

**CALIDAD DE INOCULANTES ALMACENADOS A DIFERENTES
TEMPERATURAS: EFECTO SOBRE LA POBLACION, HUMEDAD Y PH DEL
PRODUCTO.**



GERMAN ANDRES ESTRADA BONILLA

**PONTICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

Seropédica, RJ.

2008

**CALIDAD DE INOCULANTES ALMACENADOS A DIFERENTES
TEMPERATURAS: EFECTO SOBRE LA POBLACION, HUMEDAD Y PH DEL
PRODUCTO.**

GERMAN ANDRES ESTRADA BONILLA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para obtener el título de
MICROBOLOGO INDUSTRIAL**

DIRECTORA

VERA LUCIA DIVAN BALDANI

PONTICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Seropedica, RJ.

2008

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

**CALIDAD DE INOCULANTES ALMACENADOS A DIFERENTES
TEMPERATURAS: EFECTO SOBRE LA POBLACION, HUMEDAD Y PH DEL
PRODUCTO.**

GERMAN ANDRES ESTRADA BONILLA

APROBADO

Ingrid Schuler-García Ph. D.
Decano Académico

Janeth Arias, B. Sc.
Director de Carrera

AGRADECIMIENTOS.

- A la doctora Vera Lucia Divan Baldani por ser mi madre en Brasil, estar en las buenas y las malas en este tiempo y permitirme esta oportunidad en mi vida.
- Al doctor Jose Ivo Baldani por ser mi apoyo científico y ser mi ejemplo de lo que es ser excelente investigador.
- A las doctoras Ruth Rebeca Bonilla Buitrago y Maria Fernanda Garrido M.sc por estar incondicionalmente ayudándome e impulsándome desde la distancia con la realización de este trabajo.
- A la doctora Janeth Arias Palacios M.Sc, por ayudarme en todo lo que necesite de la universidad.
- A Joilson y demás colegas de laboratorio, por darme una mano siempre que los necesite y aprender de cada uno algo nuevo.
- A Lucio, Wilson, Luis Carlos, Luisinho y los demás técnicos del laboratorio por siempre estar a disposición para ayudarme.
- A Embrapa Agrobiologia por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

**A mis padres por su amor incondicional, estoy orgulloso
de ustedes, gracias por hacer de mi lo que hoy soy...**

**Tio Bethoben, mi ejemplo a seguir gracias por tu ayuda
incondicional, , sin ti hubiera sido muy difícil...**

**Mi Gorda y Mechas, ustedes me enseñaron lo que es
luchar en la vida, ojala pueda tenerlos mucho tiempo mas...**

**Tia Gade , tia Yuri siempre fueron un apoyo en mi
vida ...**

Tio Walter gracias por ayudarme siempre que pudo..

**Boris, mi hermanito, mi lado opuesto,
siempre quiero lo mejor para ti.**

A Alejandra Hoyos por ser un estimulo en mi vida.

GERMAN ESTRADA

"Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre
es que no todos ignoramos las mismas cosas."

ALBERT EINSTEIN

RESUMEN:

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes para el buen desarrollo de los cultivos, por eso desde la revolución verde, el productor ha recurrido a la alta aplicación de este en forma de fertilizantes de síntesis para suplirlo, generándose un efecto negativo sobre el ambiente y costo de los alimentos. Si se tiene en cuenta que el N es el elemento más abundante en la atmósfera constituyendo el 78% de esta, este no se encuentra disponible para las plantas debido a su alta estabilidad, dada por el triple enlace que posee la molécula. En el ambiente este elemento es fijado en el suelo por fenómenos naturales y por la acción biológica de microorganismos fijadores de nitrógeno (MFN), siendo este último el mecanismo más importante. Además se ha encontrado que algunos poseen un beneficio adicional como la producción de fitohormonas, favoreciendo el crecimiento vegetal. Debido a estas cualidades los MFN han sido utilizados como una alternativa para reducir la fertilización nitrogenada de síntesis química. Principalmente se han desarrollado inoculantes con base en bacterias simbióticas para plantas, como por ejemplo en el caso de la producción de soya, donde esta tecnología viene siendo ampliamente utilizada. Debido a la importancia de los cultivos de alta transcendencia como el soja, maíz, arroz, cebada y trigo, surge la necesidad de desarrollar inoculantes y en este caso se han venido produciendo a base de bacterias simbióticas y asimbióticas endófitas obligadas y facultativas, pero pese a obtener resultados positivos en el desarrollo de la planta en invernadero y campo, sin embargo hasta el momento no ha sido posible el desarrollo de un inoculante estándar con base en bacterias diazotrofica asociativas, debido a la variabilidad de los resultados. En este estudio se determinó que el principal factor que afecta la población en el inoculantes es la temperatura. Almacenar los diferentes inoculantes a temperatura ambiente (19°- 26 °C) durante 150 días garantiza la calidad del inoculante para su uso. El almacenamiento a las diferentes temperaturas no afectó significativamente el pH ni el nivel de humedad de los inoculantes testados.

1. INTRODUCCION	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	3
2.2 Relación entre planta hospedera y las PGPR	6
2.3. Principales mecanismos de acción de las PGPR:	9
2.4. Biofertilizantes	12
2.4.1. Perspectivas del uso de biofertilizantes	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Reactivación de las cepas de estudio	17
3.2. Conformación del banco de trabajo con las cepas de estudio	18
3.3. Montaje de los inoculantes	18
3.4. Parámetros de evaluación de los inoculantes	
3.4. 1. Recuento de los microorganismos en el inóculo y en la turba	20
3.4.1.1. Recuento de bacterias diazotróficas asimbióticas	20
3.4.1.2 Recuento de bacterias diazotróficas simbióticas	21
3.4.2. Medición de pH del soporte	21
3.4.3. Medición de la humedad de los inoculantes	21
4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS:	
4.1. Población en el inoculo y 24 horas de incubación.	22
4.2. Efectos de la temperatura sobre la sobrevivencia de las diferentes bacterias diazótroficas en los inoculantes	
4.2.1. Temperatura ambiente (19° - 26° C)	22
4.2.2. Temperatura nevera (4° - 10° C)	24
4.2.3 Temperatura 30° C	26

4.3. Efecto de la temperatura sobre la humedad de los inoculantes conteniendo diferentes bacterias diazotróficas	29
4.4. Efecto de la temperatura sobre pH de los inoculantes conteniendo diferentes bacterias diazotróficas	31
4.5. Evaluación general de la influencia de las diferentes temperaturas sobre todos los inoculantes	33
5. CONCLUSIONES	35
6. ANEXOS	36
7. BIBLIOGRAFIA	41

INDICE DE FIGURAS

Pag

FIGURA 1. Vías del ácido indol acético dependientes de triptófano. 1. Vía del ácido 3 indol pirúvico. 2. Vía de la indol 3 acetamida. 3. Vía de la triptamina	10
FIGURA 2. Ruta biosintetica de Giberelinas en <i>azospirillum sp.</i> Conversión de geranilgeranil difosfato(GDDP) a GA3 y GA1 Por la via de la 3-hidroxilacion.	11
FIGURA 3. Sobrevivencia en los diferentes inoculantes, conservados a temperatura ambiente: 19-26 °C. Las barras indican la diferencia media significativa.	23
FIGURA 4. Sobrevivencia en los diferentes inoculantes conservados a temperatura (t) nevera: 4-10 °C). Las barras indican la diferencia media significativa.	25
FIGURA 5. Sobrevivencia en los diferentes inoculantes, conservados a la temperatura (t) de 30 °C. Las barras indican la diferencia media significativa.	27
FIGURA 6. Efecto de las diferentes temperaturas de conservación sobre el porcentaje de humedad media de los diferentes inoculantes. Nevera (4-10 °C), Ambiente (19 - 26 °C). Las barras indican la diferencia media significativa.	34

INDICE DE CUADROS

	Pag
CUADRO 1. Microorganismos productores de fitohormonas.	10
CUADRO 2. Medios de cultivo empleados según género de microorganismo.	17
CUADRO 3. Rango de temperatura optima de los microorganismos utilizados en los diferentes inoculantes.	28

INDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Inoculación en campo de cereales, en diferentes regiones de México	13
Tabla 2. Población en el inóculo inicial y en el inoculante después de 24 horas de incubación.	22
Tabla 3. Temperaturas medias de la ciudad de Rio de Janeiro durante los meses de almacenamiento.	23
Tabla 4. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes, preparados con diferentes bacterias diazotróficas, almacenados en ambiente a temperaturas de 19°C – 26° C durante el periodo de 150 días.	29
Tabla 5. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes, preparados con diferentes bacterias diazotróficas, almacenados en nevera a a temperaturas de 4°C – 10° C durante el periodo de 150 días.	30
Tabla 6. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes, preparados con diferentes bacterias diazotróficas, almacenados en nevera a 30 °C durante el periodo de 150 días.	30
Tabla 7. Efecto de la temperatura Nevera (19-26 C) y bacteria utilizada en el inoculante sobre el pH del producto.	32
Tabla 8. Efecto de la temperatura y la bacteria utilizada en el inoculante sobre el pH del producto.	32
Tabla 9. Efecto de la temperatura y la bacteria utilizada en el inoculante sobre el pH del producto.	33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum irakense* y *Azospirillum halopraeferans*).

ANEXO 2. Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*).

ANEXO 3. Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum* spp).

ANEXO 4. Medio de cultivo DYGS.

ANEXO 5. Medio de cultivo papa.

ANEXO 6. Medio 79.

1. INTRODUCCION:

Durante varias décadas se ha venido desarrollando un tipo de agricultura perjudicial para el ambiente denominada “agricultura intensiva” ocasionada por la explosión demográfica que se dio después de la Segunda Guerra Mundial, trayendo consigo una gran demanda de alimentos. La “agricultura intensiva” incluye una serie de prácticas que implican la tala de bosques naturales, el uso de dosis elevadas de fertilizantes de síntesis química para el incremento de la producción, y otros productos agroquímicos como fungicidas, plaguicidas y otros fitofármacos empleados para mantener los cultivos libres de enfermedades y plagas (COLLADOS. 2006).

El aumento desmedido en el uso de fertilizantes de síntesis, principalmente nitrogenados y fosforados, está afectando tanto la vida de los seres humanos como la de las propias plantas y animales, provocando un desequilibrio ecológico que amenaza con ser irreversible, ocasionando impactos negativos tales como la eutrofización de los cuerpos de agua. La eutrofización está definida como el aumento desmedido de nutrientes en aguas que estimulan un conjunto de síntomas y cambios, como: el aumento de fitoplancton, la excesiva producción de raíces de las plantas acuáticas (macrófitas), trayendo consigo el deterioro del agua y afectando a los peces, además de cambios indeseables que interfieren con los usos del agua (PREPAS *et al.* 2003). Además de esto, la síntesis de fertilizantes químicos nitrogenados, principalmente amonio o urea requiere mucha energía, debido a que esta se obtiene a través del proceso Haber-Bosch, combinando nitrógeno e hidrogeno y se requiere de 1,3 toneladas de combustible fósil para fijar 1 tonelada de nitrógeno utilizando una alta presión (35 a 100 Mpa) y una temperatura de 300 a 400 °C (MARIN *et al* 1999).

En el mundo se aplican aproximadamente 77×10^6 toneladas de nitrógeno al año como fertilizante lo que constituye un requerimiento de combustible fósil aproximado de 91×10^9 toneladas/año, esto corresponde a aproximadamente 1,4% del combustible fósil que se consume (MARIN *et al.* 1999). Esta dependencia de compuestos nitrogenados ha llevado al productor a depender de empresas multinacionales que producen estos fertilizantes, aumentando el costo de producción y fuga de las divisas.

En los últimos años debido al impacto negativo de la agricultura en el ambiente y a los altos costos de producción se ha venido planteando el concepto de agricultura sostenible, definida como la manera de cultivar el suelo conservando al máximo la

calidad medioambiental, permitiendo ingresos adecuados a los agricultores y, generando suficientes alimentos a los consumidores, con el fin último de preservar y regenerar los recursos naturales y producir alimentos sanos y seguros (BENBROOK. 1999).

Para poder implementar este tipo de agricultura sostenible es necesario hallar novedosas soluciones que faciliten el crecimiento de las plantas, tratando de aliviar la carga impuesta a nuestro medio ambiente. Una de las opciones que se plantean dentro de los lineamientos de la agricultura sostenible, es el uso de biofertilizantes como una manera de disminuir la aplicación de fertilizantes de síntesis química (BONILLA *et al.* 2000). Dentro de este contexto en los últimos años se han venido produciendo biofertilizantes a base de microorganismos simbióticos principalmente rizobios, y asimbióticos principalmente *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum amazonense*, *Azotobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. para gramíneas de interés económico como la caña, arroz, maíz, trigo, cebada entre otros.. En este contexto en la actualidad se busca mejorar la calidad de estos inoculantes garantizando el número de células hasta su aplicación, Teniendo en cuenta esto, se ha tratado de hallar todos los factores que afectan la obtención de un inoculante de calidad, encontrándose que uno de los factores fundamentales para tener éxito es el soporte, resultando hasta el momento la turba como el más viable. Otro factor son las condiciones de almacenamiento hasta su aplicación. En este orden de ideas, el objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes inoculantes utilizándose turba como soporte, almacenados a diferentes temperaturas a base de las siguientes bacterias: 1) *Azospirillum brasilense* SP 245 (BR 11005), 2) *Azospirillum amazonense* Y2 (ATCC35120), 4) *Herbaspirillum seropedicae* ZAE 94 (BR 11417), 5) *Rhizobium Tropicum* BR 322 (CIAT 899) para Frijol (*Phaseolus vulgaris*), Los parámetros del número de bacterias, pH, y humedad, fueron considerados para las evaluaciones realizadas hasta 150 días.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Con excepción del agua, el nitrógeno es considerado generalmente el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural (FRANCO & DÖBEREINER, 1994) y es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva de nitrógeno accesible en la biosfera, la cual es prácticamente ilimitada y no es directamente utilizada por los vegetales y animales. Para que el nitrógeno molecular pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido y los únicos seres capaces de realizar esta reacción son los organismos pertenecientes a los dominios *Eubacteria* y *Archea*, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (BACA *et al.*, 2000).

