividad y el mecanismo de acción de dicha bacteria no admite discusión. El uso de preparados comerciales a base de *Rhizobium* se inició a finales del siglo pasado cuando Nobbe e Hiltner (1896) propusieron en Alemania el «nitragina»; Duggar (1897), y posteriormente Harrison y Barlow (1907) en Estados Unidos el «nitroculture» y Bottomely (1910) en Inglaterra el llamado «nitrobacterin». Hoy día tales preparados, considerablemente mejorados, están a la venta en todo el mundo.

Tampoco va a ser tratado en este estudio el posible uso como «fertilizante microbiano» de Ficomisetos del género *Endogone*, causante de las micorrizas endotróficas VA (Mosse, 1973) y que confieren a la planta una capacidad extra para captar fósforo de la solución edáfica. Tanto *Endogone* como *Rhizobium* (al igual que también ocurre con ciertos actinomicetos que fijan N asociados con no-leguminosas) actúan en simbiosis con las raíces de las plantas, y una vez que han penetrado dentro de ellas, están fuera de la lucha ecológica que tiene lugar entre microorganismos en la rizosfera.

El problema se va a centrar sobre el empleo de *Azotobacter* y fosfobacterias, «fertilizantes» microbianos de «vida libre» (no simbiótica). Después de un breve repaso a los mecanismos de acción descritos para estas bacterias, el aspecto más fundamental a tratar va a ser el estudio de los factores ecológicos que de algún modo pueden afectar el establecimiento de tales inóculos en la rizosfera de las plantas cultivadas.

MECANISMOS DE ACCIÓN

Se han descrito varios que, en esencia, pueden ser agrupados en los cuatro apartados siguientes:



a) Puesta a disposición de la planta de N_2 atmosférico (*Azotobacter*) o de PO_4^{3-} solubilizado (*fosfobacterias*)

La premisa inicial que justificó el uso de los *Azotobacter* con el fin de enriquecer el suelo en N_2 ha ido perdiendo vigencia posteriormente. Mishusin y Shil'nikova (1971) muestran unos cálculos sencillos de la cantidad de N_2 que, potencialmente, puede fijar *Azotobacter*. Se sabe que por exosmosis una raíz no puede proporcionar más del 5 por 100 del material orgánico sintetizado por la planta. Para una cosecha de trigo de 2.000 Kg/Ha., el peso seco de todas las plantas sería de unas cinco toneladas, lo que representa 250 Kg/Ha. de compuestos orgánicos procedentes de la exosmosis radicular. Este material orgánico tiene que pasar el filtro biológico de los microorganismos de la rizoplanea, y el restante debe ser compartido entre los microorganismos de la rizosfera; sobre esta base es difícil aceptar que *Azotobacter* utilice más de un 10 por 100 de los productos de exosmosis, o sea, unos 25 Kg/Ha. Un gramo de material rico en energía capacita a *Azotobacter* a asimilar 10-15 mg. de N_2 , por ello utilizando los 25 kilos no podría asimilar más de 0,25-0,37 Kg. de N_2 /Ha/año, lo cual equivale a aplicar 1,3-2,0 Kg. de NO_3Na .

No obstante, en la rizosfera puede existir materia orgánica fresca de otras procedencias diferentes de la exosmosis radicular (detritus celulares, vegetal o microbiano, aportes exógenos...), aunque siempre hay que partir de la base de que los *Azotobacter* deberán competir en el reparto con otros microorganismos de superior capacidad saprofítica (fundamentalmente en lo que se refiere a ritmo de crecimiento).

De otro lado, Brown y Cooper (1962), en un ensayo con ^{15}N , encontraron que la fijación en un suelo rizosférico inoculado con 10^8 *Azotobacter*/g. no fue superior a la ocurrida en suelo rizosférico control. Ni plantas, ni suelo libre de raíces mostraron enriquecimiento en ^{15}N .

Se ha descrito una asociación *Azotobacter*-planta (*Azotobacter paspali-Paspalum notatum*), en la que se ha demostrado que la fijación de nitrógeno ocurre en cantidades apreciables, habiéndose puesto de manifiesto actividad nitrogenasa en pastizales bien establecidos en los que la planta *P. notatum* poseía su *Azotobacter* «específico» (Dobereiner et al., 1972). No obstante, en plantas jóvenes de *P. notatum* inoculadas con *A. paspali*, el test del acetileno mostró ausencia de actividad nitrogenasa (Barea y Brown, 1974).

