

Revisión bibliográfica POTENCIALIDADES DE *Azospirillum* COMO INOCULANTE PARA LA AGRICULTURA

Yanet Parra[✉] y F. Cuevas

ABSTRACT. The use of rhizospheric bacteria with the purpose of increasing crop yield, diminishing the limitless use of mineral fertilizers and chemical products and, consequently, reducing the environmental contamination, has been a very common practice in the last decades. Among the most studied associative bacteria, there are those belonging to *Azospirillum* genus, which has become the most promising diazotroph group associated with grass and other nonlegume plants. This paper comprises the results and most current considerations in this respect, for proving that this bacterium is able to increase important crop yield in different soils and climatic regions using different strains and plant species; also this system although complex, has a potential agricultural utilization.

Key words: *Azospirillum*, inoculation, organic agriculture

RESUMEN. La utilización de bacterias rizosféricas con la finalidad de aumentar el rendimiento de los cultivos, disminuir el uso desmedido de fertilizantes minerales y productos químicos y, por consiguiente, reducir la contaminación ambiental, es una práctica que ha tomado un gran auge en las últimas décadas. Dentro de las bacterias asociativas más estudiadas, se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum*, el cual se ha convertido en el grupo más promisorio de diazótrofos asociados con gramíneas y otras plantas no leguminosas. En el siguiente trabajo se resumen los resultados y consideraciones más actuales de diversos autores al respecto, demostrándose que esta bacteria es capaz de incrementar el rendimiento de cultivos agrícolas importantes en diferentes suelos y regiones climáticas, usando diferentes cepas y especies de plantas y que aunque complejo, este sistema tiene un potencial para la explotación agrícola.

Palabras clave: *Azospirillum*, inoculación, agricultura orgánica

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías han abierto nuevas posibilidades en lo concerniente a la aplicación de microorganismos benéficos del suelo, en la promoción del crecimiento de las plantas y el control biológico de patógenos. El trabajo con bacterias rizosféricas se ha desarrollado de forma gradual y ascendente, teniendo como finalidad aumentar el rendimiento de los cultivos, disminuir el uso desmedido de fertilizantes minerales y productos químicos y, consecuentemente, reducir la contaminación ambiental. La utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la agricultura es una práctica que internacionalmente ha tomado auge en las últimas dé-

cadás; en Cuba se ha favorecido el desarrollo de diferentes investigaciones relacionadas con el aislamiento, la selección y aplicación de microorganismos rizosféricos, con vistas a desarrollar biopreparados efectivos para cultivos de interés económico (1).

Dentro de las bacterias asociativas más estudiadas, se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum*, el cual ha sido objeto de estudio desde la década del setenta, pues su inoculación en las plantas conlleva a un aumento significativo del sistema radical, además de inducir resistencia a agentes patógenos y proveer de elementos tan necesarios como el nitrógeno, inhibe la proliferación de plantas parásitas y produce hormonas

que estimulan el crecimiento vegetal, lo que permite un desarrollo más económico y saludable de los cultivos (2). La habilidad que tiene esta bacteria de colonizar el interior de las plantas y ocupar nichos protegidos contra el oxígeno y otros factores, lo convierten en el grupo más promisorio de diazótrofos asociados con gramíneas y otras plantas no leguminosas (3).

En el presente trabajo se resumen los resultados y consideraciones más actuales de diversos autores a este respecto, con el objetivo de comprobar si realmente el género *Azospirillum* posee potencialidades para ser aplicado como inoculante en la agricultura.

GÉNERO AZOSPIRILLUM

El nombre *Azospirillum* proviene del francés *Azote*, que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum*, pequeña espiral. Su descubrimiento

Yanet Parra, Investigadora y Ms.C. F. Cuevas, Investigador Agregado de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ palacios@inca.edu.cu

data del año 1925, cuando Beijerinck describió una nueva especie de bacteria, aislada a partir de suelo holandés, a la que primeramente nombró *Azotobacter spirillum* y que posteriormente denominó *Spirillum lipoferum*. En 1978, después de sucesivos aislamientos de esta bacteria, se sugirió agrupar estos organismos en un nuevo género al que se denominó *Azospirillum*. Inicialmente dos especies, *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*, fueron identificadas basándose en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y en experimentos de homología del DNA (4). Posteriormente se añadieron tres especies: *Azospirillum amazonense*, aislada a partir de varios pastos en el área del Amazonas en Brasil (5), *Azospirillum halopraeferans*, tolerante a elevadas concentraciones salinas y de preferencia por altas temperaturas (40°C) (6) y *Azospirillum irakense*, aislada a partir de la rizosfera de arroz en la región de Diwaniyah, Iraq (7). En 1997, basándose en estudios moleculares, algunos autores proponen transferir al género *Azospirillum*, la subespecie *Conglomeromonas largomobilis*, subespecie *largomobilis*, nombrando una sexta especie, *Azospirillum largomobilis* (8). Recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae* (9). De las especies mencionadas, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* son las mejores estudiadas.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO AZOSPIRILLUM

Las bacterias pertenecientes a este género son organismos fijadores de N₂ que poseen una amplia distribución ecológica, ya que ha sido posible detectar su presencia en zonas templadas, tropicales y subtropicales (10, 11). Se describen en la literatura como Gram ne-

gativas aunque la gran variabilidad ha sido observada en varias cepas de *Azospirillum brasilense*. La morfología de las células depende de las condiciones nutricionales y edad del cultivo. Se observan formas eses y vibroides de 0.8 a 1 x 2 a 5 micrómetros de tamaño; se asocia además la aparición de formas quísticas o en C, como vía de resistencia a las condiciones de estrés y del mismo modo como mecanismo de supervivencia en la rizosfera (12).

Contienen gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB) como material de reserva y un sistema muy eficiente de adquisición de hierro a través de sideróforos, que le permite secuestrarlo en la rizosfera, haciéndolo no utilizable por otros microorganismos (13, 14).

Las células son mótils tanto *in vitro* como en el suelo y son capaces de adaptar su flagelación a diferentes ambientes. Aunque pueden desarrollarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, son preferentemente microaerófilas en presencia o ausencia de fuentes combinadas de nitrógeno (15). La presencia de una respuesta quimiotáctica a diferentes compuestos, asociada a la existencia de vías metabólicas alternativas, convierten a *Azospirillum* en un organismo nutricionalmente versátil, pues le permiten consumir una amplia variedad de ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos que se encuentran disponibles en la rizosfera (16, 17).

Un análisis de estas propiedades fisiológicas y bioquímicas demuestran que este género posee características, que lo convierten en un organismo capaz de competir en la rizosfera de varias especies de plantas, a pesar de la presencia de la población rizosférica indígena y que le proporcionan mayores posibilidades de subsistencia que otros diazótrofos en el nicho ecológico.

INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

Influencia de Azospirillum sobre la planta hospedera. La inoculación de

plantas con *Azospirillum* puede provocar cambios significativos en varios parámetros de su crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento del cultivo. Esta bacteria benéfica, general y no específica es notoria por sus efectos sobre plantas comerciales (18), pastos (19) y plantas de cereales cultivadas como trigo (20, 21), maíz (22), sorgo y arroz (11, 23), además de producir asociaciones con varias plantas suculentas desérticas (24).

En gran número de artículos científicos se describen los efectos que provoca la bacterización con diferentes cepas de *Azospirillum*, medido en el aumento de peso seco total, contenido de nitrógeno de hojas, granos y brotes, floración y aparición temprana de la espiga, número de espigas y granos en estas, peso y tamaño del grano, altura de la planta y tamaño de la hoja, índice de área foliar y tasa de germinación (11, 22, 25). Además, se han observado efectos marcados sobre el sistema radical, que incluyen incrementos en el número de raíces por planta, en el número y la longitud de las raíces laterales, las cuales incrementan el volumen radical (26) y aumento en el peso seco de la raíz, número, densidad y aparición temprana de los pelos radicales (25).

El efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre el incremento del rendimiento total en experimentos de campo generalmente oscila entre un 10-30 %. Pocos informes indican valores extremadamente altos entre 50-270 % sobre controles no inoculados. No obstante, se considera que incrementos moderados en el rendimiento (hasta un 20 %) son comercialmente valiosos en la agricultura moderna si se obtienen consistentemente (27).

Específicamente en Cuba, durante los últimos años ha sido investigado el efecto de *Azospirillum* sobre varios cultivos. La aplicación al arroz de esta bacteria a razón de 20 L.ha⁻¹ (10⁸ ufc.mL) con nitrógeno inorgánico muestra que es posible ahorrar el 25 % del fertilizante nitrogenado y obtener rendimientos

agrícolas similares a los obtenidos con la aplicación de la dosis completa de nitrógeno (28). Experiencias en la aplicación de *Azospirillum lipoferum* al tomate mostraron la posibilidad de disminuir el consumo de fertilizante nitrogenado en un 30 %, lográndose rendimientos satisfactorios y contribuyendo de esta forma a minimizar las afectaciones al ambiente (29). Otros estudios realizados con el objetivo de evaluar el efecto de la biofertilización con *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*, solas y con relaciones NP, NK y PK en fase de semillero y diferentes relaciones nutricionales en fase de trasplante, sobre la altura y masa fresca de las plántulas al trasplante, el número de frutos y rendimiento agrícola en el cultivo del tomate Var. Campbell-28, comparado con un testigo de producción y un control sin fertilizar, manifestaron un mejor comportamiento para el tratamiento *A. brasilense* más NK en semillero y relación nutricional NPK en trasplante (30).

En experimentos realizados en macetas utilizando la bacterización con *Azospirillum brasilense* se demostró el efecto beneficioso que tuvo la bacteria sobre el cultivo del arroz, ya que se pudo ahorrar el 33 % del fertilizante nitrogenado y un momento de su aplicación (31). Otros autores en este mismo cultivo, en condiciones de macetas, indicaron que hasta en suelos salinos con 2500 ppm, se obtenían resultados satisfactorios con la inoculación de *Azospirillum brasilense* (32).

La inoculación de *Azospirillum* soportado en turba al sorgo forrajero a los 18 días de germinación en prueba de campo, incrementó el rendimiento de materia seca en 18-21 % con respecto al control sin fertilizar (33). Efectos favorables se presentan también en la inoculación con *Azospirillum* a la guinea (*Panicum maximum*) en condiciones de casa de cristal y campo (34).

Estudios utilizando N^{15} en el cultivo de la caña de azúcar demostraron que la bacterización con *Azospirillum brasilense* en combina-

ción con una dosis subóptima de fertilizante nitrogenado en condiciones de macetas, conllevó a un incremento del 12 % del rendimiento agrícola con respecto al tratamiento fertilizado con la misma dosis, debido a la fijación biológica del nitrógeno (35).

A pesar de los resultados positivos obtenidos a nivel mundial en varios cultivos utilizando la bacterización con *Azospirillum*, la incidencia de estos no ha sido lo suficientemente frecuente. El principal problema de la mayoría de los experimentos de campo e invernadero realizados hasta el momento, es la respuesta inconsistente de la planta a la inoculación prescindiendo de las especies de plantas. Los resultados han sido erráticos y el buen éxito de los experimentos de campo no puede garantizarse. Publicaciones a partir de la literatura de agricultura popular y compañías comerciales indican que los experimentos de campo diseñados de forma idéntica, conducidos simultáneamente en similares condiciones ambientales, no producen los resultados similares esperados en el rendimiento (27). Para superar esto, se aconseja realizar estudios previos de las poblaciones microbianas en la rizosfera, aislar de ella cepas nativas y seleccionar las más eficaces sobre la base de la quimiotaxis planta-bacteria y caracterizar los mecanismos de estimulación posibles. Todo esto con la finalidad de elaborar un biopreparado eficiente y con grandes probabilidades de éxito.

MECANISMOS DE ACCIÓN

El principal mecanismo por el cual *Azospirillum* influye en el desarrollo y la productividad de las plantas es especulativo y aún motivo de debate. Algunas explicaciones incluyen: fijación de nitrógeno atmosférico, que contribuye al nitrógeno de la planta, efectos hormonales que alteran el crecimiento y metabolismo de la planta, incrementos del desarrollo, en general, del sistema radical que provoca un aumento en

la toma de minerales y agua, actividad nitrato reductasa bacteriana en la raíz, que incrementa la acumulación de nitrato en plantas inoculadas y la teoría aditiva que plantea la sucesión de cada uno de estos mecanismos.

Fijación de nitrógeno. Todas las cepas salvajes de *Azospirillum* son capaces de fijar nitrógeno atmosférico eficientemente, ya sea como bacteria de vida libre o en asociación con plantas, además de participar en varias transformaciones en el ciclo del nitrógeno. Unido a esto, seguido de la inoculación, se observa un incremento en el contenido total de nitrógeno en retoños y granos de plantas inoculadas. Por estas razones, la fijación de nitrógeno atmosférico fue propuesta como el primer mecanismo que podía explicar el incremento en el desarrollo de las plantas por *Azospirillum* (27).