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso mediante el cual la mayor parte de nitrógeno atmosférico se ha incorporado a la materia viva, a lo largo de la evolución del planeta. Este proceso constituye la principal vía de incorporación de nitrógeno al ecosistema, que constantemente es reciclado para la atmósfera principalmente por la acción de organismos descomponedores de materia orgánica en el suelo. La transformación del nitrógeno no es exclusivamente biológica: las radiaciones ultravioleta representan un 10% del aporte global; la industria de los fertilizantes aporta un 25%, por lo que la fijación biológica de nitrógeno contribuye con el 60% aproximadamente (BACA *et al.*, 2000).

De esta forma, la acción de los microorganismos fijadores de nitrógeno y desnitrificadores garantiza un reservorio inagotable de nitrógeno en la atmósfera. La fijación biológica de nitrógeno contribuye con la manutención del ecosistema en equilibrio, lo que conlleva a la reducción en la aplicación de dosis excesivas de compuestos nitrogenados de síntesis, como por ejemplo el nitrato que contamina aguas y los vegetales que serán consumidos por el hombre. De esta forma, posibilita el desarrollo de una agricultura más sustentable y menos agresiva con el medio ambiente (PEOPLES & CRASWELL, 1992).

Varios sistemas de fijación biológica de nitrógeno ya han sido descritos en organismos procarióticos. Dentro de los organismos que fijan nitrógeno (ó diazotróficos) muchos

son heterótrofos, los cuales necesitan un suplemento de carbono reducido y otros dependen indirectamente de la energía lumínica. En general, requieren de una simbiosis con un hospedero eucariótico o pueden ser de vida libre, compitiendo con otros microorganismos por la materia orgánica disponible en el ambiente. Han sido descritas especies representantes de varios grupos de procariotes que fijan nitrógeno, tales como: bacterias fotosintéticas (*Rhodospirillum rubrum*), bacterias anaeróbicas (*Clostridium* spp.), microaeróbicas (*Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., *Klebsiella* spp., entre otros), bacterias aeróbicas (*Azotobacter* spp., *Derrxia* spp., *Beijerinckia* spp.) y también algunas especies de cianobacterias (algas verde-azules) y actinomicetes (*Frankia* sp.) (SPRENT & SPRENT, 1990).

Según EVANS & BURRIS (1992), se pueden caracterizar tres grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno: las bacterias diazotróficas de vida libre, asociativas y simbióticas.

Los diazótrofos de vida libre son heterótrofos, requiriendo ecosistemas capaces de brindar una fuente de carbono utilizable, necesario para la fijación de nitrógeno. Estos microorganismos fueron los primeros en ser conocidos como es el caso de *Beijerinckia fluminensis* y *Beijerinckia indica*, aisladas de la rizósfera de plantas de caña de azúcar en suelos tropicales, demostrando su potencial en asociaciones con gramíneas (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958; DÖBEREINER & ALVAHYDO, 1959). Dentro de las bacterias de vida libre encontramos la familia *Azotobacteraceae* que está representada en su mayoría por el género *Azotobacter* el cual es aeróbico, heterótrofo y fijador de nitrógeno y las especies más conocidas son *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. paspali*, siendo esta última la más estudiada ecológicamente (BECKING, 1991B, DÖBEREINER ET AL, 1995).

Las bacterias diazotróficas asociativas tienen la capacidad de asociación con gramíneas, dentro de las cuales se encuentran especies forrajeras utilizadas como alimento por la ganadería bovina (DÖBEREINER, 1970; DÖBEREINER & CAMPÊLO, 1971; BECKING, 1991A; DÖBEREINER & DAY, 1976; REINHOLD et al, 1987; REIS et al, 2004); de acuerdo a lo propuesto por BALDANI *et al.* en 1997, éstas se dividen en endófitos facultativos (pueden colonizar tanto la rizósfera como el interior de las raíces) y obligados (colonizan el interior de las raíces).

Respecto a los endófitos facultativos, solamente después del redescubrimiento del género *Azospirillum* (grupo predominante) por DÖBEREINER & DAY (1975), los científicos del mundo mostraron interés por la asociación de diazótrofos con gramíneas. Los microorganismos de este género se encuentran tanto en el interior como en la superficie de las raíces de muchas gramíneas forrajeras (DÖBEREINER & BALDANI, 1982). La distribución ecológica de *Azospirillum* spp. es extremadamente amplia, siendo considerada como una bacteria universal que coloniza plantas que crecen en diferentes hábitats (DÖBEREINER *et al.*, 1976; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). Otras especies también han sido encontradas en asociación con plantas monocotiledóneas incluyendo arroz, sorgo, caña de azúcar, gramíneas forrajeras, entre otras (DÖBEREINER *ET AL*, 1976; HAAHTELA *ET AL*, 1981; REINHOLD *ET AL*, 1987) y con dicotiledóneas. El género fue definido por TARRAND *et al.* (1978) y comprende once especies caracterizadas fenotípicamente, por análisis DNA:DNA y por secuencia del gen 16S rRNA: *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Tarrand *et al.*, 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMMANS *et al.*, 1989), *A. largimobile* y *A. dobereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (HUI XIE, C AND YOKOTA, A. 2005), *A. melinis* (PENG, G *et al.* 2006), *A. canadense* (MEHNAZ, *et al.* 2007). Algunas especies de *Azospirillum* son capaces de producir reguladores de crecimiento vegetal como el ácido indolacético (VANDERLEYDEN, 2000).

La característica de diazótrofos endófitos obligados fue descubierta recientemente y parece ser clave para explicar una contribución de la fijación de nitrógeno mucho más eficiente, especialmente en los trópicos, en relación con las asociaciones rizosféricas en otros cultivos (DÖBEREINER, 1995; DÖBEREINER *et al.*, 1995). A este grupo de microorganismos pertenecen: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI, 1996; GILLIS *ET AL*, 1991; BALDANI *ET AL.*, 1996), *Klebsiella pneumoniae* (DOOLITTLE *et al.*, 2007) y *Burkholderia* spp. (YABUUCHI *ET AL*, 1992).

La capacidad de fijar nitrógeno simbióticamente se encuentra en varios grupos de microorganismos y en algunos casos se observa la formación de estructuras diferenciadas. En relación a los rizobios, durante su asociación con las plantas leguminosas, se observan estructuras que se denominan nódulos. Estos

microorganismos tienen la capacidad de invadir las raíces de las plantas leguminosas en zonas estacionales y en zonas tropicales, haciendo que ocurra la formación del nódulo. En el nódulo, la bacteria, en su forma de bacteroide está involucrada en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico de una forma combinada (amonio) que puede ser utilizado por la planta huésped. Actualmente son conocidos siete géneros de diazótrofos simbióticos de la familia *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (DREYFUS ET AL., 1988; COHN (1942), DE LAJUDIE ET AL., 1994; MARTINEZ-ROMERO & CABALLERO-MELLADO, 1996; JARVIS ET AL., 1997; DE LAJUDIE ET AL., 1998).

Histórica y económicamente, varios diazótrofos han sido ampliamente utilizados como organismos modelo para investigaciones en laboratorio. Así como *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* fueron utilizados para el aislamiento y caracterización de la enzima nitrogenasa. *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y una especie de *Anabaena*, han sido utilizados en estudios de genética en la fijación biológica de nitrógeno (HASELKORN et al., 1985; POSTGATE, 1983).

Como opción tecnológica se avizora la utilización de microorganismos nativos fijadores de nitrógeno con el propósito de reducir la fertilización nitrogenada de síntesis, con las ventajas de reducir la contaminación de los suelos y aguas freáticas, disminución de los costos de producción y mejorar la competitividad de los sistemas productivos agrícolas.

2.2 Relación entre planta hospedera y las PGPR

Las dos formas básicas de interactuar entre la planta hospedera y las PGPR (PGPR del inglés "*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*") son: 1) rizosférica y 2) endofítica. En las relaciones llevadas a cabo en la rizosfera, las PGPR son capaces de colonizar la rizosfera, la superficie de las raíces, o incluso espacios intercelulares superficiales de las plantas (MCCULLEY, M. 2001). Las plantas cambian física y químicamente la composición del suelo en la rizosfera comparado con el resto del suelo y esto genera la inducción de la capacidad de colonización de la rizosfera por parte de las PGPR. Estas diferencias son cambios en el pH del suelo, potencial hídrico, presión parcial de oxígeno y otras características físico químicas modificadas por los exudados de la planta (XU, 2000).

El éxito de la colonización de la raíz por la introducción de las PGPR, es un criterio esencial para ejercer efectos benéficos sobre el crecimiento de la planta. La colonización bacteriana de la raíz es un proceso complejo, dependiente de las características bacterianas, exudados de la raíz y señalización celular y molecular entre las bacterias y plantas. Las características bacterianas que participan en la colonización de la raíz son la motilidad y componentes de su superficie, tales como flagelos, pili, y el antígeno O de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana celular (PODILE, A. *et al* 2006).

Flagelos, pili, LPS y exopolisacáridos son los principales factores determinantes para que las PGPR colonicen la raíz. Los pili bacterianos, proteínas de membrana externa, y flagelos que participan en la motilidad celular, contribuyen con la adhesión de las PGPR a la superficie de la raíz de la planta. Un tipo IV de pili en la superficie de *Pseudomonas fluorescens* participa en la competencia por la colonización de la punta de la raíz (LUGTENBERG *et al.* 2001). Los LPS bacterianos contribuyen al crecimiento y la supervivencia de las bacterias en la planta favoreciendo la colonización y ayudan a la creación de un micro-ambiente favorable, actuando como una barrera para los compuestos defensivos de la planta y modulando las reacciones del hospedero (DOW *et al.* 2000). El pretratamiento con LPS de *Azospirillum brasilense* promovió significativamente la adherencia de este a la raíz de la planta (MATORA *et al.* 2001) lo que sugiere su papel en el proceso de adhesión.

Otros factores que influyen son la composición de los exudados de la raíz. Las plantas secretan exudados radiculares específicos de cada especie por la raíz, que contienen carbohidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y otros nutrientes que afectan el crecimiento y la fisiología de las poblaciones de rizobacterias. Los principales colonizadores de la comunidad microbiana son determinados por la composición de estos exudados radiculares y las bacterias capaces de catabolizar estos diversos nutrientes (PODILE, A. *et al*, 2006), haciendo que las poblaciones bacterianas cambien de acuerdo a sus requerimientos nutricionales (GARRIDO, 2007)

Las bacterias endofíticas, son microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas sin ocasionar daños. Estas bacterias pueden ser aisladas de la superficie desinfectada de tejidos vegetales o extraída de los tejidos internos de plantas. En las relaciones endofíticas, las PGPR realmente residen dentro de los espacios intercelulares

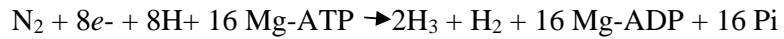
o bien en el interior de las células de la planta huésped. Existen algunas pruebas de endófitos ocupando espacios intracelulares según lo descrito por AN, *et al.*, 2001. Las bacterias endofíticas han sido aisladas de una gran variedad de especies de plantas saludables y diferentes tipos de tejido vegetal. KOBAYASHI Y PALUMBO (2000) compilaron una lista de 55 géneros bacterianos y 144 especies endófitas aisladas de raíces, tallos, flores, tubérculos, semillas o frutos de numerosas especies vegetales, esta lista incluyó 50 especies bacterianas endófitas que fueron aisladas del suelo de dos especies de plantas.

Los sitios endofíticos incluyen todas las regiones internas de la planta. Los microorganismos endofíticos por lo general, se encuentran dentro de los espacios intercelulares, o apoplásticos. Los espacios intercelulares comprenden una parte importante del tejido dentro de las raíces y hojas. Por ejemplo, los espacios entre las células corticales de la raíz pueden ser hasta de un 30% del volumen de la raíz, y los que existen entre las células del mesófilo de la hoja pueden ser de hasta un 70% del volumen de la hoja. Los microorganismos que llegan a estas regiones intercelulares deben soportar las respuestas de defensa vegetal, que se activan cuando las bacterias se encuentran próximas a las células vegetales. Las bacterias en estos sitios endofíticos pueden tener acceso a los nutrientes y el agua más fácilmente que en la superficie, especialmente si las células vegetales se lisan causando fuga de nutrientes, como ocurre durante la patogénesis. De igual forma, dentro de la planta, las bacterias pueden obtener protección frente a las fluctuaciones del medio ambiente característicos de la filósfera y obtener ventaja frente a la intensa competencia por los nutrientes característicos de la rizosfera. La entrada bacteriana en las plantas ocurre en los sitios de daño epidérmico, de raíz lateral o aparición radicular, a través de aberturas naturales, tales como las lenticelas y estomas (poros para el intercambio de gases), “hydathodes” (poros de agua), “nectarthodes” (aberturas en el nectario de las flores), y en “progency” que son plantas infectadas en la semilla. Algunas bacterias simbióticas como el género *Rhizobium* sp., han desarrollado sofisticados mecanismos de entrada que incluyen la formación de un canal, llamado tubo de infección, que promueve la penetración de bacterias en los tejidos vegetales (BEATTIE, 2006).