Indudablemente, la energía necesaria para la fijación de N_2 depende de la presencia de material orgánico, y como se ha citado, los exudados radiculares aportan cantidades limitadas para pretender justificar que el potencial fijador de N_2 por los *Azotobacter* puede desarrollar un mecanismo que provoque un aporte nitrogenado en cantidades sustanciales a las plantas superiores.



En diversos trabajos *in vitro* se ha puesto de manifiesto la capacidad de ciertos microorganismos para mineralizar fosfatos inorgánicos insolubles. Estos microorganismos son muy comunes en la rizosfera habiéndose encontrado cifras elevadas de incidencia de los mismos en tal hábitat (Sperber, 1958; Louw y Webley, 1959; Greaves y Webley, 1965; Barea et al., 1970). Sin embargo, es un tema bastante discutido si las bacterias capaces de llevar a cabo la mineralización de fosfatos *in vitro*, son capaces de ejecutarla al ser inoculadas en la rizosfera de forma tal, que el «pool» de P soluble resulte significativamente incrementado por encima de los valores de solubilización normal de ese suelo, Greaves y Webley (1969) y Martín (1970) no detectaron solubilización de inositol polifosfato mediante inoculación de bacterias que *in vitro* mineralizaban el P de dicho compuesto (que constituye más de la mitad del fósforo orgánico de los suelos (Anderson, 1970). No obstante, se sabe que los fosfatos orgánicos, en general, fuertemente absorbidos sobre la superficie de las arcillas o de las sales insolubles con hierro o aluminio, lo cual reduce considerablemente el ritmo de hidrólisis (Anderson et al., 1974).

De una parte, el hecho científico de que «... el incremento de la concentración de producto inhibe la acción del enzima», es aplicable lógicamente, al caso de las reacciones fosfatásicas en la rizosfera. Sin embargo, la solubilización de fosfatos inorgánicos por microorganismos, al no depender de reacciones enzimáticas por fosfatasa, está fuera del anterior razonamiento. Como se sabe, la solubilización microbiana de fosfatos inorgánicos ocurre por formación de ácidos orgánicos, procedentes del metabolismo glucídico de los microorganismos; ácidos, que por una mera bajada del pH o por un aumento de quelación son capaces de llevar a cabo el proceso. Tal como ocurre en suelos neutro-alcalinos, podría tener un cierto significado en la liberación de iones fosfato, dependiente de la presencia de un sustrato glucídico susceptible de ser metabolizado. Esta situación podría ser más efectiva en suelos con un bajo contenido en fosfato así como en suelos con un alto contenido en materia orgánica.

La inoculación de fosfobacterias en suelos neutro-alcalinos deficientes en PO_4^{3-} ha sido objeto de varios estudios en este laboratorio (Azcón et al., 1975, y González-Eguiarte y Barea, 1975), y en algunas de las condiciones experimentales investigadas se han conseguido cuadros de respuestas de los vegetales en los que parecía haber lugar a la solubilización bacteriana de iones PO_4^{3-} ; si ello ocurrió, debió de ser de forma limitada, pero el hecho reviste suficiente importancia, dadas las características de los suelos. Por esa razón se planea en los mencionados trabajos realizar ensayos con ^{32}P para poner de manifiesto definitivamente la posible solubilización, así como el efecto real de tal proceso en la nutrición de los vegetales crecidos en los suelos referidos.

Lo que sí es cierto, es que hasta a fecha no se posee una evidencia

concluyente de que las bacterias de la rizosfera provoquen una solubilización sustancial de fosfatos inorgánicos u orgánicos en el suelo. En este sentido, Tinker (1974) y Tinker y Sanders (1975) apuntan que hay varias razones que inducen a pensar en la dificultad para esperar que ello ocurra.