La observación común de un incremento en la actividad nitrogenasa de raíces inoculadas constituyó otra evidencia de que este mecanismo podía contribuir al balance de nitrógeno de las plantas, pues se ha reflejado que la actividad de esta enzima, bien documentada, es de magnitud suficiente para explicar este incremento si todo el nitrógeno fijado es incorporado a la planta (36). Así tenemos que, por un lado, en inoculaciones de maíz y trigo se demostró que del 5-10 % (37) y hasta el 18 % (38) del nitrógeno de la planta era derivado de la fijación de N_2 y que las plantas inoculadas eran capaces de crecer normalmente con solo una cantidad parcial del fertilizante nitrogenado requerido para un normal desarrollo. Sin embargo, se observó que plantas que incrementaron el rendimiento con la inoculación, mostraban una baja o ninguna actividad nitrogenasa y que de todo el nitrógeno fijado por la bacteria, menos del 5 % era incorporado en el interior de la planta hospedera y estas cantidades incorporadas eran insuficientes para explicar el incremento total en el contenido de nitrógeno observado. A esto se adicionó el hecho de que

altos niveles de fertilización nitrogenada, los cuales inhiben la fijación de N_2 , no eliminaban la respuesta de la planta a la inoculación (39). Ante estos resultados contradictorios, la posibilidad de que la fijación de N_2 fuera el principal mecanismo de acción de *Azospirillum* comenzó a cuestionarse.

El uso de mutantes Nif⁻, incapaces de fijar N_2 pero que, por otra parte, son isogénicos con respecto a las cepas parentales, fue la vía fundamental para distinguir la contribución a través de la fijación de N_2 de otros efectos de la inoculación bacteriana. La inoculación de cereales con este tipo de mutantes causó los mismos efectos que las cepas parentales, lo que demostró que en la respuesta de la planta intervienen otros factores además de la fijación de N_2 (40).

A pesar de estos resultados, este mecanismo continúa siendo una posibilidad que se pone de manifiesto en muchas asociaciones de *Azospirillum*; la pregunta básica en cada sistema de inoculación se encuentra relacionada con la cantidad de nitrógeno que es aportado por la bacteria a la planta y en qué condiciones de crecimiento, un factor que es altamente variable y errático (27). *Actividad nitrato reductasa de Azospirillum en plantas.* La actividad de la nitrato reductasa de *Azospirillum* ha sido otro de los mecanismos propuestos, como una alternativa de la fijación de nitrógeno atmosférico que mantiene la asimilación de nitrato por la planta hospedera.

Experimentos de dilución de N^{15} con mutantes negativos nitrato reductasa de *Azospirillum brasilense* y la cepa salvaje, indicaron que la actividad de la nitrato reductasa de esta última favoreció la toma de nitrógeno en plantas de trigo. Estos resultados fueron confirmados por otros autores, quienes mostraron que la incorporación total de nitrógeno por el trigo fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con las cepas tipo salvaje de *Azospirillum brasilense* que en aquellas inoculadas con mutantes nega-

tivos nitrato reductasa (41). La inoculación de plantas con *Azospirillum brasilense Sp-245* y su mutante negativo nitrato reductasa también confirmó que la cepa mutante es significativamente menos efectiva en el incremento del rendimiento que la cepa parental (42).

Estos resultados constituyen una evidencia de que el efecto de algunas cepas de *Azospirillum* sobre su planta hospedera no es solamente vía fijación de nitrógeno (tanto la cepa parental como la cepa mutante poseen esta habilidad), sino que puede ser debido a un incremento en la asimilación de nitrato. La cepa parental ayuda a la reducción de nitrato en las raíces y así disminuye su traslocación hacia las hojas, mientras que la inoculación con la cepa mutante causa una traslocación directa y una reducción de nitrato en el follaje de la planta. Esta teoría puede explicar parcialmente el incremento en la acumulación de nitrógeno en retoños, debido a que la habilidad natural para fijar nitrógeno atmosférico puede también contribuir al nitrógeno de la planta unido a la actividad de la nitrato reductasa (27).

Efectos hormonales sobre las plantas. En experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, se ha comprobado que la aplicación de hormonas sintéticas o naturales reproduce los efectos de la bacterización con *Azospirillum* sobre la morfología y el desarrollo de la raíz; esto nos hace pensar que se deba a la capacidad de las bacterias de este género de producir hormonas. Una de las principales hormonas producidas por *Azospirillum* es el ácido 3 indol acético (AIA). Otras han sido detectadas a bajas concentraciones pero biológicamente significativas, entre ellas el ácido indol láctico, ácido 3-indol butírico (IBA), 3-indol etanol, 3-indol metanol, compuestos indol no identificados, ácido abscísico (ABA), citoquininas y giberelinas (43, 44).

Adicionalmente, se ha observado que *Azospirillum* puede producir grandes cantidades de nitrito, debido a su alta capacidad de reducción

desasimilatoria de nitratos, los cuales al alcanzar concentraciones de 0.1-2.0 mM pueden producir un efecto similar al AIA, estimulando el crecimiento de las raíces de varias plantas (16). Existen evidencias que demuestran que mutantes hiperproductores de hormonas provocan efectos más pronunciados sobre el crecimiento vegetal que las cepas tipo salvaje; además, la inoculación con bacterias de este género cambia la concentración de hormonas en la planta inoculada (45).

Se ha visto que el efecto del ácido indol acético sobre las raíces es efectivo en concentraciones de 10^{-8} M, estimulando la elongación radicular; sin embargo, a concentraciones de 10^{-6} M esto no sucede igual. En relación con esta hormona se postuló que en *Azospirillum* existen tres vías biosintéticas para la producción de ácido indol acético (AIA), dos de ellas dependientes del triptófano identificadas como la vía 3 indol acetamida (IAM) y la del ácido 3-indol pirúvico (IpyA) y una tercera vía, no identificada, que no usa al triptófano como precursor. Hasta el momento, *Azospirillum* es la única bacteria para la cual se ha informado una vía de producción de AIA no dependiente de triptófano (46). *Incremento general en el desarrollo de la raíz, toma de minerales y agua.* La inoculación de plantas con *Azospirillum* además de afectar varios parámetros radicales también afecta algunos parámetros foliares. Estos cambios son atribuidos directamente a los efectos positivos que tiene la bacteria sobre la toma de minerales por la planta.

Se sugiere que el mayor elemento implicado es el nitrógeno en forma de nitrato o amonio. Sin embargo, otros elementos como PO_4^{2-} , K^+ , Fe^{2+} y Rb^+ también juegan un papel importante en la interacción planta-bacteria (47).

El aumento en la toma de minerales puede resultar en un incremento en la acumulación tanto de materia seca como de minerales en el tallo y las hojas de la planta. Durante el período reproductivo, los

minerales acumulados pueden ser transferidos a las partes reproductivas y finalmente se obtienen mayores rendimientos.

El incremento en el volumen del sistema radical ha sido propuesto como una de las causas que provoca este aumento en la toma de minerales y no el favorecimiento específico de algún mecanismo normal de toma de iones. Este incremento puede ser explicado por la suplementaria combinación de hormonas de crecimiento en la planta y la excreción de nitrato por este microorganismo (48).