2.3. Principales mecanismos de acción de las PGPR:

Las bacterias asimbióticas, son consideradas PGPR principalmente por la producción de hormonas estimulantes del crecimiento vegetal como ácido indol acético (AIA) (fig 1), giberelinas (fig 2) y la capacidad de la fijación de nitrógeno a través de la enzima nitrogenasa, la cual es sensible al oxígeno. La reducción del di- nitrógeno a amonio ocurre en tres pasos: 1) reducción de la Fe-proteína por acarreadores de electrones, 2)

transferencia de un único electrón a partir de la Fe-proteína hacia MoFe-proteína a través de un proceso dependiente de Mg-ATP (un mínimo de 2 Mg-ATP por electrón transferido) y 3) transferencia del electrón para el sustrato ligado al sitio activo de la MoFe-proteína. La estequiometría global se muestra a continuación:



Existen tres tipos de nitrogenasa (1, 2, 3), los microorganismos diazotróficos que se han estudiado hasta el momento sólo poseen la nitrogenasa 1 clásica o dependiente de molibdeno (Mo) la cual es codificada por los genes *nif* y solo se expresa cuando el medio contiene Mo (TEXEIRA *et al.*, 1998).

En cuanto a la producción de fitohormonas, se han encontrado numerosos microorganismos capaces de producir fitohormonas (tabla 1). Los efectos generales a la planta pueden ser directos, que es a través de la promoción del crecimiento, o indirecta, a través del mejoramiento de la nutrición de las plantas por un mejor desarrollo de las raíces. Además, las bacterias asociadas a la planta podrían inducir síntesis de fitohormonas por la planta como tal. El efecto observado es el aumento del tamaño y la densidad de los pelos radiculares, desencadenando una mejora en la capacidad de absorber agua y nutrientes minerales en un volumen mayor de suelo (FUENTES, *et al.*, 2005). *Azospirillum* produce principalmente auxinas (ácido indol acético) y giberelinas, (Fig1) siendo esta última la más reportada en él.

Cuadro 1: Microorganismos productores de fitohormonas. (fuente: Anwar, 2000)

Hormona de crecimiento	Microorganismo(s) productor(es)
AIA	<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>
Giberelina	<i>Agrobacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Brevibacterium</i> spp. , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium</i>
Giberelina y citoquinina	<i>Arthrobacter giacomelloi</i> , <i>Azospirillum brasilense</i>
AIA, giberelina y citoquinina	<i>Azospirillum paspali</i> , <i>Azotobacter</i> spp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Aerobacter</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Chromobacterium</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Xanthomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> spp.

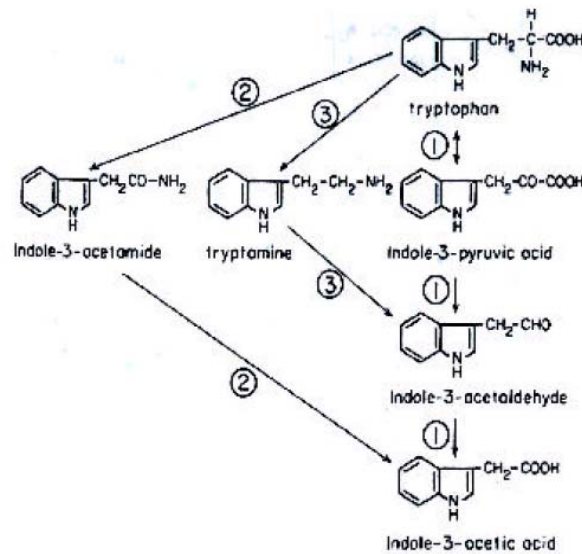


Figura 1: Vías del ácido indol acético dependientes de triptófano. 1. Vía del ácido 3 indol pirúvico. 2. Vía de la indol 3 acetamida. 3. Vía de la triptamina (Fuente: WOHLER, 1997).

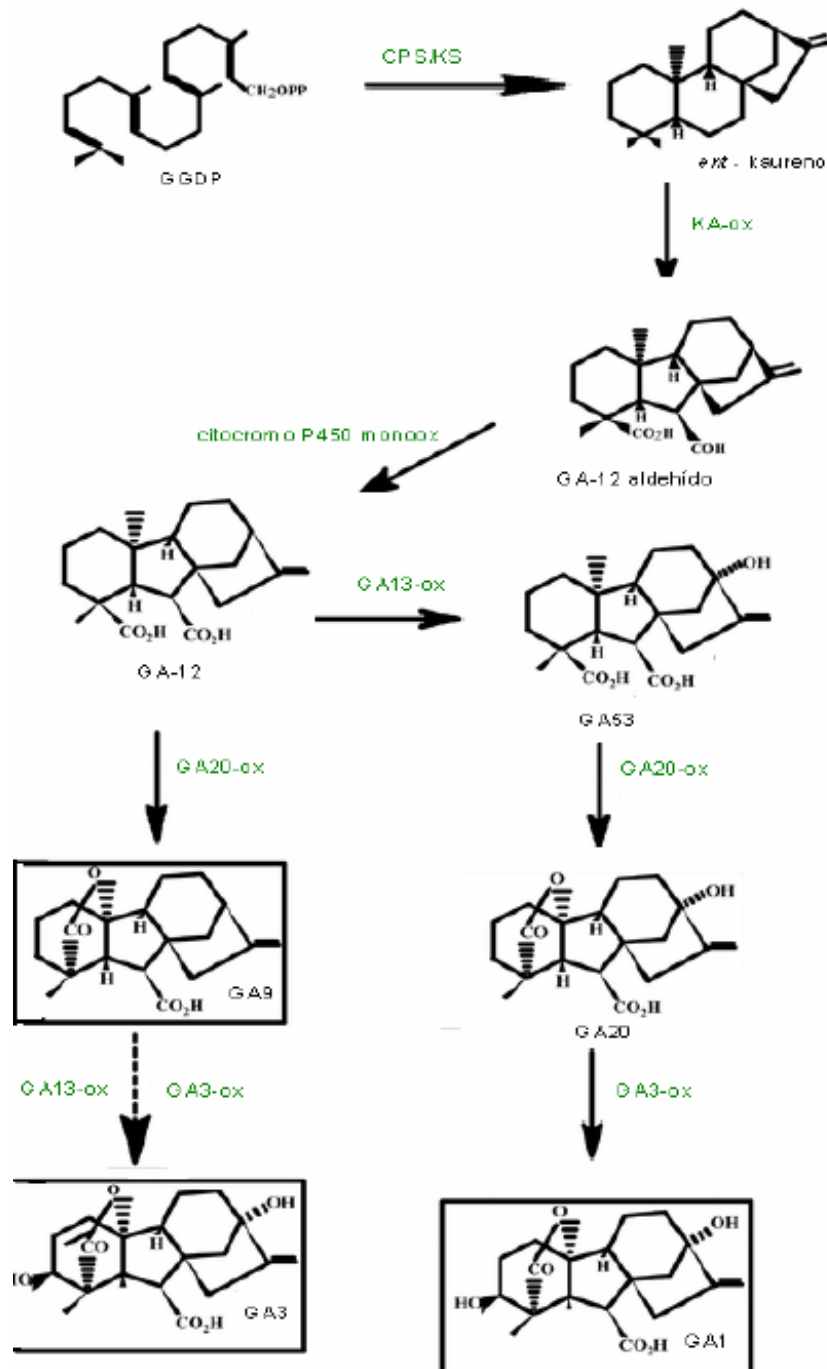


Fig2. Ruta biosintetica de Giberelinas en *azospirillum* sp. Conversión de geranylgeranyl difosfato(GDDP) a GA3 y GA1 Por la via de la 3-hidroxilacion. (Fuente: Bottini et al., 2004)

2.4. Biofertilizantes

Los microorganismos utilizados para producir biofertilizantes son principalmente bacterias promotoras de crecimiento en plantas, que agrupan diferentes géneros con capacidad de estimular e incrementar el crecimiento y productividad vegetal (BASHAN. 1998). Por más de 100 años, se ha considerado como una alternativa para aumentar la producción y rendimiento de los cultivos y a su vez reducir la importación de fertilizantes, el aprovechamiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa considerándose como la forma más eficiente de transformación del N₂ atmosférico en nitrógeno aprovechable para las plantas, logrando resultados en los cuales se ha remplazado hasta un 100% la fertilización química, en cultivos de soya (PAZOS *et al.*, 2000). Gran parte de las necesidades de nitrógeno de las leguminosas en pastos se ha encontrado que es suplida por la fijación biológica. Usando la dilución isotópica de ¹⁵N, como un método de medida del nitrógeno en la planta, derivado de la fijación biológica, en leguminosas forrajeras tropicales, bajo diferentes condiciones de crecimiento, se ha encontrado que entre el 75% y el 97% del N que asimila la planta es suministrado por este proceso (OLIVEIRA *et al.*, 1998). En el mundo, son cultivadas aproximadamente 250 millones de hectáreas, en asociación con *Rhizobium* y se calcula que se fijan cerca de 90 millones de toneladas métricas de N₂ por año. Un cultivo bien nodulado puede fijar hasta 330 Kg/hectárea/ año, equivalente a 625Kg del fertilizante urea. (KINZIG, *et al.*,1994)

Los cultivos de maíz, arroz, sorgo, caña de azúcar y trigo, por su importancia económica a nivel mundial, han sido objeto de estudio en los últimos años, y se ha venido evaluando la aplicación de bacterias asimbióticas diazotróficas como *Azospirillum* sp. (endófito facultativa) y *Herbaspirillum* sp. (endófito obligada) asociadas a estas especies vegetales. OKON *et al.*, (1994) analizaron datos obtenidos durante los últimos veinte años sobre inoculación con *Azospirillum* sp., donde se demostraron incrementos del 5 al 30% en rendimiento en producción del cultivo en aquellos experimentos donde se utilizó el inoculante en concentración óptima de células (10⁷ a 10⁸ UFC/g de inoculante). CABALLERO *et al.*, (1992) señalaron resultados importantes en el rendimiento de la cosecha de trigo, desde 23% hasta 63% al inocular las plantas con *Azospirillum* sp. FERREIRA (2008), por su parte, logró suplir parte del requerimiento de N en cultivos de arroz, utilizando un inoculante de *Herbaspirillum seropedica* (Z94) en turba como soporte, obteniendo los mejores resultados al utilizarlo en conjunto con 20 Kg/ha de

fertilizante de síntesis química (sulfato de amonio). GUIMARÃES, S. *et al.*(2003) en a nivel de campo, demostraron incrementos en la producción de granos arroz, obteniendo incrementos del 19% debido a la inoculación con la cepa M130 de *Burkolderia brasilensis* y de hasta un 25% con *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94). Este mismo autor observó aumentos en la producción de granos en los cultivos de arroz IR42 con alto potencial de FBN y IAC4440 con bajo potencial de FBN, de 88 y 57%, respectivamente, con la adición de un inoculante con las cepas *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 y *Burkolderia brasilensis* M130 con molibdeno usando la turba como soporte.

2.4.1. Perspectivas del uso de biofertilizantes

Durante los últimos años, varios inoculantes comerciales de pequeña escala han entrado lentamente en el mercado internacional de Europa y América del Sur (OKON *et al.*, 1994). En México, la Universidad Autónoma de Puebla, en colaboración con la Secretaria de Desarrollo Rural en el estado de Puebla, durante el 2002 produjeron biofertilizantes con base de *Azospirillum* sp. para 15.000 hectáreas de maíz, trigo, cebada y sorgo. Así mismo, se estima que en todo México, dentro del programa de inoculación en campo, en 1999 se fertilizaron a 600000 hectáreas de maíz, sorgo, cebada y trigo, mostrando resultados positivos, razón por lo cual la demanda aumentó a 1.5 millones de hectáreas en el año 2000, este fue llevado a cabo se llevó a cabo a través del Instituto de Investigación del Ministerio de Agricultura (INIFAP), en colaboración con el Centro de Investigación de Fijación de Nitrógeno (CIFN-UNAM) (tabla 2). Actualmente, en México, la empresa ASIA (Asesoría Integral Agropecuaria, SA) vende un producto para maíz y sorgo, y otro para trigo y cebada, que contiene una mezcla de cepas de *Azospirillum brasilense*. Empresas en América del Sur han desarrollado nuevos productos basados en *Azospirillum* sp., tal es el caso de Lage & Co en el Uruguay; y Nitrasoil y Nitragin en Argentina (FUENTES *et al.*, 2006). En Europa y Sudáfrica hay inoculantes disponibles con base en *Azospirillum*, con una insipiente comercialización basada en los experimentos llevados a cabo inoculando *Azospirillum* durante los años 80 y 90 (DOBBELAERE, *et al.*, 2006).