En primer lugar, dicen los autores mencionados, cualquier cantidad de fosfato liberado por las bacterias tendrá que pasar a formar parte de los equilibrios normales de adsorción de los fosfatos inorgánicos en el suelo y sufrir los mismos problemas de transporte de otros iones fosfato. Las bacterias utilizan los iones fosfato y puede ocurrir que se produzca un acúmulo de tejido bacteriano en las superficies de las raíces en donde las fosfatasas podrían llevar a cabo un papel de gran importancia.

Para ser útil a la planta, la solubilización bacteriana de fosfatos exigiría un cambio general en las propiedades de adsorción del suelo en la rizosfera. Esto podría ocurrir si la raíz o la microflora asociada a ella produjeran suficiente material capaz de formar quelatos tales como los ácidos cetoglucónico, cítrico o málico. Sin embargo, las cantidades producidas son muy pequeñas. Si, por ejemplo, cada 100 g. de material vegetal seco exudara 4 g. y la mitad de ellos fueran convertidos en ácido cítrico, éste podría saturar solamente, por tanto, unos 1.000 miligramos de suelo aproximadamente (Nagarajah, 1969). Incluso aceptando que la mitad del «pool» lábil de fósforo, es decir, 200 µg. por gramo de suelo serían desplazados hacia la superficie de la raíz, donde si son totalmente adsorbidos representarían un 0,2 por 100 del peso seco de la planta. A la vista de estos datos, Tinker y Sanders (1975) concluyen diciendo que el mecanismo no condiciona un aporte de fósforo importante para el vegetal.

b) Producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal

Mishustin y Naumova (1962) fueron los primeros autores en sugerir que ciertas vitaminas, auxinas y giberelinas, sustancias que detectaron en cultivos de *Azotobacter*, podían tener una importante participación en el mecanismo de acción de los «fertilizantes» microbianos. A partir de entonces, los estudios sobre producción de estas sustancias por microorganismos de la rizosfera ha experimentado un considerable impulso. En efecto, en los últimos diez años el estudio de la síntesis de hormonas vegetales por hongos y especialmente por bacterias del suelo, ha merecido la atención de numerosos investigadores, por lo que se han sucedido las publicaciones en las que se describe la síntesis de auxinas, giberelinas y citoquininas en cultivos microbianos. Estos trabajos han sido revisados recientemente por Barea y Montoya (1975).

En relación con la producción de sustancias hormonales por *Azotobacter* y fosfobacterias, Brown y Burlinghan (1968) y Lee, Breckenridge y Knowles (1970) describen la producción de auxinas y giberelinas en *A. chroococcum* y *A. vinelandii*, respectivamente. Azcón y Barea (1975) encuentran auxinas, giberelinas y citoquininas en los sobrenadantes de los cultivos de *A. beijerinckii* y *A. vinelandii*, y Barea y Brown (1974) describen la producción de las tres sustancias hormonales mencionadas en cultivos de *A. paspali*. En los dos últimos trabajos citados, se pone de manifiesto la relación entre la síntesis de estas sustancias y los efectos de los *Azotobacter* inoculados sobre el crecimiento de las plantas.

Recientemente se ha estudiado la producción de fitohormonas (Barea, Navarro y Montoya, 1973) y de aminoácidos (Ruiz-Berraquero y Ramos-Cormenzana, 1974) por fosfobacterias y la síntesis de vitaminas por microorganismos del suelo (Baya y Ramos-Cormenzana, 1975).

En opinión de diversos autores, la producción de fitohormonas es el principal mecanismo de acción que explica los efectos positivos sobre el crecimiento encontrados por aplicación de «fertilizantes» microbianos. En las revisiones de Brown et al. (1968) y Brown (1974), la literatura científica recogida apoya dicha idea. El hecho de que los efectos sobre el crecimiento sean muy parecidos independientemente del tipo de bacteria inoculada, y que dicho efecto, no sólo no es incompatible con los fertilizantes NPK, sino que incluso tal abonado inorgánico aplicado en dosis adecuada exalta la acción, sugiere que los distintos tipos de «fertilizantes» microbianos actúan por un mecanismo común. La precocidad con que se muestran los efectos y los síntomas más sobresalientes hacen pensar en el mecanismo hormonal. De hecho, Jackson et al. (1964) encuentran los mismos resultados en la estimulación del crecimiento de plantas de tomate (elongación de tallos, incremento del área foliar, adelanto de la floración, no influencia sobre la cosecha...) por inoculación de *Azotobacter* que al aplicar giberelinas. En los trabajos de este laboratorio, unos recientemente citados, así como en otros (Azcón et al., 1973; Barea et al., 1974, y Azcón et al., 1974) se ha puesto de manifiesto la importancia de este mecanismo de acción en el comportamiento de las bacterias inoculadas y su repercusión sobre el crecimiento de las plantas.