Una evidencia que confirma el incremento en la toma de minerales por las raíces inoculadas es el aumento en la actividad de flujo de protones observada en raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum* (49). También han sido observadas variaciones en el potencial de membrana de células radicales, así como cambios en la concentración relativa de fosfolípidos en la membrana de células de Caupí (50). Todos estos cambios que se producen con la inoculación son atribuidos a una señal molecular bacteriana no identificada que es un resultado directo de la interacción planta-*Azospirillum* y que no se produce en cultivo bacteriano o en plantas no inoculadas (49). Esta señal es una molécula de pequeño peso molecular cuya naturaleza química se desconoce, aunque se ha considerado la implicación de un sideróforo teniendo en cuenta que *Azospirillum* es capaz de incrementar la toma de hierro por la planta (13).

Además de favorecer la toma de minerales, la inoculación con bacterias de este género mejora los factores relacionados con el agua y la conductividad hídrica en plantas sometidas a estrés hídrico, ya que se ha visto que la extracción total de humedad del suelo es mayor en plantas que han sido inoculadas (51).

Aunque el aumento en la toma de agua y minerales juega un papel vital en la asociación planta-*Azospirillum* al igual que en los casos anteriores, los datos que se tie-

nen hasta el momento no sustentan la hipótesis de que este sea el principal mecanismo de acción de esta bacteria, pues existen evidencias de que algunas cepas de *Azospirillum brasilense* que no provocan un aumento en la toma de minerales incrementan el desarrollo de la planta (47). Además, todavía existen muchos aspectos por dilucidar, como por ejemplo, conocer si existe una interrelación entre las actividades de las membranas de plantas inoculadas y los parámetros de crecimiento; si este fenómeno detectado *in vitro* también ocurre *in situ*, se hace necesario determinar exactamente la naturaleza química de las señales moleculares involucradas y si diferentes cepas de *Azospirillum* y especies de plantas pueden formar una interacción que resulte en cambios en la actividad de la membrana.

Hipótesis aditiva. A pesar de que lo expuesto anteriormente está basado en evidencias experimentales, no existen datos cuantitativos que permitan sostener la idea de que uno de estos mecanismos por sí solo sea el responsable de la inducción de los cambios observados en plantas inoculadas. Sin embargo, la introducción de una teoría aditiva es más apropiada para describir el efecto de *Azospirillum* sobre su planta hospedera. Esta teoría sugiere que probablemente más de un mecanismo participa en esta asociación, ya sea simultáneamente o en sucesión. La suma de sus actividades, en condiciones ambientales apropiadas, resulta en los cambios observados en el crecimiento de las plantas. Esta hipótesis puede también explicar los resultados inconsistentes que se han obtenido hasta el momento, si tenemos en cuenta que probablemente uno o más mecanismos son activados o solamente parcialmente activados, lo que trae como consecuencia que sea difícil lograr los máximos beneficios. Esta hipótesis puede permitirnos finalmente redefinir a *Azospirillum* como una "rizobacteria promotora del creci-

miento vegetal" (PGPR) en lugar de fijador de nitrógeno asociativo (52).

COLONIZACIÓN

La colonización eficiente de la raíz constituye el factor más importante, cuando nos referimos al efecto beneficioso de la asociación planta-bacteria (27).

Los análisis microscópicos de la interacción planta-*Azospirillum* revelan dos tipos de colonización: una población bacteriana externa localizada en la capa de mucílago de la superficie de la raíz y una población interna localizada en los espacios intercelulares de la corteza radical. Aunque las células bacterianas pueden localizarse en cualquier parte del sistema radical, ellas tienen preferencia por el extremo radical, la zona de elongación y la zona de los pelos radicales (45).

El proceso de colonización comienza con una fase de dispersión, resultante de la inoculación artificial de la bacteria, seguido de un movimiento activo de esta hacia la raíz de la planta hospedera. Esta migración horizontal en el suelo puede variar desde unos pocos micrómetros hasta algunos centímetros y ocurre en un ambiente de feroz competencia con otros microorganismos del suelo, que también luchan por los nutrientes y por los sitios de colonización de la raíz de las plantas en crecimiento (53).

El movimiento de *Azospirillum* hacia la planta hospedera es un proceso activo no específico determinado por la motilidad bacteriana, que no depende directamente de la deficiencia de nutrientes, pero que es una consecuencia de la quimiotaxis bacteriana no específica, influenciada por el balance entre atrayentes y posibles repelentes liberados por la raíz y los niveles subatmosféricos de PO_2 que existen en la superficie radical, debido a la intensa actividad microbiana y que pueden guiar a la bacteria hacia un nicho óptimo para la fijación de nitrógeno en la rizosfera (54).

Posterior a esta migración ocurre el proceso de absorción que consta de dos fases. La primera es una adhesión rápida, reversible, gobernada por compuestos proteicos y basada principalmente en uniones fisicoquímicas (iónicas hidrofóbicas), las cuales son usualmente poco fuertes, no específicas y permiten que las células sean fácilmente separadas de la raíz (55). La segunda fase es una adhesión irreversible, en la cual la interacción bacteria-superficie forma una malla o retículo de sustancias, que unen permanentemente la bacteria a la superficie radical. Esta segunda etapa es más fuerte y probablemente basada en polisacáridos de superficie, y puede ser el factor principal en la colonización efectiva de la raíz, lo cual contribuye finalmente al crecimiento de la planta (56).

Aunque no se conoce exactamente el mecanismo de unión de esta bacteria, se ha sugerido que las lectinas presentes en la superficie celular interactúan con las lectinas presentes en la superficie radical de las plantas (57). Estas han sido implicadas en la asociación de la bacteria con plantas de trigo (58). Recientemente se ha propuesto que la carga y la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana pueden jugar un papel, quizás pequeño, en la adsorción primaria de *Azospirillum* (55).

Una vez colonizada la raíz, el movimiento de la bacteria en el sistema radical y entre plantas vecinas se convierte en un mecanismo de dispersión que incrementa la supervivencia de las células de *Azospirillum*, las cuales son totalmente dependientes de la presencia de las raíces para sobrevivir, ya que en ausencia de plantas, la bacteria es fuertemente absorbida en la fracción arcillosa y orgánica del suelo, mediante una interacción pasiva carga-carga, donde el movimiento es extremadamente restringido, aún en presencia del agua de percolación (57). Esta interacción que se establece entre las células bacterianas y las partículas del suelo y que está influida por la disponibilidad de quimioatra-

yentes y condiciones físicas y químicas del suelo, es uno de los factores que afecta la migración de la bacteria.