Tabla 1: Inoculación en campo de cereales, en diferentes regiones de México (adaptado de FUENTES y MELLADO, 2006)

State/crop/cultivar	N level kg ha ⁻¹	Grain yield (kg ha ⁻¹)		Difference (%)
		Control*	Inoculated	
Campeche				
Maize cv. H-515	110	4,590	5,100	+ 10
Chiapas				
Maize cv. H-515	120	3,862	4,125	+ 6
Michoacán				
Maize cv. H-515	110	6,406	6,887	+ 8
Guanajuato				
Sorghum cv. D-65	90	6,235	6,486	+ 4
Morelos [†]				
Sorghum cv. D-65	90	5,335	6,223	+ 17
Sorghum cv. D-65	90	4,105	4,900	+ 19
Puebla				
Sorghum cv. D-65	80	7,604	8,025	+ 6
Tlaxcala				
Barley cv. Esmeralda	0	1,444	2,387	+ 65
Hidalgo				
Barley cv. Esmeralda	0	1,600	2,590	+ 62

*Non-inoculated control

[†]Different sites in the same state

A pesar de los numerosos resultados positivos, la comercialización a gran escala no ha sido posible debido a la imprevisibilidad e inconsistencia de los resultados en campo, sobre todo cuando el productor tiene pocos conocimientos para hacer frente a la inoculación de bacterias (BASHAN *et al.*, 1997). La incongruencia y la variabilidad en el rendimiento de las respuestas han sido atribuidas a condiciones adversas como la interacción de los organismos rizosféricos, condiciones físicas y químicas del suelo (por ejemplo, los bajos pH), la baja competitividad de la PGPR del inoculante, para colonizar las raíces de las plantas, factores ambientales incluyendo temperaturas medias altas, y las bajas precipitaciones durante el crecimiento de la planta. Para conseguir un producto de amplia aplicación es necesario que las técnicas de inoculación sean prácticas, económicas y fáciles de manejar por el agricultor; el producto formulado debe proveer inóculo suficiente para la planta; debe ser competitivo con las normas comerciales vigentes, y así mismo, tener una larga viabilidad en las condiciones de almacenamiento (BASHAN *et al.*, 1997).

Las principales características deseables para un buen inoculante son las siguientes (BASHAN, 1998):

- a) **Características físicas y químicas:** los inoculantes se deben poder esterilizar fácilmente y en lo posible deben ser uniformes en cuanto a sus características químicas y físicas. También deben tener una calidad constante, una alta capacidad de retención de agua (para los soportes húmedos) y ser adecuados para el mayor número de especies y cepas bacterianas como sea posible.
- b) **Cualidades de fabricación:** el inoculante debe ser fácilmente fabricado por la industria existente, permitiendo la adición de nutrientes, además de poderse calibrar su pH fácilmente. La materia de la cual está hecho debe tener precios razonables y una oferta adecuada.
- c) **Manejabilidad en campo:** un buen inoculante es fácilmente manejable, la cual es una de las principales preocupaciones para el productor, también debe proporcionar una rápida y controlada liberación de las bacterias al suelo, además de poder ser aplicado con maquinaria estándar.
- d) **Características ambientales:** Aparte de ser biodegradable, no debe ser tóxico, ni contaminante, reduciendo al mínimo el riesgo al medio ambiente, como la dispersión de células a la atmósfera o aguas subterráneas.
- e) **Calidad en el almacenamiento:** debe tener suficiente período de vida (uno o dos años a temperatura ambiente a menudo es necesario para el éxito de la integración en el sistema de distribución agrícola en algunos países).

Según (STEPHENS *et al*, 2000). uno de los grandes retos para la producción a gran escala de biofertilizantes ha sido el encontrar un soporte que cumpla las siguientes características: 1) que se encuentre fácilmente disponible, teniendo una composición uniforme y con un precio asequible, 2) que no sea tóxico para la bacteria, 3) que tenga una alta capacidad de retención de agua, 4) que sea fácilmente esterilizado; 5) que se pueda corregir fácilmente su pH a valores de 6,5 a 7,3; 6) que favorezca el crecimiento inicial de la bacteria utilizada, y 7) que mantenga un alto número de células hasta su uso. Estudios sobre el uso de diferentes vehículos para bacterias, han demostrado que al comparar la viabilidad de *Azospirillum* en diferentes soportes, la turba superó a la vermiculita, el polvo de talco, los gránulos de basalto y la bentonita (FALLIK *et al.*, 1996). La turba ha sido el soporte mas ampliamente utilizado, obteniéndose buenos resultados.

Los problemas de la turba son: baja disponibilidad en algunos países, además de estar en algunos casos en reservas naturales; el métodos de almacenamiento (refrigeración), hace que sea costosa su conservación; Su composición no es constante, lo que hace difícil mantener la misma calidad; por ser un recurso no renovable, es cada vez mas difícil de hallar. Esto ha llevado a que se busquen soportes nuevos como el uso de encapsulamiento en perlas de alginato y liofilización, con las ventajas de la conservación del numero de microorganismos hasta la aplicación del inoculante, tener características definidas, permitir la liberación gradual del microorganismo. Estos soportes presentan el problema de ser costosos, y la necesidad de alta tecnología para su fabricación. Otro soporte con gran potencial son los biopolimeros, donde se han encontrado buenos resultados a nivel de laboratorio, con el gran problema de la escasa información en la literatura, por causa de ser desarrollados bajo patentes (BASHAN *et al.* 1997).

Cuando se va a comercializar un inoculante es vital que el número de células de PGPR aplicado a la planta sea el correcto para la promoción del crecimiento (BODDEY et al. 1988). Si bien puede haber un umbral del número de bacterias que deben ser inoculados en una determinada planta, excesivas cantidades de bacterias puede ser perjudicial para la germinación y el crecimiento de las semillas o de las plantas. (CHANWAY 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivación de las cepas de estudio

Se evaluaron 4 cepas de referencia del Banco de Microorganismos de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA) – Agrobiología, Seropédica:

Azospirillum brasilense Sp245 (BR 11005) (BALDANI *et al.*, 1983)

Azospirillum amazonense ATCC35120 - Y2 (MAGALLAES *et al.*, 1983)

Herbaspirillum seropedica BR11417 - Z94 (BALDANI *et al.*, 1996)

Rhizobium tropici BR 322 (CIAT 899) para Frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Los liofilizados, conservados en el cepario de Embrapa Agrobiología, de las cepas de estudio, fueron inoculados en medio de cultivo DYGS por duplicado y se incubaron inclinados durante 15 horas a 30° C y con una agitación de 150rpm. A estos tubos se les hizo una prueba de pureza observándolos al microscopio y mirando su morfología típica en medio líquido, según lo descrito en el Manual de Bergey's (2005).

A partir de estos inóculos, se hizo un repique por duplicado en medios semi-selectivos dependiendo del microorganismo (Tabla 3). Posteriormente, se realizó la inoculación en medios semisólidos, a aproximadamente 5 a 10mm de la superficie y se incubaron de 24 a 48 horas a 30° C. Se observó al microscopio con el objetivo de observar la morfología característica de cada cepa y garantizar su pureza.

Cuadro 2 Medios de cultivo empleados según género de microorganismo.

Microorganismo	Medio de cultivo*
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z94	JNFb
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	NFb
<i>Azospirillum amazonense</i> Y2	LGI
<i>Rhizobium</i> Br322 para fríjol	Medio 79

*Fuente: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc110.pdf>

Después de observar el crecimiento típico de las bacterias (debajo de la superficie, en forma de película) y el viraje de color del indicador del medio de cultivo, se prosiguió a realizar siembras en placas de medio de cultivo Batata, con un periodo de incubación de 7 días a 30° C, revisándose diario a partir del día segundo, para evaluar el crecimiento típico (morfología) de cada una de las cepas en este medio, según lo descrito en el Manual de Bergey's (2005).

A partir de una única colonia, se hizo un nuevo repique en un nuevo medio semisólido, dejándose en la incubadora durante 24 horas a 30° C, para renovar el microorganismo favoreciendo el crecimiento en el medio que va a ser conservado.

3.2. Conformación del banco de trabajo con las cepas de estudio

Después de observar la aparición de la película en el medio de cultivo semisólido se procedió a repicar en tubos de penicilina, con 5 ml del medio inclinado, los medios de cultivo en los que se llevo a cabo la conservación. Los medios empleados fueron: Agar Batata sólido para *Azospirillum brasilense* Sp245, *Herbaspirillum seropedica* Z94 y medio de cultivo LGI sólido suplementado con extracto de levadura para *Azospirillum amazonense*. Se incubaron durante 24 a 72 horas a 30° C, hasta observar crecimiento en la superficie del medio, después se agrego 2ml de aceite mineral, suficiente para cubrir la superficie del medio y los frascos fueron almacenados a temperatura ambiente.

3.3. Montaje de los inoculantes

Para realizar el preinóculo, a partir los frascos de banco de trabajo, se hicieron repiques en 100ml de medio NFB liquido para *Azospirillum brasilense* SP245 y *Herbaspirillum seropedica* ZAE94; LGI liquido para *Azospirillum amazonense* Y2 y medio 79 para *Rhizobium* Br322 para frijol. Estos medios fueron suplementados con extracto de levadura y con una fuente de nitrógeno inorgánica (NH₄Cl) para estimular el crecimiento rápido HARTMAN *et al*, (2006). Se incubaron por 24 horas a 30° C y 150rpm. Después de este tiempo se inocularon a 900mL de medio de cultivo que fue incubado a las mismas condiciones y por el mismo tiempo que el preinóculo. Después de la incubación fue verificada la pureza del inoculo observando las características morfológicas en medio solido 79 con rojo congo para *R. tropici* BR322 y medio batata solido para el resto de bacterias. También se observo al microscopio cada uno de los inoculos, para confirmar la pureza. Bergey's (2005).

Para el inóculo a base de *R. tropici* Br 322 se utilizó la técnica de recuento en placa en microgota. Se sembraron seis diluciones (de 10^6 a 10^{12}) en cada caja de Petri, dividiéndolas en 6 partes cada caja. Se hicieron 4 repeticiones por dilución. Se contaron después de 24- 48 horas de incubación, revisando cada 12 horas, solo se contaron las que presentaron las características típicas según el Manual de Bergey's (2005).

Para el resto de inóculos se utilizó la técnica del número más probable (NMP) descrita por DOBEREINER *et al* (1995), utilizando 3 tubos por dilución, se hicieron diluciones de 10^6 a 10^{12} , en el medio semisólido selectivo dependiendo del microorganismo a evaluar. Para efectuar el recuento se observó el número de tubos positivos (formación de película, y viraje del indicador) y se informó basándose en la tabla de MCCRADY (1946). Después de observar el crecimiento típico en medio semisólido, se confirmó su pureza por medio de microscopía en fresco, además se hizo un repique en medio Batata, observando el crecimiento característico, estas observaciones se confirmaron empleando la descripción de las colonias descritas por el Manual de BERGEY'S (2005).

La turba que se empleó es de origen brasileño a la cual se le conoce sus características organolépticas:

pH en H₂O de 3,4, nivel de Al 8,5 (cmolc/dm³), Ca 7,1 (cmolc/dm³), Mg 6,9 (cmolc/dm³), P 22 (mg/dm³), K 47 (mg/dm³) e Materia Orgánica (MO) de 72 (g . kg⁻¹).

Previamente la turba fue molida, seca, esterilizada 2 veces bajo las siguientes condiciones: 120° C, 15 libras de presión, 15 minutos en autoclave por 2 días con intervalos de 24h y neutralizada utilizando carbonato de calcio (CaCO₃), a la turba se le agregó 140 kg de CaCO₃ por cada Kg, para obtener un pH cercano a 7, se empacaron 35g en bolsas de polipropileno. Estas se inocularon con 17 ml de inóculo con una jeringa estéril, empleando por cada tratamiento 78 bolsas. En total fueron 5 tratamientos, que fueron evaluados a 3 temperaturas diferentes, cada 15 días, para un total de 13 muestreos, se hizo por cuadruplicado para un total de 478 bolsas. Estas fueron llevadas a incubar por 24 horas a 30°C y luego almacenadas a diferentes temperaturas (FERREIRA., 2003), para el control negativo se inoculó solo el medio esterilizado.

Los tratamientos evaluados fueron:

T1: Inoculante con base en *Azospirillum amazonense* Y2

- T2: Inoculante con base en *Herbaspirillum seropedicae* Z94
- T3: Inoculante con base en *Rhizobium* Br322 para fríjol
- T4: Inoculante con base en *Azospirillum brasilense* Sp245
- T5: Turba inoculada con medio de cultivo estéril.

Para todos los tratamientos se evaluaron tres temperaturas: temperatura ambiente (19 a 26 ° C), nevera (4 a 10° C) e incubadora (30° C).

3.4. Parámetros de evaluación de los inoculantes

3.4. 1. Recuento de los microorganismos en el inóculo y en la turba

El experimento fue llevado a cabo bajo condiciones de laboratorio, se utilizo un delineamiento enteramente casualizado con 4 repeticiones para cada temperatura, evaluándose la población para cada tratamiento, cada 15 días. Para el manejo de los datos fueron transformados a $\text{Log}_{(10)}$, La separación de las medias fue hecha utilizando el test estadístico LSD al 10% de probabilidad en el programa Sisvar. (FERREIRA, 2000).

3.4.1.1. Recuento de bacterias diazotróficas asimbióticas

El recuento de los microorganismos se hizo utilizando la técnica del número más probable (NMP) descrita por DOBEREINER *et al* (1995), utilizando 3 tubos por dilución, en el medio semisólido selectivo dependiendo del microorganismo a evaluar. Para efectuar el recuento se observo el número de tubos positivos (formación de película, y viraje del indicador) y se informó basándose en la tabla de MCCRADY (1946). Después de observar el crecimiento típico en medio semisólido, se confirmó su pureza por medio de microscopia en fresco, además se hizo un repique en medio Batata, observando el crecimiento característico, estas observaciones se confirmaron empleando la descripción de las colonias descritas por el Manual de BERGEY'S (2005).