No cabe duda que un aporte extra de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, cuando la planta se encuentra en un estadio crítico de su desarrollo, confiere al vegetal un estímulo importante. Consecuentemente, plantas más vigorosas, en función del aporte hormonal provocado por el inoculo bacteriano, poseen una capacidad superior a los controles no inoculados para captar N, P, etc., a partir de la solución edáfica.

c) *Cambios en las poblaciones rizosféricas*

Brown (1974), al tratar este punto y revisar las investigaciones en relación con la posibilidad de que *Asotobacter* o fosfobacterias afecten el crecimiento vegetal por estimulación de la actividad de ciertos grupos microbianos en la rizosfera (amonificantes, nitrificantes, celulolíticos, solubilizadores de fosfatos...), opina que los resultados obtenidos son inconsistentes para elaborar una conclusión definitiva, ya que existen trabajos en los que se describe la estimulación de algunos, mientras que en otros casos la inoculación no produce tal efecto.

d) *Protección de la planta frente al ataque de microorganismos patógenos y acción de productos fitolójicos*

Este mecanismo de acción de los inoculos (*Asotobacter* y fosfobacterias) parece revestir una importancia considerable. Se han descrito abundantes evidencias de casos en los que se detectó protección frente al ataque de hongos fitopatógenos; por ello, la bacterización para el control biológico de las enfermedades de las plantas es un campo de investigación que parece presentar un futuro esperanzador (Brown, 1974; Baker y Cook, 1974).

ESTABLECIMIENTO DE INOCULOS EN LA RIZOSFERA Y CAUSAS PRINCIPALES QUE LO AFECTAN

Independientemente del modo en que vayan a actuar los *Asotobacter* o las fosfobacterias introducidas en la rizosfera de las plantas, si el inoculo sobrevive o incluso se multiplica, su efecto, no cabe duda, es más intenso (Ocampo et al., 1975). El hecho de que las cifras de bacterias inoculadas descienda, a veces de manera drástica, hasta niveles subóptimos, puede ser la causa de que la planta no acuse los efectos de la bacterización de forma consistente a lo largo de su ciclo de cultivo.

De acuerdo con la revisión de Ocampo et al. (1976), el establecimiento de una población de microorganismos depende de que se le pueda conferir una ventaja competitiva sobre las condiciones adversas de la rizosfera. Estas condiciones adversas pueden particularizarse en dos tipos: efectos inhibidores de ciertos productos secretados por la raíz y actividad de microorganismos antagonistas.

En numerosos trabajos se ha puesto de manifiesto que los *Asotobacter* se desarrollan mejor en la proximidad de las raíces que en el suelo no rizosférico (revisión de Mishustin y Shil'nikova, 1971). Tanto

con la técnica autorradiográfica de Kotelev (1964), en la que las células de *Azotobacter* se marcan con ^{32}P , como con el método del «root-mapping» de Jackson y Brown (1966), se confirma claramente la apatencia por las raíces del *Azotobacter*. En relación con ello, Strzelczyk (1966) demuestra que tanto los exudados como los extractos de raíz de diversas plantas contienen sustancias fácilmente utilizables por *Azotobacter* y que estimulan la actividad respiratoria del microbio. No obstante, puntualiza el autor, los microorganismos indígenas, al utilizar más rápidamente y con mayor eficacia dichos sustratos, perjudican enormemente el establecimiento de los *Azotobacter* inoculados.

Por el contrario, hay un gran número de trabajos en los que se pone de manifiesto que las secreciones de las raíces de varias plantas inhiben a los *Azotobacter*. Concretamente, Elroy (1964 y 1965) cita que muchas plantas secretoras de sustancias fenólicas y tánicas afectan negativamente el desarrollo de los *Azotobacter*. En suma, se puede decir que tanto el tipo y edad de la planta como el tipo de suelo son factores que van a decidir que las raíces de las plantas resulten un hábitat favorable o antagónico para *Azotobacter* (Katznelson y Strzelczyk, 1961).