En conclusión, el modo de colonización radical por *Azospirillum* puede variar, dependiendo de la cepa bacteriana, las especies de plantas utilizadas, las condiciones ambientales y otros factores no identificados. La interacción entre todas estas variables crea diferentes grados y patrones de colonización radical, diferentes tamaños de poblaciones y diferentes sitios de colonización. La colonización interna ha sido demostrada solamente en algunas especies de plantas y es única para ciertas interacciones planta-*Azospirillum*.

INTERACCIÓN DE *AZOSPIRILLUM* CON OTROS MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS

Después de su aplicación al suelo, las células de *Azospirillum* pueden adaptarse rápidamente a las condiciones siempre cambiantes de la rizosfera de las plantas, incluidos los frecuentes cambios en la disponibilidad de nutrientes y la interacción con los microorganismos indígenas que también compiten por estos nutrientes. Estas interacciones pueden ser antagónicas o sinérgicas o del tipo predador presa, donde las células de *Azospirillum* pueden servir como alimento a la micro y macro fauna siempre deficiente de nutrientes (27).

La interacción de *Azospirillum* con *Rhizobium* ha sido una de las más estudiadas. Diferentes experimentos en campo e invernadero han mostrado que la inoculación simultánea de ambos microorganismos o la adición de *Azospirillum* a las leguminosas colonizadas naturalmente por *Rhizobium*, provoca un incremento en la fijación de N_2 , mayor número de nódulos y por tanto un incremento de los rendimientos (59, 60). Sin embargo, existen estudios de laboratorios de inoculación mix-

ta donde se han obtenido resultados contradictorios; por un lado, la aplicación de *Azospirillum* antes que *Rhizobium* incrementa la formación de nódulos, aún cuando este último es aplicado a concentraciones subóptimas para la formación de estas estructuras. Por otro lado, se han obtenido resultados negativos de inoculación mixta que impiden la nodulación del trébol y ocurre especialmente cuando en la mezcla las células de *Azospirillum* sobrepasan en número a las células de *Rhizobium* (61).

Estos resultados contradictorios indican que la interacción exacta que se establece entre *Azospirillum* y *Rhizobium* debe ser bien definida antes de llegar a una conclusión al respecto, considerando que concentraciones superiores de *Azospirillum* impiden el correcto establecimiento de los rizobios en los sitios de nodulación.

Por su parte, la inoculación mixta *Azospirillum*-hongo micorrízico vesículo arbuscular provoca incrementos significativos en el crecimiento y contenido de fósforo de las plantas, lo que puede sustituir completamente la aplicación de fertilizantes fosfóricos y nitrogenados, y favorecer la infección de plantas por hongos micorrizógenos (62). Sin embargo, el déficit de información obtenida hasta el momento puede solamente estimular nuevas investigaciones sobre esta interacción.

Otro efecto de sinergismo ha sido observado cuando al inocular *Azospirillum*, la descomposición de la paja por bacterias celulolíticas se ve favorecida. Se ha demostrado que la mezcla de estos cultivos bacterianos, ya sea en cultivo líquido o en el suelo, resulta ser más eficiente en la descomposición de la paja que las bacterias celulolíticas por sí solas. Esta interacción también favorece la fijación de N_2 por *Azospirillum*. El sinergismo que se establece entre estos microorganismos, puede ofrecer una explicación indirecta para el incremento del rendimiento por *Azospirillum* que ocurre en suelos enmendados con

paja (63). Similar a la interacción de *Azospirillum* con hongos micorrizógenos arbusculares, esta interacción debe ser primero definida con el objetivo de evaluar su potencial.

Existen algunos trabajos en la literatura que hacen pensar en el género *Azospirillum* como agente de control biológico. En 1992, se encontró que una cepa de *Azospirillum lipoferum* producía sideróforos, que inhibían la actividad microbiana en algunas bacterias y hongos (13). Se observó, además, que la inoculación de algunas dicotiledóneas con *Azospirillum brasilense* evitó el desarrollo de cáncer, provocado por *Agrobacterium tumefaciens* (64). También se ha encontrado que algunas cepas de *A. brasilense* producen bacteriocinas que inhiben cepas de enterobacterias, estreptococos y algunas bacterias Gram(-) (65). El nivel poblacional de *Staphylococcus* sp. decayó drásticamente al crecer en cultivo mixto con *Azospirillum brasilense Cd* (66). También se demostró que cuatro cepas bacterianas pertenecientes a *Azospirillum brasilense*, aisladas de un suelo sembrado con sorgo, limitaron la germinación de la planta parásita *Striga hermonthica* (2). Se ha comprobado, además, en diferentes experimentos que *Azospirillum* es capaz de inhibir el crecimiento de hongos como *Fusarium* y *Rizoctonia* (67).

Las referidas interacciones representan solamente una pequeña fracción de las interrelaciones de *Azospirillum* con otros microorganismos rizosféricos. Las interacciones con especies comunes, indígenas y predominantes de *Pseudomonas*, *Azospirillum* y poblaciones de *Bacillus* (10-6-10-9 ufc/g) han sido escasamente estudiadas. Teniendo en cuenta que la población de *Azospirillum* se ha estimado que representa del 1 al 10 % de la población rizosférica total (44), su supervivencia puede verse afectada por la presencia de muchas otras especies de bacterias y esto debe ser considerado cuando *Azospirillum* es aplicado al suelo.

GENÉTICA E INMUNOLOGÍA

A pesar de que las investigaciones genéticas en *Azospirillum* constituyen el talón de Aquiles de este sistema, muy poco se conoce de la genética de esta bacteria relacionada a su asociación con las plantas (68). Desafortunadamente, la mayoría de las publicaciones están relacionadas con la habilidad que tiene la bacteria para fijar N_2 y específicamente con los genes estructurales de la nitrogenasa (69).

De las seis especies conocidas, *Azospirillum brasilense* es la más documentada en términos de genética y regulación de la fijación de nitrógeno. Han sido caracterizadas varias vías regulatorias y genes estructurales, que incluyen *nifA*, *ntrBC*, *glnA*, *glnB* y *rpoN* entre otros. La regulación de sus expresiones ha sido estudiada en estado de vida libre y en asociación con trigo. (70, 71).

Las principales dificultades en los análisis genéticos de *Azospirillum* son el déficit de mutantes, unido a la carencia de sistemas indígenas de recombinación genética (conjugación o transducción). Para eliminar esta última barrera, muchos estudios han usado la ventaja que tiene *Azospirillum* de almacenar plásmidos secretos. Aunque no existe uniformidad entre los patrones de los plásmidos en diferentes especies, se asume que estos codifican para funciones relacionadas con la asociación planta-bacteria, al igual que los de *Rhizobium*. Un análisis genético detallado del megaplásmido p90 revela, entre otros genes, la presencia de numerosos genes involucrados en la flagelación de *Azospirillum* (72).