3.4.1.2 Recuento de bacterias diazotróficas simbióticas

Para efectuar el recuento de *Rhizobium* Br322, que es de crecimiento rápido, se llevó a cabo en el medio de cultivo 79 con rojo congo. Se utilizó la técnica de recuento en placa en microgota. Se sembraron tres diluciones en cada caja de Petri, dividiéndolas en 6

partes cada caja. Se utilizaron 2 cajas por cada muestra, para un total de 4 repeticiones por dilución. Se contaron después de 24-4848 horas de incubación, observando cada 12 horas, esto por la producción excesiva de exopolisacarido que puede interferir en el conteo las colonias, solo se contaron las que presentaron las características típicas según el Manual de Bergey's (2005).

3.4.2. Medición de pH del soporte

La medición fue realizada en agua con una relación de 1:2,5 volumen agua: volumen de turba, se tomo 10 ml de turba por 25 ml de agua, se coloco bajo agitación 20 minutos, luego se dejo descansar por 20 minutos, midiendo con el pH metro M.S. MISTURA (ISO 10390:2005).

3.4.3. Medición de la humedad de los inoculantes

Se utilizo el método de secado en horno M.R.® a una temperatura constante de 60° C. El porcentaje de humedad (U) se determino por la diferencia entre la masa de la muestra húmeda (MAU) y la muestra seca (MAS):

$$U (\%) = (MAU - MAS) * 100 / MAS \text{ (FERREIRA, 2008).}$$

El experimento fue llevado utilizando un delineamiento enteramente casualizado con 3 repeticiones para cada temperatura, evaluándose la humedad para cada tratamiento, cada 15 días. La separación de las medias fue hecha utilizando el test estadístico LSD al 10% de probabilidad en el programa Sisvar. (FERREIRA, 2000)

El recuento de las bacterias, medición del pH y medición de la humedad en los inoculantes se realizó para cada tratamiento cada 15 días, en un periodo de evaluación de 150 días.

4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS:

4.1. Población en el inoculo y 24 horas de incubación.

Después de la inoculación en la turba y dejarla 24 horas en incubadora, todos los microorganismos presentaron multiplicación (Tabla 2). Teniendo en cuenta que cuando se agrega el inoculo a la turba se diluye a menos de la mitad de UFC/g inoculante, se observa que en el inoculante a base de *A. brasilense* sp a pesar de el numero de microorganismo después de la incubación ser menor que en el inoculo inicial, esta bacteria se multiplico en la turba.

Tabla 2: Población en el inoculo inicial y en el inoculante después de 24 horas de incubación.

Bacteria	Ret	
	Inoculo	Turba (24 horas)
Z94	9,544068	10,01598811
Y2	10,14613	10,14612804
Br 322	12	12
Sp245	9,653213	9,33

Leyenda: Y2: Cepa de *A. Amazonense*; ZAE 94: Cepa de *H. Seropedicae*; BR 322: Cepa de *Rhizobium . tropici.*; Sp 245: Cepa de *A. brasilense*;

4.2. Efectos de la temperatura sobre la sobrevivencia de las diferentes bacterias diazótroficas en los inoculantes

4.2.1. Temperatura ambiente (19° 26° C)

Estos resultados se obtuvieron bajo las condiciones de temperatura imperantes durante los meses de mayo, junio, julio, agosto, septiembre, en el año 2008 (Tabla 4), con temperatura mínima de 19° C y máxima de 26° C, lo que sugiere que en las condiciones de elaboración y dentro de estos rangos de temperatura, se podría almacenar hasta por 150 días el inoculante.

Tabla 3. Temperaturas medias de la ciudad de Rio de Janeiro durante los meses de almacenamiento.

Temperatura	Meses				
	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre

C

máxima	27	25	26	26	26
mínima	21	19	18	19	19
Media	23	22	21	22	22

(Fuente <http://br.weather.com/weather/climatology/BRXX0201.htm?dayofyear=146>)

La temperatura ambiente (19°C a 26° C) mantuvo la población por encima de 10^8 UFC/g de inoculante, hasta 150 días de almacenamiento, (fig 3) que es lo exigido por la Ley No. 86955 del 18 de febrero de 1982 en Brasil, concentración que se ha usado por diversos autores en experimentos en campo, con resultados positivos. (DE FREITAS, et al 1991; DI CIOCCO, et al. 1994; FAGES 1994; OKON et al. 1988; TRAN VAN et al. 2000; WELLER 1986).

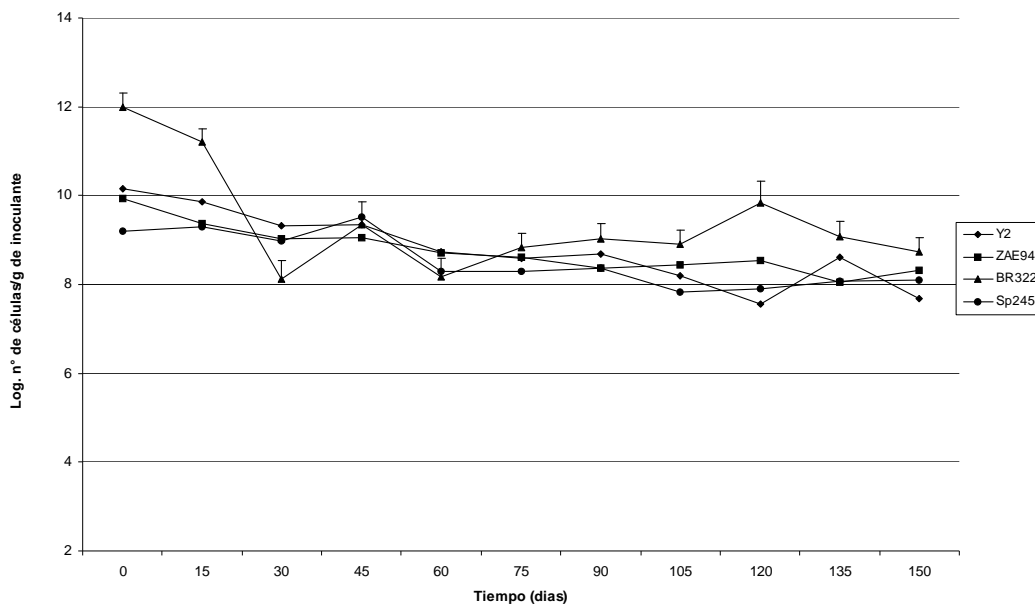


Fig 3. Sobrevivencia en los diferentes inoculantes, conservados a temperatura ambiente: 19-26 °C. Las barras indican la diferencia media significativa.

Al final de los 150 días de almacenamiento se observó que no hay una diferencia media significativa entre las concentraciones celulares de *Azospirillum brasilense* Sp245 y *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, con lo que se concluye que a temperatura ambiente, los inoculantes con base en estos microorganismos tienen un recuento similar.

La población de *Rhizobium* BR322 en los inoculantes, inició con concentraciones alrededor de 10^{12} UFC/g de inoculante, perdiendo 3 unidades exponenciales durante el primer mes, lo cual pudo ser ocasionado por la baja tensión de oxígeno (O_2). Hubo poca pérdida de humedad durante todo el periodo de almacenamiento a esta temperatura, lo que indica que el polipropileno usado tiene poca porosidad como consecuencia un bajo intercambio gaseoso, haciendo que la tensión de O_2 sea suficiente sólo para mantener la tasa metabólica de cierto número de células, manteniendo las concentraciones sobre 10^8 UFC/g de inoculante durante 150 días de almacenamiento, después se llegó al equilibrio entre la población y los niveles de O_2 , manteniendo las concentración celular más alta a partir de los 75 días de almacenamiento comparado con los otros inoculantes, hasta el tiempo final de almacenamiento (150 días). El número mínimo de células *Rhizobium* sp. necesario en un inoculante varía en todo el mundo con rangos entre 10^7 y 4×10^9 UFC/g de inoculante (OLSEN et al. 1994).

A. amazonense Y2 tuvo una población por debajo de 10^8 UFC/g de inoculante, al final del tiempo de almacenamiento. Se puede inferir por el comportamiento fisiológico de esta especie o a un error experimental, ya que una de las repeticiones tenía una población muy baja.

4.2.2. Temperatura nevera (4° a 10° C)

Se observó que tanto el inoculante con base en *H. seropedicae* ZAE94 y *Rhizobium* Br322 fueron los únicos que mantuvieron su concentración por encima de 10^8 UFC/g de inoculante durante los 150 días de evaluación (fig 4). Estos resultados concuerdan con los encontrados por GUIMARAES (2006), quien en un inoculante en sustrato de turba a base de *H. seropedicae* ZAE94, almacenado en nevera, obtuvo recuentos superiores a 10^8 UFC/g de inóculo después de 110 días de almacenamiento. En forma similar, TEMPRANO et al. (2002), encontraron que las poblaciones bacterianas en un inoculante en sustrato de turba, con base en *Rhizobium etli* ISP42, conservados a temperatura de , 4° se mantuvieron por encima de 10^9 UFC/g de inoculante después de 180 días de almacenamiento

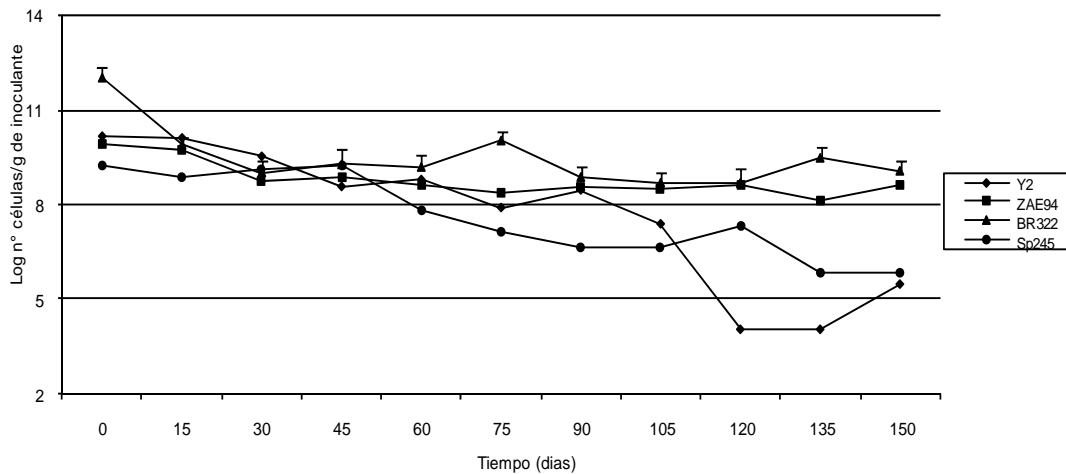


Fig4. Sobrevivencia en los diferentes inoculantes conservados a temperatura (t) nevera: 4-10 °C). Las barras indican la diferencia media significativa.

Los inoculantes con base en *A. brasilense* Sp245 y *A. amazonense* Y2, a los 150 días de conservación, disminuyeron su población a menos de 10^6 UFC/g de inoculante. La concentración estuvo por encima de 10^8 UFC/g de inoculante de *A. amazonense* hasta los 90 días y hasta los 60 días de *A. brasilense*. El comportamiento diferente en estos 2 inoculantes pudo deberse al mal funcionamiento de la nevera, presentando fluctuaciones grandes de temperatura, lo que pudo causar el descenso en el número de células/ g de inoculante tan marcado que se observa en estos dos inoculantes; *A. brasilense* Sp 245 decreció menos a partir de los 60 días, mientras que *A. amazonense* descendió rápidamente a partir de los 90 días, llegando a tener 10^4 UFC/g de inoculante, alcanzando a los 150 días de almacenamiento una concentración de 10^5 UFC/g de inoculante. Estas diferencias se pueden deber a la ubicación del inoculante en la nevera, pues hubo partes de esta donde fueron más marcados los cambios de temperatura, llegando, inclusive al estado de congelación. Las bacterias en la turba tienen una menor tolerancia al estrés físico durante el almacenamiento, en particular a las variaciones de temperatura (BASHAN, 1998). El efecto de las bajas temperaturas en las células, es la inactivación del crecimiento por la pérdida de la fluidez de la membrana plasmática, causando pérdida de sus funciones, en cuanto al transporte de nutrientes y la formación del gradiente de protones. (BROCK 2005).

H. seropedicae ZAE 94, mantuvo la población ante la caída de la temperatura, posiblemente a causa de su metabolismo, que es más amplio que el de *Azospirillum* sp, siendo inclusive algunas especies, hasta hace algunos años perteneciente al genero

Pseudomonas spp (BALDANI et al 1996). R. Br 322 posee una mejor capacidad de adaptación frente a los estrese ambientales como: el estrés por radiación, especies activas de oxígeno (ROS), algunas sales y solutos, y temperaturas extremas (VRIEZEN et al, 2007).

4.2.3 Temperatura 30° C

El inoculante con base en *Rhizobium* Br322 tuvo una población superior a 10^8 UFC/g de inoculante, después de 150 días de almacenado (fig 5). FENG *et al* (2002), encontraron que después de almacenar dos inoculantes con base en *Rhizobium sp.* SU343 y *B. lupini* WU425, ambos en sustrato de turba, con una humedad inicial de 52% a 30° C, el número de células de cada inoculante estaba por encima de 10^8 UFC/g de inoculante, a los 90 días de almacenamiento. Estos mismos autores determinaron que los gránulos de polihidroxiбутирато (PHB) producidos por la bacteria, no están relacionados con la mayor sobrevivencia de *Rhizobium* en la turba a 30° C, sugiriendo como una posible respuesta al estrés ambiental, el engrosamiento de la pared celular y la oclusión del espacio periplasmático.

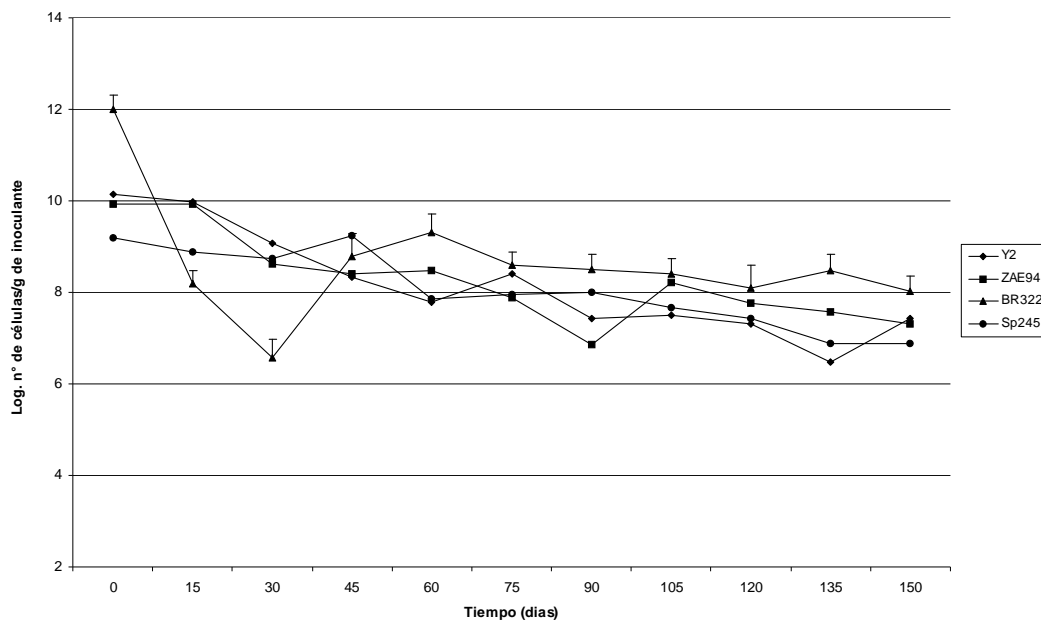


Fig 5. Sobrevivencia en los diferentes inoculantes, conservados a la temperatura (t) de 30 °C. Las barras indican la diferencia media significativa.

Estos resultados concuerdan por los encontrados por TEMPRANO et al (2002), quienes obtuvieron recuentos superiores a 10^8 UFC/g de inoculante a una temperatura de 28°C, en un inoculante en soporte de turba con base en *Rhizobium etli* ISP42, hasta los 150 días, a los 180 días obtuvo recuentos inferiores.

Los inoculantes con base en *H. seropedicae* ZAE 94 y *A. amazonense* Y2, no presentan diferencias significativas, lo que quiere decir que la conservación de la población en esta temperatura se puede considerar igual por 150 días de almacenamiento. Se puede concluir que hasta los 45 días todos los inoculantes poseían una población superior a 10^8 UFC/g de inoculante. El inoculante con base en *A. amazonense* Y2 conservó una población adecuada hasta los 75 días de almacenamiento, mientras que el inoculante con base en *A. brasilense* Sp245 mantuvo la población encima de 10^8 UFC/g de inoculante hasta los 90 días. Para *H. seropedicae* ZAE 94 se mantuvo hasta los 105 días.

En esta temperatura (30°C), se dio el descenso más marcado de la población, debido a que este es el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de *Herbaspirillum* sp, *Rizobium* sp y próximo al rango óptimo para *Azospirillum* sp (Tabla 5); esto causa que se estimulen las reacciones químicas y enzimáticas, acelerando el metabolismo microbiano, lo que tiene como resultado el incremento en el consumo de nutrientes, causando el agotamiento más rápido de estos en la turba y, como consecuencia la población decrece. La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento bacteriano y la supervivencia en ambientes naturales, incluidos los suelos, y soportes del inoculante. Se ha encontrado que la supervivencia de las bacterias del género *Rhizobium* utilizadas como principio activo de los inoculantes, se ve severamente afectada por las altas temperaturas de almacenamiento. (MUNEVART, F et al. 1981).

Cuadro 3. Rango de temperatura optima de los microorganismos utilizados en los diferentes inoculantes.

Microorganismo	Temperatura optima (°C)
<i>Azospirillum</i> sp.	30-40
<i>Herbaspirillum</i> sp.	30-35

<i>Rhizobium</i> sp.	25-30
----------------------	-------

(Fuente: Bergey's 2005)

Se encontró que el inoculante con base en *Rhizobium* Br322, bajo las condiciones del presente estudio, es adecuado para su comercialización, conservándose hasta 150 días a 30°C continuos, con un número de células/g de inoculante por encima de lo exigido por la legislación brasilera (10^8 UFC/g o mL de inoculante) y de lo recomendado por diferentes autores a nivel internacional. Esto hace que no se requiera refrigeración en ambientes que estén por debajo de esta temperatura, si se tiene en cuenta la utilización del mismo en ambientes tropicales donde reinan temperaturas altas, evitando los gastos de refrigeración, lo que traerá como consecuencia la disminución en los costos de producción, haciéndolo más atractivo para el mercado. En países como Colombia se podrían comercializar todos los inoculantes utilizados en esta investigación, pues la legislación es más flexible en cuanto a la concentración de microorganismos, exigiendo mínimo 10^5 UFC/ g de inoculante (ICA, 2006).

4.3. Efecto de la temperatura sobre la humedad de los inoculantes conteniendo diferentes bacterias diazotróficas

En condiciones ambientales y de refrigeración se presentaron pérdidas de humedad del 3 a 5 % y del 4 al 9% de humedad, respectivamente en todos los inoculantes (Tablas 1 y 2); de otro lado, en la temperatura controlada a 30° C, los inoculantes perdieron de 9 a 13 % de humedad (Tabla 3). El control negativo (CN), tanto en condiciones de nevera, como ambientales, presentó humedad final superior a la humedad inicial, lo cual pudo deberse a errores experimentales a la hora de aplicar el medio de cultivo en la turba ya que no fue verificado la presencia de contaminantes en estos tratamientos.

Tabla. 4. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes, preparados con diferentes bacterias diazotróficas, almacenados en ambiente a temperaturas de 19°C – 26° C durante el periodo de 150 días.

	Tiempo (días)											
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
<i>Bacteria</i>												
Y2	69,15 a	63,91 a	67,48 b	63,03 a	66,85 b	68,35 b	63,58 a	67,22 a b	67,49 a	66,21 ab	65,024 ab	

ZAE 94	65,40 b	63,60 a	68,70 b	64,20 a	66,85 b	65,37 a	66,28 b	66,38 a	66,22 a	62,91 a	64,20 a
BR 322	70,68 c	70,51 b	67,01 b	66,70 a	71,50 b	68,50 b	67,35 b	68,57 a b	67,69 ab	67,97 b	67,46 bc
Sp 245	70,00 ac	65,72a	68,20 b	72,75 b	71,50 a	68,18 b	69,84 c	70,76 a b	68,96 ab	66,20 ab	66,35 ab
CN	68,00 d	67,00ab	64,60 a	71,50 b	71,50 b	69,90 b	73,63 d	69,87 b	70,97 b	69,60 b	69,71 c

Letras iguales no difieren entre si por el test LSD a 10% de significancia. Medias de 3 repeticiones. **Leyenda:** Y2: Cepa de *A. Amazonense*; ZAE 94: Cepa de *H. Seropedicae*; BR 322: Cepa de *Rhizobium . tropici.*; Sp 245: Cepa de *A. brasilense*; CN: Control negativo inoculado con medio de cultivo sin bacterias.

Tabla 5. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes, preparados con diferentes bacterias diazotróficas, almacenados en nevera a a temperaturas de 4°C – 10° C durante el periodo de 150 días.

	Tiempo (días)										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Y2	69,15 a	66,19 a	63,18 a	63,00 a	57,55 a	67,62 a	65,67 b	68,02 b	68,75 b	66,74 a	64,06 a b
ZAE 94	65,40 b	63,00 a	63,79 ab	62,11 a	62,15 a	66,80 a	62,83 a	66,59 b	65,50 a	64,64 a	64,95 b
BR 322	70,68 c	73,50 b	66,40 c	68,59 b	62,50 a	71,50 b	66,16 b c	68,88 b	64,13 a b	65,79 a	61,74 a
Sp 245	70,00 ac	66,2a	65,70 bc	70,83 b	62,25 a	67,00 a	68,30 c	69,81 b	66,70 a b	68,89 a	66,72 b c
CN	68,00 d	66,30 a	64,47 abc	71,17 b	61,50 a	69,10 a	66,93 bc	58,59 a	68,12 b	67,48 a	68,88 b c

Letras iguales no difieren entre si por el test LSD a 10% de significancia. Medias de 3 repeticiones. **Leyenda:** Y2: Cepa de *A. Amazonense*; ZAE 94: Cepa de *H. Seropedicae*; BR 322: Cepa de *Rhizobium . tropici.*; Sp 245: Cepa de *A. brasilense*; CN: Control negativo inoculado con medio de cultivo sin bacterias.

Tabla 6. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes, preparados con diferentes bacterias diazotróficas, almacenados en nevera a 30 °C durante el periodo de 150 días.

	Tiempo (días)										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Bacteria											
Y2	69,15a	62,18 a	63,70 a	59,50 a	64,80 a b	65,63 b	61,73 a	63,28 a	62,30 b	61,54 b	60,00 b
ZAE 94	65,40 b	63,24 a b	64,40 a	60,47 a	60,55 a b	63,27 a	63,98 b	62,26 a	57,05 a	57,12 a	56,94 a
BR 322	70,68 c	70,46 c	68,26 b	61,60 a	58,00 a	66,10 b	61,68 a	61,97 a	56,01 a	59,39 a b	57,81 a b
Sp 245	70,00 a c	64,90 a b	64,00 a	63,12 a b	66,25 b	64,98 a	65,54 b	60,63 a	59,05 a b	60,79 a b	59,28 a b
CN	68,00 d	67,10 b c	67,15 b	66,82 b	62,00 a b	64,98 b	64,49 b	64,58 a	62,19 b	60,51 a b	56,59 a

Letras iguales no difieren entre si por el test LSD a 10% de significancia. Medias de 3 repeticiones. **Leyenda:** Y2: Cepa de *A. Amazonense*; ZAE 94: Cepa de *H. Seropedicae*; BR 322: Cepa de *Rhizobium . tropici.*; Sp 245: Cepa de *A. brasilense*; CN: Control negativo inoculado con medio de cultivo sin bacterias.

Tanto a temperatura ambiente, como en la nevera no se observan pérdidas de la humedad estadísticamente significativas, lo que demuestra que el estrés osmótico no fue

un factor importante en la conservación de la población en estos inoculantes. Sin embargo, VRIEZEN *et al.* (2007), consideran la desecación uno de los limitantes en la conservación del inoculante, causando (i) acumulación de sales y solutos, (ii) estrés hiperosmótico, (iii) alteración del metabolismo microbiano, cuando una determinada actividad de agua se ha alcanzado, y (iv) daños donde la monocapa acuosa es removida de las macromoléculas.

En la temperatura continua de 30 °C se pierde más humedad, debido a que se encuentra en un ambiente donde hay poca humedad en el ambiente, manteniéndose aun dentro del rango en el que la bacteria no ve afectado su crecimiento. FERREIRA en el 2008, evaluó inoculantes con base en *H. seropedicae* ZAE94 a diferentes humedades, conservándolos en nevera de 4 a 10°C durante, durante 180 días, y encontró que en el rango de 43 a 80% de humedad, el número de células/g de inoculante, permaneció alrededor de 10⁹ UFC/g de inoculante. En este experimento se encontró que la humedad de todos los inoculantes, durante los 150 días de almacenamiento, se mantuvo dentro de este rango.

Otros autores (FALLIK, *et al.* 1996), evaluaron inoculantes con base en *Azospirillum Brasilense* ATCC 29729 a 20± 2 C, obteniendo una población de 4 10⁶UFC /g de inoculante después de 180 días de almacenamiento, con una humedad final de 37 %.

Se ha encontrado que la capacidad de retención de agua está directamente relacionada con la cantidad de materia orgánica de la turba siendo un factor importante para mantener la humedad. FERREIRA (2004), encontró que inoculantes preparados con niveles de materia orgánica mayores pierden menos humedad. Otro factor que afecta el mantenimiento de la humedad es el tipo de bolsa plástica empleada durante el almacenamiento. Según HUNGRIA *et al.* (2005), las bolsas utilizadas para el empaque de los inoculantes deben ser resistentes a la esterilización, permitir el transporte seguro del inoculante, retener la humedad sin perjudicar el intercambio gaseoso, con el objetivo de mantener la viabilidad de la bacteria utilizada en el inóculo y el sistema de cierre debe de ser sencillo y seguro para evitar la contaminación.

4.4. Efecto de la temperatura sobre pH de los inoculantes conteniendo diferentes bacterias diazotróficas

Se observó que ningunos de los rangos de temperatura utilizados para la conservación modifica el pH de los diferentes inoculantes testeados, permaneciendo dentro de los rangos óptimos para el desarrollo de cada microorganismo utilizado (Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11), que según el manual BERGEY'S, 2005 es de 5.5 a 7.5 para *Azospirillum* sp, 5.3 a 8.0 para *Herbaspirillum* sp y 4.0 a 10 para *Rhizobium* sp. Esta poca variación en el pH se debe a la presencia de gran cantidad de materia orgánica en la turba, dándole al soporte, una mayor capacidad tampón, estabilizando el pH ante los productos del metabolismo microbiano. (BINATO, A. 2001).

FERREIRA (2008), evaluó inoculantes con base en *H. seropediace* ZAE 94 a 2 valores de pH iniciales diferentes, y encontró que el pH inicial del producto no afecto la población del inoculante durante 180 días de almacenamiento.

Tabla 7. Efecto de la temperatura Nevera (19-26 C) y bacteria utilizada en el inoculante sobre el pH del producto.

	Tiempo											
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
Bacteria												
Y2	7,16	7,06	6,96	6,90	6,90	7,01	7,24	7,19	7,01	7,09	7,09	
ZAE 94	7,08	7,07	6,99	6,96	6,84	7,01	7,11	7,01	7,02	7,10	7,09	
Br 322	7,06	6,88	6,80	6,90	6,95	7,04	6,98	7,07	6,93	6,93	7,07	
Sp 245	6,98	6,78	6,95	6,94	7,01	7,06	7,04	6,98	7,02	7,02	7,22	
CN	7,07	6,83	6,96	6,97	6,94	7,00	7,08	7,06	6,95	7,00	7,15	

. **Leyenda:** Y2: Cepa de *A. Amazonense*; ZAE 94: Cepa de *H. Seropediace*; BR 322: Cepa de *Rhizobium . tropici.*; Sp 245: Cepa de *A. brasilense*; CN: Control negativo inoculado con medio de cultivo sin bacterias.

Tabla 8. Efecto de la temperatura y la bacteria utilizada en el inoculante sobre el pH del producto.

	Tiempo											
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
Bacteria												
Y2	7,16	6,97	6,94	7,07	7,01	7,03	7,14	7,28	7,10	7,09	7,19	
ZAE 94	7,08	7,08	7,01	7,06	6,97	7,16	7,18	7,17	7,27	7,22	7,15	
Br 322	7,06	7,15	6,95	7,12	6,90	7,06	7,12	7,13	7,04	7,10	7,22	
Sp 245	6,98	7,07	6,95	7,04	6,99	7,03	7,00	7,06	7,05	7,05	7,12	
CN	7,07	7,25	7,00	6,93	7,02	7,03	7,02	7,11	6,98	7,10	7,08	

. **Leyenda:** Y2: Cepa de *A. Amazonense*; ZAE 94: Cepa de *H. Seropedicae*; BR 322: Cepa de *Rhizobium . tropici.*; Sp 245: Cepa de *A. brasilense*; CN: Control negativo inoculado con medio de cultivo sin bacterias.

Tabla 9. Efecto de la temperatura y la bacteria utilizada en el inoculante sobre el pH del producto.

	Tiempo											
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
Bacteria												
Y2	7,16	7,01	7,03	7,10	6,98	7,14	7,25	7,12	7,13	7,11	7,30	
ZAE 94	7,08	7,18	6,99	7,09	7,01	7,16	7,17	7,09	7,30	7,21	7,16	
Br 322	7,06	6,94	6,98	7,06	6,98	7,12	7,24	7,18	7,15	7,13	7,15	
Sp 245	6,98	7,03	7,06	7,11	7,15	7,15	7,11	7,11	7,11	7,34	7,30	
CN	7,07	6,99	7,07	6,98	7,06	7,04	7,15	7,16	7,15	7,27	7,34	

. **Leyenda:** Y2: Cepa de *A. Amazonense*; ZAE 94: Cepa de *H. Seropedicae*; BR 322: Cepa de *Rhizobium . tropici.*; Sp 245: Cepa de *A. brasilense*; CN: Control negativo inoculado con medio de cultivo sin bacterias.

4.5. Evaluación general de la influencia de las diferentes temperaturas sobre todos los inoculantes.

Se puede observar que tanto la conservación de los inoculantes en la temperatura constante de 30 C y en la nevera (4-10), tiene un efecto negativo, causando disminución en el número de células/g de inoculante. Este comportamiento en el almacenamiento nevera es debido a la variación de temperatura, que causo la disminución de la población en los inoculantes a base de *R. Br 322* y *A. amazonense* Y2. La temperatura ambiente (19-26 C) mantuvo la población, dentro de lo recomendado.

La temperatura y posiblemente la tención de oxígeno dentro de los inoculantes, fueron los factores que influenciaron la conservación de los inoculantes, esto debido al poco descenso de la humedad en todos los inoculantes fig 7., esto indica que la bolsa utilizada conserva la humedad, y no se ve sometido a estrés osmótico y a la no variación del pH del producto.

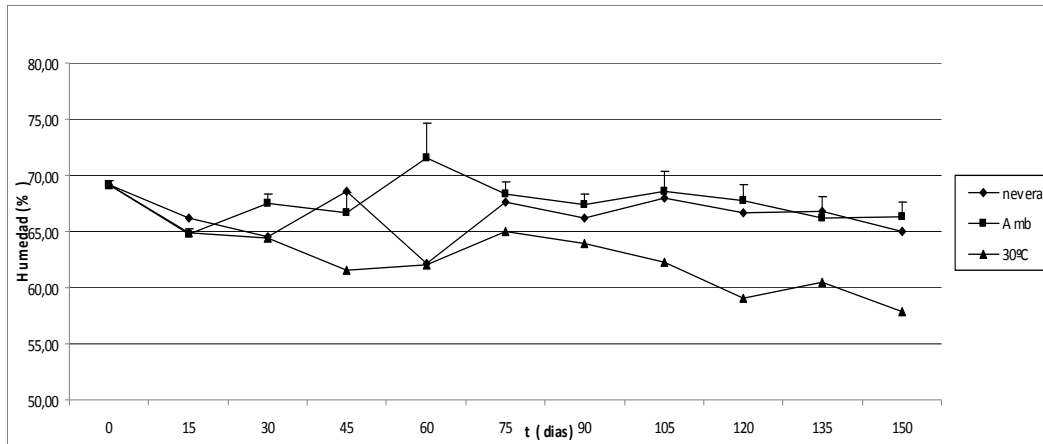


Fig 6. Efecto de las diferentes temperaturas de conservación sobre el porcentaje de humedad media de los diferentes inoculantes. Nevera (4-10 °C), Ambiente (19 - 26 °C). Las barras indican la diferencia media significativa.

5. CONCLUSIONES

- El desarrollo de esta investigación permitió establecer que la temperatura ambiente en el rango de 19 a 26 °C es la más apta para realizar la conservación de la población de las diferentes bacterias diazotróficas empleadas en los inoculantes durante 150 días de almacenamiento
- Se encontró que al almacenar los inoculantes a temperatura ambiente (19° - 26° C) y nevera (4° -10° C) retienen mas la humedad, que almacenándolos a la temperatura constante de 30° C.
- La Calidad de las bolsas de plástico utilizadas en este trabajo conservo la humedad del producto.
- El pH no fue modificado durante el tiempo del almacenamiento de 150 días.
- Inoculantes producidos con las bacterias de los genero *Herbaspirillum seropedicae* y *Rizobium tropici* son más tolerantes a las condiciones de almacenamiento que el genero *Azospirillum* spp.

6. ANEXOS

Soluciones para preparación de medios de cultivo:

1. Solución de Micronutrientes

CuSO ₄	0.04g
ZnSO ₄	1.20g
H ₃ BO ₃	1.40g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1.00g
MnSO ₄ *H ₂ O	1.175g

2. Solución de Vitaminas

Biotin	10mg
Piridoxal-HCl	20mg

Completar el volumen a 100ml y guardar en nevera

Anexo 1: Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum irakense* y *Azospirillum halopraeferans*).

Composición por litro:

Glucosa	5,0g
HPO ₄	.5g5ml
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.02g
Solución de Micronutrientes	2ml
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	2ml
FeEDTA (Solucion 1.64%)	4ml
Solucion de Vitaminas	1ml
KOH	4.5g

Preparación:

Completar el volumen con agua destilada a 1000ml y ajustar el pH a 6.5 .

Para el medio semisólido se debe agregar entre 1.75 y 1.8g de agar-agar/l y para el medio sólido se adicionan 15g de agar-agar/l.

Para medio sólido agregar 50 mg de extracto de levadura por litro de medio de cultivo.

Para medio líquido agregar 1g de NH₄ Cl por litro de medio de cultivo.

Anexo 2: Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*)

Composición por litro:

Azúcar cristal	5.0g
K ₂ HPO ₄	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.6g
MgSO ₄ *2H ₂ O	0.2g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.02g
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0.002g
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	5ml
FeEDTA (Solución 1.64%)	4ml
Solución de Vitaminas	1ml

Preparación:

Completar el volumen a 1000ml con agua destilada y ajustar el pH entre 6.0y 6.2 con H₂SO₄. Para el medio semisólido se debe adicionar 1.75g de agar/l y para medio solido 15g de agar/l.

Para medio solido agregar 20mg de extracto de levadura por litro

Para medio liquido agregar 1g de NH₄ Cl por litro de medio de cultivo.

Anexo 3: Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum spp*)

Composición por litro:

Acido málico	5.0g
--------------	------

K ₂ HPO ₄	0.6g
KH ₂ PO ₄	1.8g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.02g
Solución de micronutrientes	2ml
Azul de bromotimol (0,5% en etanol)	2ml
FeEDTA (Solucion 1.64%)	4ml
Solución de Vitaminas	1ml
KOH	4.5g

Preparación:

Completar el volumen a 1000ml con agua destilada. Ajustar el pH a 5.8. Para medio semisólido agregar 1.8g de agar/l y para medio solido 18g de agar/l.

Para medio solido agregar 20mg de extracto de levadura por litro

Para medio liquido agregar 1g de NH₄ Cl por litro de medio de cultivo.

Anexo 4: Medio de cultivo DYGS:

Glucosa	2,0 g
Acido Málico	2,0 g
Peptona Bacteriológica	1,5 g
Extracto de Levadura	2,0 g
Fosfato de Potasio Dibasico	0,5 g
Sulfato de Magnesio Hidratado	0,5 g

Ácido Glutámico 1,5 g

Preparación:

Completar el volumen a 1000ml con agua destilada. Ajustar el PH. 6,0 p/

Herbaspirillum;

PH. 6,8 p/ *Azospirillum* con KOH solución al 10% o con H₂SO₄ solución al 5%

Completar volumen a 1000ml.

Anexo 5: Medio de cultivo papa:

Procedimiento:

-Colocar aproximadamente 50 ml de agua destilada en un erlenmeyer de 100

ml e adicionar 2,5 g de ácido málico y 2 gotas de azul de bromotimol (sol. 0,5% en

0,2 N de KOH).

- Llevar el pH de la solución a 6,8-7,0 (verde) utilizando solución de KOH a 10%.

-Adicionar a esta solución 2,5 g de azúcar cristal, 2 ml de solución de micronutrientes para medio de cultivo y 1 ml de solución de vitaminas para medio de cultivo, agitando levemente.

- Pesar 200 g de papa inglesa, descascar, lavar, cortar en pedazos grandes y colocar para cocinar durante media hora.

-Después de cocida, filtrar la papa con algodón, agregando el filtrado a la solución de vitaminada de ácido málico recién preparada.

-completar volumen a 1000ml

Para medio sólido agregar 15 g por litro de medio de cultivo

Anexo 6: Medio 79

Manitol (Crecimiento lento) 10 g

K₂HPO₄ sol. 10% 1 ml

KH₂PO₄ sol. 10% 4 ml

MgSO ₄ .7H ₂ O sol. 10%	2 ml
NaCl sol.10%	1 ml
Extracto de levadura	0,4 g
Azul de bromotimol 0.5%	
em 0.2N de KOH	5 ml

Ajustar el pH a 6,8 –7,0 con KOH sol. 10%;

Completar el volumen para 1000 ml con agua destilada;

Adicionar 20 gr/l de agar, para medio solido.

* Usar azúcar cristal para Rhizobium de crecimiento rápido.

Para medio 79 con rojo congo, substituir o azul de bromotimol por rojo congo sol. 0.25 % usando 10 ml por litro de medio de cultivo.

7. BIBLIOGRAFIA

AN,Q; YANG, X; DONG, Y, FENG, L; KUANG, B; LI, J. Using confocal laser scanning microscope to visualize the infection of rice roots by GFP-labelled *Klebsiella oxytoca* SA2, an endophytic diazotroph. **Acta Bot. Sinica** 43, 558–564. 2001

ANWAR, G. Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis. University of the Punjab, Lahore. 9-25; 32-44. 2000.

BACA, B., SOTO, L. & PARDO, M. Fijación biológica de nitrógeno. **Elementos**. 1: 39 – 49. 2000

BALDANI V.L.D; BALDANI J.I; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology** 29, 869-88 1. 1983.

BALDANI, V., ALVAREZ, M., BALDANI, J. & DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**. 90: 35 – 46. 1986.

BALDANI, J.I; POT, B; KIRCHHOF, G; FALSEN, E; BALDANI, V.L.D; OLIVARES, F.L; HOSTE, B; KERSTERS, K; HARTMANN, A; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans* a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group1) as *Herbaspirillum* Species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 46:802- 810, 1996.

BALDANI, V. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 234 p. 1996.

BALDANI, J., CARUSO, BALDANI, V., GOI, S. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. 29: 911 – 922. 1997

BASHAN, Y; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.** 43: 103-121., 1997.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, 16 (4): 729-770. 1998.

BEATTIE, G. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances S.S. Gnanamanickam (ed.), **Plant-Associated Bacteria**, 1-56. 2006.

BECKING, J. The genus *Beijerinckia*. En: BALOWS, A., TRIPPER, H., DWORKING, M., HARDER, W. & SCHELEIDER, K. The prokaryotes. Springer. Disponible en: http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=110&intsec=06_00. 1991.

BECKING, J. The family *Azotobacteraceae*. En: BALOWS, A., TRIPPER, H., DWORKING, M., HARDER, W. & SCHELEIDER, K. The prokaryotes. Springer - Verlag. Disponible en: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaprender/jsp/showchap.jsp?chapnum=165>. 1991b.

BENBROOK, C. World Food System Challenges and Opportunities: GMOs, Biodiversity, and lessons from Americas Heartland. In; World Food System Challenges and Opportunities. <http://www.pmac.net/IWFS.pdf>, 1999

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Release 5.0 <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>. 2005.

BODDEY R; DOBEREINER J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. **Plant. Soil**. 108: 53–65. 1988.

BONILLA, R; NOVO, R; VENEGAS, N; GLVIS, A; MARTINEZ, M.; PARRA D; VANEGAS, O. Generación de tecnologías para la utilización de fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. Corpoica – Regional 3. 40p. 2000.

BOTTINI, R; CASSAN, F; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied and Environmental Microbiology**. 65: 497–503. 2004.

BOTTOMLEY, P. & NEWTON, W. Nitrogen fixation research progress. **Martinus Nijhoff**. p. 485 – 490. 1985.

- CHANWAY C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting rhizobacteria: An emerging technology for reforestation. **For. Sci.** 43: 99–112. 1997.
- CALVACANTE, V. & DÖBEREINER, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar-cane. **Plant and Soil.** 108: 23 – 31.
- COLLADOS, C.; Tesis doctoral; Universidad de Granada, Granada. **Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizosfera de trigo y maíz.** 2006.
- CONN, H. Validity of the genus *Alcaligenes*. **J. Bacteriol.** 44, 353–360. 1942
- DE FREITAS J; GERMIDA, J. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Can. J. Microbiol.** 37: 780–784. 1991.
- DELAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B. & GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **Inter J of Syst Bact.** 48:1277 - 1290. 1998.
- DELAJUDIE, P.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K. & GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **Inter J Syst Bact.** 44: 715 – 733. 1994.
- DI CIOCCO C; RODRIGUEZ, E. 1994. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. in Argentine humid pampas. **Field Crop Res.** 37: 253–257.
- DÖBEREINER, J. & ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II - Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia.** 19: 401 – 412. 1959.
- DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. En: DÖBEREINER, J.,

BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 1995. 60 pp. 1970.

DÖBEREINER, J. & DAY, J. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Proceedings of the 1st International Symposium on N₂ Fixation (Newton, W.E. and Nyman, C.J., Eds.), pp. 518 - 538. Washington State University Press, Pullman. En: STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Review**. 24(2000): 487 – 506. 1976.

DÖBEREINER, J. & BALDANI, J. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**. 34: 869 – 881. 1982.

DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. 1987. Nitrogen fixing bacteria in non-leguminous plants. Springer – Verlag. En: DÖBEREINER, J., BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 60 pp. 1995.

DÖBEREINER, J. & RUSCHEL, A.. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**. 1: 261 – 272. 1958.

DÖBEREINER, J. & CAMPELO, A. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. En: DÖBEREINER, J., BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 60 pp. 1995. 1971.

DÖBEREINER, J., MARRIEL, I. & NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**. 22: 1464 – 1473. 1976.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V. & BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa – CNPAB. 60 pp. 1995.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista de Biologia**. 19: 251 – 258. 1995.

DOBBELAERE, S; CROONENBORGH, A; THYS, A; PTACEK, D; VANDERLEYDEN, J; DUTTO, P; LABANDERA, G; CABALLERO, M; AGUIRRE,

J; KAPULNIK, Y; BRENER, S; BURDMAN, S; KADOURI, D; SARIG, S; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*, *Aust. J. Plant Physiol.* 28:871-879, 2001.

DOOLITTLE, M., RAINA, A., LAX, A. & BOOPATHY, R. Presence of nitrogen fixing *Klebsiella pneumoniae* in the gut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). *Bioresource Technology*. **In Press, Corrected Proof**, Available online 20 August 2007, En: ScienceDirect. 2007.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L. & GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbani rostrata*. **Inter J Syst Bact.** 38(1): 89 - 98. 1988.

ECKERT, B., BALLER, O., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M. & HARTMANN, A. *Azospirillum doebereinae* sp. nov. a nitrogen fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 51: 17 - 26. 2001.

EVANS, H. & BURRIS, R. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. En: STACEY, G., BURRIS, R. & EVANS, H. Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall. New York – USA. pp. 1 - 42. 1992.

FAGES J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: Okon Y. ed., *Azospirillum-Plant associations*. **CRC Press, Boca Raton, Florida**, pp 87–110. 1994.

FALLIK, E; OKON, Y. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. **Soil Biol. Biochem.** 28: 123-126., 1996

FENG, L. ROUGHLEY, R. COPELAND, L. Morphological Changes of Rhizobia in Peat Cultures. **Applied And Environmental Microbiology.** 68(3): 1064–1070. 2002.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, **Anais**. São Carlos: UFSCar, p. 255-258. 2000

FERREIRA, J. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Agrochimica**, vol. 37, nº 2, p. 06 - 12, 2003.

FERREIRA, J.S. Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado. Dissertação de Mestrado. Seropédica: UFRRJ, 44p., 2004.

FERREIRA, J. Qualidade de Inoculante, Inoculação e Reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em Duas Variedades de Arroz Irrigado. Tesis doctoral. Universidad Rural de Rio de Janeiro. Brasil., 2008.

FRANCO, A. & DÖBEREINER, J. A biología do solo e sustentabilidad dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**. 20: 68 -74. 1994.

FUENTES, L; CABALLERO, J. BACTERIAL BIOFERTILIZERS. In: Z.A. Liddiqui (Ed.) PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2006.

GARRIDO, M. F. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas. Tesis de Maestría. Universidad Militar Nueva Granada. 95 p. 2007.

GILLIS, M., DÖBEREINER, J., POT, P., GOOR, M., FALSEN, E., HOSTE, B., REINHOLD, B. & KERSTERS, K. Taxonomic relationship between (*Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autotrophicum*. En: POLSINELLI, M., MATERASSI, R. & VICENZINI, M. Nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers. p. 293 – 294. 1991.

GUIMARÃES, D; BALDANI, J; BALDANI, V. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia** 37(2): 25 - 30, 2003.

GUIMARÃES, S.L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. Tese de doutorado, Seropédica, UFRRJ, 88f. 2006.

HAAHTELA, A., BALDANI, J., KIRCHHOF, G., ABMUS, B., HUTZLER, P., SPRINGER, N., LUDWING, W., BALDANI, V. & DÖBEREINER, J. 1981. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. En: PENDRIK, I., DEL GALLO, M.

HARTMANN, A; BALDANI, J. the Genus *Azospirillum*. **Prokaryotes**. 5:115–140. CHAPTER 3.1.5., 2006.

HASELKORN, R., GOLDEN, J., LAMMERS, P. & MULLIGAN, M. Organization of the genes for nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena*. En: EVANS, H.

HUI XIE, C; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** . 55, 1435–1438. 2005

HUNGRIA, M; LOUREIRO, M; MENDES, I; CAMPO, R; GRAHAM, H. Inoculant preparation, production and application. D. Werner and W. E. Newton (eds.), **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**, 223-253. 2005.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Manual de buenas practicas de distribución y manejo para insumos agropecuarios. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 12-17. 2006.

ISO 10390. Soil quality – Determination of pH., 2005

JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C. & GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. **Inter J Syst Bact** 47(3): 895 – 898. 1997

KHAMMAS, K.M., AGERON, E., GRIMONT, P.A.D. AND KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.** 140: 679-693. 1989.

KINZIG, A. P., AND R. H. SOCOLOW. Is nitrogen fertilizer use nearing a balance-reply. **Phys. Today** 47: 24–35. 1994.

KOBAYASHI, D. PALUMBO, J. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In C. W. Bacon & J. F. White, Jr. (Eds.), **Microbial Endophytes** (pp. 199-233). New York: Marcel Dekker, Inc. 2000

LUGTENBERG, B. DEKKERS, L. BLOEMBERG, G. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**. 39, 461-490. 2001.

MCCRADY, P. Standard methods of water analysis. Am. Pub. Health and Am. Water Assoc. eds., 9 ed. 131-138. 1946.

MCCULLY, M. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 983–990. 2001

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. Brock *Biologia de Los Microorganismos* .10 Ed. Editorial PEARSON EDUCACION. pp1011. 2003.

MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acidtolerant *Azospirillum* species. *An. Academia Bras. Ci.* 55:417-430, 1983.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D; TEIXEIRA, K.R. dos S.; BALDANI, J.I. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 27p. (Embrapa – CNPAB. Documentos, 91). 1999.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Review in Plant Sciences*. **15**: 113 - 140. 1996.

MATORA, L; SEREBRENNIKOVA, O; SHCHYOGOLEV, S. Structural effects of the *Azospirillum* lipopolysaccharides in cell suspensions. *Biomacromolecules*, 2, 402-406. 2001.

MEHNAZ, S; WESELOWSKI, B; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* . 57: 620-624. 2007

MUNEVART, F; WOLLUM, A. Growth of *Rhizobium japonicum* Strains at temperatures Above 27 C. *Applied and Environmental Microbiology*. 272-276.1981.

OKON Y., KAPULNIK Y. AND SARIG S. Field inoculation studies with *Azospirillum* in Israel. In: Subba Rao N.S. _ed._, *Biological Nitrogen Fixation Recent Developments*. **Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi, India**, pp. 175–195. 1988.

OKON, Y; GONZALEZ, L. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591–1601. 1994.

OLIVEIRA, F.L. de; PITARD, R.M.; SOUTO, S.M. Seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas *Arachis pintoi* e *Cratylia argentea*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 19p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 53). 1998.

- OLSEN, P; RICE, W; BORDELEAU, L; BIEDERBECK, V.O. Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: the need for an increase in standards. **Plant Soil** 161: 127-134. 1994.
- PAZOS, M; HERNANDEZ, A; PANEQUE, M; SANTANDER, J. Caracterización de cepas del genero *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. **Cultivos Tropicales** 21(3):19-23, 2000.
- PENG, G; WANG, H; ZHANG, G; HOU, W; LIU, Y; WANG, ET; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int J Syst Evol Microbiol.** 56, 1263-1271. 2006
- PEOPLES, M. & CRASWELL, E. Biological nitrogen fixation; investments expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil.** 141: 13 – 39. 1992.
- PODILE, A; KISHORE, A. Plant growth-promoting rhizobacteria. **S.S. Gnanamanickam (ed.), Plant-Associated Bacteria**, 195–230. 2006.
- POSTGATE, J. The fundamental of nitrogen fixation. University Press Cambridge. 252 pp. 1983.
- PREPAS, E; CHARETTE, T. HEINRICH, D; HOLLAND, K. Worldwide Eutrophication of Water Bodies: Causes, Concerns, Controls. **Treatise on Geochemistry.** 311-331, 2003.
- REINHOLD, B., HUREK, T., FENDRIK, I., POT, B. GILLIS, M., KERSTERS, K., THIELEMANS, S. & DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organisms associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth]. **International Journal of Systematic Bacteriology.** 37: 43 – 51. 1987.
- REIS-JUNIOR, F., SILVA, M., TEIXEIRA, K., URQUIAGA, S. & REIS, V. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bacteria. **R Bras Ci Solo.** 28: 103 – 113. 2004.
- SPRENT, J. & SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall, 2 ed., London – England. 256p. 1990.

STEPHENS, J; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Res.**, 65, 249-258. 2000.

TARRAND, J.J., KRIEG, N.R. AND DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** 24: 967-980. 1978.

TEIXEIRA, K.R. dos S.; MARIN, V.A.; BALDANI, J.I. Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 25p. (Embrapa – CNPAB. Documentos, 84). 1998.

TEMPRANO, F; ALBAREDA, M. CAMACHO, M. DAZA, A; SANTAMARIA, C; NOMBRE, D. Survival of several rhizobium/bradyrhizobium strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **Int Microbiol**; 5: 81–86. 2002.

TRAN VAN, V; BERGEONGOKE, S; BALANDREAU, J; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant Soil** 281: 273–284. 2000.

VANDERLEYDEN, J. & ZAMAROCZY, M. *Azospirillum* VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology. **Springer**. p. 415 – 427. 1994.

VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Review**. 24: 487 – 506. 2000.

VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**. 255: 571–586. 2003.

WELLER, D; COOK, R. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. **Can. J. Microbiol.** 8: 328–334. 1986.

WOHLER, I. Auxin-indole derivates in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. **Microbiology Research**. 152: 399-405. 1997.

XU, H. Soil–root interface water potential in sweet corn as affected by organic fertilizer and a microbial inoculant. **J. Crop Prod.** 3, 139–156. 2000.

YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., OYAIZU, H., YANO, I., HOTTA, H., HASHIMOTO, Y., ESAKI, T. & ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology.** 36: 1251 – 1275. 1992.

3.4. Recuento de los microorganismos en el inóculo inicial.