Muchos microorganismos del suelo pertenecientes a diversos grupos fisiológicos y sistemáticos pueden estimular o antagonizar a los *Azotobacter*. Entre los microorganismos favorecedores, Mishustin y Shil'nikova (1971) destacan a los celulíticos. Remacle (1972) cita el efecto marcadamente favorable ejercido por un hongo pectinolítico sobre los *Azotobacter*. Con respecto a los antagonistas, los actinomicetos han acaparado especial atención; así, Patel y Brown (1969) estudian el posible papel antagónico de tales bacterias para restringir la multiplicación de los *Azotobacter* introducidos. Encuentran que los actinomicetos eran igualmente abundantes en rizosferas inoculadas o no con *Azotobacter*, aunque en las inoculadas apareció mayor número de estirpes fuertemente antagónicas. Entre otros microorganismos antagónicos de *Azotobacter* merece destacar especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Micrococcus* (Sedano y Callao, 1968); *Mixococcus* (Callao et al., 1966); *Pseudomonas* (Chan et al., 1970).

No obstante, como demostró Szegi (1960), parece ser que el antagonismo frente a *Azotobacter* es menos marcado en el suelo que en los medios de cultivo en laboratorio.

Otro fenómeno antagónico general de un suelo: la bacteriostasis debe actuar, lógicamente, como factor limitante del crecimiento de las fosfobacterias introducidas. Posiblemente, este tipo de antagonismo sea el responsable de la inhibición de la germinación de quistes de *Azotobacter* en el suelo (Brown, 1973).

El parasitismo por bacteriofagos, como fenómeno antagónico frente a *Azotobacter*, ha sido considerado en varios trabajos (Small, 1936; Sergienko, 1936; Monsour et al., 1955; Duff y Wys, 1961; Hegazi y

Jensen, 1972). Sin embargo, Mishustin y Shil'nikova (1971) opinan que el papel real de los fagos sobre la actividad vital de los *Azotobacter* en la rizosfera no ha sido estudiado en detalle.

El papel ecológico de los *Bdellovibrios* sobre el establecimiento de *Azotobacter* o fosfobacterias en la rizosfera nunca ha sido investigado, pero se sabe que existen relaciones *in vitro* parásitas con respecto a *Azotobacter* (Sullivan y Casida, 1968).

En otro orden de cosas, hay que tener presente que tanto *Azotobacter* (Mishustin y Shil'nikov, 1971) como las fosfobacterias (Domergues y Mangenot 1970) necesitan nutrientes minerales (macro y micro) y materia orgánica para su desarrollo. Lógicamente, la carencia de alguno de estos principios es un factor que influye negativamente en el establecimiento. De hecho, los resultados más importantes de la bacterización se han conseguido en suelos moderadamente fértiles, con un contenido adecuado de materia orgánica, con pH próximo a la neutralidad y con un grado de humedad relativamente elevado (un 40 por 100 de la capacidad de campo), Cooper (1959). Brown (1974) cita algunos casos en los que se han conseguido establecimientos prolongados de *Azotobacter*, aunque siempre ha sido en suelos que mostraban condiciones favorables para el desarrollo de esta bacteria. En suelos en que están naturalmente ausentes, es difícil aceptar que el establecimiento de los introducidos se produzca. En experimentos llevados a cabo por Ocampo et al. (1975), encontraron que siempre había más fosfobacterias y *Azotobacter* en la rizosfera, cuando las plantas fueron inoculadas conjuntamente con ambos microorganismos que cuando fueron inoculados individualmente. Esto permitió encauzar una nueva línea de investigación en este sentido.

CONCLUSIONES

En resumen, los métodos de estudio para intentar la resolución del problema de la implantación y establecimiento prolongado del inoculo, deberían iniciarse conociendo cómo afectan el establecimiento los factores ecológicos antes aludidos. Unos de estos factores son de índole física, química o fisicoquímica, y otros de tipo biológico, entre los cuales los microbiológicos manifiestan una importancia indudable. En relación con los primeros, la investigación ha de realizarse estudiando cómo influye la fertilidad del suelo, así como los aportes de elementos minerales y materia orgánica, según tiempo y forma de aplicación. Con respecto a los problemas de tipo microbiológico, el estudio ha de abordarse desde el punto de vista de la caracterización e incidencia de los diferentes factores antagónicos sobre la supervivencia del inoculo. El éxito de la inoculación posiblemente dependa de la selección de estirpes resistentes a los mencionados factores.