Una vía alternativa ha sido el uso de la mutagénesis con tramposon sitio dirigido, a través de la cual se han obtenido diferentes tipos de mutantes que han facilitado los estudios relacionados con esta asociación (73). A pesar de que esta técnica es una poderosa herramienta en los análisis genéticos de *Azospirillum*, aún no existe un cono-

cimiento suficiente que permita mejorar la tecnología de inoculación de esta bacteria.

Los estudios inmunológicos sobre *Azospirillum* constituyen una de las áreas a las que menos atención se les ha brindado en la investigación de esta bacteria (74). La literatura relacionada revela que a pesar de que existen muy pocos estudios utilizando anticuerpos policlonales específicos; estos pueden ser usados con buen éxito en los estudios de la rizosfera para la detección y enumeración de *Azospirillum*. Además, se evidencia el desarrollo de varias investigaciones encaminadas a ampliar el conocimiento existente acerca de los antígenos presentes en este género. Al respecto, han sido encontrados antígenos específicos de *Azospirillum brasilense Cd* en los exopolisacáridos y en los diferentes tipos de flagelos (75). Las células de *Azospirillum* han sido identificadas cualitativamente en la rizosfera por técnicas de anticuerpos fluorescentes (76), peroxidasa-antiperoxidasa, y por otras técnicas inmunológicas (10). *Azospirillum brasilense Cd* ha sido cuantificado específicamente en la rizosfera de varios cereales por ensayos inmuno-enzimáticos directos y de competición (ELISA) y por ensayos utilizando el complejo avidina-biotina incorporado a las técnicas ELISA (77). La precisión y utilidad de las técnicas inmunológicas demuestran que son una herramienta práctica esencial en la investigación de la rizosfera, a pesar de la falta de conocimiento inmunológico básico acerca de *Azospirillum*.

INOCULANTES Y SUS APLICACIONES

Las diferentes formulaciones del género *Azospirillum*, independientemente de su forma de aplicación y su modo de acción sobre la planta, son denominadas inoculantes. El término biofertilizante no es apropiado (15).

Medio de cultivo. Teniendo en cuenta la información que está reflejada

en la literatura, es obvio que no existen limitaciones para obtener cultivos de *Azospirillum* con altas concentraciones celulares (5×10^9 a 2×10^{10} ufc ml^{-1}). El medio más comúnmente usado con este propósito es el NFb con NH_4Cl o una modificación. La adición de sustancias promotoras del crecimiento (extracto de levadura) y modificaciones en las concentraciones de nitrógeno en el NFb pueden incrementar el crecimiento. Algunos investigadores enfatizan en la importancia del número de células del inóculo, pero no de su estado fisiológico, lo que provoca la existencia de diferencias en cuanto a la fase de cultivo empleada. Así, la mayoría de los laboratorios utilizan las fases de cultivo logarítmica o logarítmica tardía, con períodos de fermentación de 30-72 h. Otros laboratorios prefieren cultivos de 10-15 días en la fase estacionaria. El objetivo es obtener estructuras celulares que tengan ventajas de supervivencia, materiales de reserva y acumulación de sustancias promotoras del crecimiento.

Han sido publicadas también respuestas positivas a la inoculación, sin hacer referencia a la metodología de fermentación utilizada, lo que hace imposible determinar qué método de fermentación es mejor. Es necesario hacer estudios más detallados para evaluar el efecto del estado fisiológico de la célula en la formulación del inoculante con respecto a la supervivencia en el portador, sobre la semilla, colonización de la rizosfera y la cuantía de la respuesta de la planta. El papel que puedan desempeñar sobre el crecimiento de la planta y los metabolitos secundarios acumulados en el medio está siendo investigado en condiciones controladas (15).

Portadores y formulaciones. Los problemas de la supervivencia de *Azospirillum* en los inoculantes ha sido examinada en portadores como turba, vermiculita, alginato, formulaciones líquidas y otros (78). Actualmente, el método más simple de inoculación es por aplicación de la bacteria en una suspensión líquida,

ya sea directamente en el suelo o a la semilla. Esta técnica ha sido empleada en numerosos experimentos de campo e invernadero, pero para bacterias como *Azospirillum*, que sobrevive poco en el suelo, estas formulaciones están en desuso, debido a que no proporcionan un ambiente seguro para el microorganismo (79). Procedimientos más confiables usan varios portadores orgánicos. El mejor resultado del rendimiento ha sido obtenido a partir de suspensiones de turba aplicadas por goteo en el interior del surco de siembra o por esparcimiento de inoculantes de turba granular en el momento de la siembra. Estos inoculantes prácticos no poseen algunos de los requerimientos de un buen inoculante, debido a la liberación incontrolada de la bacteria y a varias dificultades técnicas, lo que probablemente provoca la obtención de resultados inconsistentes en el rendimiento. La utilización de formulaciones encapsuladas, principalmente las que emplean alginato como material para la encapsulación de los microorganismos, supera algunos de los problemas de los inoculantes líquidos y de turba, y cumple muchos de los requerimientos para un buen inoculante práctico. Es seco, sintético, simple de usar, uniforme, biodegradable por los microorganismos del suelo, no tóxico a la naturaleza, contiene una gran población bacteriana uniforme, permite una liberación lenta de la bacteria por períodos prolongados y puede ser producido a gran escala. Sin embargo, aunque se ha demostrado que de todos los materiales evaluados, el alginato constituye el más promisorio, la limitada información publicada sobre la aplicación de estos inoculantes en la agricultura y las posibles deficiencias, como por ejemplo su alto precio comparado con la turba, no permite predecir si el alginato podrá en un futuro sustituir a la turba en la industria de la inoculación; por tanto, el desarrollo de inoculantes avanzados es la tarea más importante en la aplicación futura de *Azospirillum* (79).

CONSIDERACIONES

A pesar de la gran cantidad de datos acumulados sobre *Azospirillum* durante los últimos 20 años, el conocimiento acerca de este sistema de asociación es demasiado limitado para asegurar una interacción positiva consistente entre la bacteria y la planta, que permita la explotación comercial de la tecnología de inoculación.

Sin embargo, durante la última década se ha demostrado, que esta bacteria es capaz de incrementar el rendimiento de cultivos agrícolas importantes en diferentes suelos y regiones climáticas usando diferentes cepas y especies de plantas y que aunque complejo, este sistema presenta potencialidades para la explotación agrícola.

Se sugiere que la dirección en la cual debe encaminarse la investigación con *Azospirillum*, para aprovechar el potencial completo de esta asociación, es hacia el entendimiento básico de los componentes fundamentales del sistema y menos hacia la experimentación a escala de campo. Esto puede lograrse realizando investigaciones sobre la ecología microbiana, genética y bioquímica de este microasociado, tecnología para su aplicación, así como la imbricación del empleo del biopreparado en la fitotecnia de los cultivos.