RESUMEN

«Fertilizantes microbianos» es el nombre genérico que se da a ciertos preparados que contienen microorganismos vivos y que han sido usados para favorecer el crecimiento de las plantas. De estos preparados, aquellos que utilizan microorganismos de vida libre (*Azotobacter* y fosfobacterias), han sido objeto de muchas controversias. Este trabajo presenta un estudio crítico del concepto y modo de acción de los «fertilizantes microbianos» preparados con bacterias de vida libre.

Se dedica especial atención a los trabajos que estudiaron el modo de conseguir un establecimiento prolongado de los inoculos bacterianos en la rizosfera.

Estación Experimental del Zaidín, Granada
Departamento de Microbiología

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, G. (1967). Nucleic acids, derivatives and organic phosphates. *Soil Biochemistry*, ed. A. D. McLaren, G. H. Peterson, Dekker, New York, 67-70.
- ANDERSON, G., WILLIAMS, E. G. y MORR, J. O. (1974). A comparison of the sorption of inorganic orthophosphate and inositol hexaphosphate by six acid soils. *J. Soil Sci.*, 25, 51-62.
- AZCÓN, R. y BAREA, J. M. (1975). Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *A. beijerinckii* and *A. vinelandii* related to effects produced on tomato plants. *Plant and Soil*, 43, 609-619.
- AZCÓN, R., BAREA, J. M. y CALLAO, V. (1973). Selección de microorganismos movilizados de fósforo y fijadores de nitrógeno para utilizarlos como fertilizantes biológicos en cultivos enarenados. *Cuad. C. Biol.*, 21, 23-30.
- AZCÓN, R., BAREA, J. M. y CALLAO, V. (1973). Inoculación conjunta de microorganismos movilizados de fósforo y *Rhizobium* en cultivos enarenados de judía. I. *Microbiol. Españ.*, 26, 31-29.
- AZCÓN, R., BAREA, J. M. y CALLAO, V. (1973). Inoculación conjunta de microorganismos movilizados de fósforo y *Rhizobium* en cultivos enarenados de judía. II. *Microbiol. Españ.*, 26, 135-147.
- AZCÓN, R., BAREA, J. M. y HAYMAN, D. S. (1975). Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol. and Biochemistry*, 8, 135-138.
- AZCÓN, R., GÓMEZ, M. y BAREA, J. M. (1974). Efectos de la aplicación conjunta de fertilizantes químicos y microbianos (*Azotobacter* + fosfobacterias) en cultivos enarenados de tomates. *Anales de Edaf. y Agrobiol.*, 33, 9-10, 863-878.
- BAKER, K. F. y COOK, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, U. S. A.
- BAREA, J. M. y BROWN, M. E. (1974). Effects on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances. *J. Appl. Bact.*, 37, 583-593.
- BAREA, J. M. y MONTOYA, E. (1975). Producción de fitohormonas por microorganismos: Revisión. *Anal. Edaf. y Agrobiol.*, 34, 1075-1096.
- BAREA, J. M., NAVARRO, E. y MONTOYA, E. (1975). Plant growth regulators produced by phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 40, 129-134.
- BAREA, J. M., NAVARRO, E., PALOMARES, A. y MONTOYA, E. (1974). A rapid microbiological assay method for auxins, gibberellic acid and kinetin using yeast. *J. Appl. Bacteriol.*, 37, 171-174.
- BAREA, J. M., RAMOS, A. y CALLAO, V. (1970). Contribución al estudio «in vitro» de la mineralización bacteriana de fosfatos. *Microbiol. Españ.*, 23, 257-270.
- BAYA, A. M. y (RAMOS-CORMENZANA, Director). (1975). Producción de vitaminas por

- microorganismos solubilizadores o no de fosfato, aislados del suelo, rizosfera y rizoplasma. Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- BOTTOMLEY, W. B. (1910). The assimilation of nitrogen by certain nitrogen-fixing bacteria in the soil. Proc. Roy. Soc., B 82, 627.
- BROWN, M. E. (1973). Soil Bacteriostatic limitation in growth of soil and rhizosphere bacteria. Can. J. Microbiol., 19, 195-199.
- BROWN, M. E. (1974). Seed and roots bacterization. Ann. Rev. Phytopathol., 12, 181-197.
- BROWN, M. E. y BURLINGHAM, S. K. (1968). Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol., 53, 135-144.
- BROWN, M. E. y COOPER, R. (1962). Pot experiments on *Azotobacter inoculation*. A. Rep. Rothamsted Experimental Station.
- BROWN, M. E., JACKSON, R. M. y HURLINGHAM, S. K. (1968). Effects produced on tomato plants, *Lycopersicon esculentum*, by seed or root treatment with gibberellic acid and indol-3 y P-acetic acid. J. Exp. Bot., 99, 544-552.
- CALLAO, V., ALVARADO, R., SEDANO, A., OLIVARES, J. y MONTOYA, E. (1966). Efecto antagónico del *Mycococcus xanthus* sobre los *Azotobacter*. Microbiol. Españ., 19, 45-51.
- CHAN, E. C. S., BASAVANAND, P. y LIPVAK, T. (1970). The growth inhibition of *Azotobacter chroococcum* by *Pseudomonas* sp. Can. J. Microbiol., 16 (1), 9-16.
- COOPER, R. (1959). Bacterial fertilizers in the Soviet Union. Soils Fertilizers, 22, 327-333.
- DOBREINER, J., DAY, J. M. y DART, P. J. (1972). Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol., 71, 103-116.
- DOMMERGUES, Y. y MANGENOT, F. (1970). Ecologie microbienne du sol. Ed. Masson et Cie. Paris.
- DUFF, J. T. y WYSS, O. (1961). Isolation and classification of a new series of *Azotobacter* bacteriophages. J. Gen. Microbiol., 24, 279-289.
- DUGGAR, J. F. (1897). Soil inoculation for leguminous plants. Alabama Agric. Exp. Stat. Bull., 87, 459-488.
- ELROY, R. L. (1964). Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. Ecology, 45, 824-837.
- ELROY, R. L. (1965). Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. Characterization and identification of inhibitors. Physiol. Plant., 18, 255-268.
- GONZÁLEZ-EGUIARTE, D. y BARRA, J. M. (1975). Fertilización biológica con fosfobacterias productoras de fitohormonas. Rev. Lat.-Amer. Microbiol., 7, 227-232.
- GRAVES, M. P. y WERLEY, D. M. (1965). A study of the breakdown of organic phosphates by the root region of certain pasture grasses. J. Appl. Bacteriol., 28, 454-465.
- GRAVES, M. P. y WERLEY, D. M. (1969). The hydrolysis of myoinositol hexaphosphates by soil microorganisms. Soil Biol. Biochem., 1, 37-43.
- HARRISON, F. y BARLOW, B. (1907). The nodule organisms of the Leguminosae, its isolation, cultivation, identification and commercial application. Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Abt., 2, 19, 264-272.
- HEGAZI, N. A. y JENSEN, V. (1973). Studies on *Azotobacter* bacteriophages in Egyptian soils. Soil Biol. Biochem., 5, 231-243.
- JACKSON, R. M. y BROWN, M. E. (1966). Behaviour of *Azotobacter chroococcum* introduced into the plant rhizosphere. «Ann. Inst. Pasteur., 111 (3), Suppl. 103-112.
- JACKSON, R. M., BROWN, M. E. y BURLINGHAM, S. K. (1964). Similar effects on tomato plants of *Azotobacter* inoculation and application of gibberellins. Nature, London, 203, 851-852.
- KATZNERSON, H. y STREZELCZYCK, E. (1961). Studies on the interaction of plants and free-living nitrogen fixing micro-organisms. Can. J. Microbiol., 7, 437-446.
- KOSTYCHEV, S. P., SHELOUMOVA, A. M. y SHUL'GINA, O. G. (1966). Investigations on soil biodynamics. Trudy Otd. S-kh. mikrobiologii, 1, 5-46.

- KOTELEV, V. V. (1964). Use of ^{32}P for establishing the distribution of azotobacters around the root system of the plant when seeds are bacterized. In: Use of microorganisms in the national economy. Kishinev, Kar'a Moldovenyaske, 1, 18-21.
- LEE, M., BREKENRIDGE, C. y KNOWLES, R. (1970). Effect of some culture conditions on the production of indo-3-acetic acid and a gibberellin-like substance by *Azotobacter vinelandii*. Can. J. Microbiol., 16, 1325-1330.
- LOUW, H. A. y WERLEY, D. M. (1959). A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. J. Appl. Bacteriol., 22, 227-233.
- MARTIN, M. M. (1970). The biochemical basis of the fungus-plant and symbiosis. Science, 169, 16-20.
- MISHUSTIN, E. N. y NZUMOVA, A. N. (1962). Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. Mikrobiologiya, 31, 543-555.
- MISHUSTIN, E. N. y SHIL'NIKOVA, V. K. (1971). Biological fixation of atmospheric nitrogen. Macmillan, London.
- MONSOUR, V., WISS, O. y KELLOGG, D. S. (1955). A bacteriophage for *Azotobacter*. J. Bacteriol., 70 (7), 486-487.
- MOSSE, B. (1973). Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phytopathology, 11, 171-190.
- NAGARAJAN, S. (1969). The desorption of phosphate from kaolinite and hydrous oxides. Thesis, Univ. of W. Australia.
- NOBBE, F. e HILTNER, L. (1896). Bodenimpfung auban von leguminosen. Sachs. Landwirtschaftl. Z., 44, 90-92.
- OCAMPO, J. A., BAREA, J. M. y MONTOYA, E. (1975). Interactions between Azotobacter and phosphobacteria and their establishment in the rhizosphere as affected by soil fertility. Can. J. Microbiol., 21 (8), 1160-1165.
- OCAMPO, J. A., BAREA, J. M. y MONTOYA, E. (1977). Estudio de los factores ecológicos que afectan a las poblaciones microbianas en la rizosfera. Anal. Edaf. y Agrobiol. (env. a publicar).
- PATEL, J. J. y BROWN, M. E. (1969). Interactions of *Azotobacter* with rhizosphere and root-surface microflora. Pl. Soil, 36 (2), 273-281.
- REMACLE, J. (1972). Mixed culture of micro-organisms in the rhizosphere of ivy (*Hedera helix* L.). Pl. Soil, 36, 199-203.
- RUIZ-BERRAQUERO, F. y (RAMOS-CORMENZANA, A., Director). (1974). Estudio de la segregación de aminoácidos y solubilización de fosfatos por microorganismos del suelo. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- SEDANO, A. y (CALLAO, V., Director). (1968). Influencia antagónica de gérmenes terrílicos sobre el desarrollo del *Azotobacter* en el suelo. Tesis doctoral. Analecta Calasactia.
- SERGIENKO, F. (1935). Question of the causes of bacteriophage occurrence in the soil. Mikrobiol. zh. Akad. Nauk. Ukr SSR, 3 (2).
- SMALII, V. T. (1936). Bacteriophage of *Azotobacter*. Mikrobiol. zh. Akad. Nauk Ukr SSR, 3 (3).
- SPEERBER, J. L. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aus. J. Agric. Res., 9, 778-781.
- STREZELCZYK, E. (1965). Influence of root extracts and root exudates on respiratory activity of *Azotobacter*. Acta Microbiologica Polonica, 15, 153-162.
- SULLIVAN, C. W. y CASIDA, L. E. (1968). Parasitism of *Azotobacter* and *Rhizobium* species by *Bidelloxibria bacteriovorus*. Ant. van Leeuwenhoek, 34, 188-196.
- SZEGI, J. (1969). Effect of antibiotics on a system of enzymes participating in *Azotobacter* nitrogen fixation. Agrochem. és talaj, 9 (1), 1-10; 2, 227-236.
- TINKER, P. B. (1975). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas on higher plants. Symp. Soc. Exp. Bio.
- TINKER, P. B. y SANDERS, F. E. (1975). Rhizosphere microorganisms and plant nutrition. Soil Sci., 119 (5), 363-368.

Recibido para publicación: 13-VII-76