REFERENCIAS

1. Hernández, A. N. /et al./ Selección de cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. proyecto 300089, INCA. 1998.
2. Bouillant, M. /et al./ Inhibition of Striga seed germination with Sorghum growth promotion by soil bacteria. *Sciences de la Vie*, 1997, vol. 320, no. 2, p. 159-162.
3. Baldani, J. I. /et al./ Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil-biol-biochem.*, 1997, vol. 29, no. (5/6), p. 911-922.

4. Tarrand, J. J.; Krieg, N. R. y Dobereiner, J. A. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 1978, vol. 4, p. 967-980.
5. Falk, E. C. /et al./ Dexoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1985, vol. 35, p. 117-118.
6. Reinhold, B. /et al./ *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1987, vol. 37, p. 43-51.
7. Khammas, K. M. /et al./ *Azospirillum irakense* sp. nov, a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.*, 1989, vol. 140, p. 679-693.
8. Ben Dekhie, S. /et al./ Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *Largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov. and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1997, vol. 20, p. 72-77.
9. Eckert, B. /et al./ *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass. *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, vol. 51, p. 17-26.
10. Pazos, M. Aislamiento e identificación de cepas nativas, pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. [Tesis de maestría]. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 2000, 50 h.
11. Velazco, A. Utilización de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) sobre un suelo Hidromórfico Gley de la provincia de Pinar del Río. [Tesis de doctorado]. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Instituto de Ecología y Sistemática. Ciudad de La Habana. 2001, 101 h.
12. Bashan, Y.; Levanony, H.; y Whitmoyer, R. E. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology*, 1991, vol. 137, p. 187-196.
13. Steenhoudt, O., y Vanderleyden, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, vol. 24, p. 487-506.
14. Perotti, E. B. R. y Pedello, A. En: Reunión Científica Técnica de Biología de Suelo, Fijación Biológica del Nitrógeno. (2:1999:Catamarca), 1999, p. 181-184.
15. Yaacov, O. y Labandera, C. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 year-worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, vol. 26, no. 12, p. 1591-1601.
16. Didonet, A. D. y Magalhaes, A. C. Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, vol. 29, no. (11/12), p. 1743-1746.
17. Domelen, A. /et al./ Methyl ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no.10, p. 2652-2659.
18. Dosreis, F. B. /et al./ Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugar cane genotypes. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2000, vol. 35, no. 5, p. 985-994.
19. Lyrstis, M. /et al./ Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 2000, vol. 14, no. 2, p. 151-158.
20. Rethati, B. /et al./ Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticum aestivum* L., var. Norstar) inoculated with rhizobacteria. *Pedobiología*, 2000, vol. 44, no. 2, p. 97-104.
21. Hassan, U. /et al./ Isolation and identification of diazotrophic bacteria from rice, wheat and kallar grass. En: Nitrogen fixation with non-legumes. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes (7: 1996 oct 16-21: Boston), 1998.
22. Pandey, A.; Sharma, E.; y Palni, L. M. S. Influence of bacterial inoculation on maize in upland systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biol Biochem.*, 1998. vol. 30, no. 3, p. 379-384.
23. Yanni, Y. G. y Abdelfattah, F. K. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile delta. *Symbiosis*, 2000, vol. 27, no. (3-4), p. 319-331.
24. Carrillo, A. /et al./ Effects of resource-island soils, competition and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. *Restoration Ecology*, 2000, vol. 8, no. 1, p. 65-73.
25. Woodard, H. J. y Bly, A. Maize growth and yield responses to seed-inoculated N₂-fixing bacteria under dryland production conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 2000, vol. 23, no. 1, p. 55-65.
26. Bhattari, T. y Hess, D. Growth and yield responses of Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp. at various levels of nitrogen fertilization. *Biol. Fertil. Soils*. 1998, vol. 26, no. 1, p. 72-77.
27. Bashan, Y. y Levanony, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 1990, vol. 36, p. 591-608.
28. Hernández, T.; Díaz, G. S. y Velazco, A. Comportamiento de dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) frente a la inoculación con *Azospirillum brasilense* como biofertilizante. *Cultivos Tropicales*, 1996, vol.17, no. 1, p. 10-12.
29. Terry, E. Efectividad agronómica de biofertilizantes en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). [Tesis de maestría], ISCAH, 1998, 72 h.
30. Cuevas, F. /et al./ Efecto de la biofertilización con bacterias rizosféricas en el cultivo del tomate. *Avances*, 2000, vol. 2, no. 2., p. 9-12.
31. Velazco, A. y Castro, R. Estudio de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (Variedad A'82) en condiciones de macetas. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 5-9.

32. Cuevas, F.; Fuentes, O y Hernández, M. Establecimiento de *Azospirillum brasilense* en condiciones de suelos salinos dedicados al cultivo del arroz. En: Seminario Científico del INCA (9: 1994 nov. 16-18 : La Habana), 1994.
33. Hernández, Y; Sistachs, E y Prieto, A. Respuesta del sorgo forrajero (*Sorghum bicolor* vc sudanesa) a la inoculación con *Azospirillum* spp. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 1994, vol. 28, no. 2, p. 245-250.
34. Hernández, Y.; García, D. y Sarmiento, M. Comportamiento de la guinea (*Panicum maximum*) inoculada con *Azospirillum*. En: XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología: Resúmenes. La Habana, 1997, p.104.
35. Velazco, A. /et al./ Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de la caña de azúcar. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2000, vol. 35, no. 5, p. 985-994.
36. Sarig, S. /et al./ Response of non-irrigated *Sorghum bicolor* to *Azospirillum* inoculation. *Exp. Agric.*, 1984, vol. 20, p. 59-66.
37. Kucey, R. M. N. Alteration of size of wheat root system and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol.*, 1988, vol. 34, p. 735-739.
38. Rennie, R. J. y Thomas, J. B. N¹⁵ determined effect of inoculation with N₂ fixing bacteria on nitrogen assimilation in western Canadian wheats. *Plant Soil.*, 1987, vol. 100, p. 213-223.
39. Bashan, Y.; Singh, M. y Levanony, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can J. Bot.*, 1989, vol. 67, no. 8, p. 2429-2434.
40. Barbieri, P. /et al./ Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 1986, vol. 36, p. 87-90.
41. Ferreira, M. C. B.; Fernandez, M. S. y Dobereiner, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. *Biol. Fertil. Soils*, 1987, vol. 4, p. 47-53.
42. Garcia de Salome, P. E. /et al./ Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the N₁₅ isotope dilution technique. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, vol.23, no. 3, p. 249-256.
43. Rasul, G. /et al./ Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice, wheat and kallar grass. En: Nitrogen fixation with non-legumes. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, (7: 1996 oct. 16-21: Boston), 1998.
44. Piccoli, P.; Masciarelli, O. y Bottini, R. Gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultured in chemically defined medium as affected by oxygen availability and water status. *Symbiosis*, 1999, vol. 27, no. 2, p 135-145.
45. Hirsch, A. M.; Fang, Y.; Asad, S. y Kapulnik, Y. The role of phytohormones in plant-microbe symbiosis. *Plant Soil*, 1997, vol.194, p. 171-184.
46. Bar, T. y Okon, Y. Conversion of tryptophan indole-3-piruvic acid, indole-3-lactic acid and indole to indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense* Sp7. En: *Azospirillum* VI and related microorganism, genetic-physiology-ecology., Berlin, Heidelberg, Germany. Springer Verlag, 1995, vol. 637, p. 347-359.
47. Bashan, Y.; Harrison, K. y Whitmoyer, R. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, vol. 56, no. 3, p. 769-775.
48. Van, A. Amonium transport in *Azospirillum brasilense*. *Rev. Dissertaciones de Agricultura*, vol. 24, no. 5, 1998.
49. Bashan, Y.; Alcanez-Melendez, L. y Toledo, G. Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis*, 1992, vol. 13, p. 217-228.
50. Zhulin, I. B.; Sarmiento, L. E.; Taylor, B. L. Changes in membrane potential upon chemotactic stimulation of *Azospirillum brasilense*. *Ecol. Sci. V.*, 1995, vol. 37, p. 299-305.
51. Creus, C. M.; Sueldo, R. J. y Barassi, C. A. Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1997, vol. 35, no. 12, p. 939-944.
52. Bashan, Y. Potential use of *Azospirillum* as biofertilizer. *Turrialba*, 1993, vol. 43, no. 4, p. 286-291.
53. Burmand, S.; Okon, Y. y Jurkevitch, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2000, vol. 26, p. 91-110.
54. Marshal, K. y Vanderleyden, J. The 'oxygen paradox' of dinitrogen-bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, vol. 30, no. (5-6), p. 363-373.
55. Castellanos, T.; Ascencio, F. y Bashan, Y. Cell-surface hydrophobicity and cell-surface charge of *Azospirillum* spp. *FEMS-Microbiol-Ecol.*, 1997, vol. 24, no. 2, p. 159-172.
56. Burmand, S. /et al./ Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 2000, vol. 189, p. 259-264.
57. Castellanos, T.; Ascencio, F. y Bashan, Y. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. *Current Microbiology*, 1998, vol. 36, no. 4, p. 241-244.
58. Burdman, S.; Kigel, J. y Okon, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.*, 1997, vol. 29, no. (5/6), p. 923-929.
59. Galal, Y. G. M. Dual inoculation with strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* to improve growth and biological nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L.). *Biol. Fertil. Soils*, 1997, vol. 24, no. 3, p. 317-322.
60. Burdman, S., /et al./ Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. Biological nitrogen fixation for the century. Proceedings of the International Congress on Nitrogen Fixation. (21, 11:1997 jul. 20-25:Dordreegt París), 1998. p. 609-612.
61. Plazinski, J. y Rolfe, B. G. *Azospirillum*-*Rhizobium* interaction leading to a plant growth stimulation nodule formation. *Can. J. Microbiol.*, 1985, vol. 31, p. 1026-1030.

62. Ratti, N. y Janardhanan, K. K. Response of dual inoculation with VAM and *Azospirillum* on the yield and oil content of Palmarosa (*Cymbopogon martinii* var. *motia*). *Microbiol. Res.*, 1996, vol. 151, no. 3, p. 325-328.
63. Hegazi, N. A. Modification of soil environment through straw application versus *Azospirillum* spp. inoculation. En: *Azospirillum*. IV. Genetics, physiology, ecology. Edited by W. Klingmuller. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg., 1988, p. 215-222.
64. Bakanchevova, T. I. Inhibition of tumor formation process in dicotyledoneous plants by *Azospirillum brasilense* strains. *Mikrobiologiya*, 1993, vol. 62, p. 515-523.
65. Bashan, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 1999, vol.29, p. 246-258.
66. Holguin, G. y Bashan, Y. Co-culturing of *Azospirillum brasilense* Cd. with the mangrove rizosphere bacteria *Staphylococcus* sp. promotes its nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, vol. 32, no. 16, 1996.
67. Cho-Jayong /et al./ Effect of rhizobacteria on the growth of cucumber and tomato plug seedlings. *J. of the Korean Society for Horticultural Science*, 1998, vol. 39, no. 1, p.18-23.
68. Pereg, L. /et al./ A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol Plant Microb. Interact.*, 1998, vol.11, no. 3, p. 177-187.
69. Frazzon, J. y Schrank, I. S. Sequencing and complementation analysis of the nifUSV genes from *Azospirillum brasilense*. *FEMS Micro. Biol. Lett.*, 1998, vol. 159, no. 2, p. 151-158.
70. Elmerich, C. /et al./ Regulation of Nif gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. *Soil. Biol. Biochem.*, 1997, vol. 29, no. (5/6), p. 847-852.
71. Sun, J.; Peng, X.; Vanimpe, J. y Vanderleyden, J. The ntrB and ntrC genes are involved in the regulation of poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no 1, p. 113-117.
72. Broek, A. V. y Vanderleyden, J. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1995, vol. 14, no. 5, p. 445-466.
73. Pratiwi, E. /et al./ Characterization of Indole acetic acid mutant of *Azospirillum lipoferum* J21.4 generated by transposon mutagenesis. *Hayati, Journal Biosains*, 2001, vol.8, no. 1, p. 150-154.
74. Bashan, Y. y Holguin, G. *Azospirillum* plant relationships: environmental and physiological advances. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, vol. 43, no. 2, p. 103-121.
75. Schloter, M.; Bode, W. y Hartmann, A. Characterization and application of a strain-specific monoclonal antibody against the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Wa5. *Hybridoma*, 1997, vol. 16, no. 2, p. 183-187.
76. Schloter, M. y Hartmann, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 1998, vol. 25, no. (1/3), p. 159-179.
77. Levanony H. y Bashan, Y. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. *Current Microbiology*, 1990, vol. 20, p. 91-94.
78. Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 1998, vol. 16, no 4, p. 729-770.
79. Bashan, Y. /et al./ Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, p. 1938-1945.

Recibido: 23 de Julio del 2001

Aceptado: 22 de febrero del 2002

DIPLOMADOS

Precio: 500 USD

Uso y manejo de los biofertilizantes

Coordinador: Dr.C. Nicolás Medina Basso
Duración: 1 año



SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu