

POBLACIONES BACTERIANAS NATIVAS: ALTERNATIVA SUSTENTABLE PARA LA AGRICULTURA

Native Bacterial Populations: Sustainable Alternative to Agriculture

Hernández-Flores Lina^{1‡}, Munive-Hernández J. Antonio², Sandoval-Castro Engelberto¹,
Martínez-Carrera Daniel¹ y Villegas-Hernández Ma. Carmen³

RESUMEN

La producción agrícola moderna requiere gran cantidad de agroquímicos derivados del petróleo, por lo que su producción y uso contaminan el ambiente, además de generar daños en la salud de los seres vivos. Una alternativa para mantener un nivel rentable de producción, con un menor uso de agroquímicos, y enfocando la agricultura hacia un manejo sustentable, es la aplicación de microorganismos fijadores de nitrógeno. De esta forma, se busca implementar alternativas que permitan reducir los costos (económicos y ambientales) sin afectar la productividad de los cultivos. Este trabajo se enfocó a generar una tecnología sustentable a base de cepas nativas de rhizobia, potencialmente útiles como biofertilizantes, aplicable a cultivos agrícolas en localidades del estado de Chihuahua. En 11 muestras de suelos con actividad agrícola se evaluó la densidad de poblaciones bacterianas, a niveles de 1×10^2 a 6.6×10^3 unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1}), mostrándose el efecto negativo de la aplicación de fertilizante químico a nivel de las poblaciones microbianas del suelo. Algunas cepas presentaron una baja tasa de supervivencia *in vitro*, se obtuvo una colección de 24 cepas provenientes de suelo y 7 de nódulos radiculares. Las 31 cepas se identificaron mediante el análisis de secuencias del gen 16S rDNA, encontrando principalmente *Rhizobium* y *Ensifer*. Se evaluó el crecimiento de las cepas en medio de cultivo bajo diferentes condiciones fisiológicas (pH de 4.0, 5.5,

6.8 y 8.0; temperatura de 32 y 42 °C; NaCl de 0.01, 0.51 y 0.85 moles L^{-1}). Se aislaron cepas con capacidad de crecimiento en condiciones que se consideran adversas y que sugieren una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales (pH, temperatura, osmolaridad, fuente de C y energía). La diferencia en efectividad de las cepas inoculadas en leguminosas hace evidente la necesidad de diseñar un inoculante multicepa como parte de una alternativa encaminada hacia la agricultura sustentable.

Palabras clave: biofertilizantes, leguminosas, nodulación, rhizobia.

SUMMARY

Modern agricultural production requires high amounts of agrochemical derivatives of petroleum. Their production and use contaminate the atmosphere, generating damage to health of living beings. An alternative to the exclusive use of agrochemicals, while maintaining a profitable agricultural production and aiming for sustainable management, is the application of nitrogen fixing microorganisms. In this way, this alternative reduces costs (economic and environmental) without affecting crop productivity. Our objective was to generate a technology with potentially useful native rhizobia strains as biofertilizers, applied to agricultural crops in localities of the state of Chihuahua. In 11 agricultural soil samples, bacterial populations were evaluated, finding levels from 1×10^2 a 6.6×10^3 training units of colonies (UFC g^{-1}); showing the negative effect of chemical fertilizers on microbial soil populations. Some strains showed very low survival capacity *in vitro*. We obtained a collection of 24 strains isolated from soil and 7 strains isolated from root nodules. The 31 isolates were identified by 16S rDNA sequencing, mainly *Rhizobium* and *Ensifer* were found. Growth in culture medium was evaluated under different physiological conditions (pH 4.0, 5.5, 6.8 and 8.0; temperature of 32 and 42 °C,

¹ Colegio de Postgraduados, Campus-Puebla. Carretera México-Puebla km 125.5. La Libertad. 72130 Cholula, Puebla, México.

[‡] Autor responsable (hlina@colpos.mx)

² Instituto de Ciencias, BUAP. Edificio 76, segundo Piso Ciudad Universitaria. Colonia San Manuel. 72570 Puebla, México

³ Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. 11340 México, D. F.

and NaCl concentration of 0.01, 0.51 and 0.85 mol L⁻¹). Strains with capacity to grow under adverse conditions were obtained. This capacity suggests physiological flexibility and adaptation to environmental conditions. The difference in effectiveness observed for inoculated strains on leguminous crops visibly shows the necessity of multistrain inoculants as an alternative for sustainable agriculture.

Index words: *biofertilizers, leguminous, nodulation, rhizobia.*

INTRODUCCIÓN

En la década de 1950 se inicia en México la Revolución Verde, con el incremento del uso de semillas mejorada, pesticidas y fertilizantes químicos, que buscaban incrementar la productividad de diferentes cultivos destinados a la alimentación humana o del ganado (Núñez, 2001). Sin embargo, el uso indiscriminado de fertilizantes ocasionó que se elevaran los niveles de nitratos en mantos freáticos, ríos y lagos (Castellanos *et al.*, 2000); situación que prevalece hasta nuestros días. Por otro lado, las condiciones naturales de un suelo no aportan los nutrientes suficientes para cumplir con la demanda que ocasiona la agricultura intensiva, especialmente si no se implementan prácticas agrícolas adecuadas, como ocurre en el agro mexicano (Núñez, 2001). Así, es necesario utilizar alternativas que permitan lograr una producción sostenida y fomentar el manejo adecuado de los recursos bióticos y abióticos de los agroecosistemas (Aguirre, 2001; Thrall, 2005). Desde la década de los 70's, el estudio de microorganismos promotores del crecimiento vegetal es una línea de investigación de gran impulso en países europeos, asiáticos y latinoamericanos, incluido México (Aguirre-Medina, 2006), destacándose aquellos microorganismos capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno. Existen investigaciones cuyo objetivo es el de esclarecer los factores que permiten una mejor interacción entre diferentes especies de plantas y microorganismos (Walley *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2004; Villegas *et al.*, 2006; Giles *et al.*, 2008; Zahir *et al.*, 2010).

El uso de microorganismos promotores de crecimiento en la agricultura se denomina inoculación o biofertilización, es considerada una biotecnología que

contribuye al desarrollo sostenible ya que favorece el desarrollo de los cultivos agrícolas, beneficia al productor y se ha descrito como ambientalmente segura, económica y socialmente aceptable (Urzúa, 2005; Aguirre-Medina, 2006; Bhattacharjee *et al.*, 2008; Cong *et al.*, 2009).

Entre los grupos microbianos del suelo más estudiados, se encuentra el grupo rhizobia, el cual agrupa a todas aquellas bacterias capaces de nodular una o más especies de leguminosas, y que llevan a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno en asociación simbiótica con estas plantas (Moulin *et al.*, 2001; Weir, 2011). Tras el establecimiento de la simbiosis se genera un nuevo órgano, el nódulo radicular, al interior del cual la bacteria fija nitrógeno; éste es aprovechado por la planta e incrementa su capacidad para desarrollarse en suelos pobres, especialmente aquellos carentes de nitrógeno (Trinchant *et al.*, 2001). El grupo de los rhizobia incluye, actualmente, trece géneros que comprenden más de 70 especies, *Rhizobium* (Jordan, 1982), *Allorhizobium* (De Lajudie *et al.*, 1998), *Ensifer* (Chen *et al.*, 1988, Casida, 1982; Young, 2003), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001; Jourand *et al.*, 2004), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002, 2004), *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005), *Shinella* (Lin *et al.*, 2008), entre las α -proteobacterias y dos géneros de la subclase β -Proteobacteria, *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) y *Cupriavidus* (Chen *et al.*, 2001; Vandamme y Coenye, 2004). Este grupo reviste gran importancia debido a las ventajas tanto ecológicas como económicas que puede proporcionar su adecuada aplicación (Villegas y Munive, 2005).

Una alternativa para mantener el nivel de producción agrícola, con un menor uso de agroquímicos y manejo sustentable, es la inoculación de microorganismos benéficos asociados a las especies cultivadas (Urzúa, 2005; Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*, 2010). Sin embargo, es fundamental cuidar la adecuada selección de los microorganismos a utilizar como inoculantes, considerando su potencial biofertilizante, su capacidad de adaptación, permanencia en el sitio de interés y su facilidad de manejo. Por ello, éste trabajo se enfocó a generar una tecnología sustentable, con base en cepas nativas de rhizobia potencialmente útiles como biofertilizantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de Suelo y Nódulos

El estado de Chihuahua se localiza en el norte de México entre 25° 5' y 31° 47' N, y 103° 11' y 109° 07' O. Las condiciones climáticas predominantes son de tipo seco, clima seco árido en 28% de la superficie estatal, con una precipitación promedio anual menor a 300 mm y temperatura máxima de 40 °C; 46% del territorio estatal es semiárido con una precipitación promedio anual de 300 a 500 mm (CONAFOR, 2004; Núñez-López *et al.*, 2007). Se muestrearon terrenos de cultivo de productores interesados en participar en el estudio de microorganismos con potencial biofertilizante. Debido a la enorme superficie del estado, se eligieron tres localidades con características edafoclimáticas diferentes y se privilegió el muestreo de cultivos de importancia económica para la región. Las tres localidades de muestreo se ubican en las coordenadas especificadas en el Cuadro 1.

En cada localidad se muestrearon diferentes terrenos, y en cada uno de estos se eligieron cinco puntos al azar, de donde se extrajo suelo a una profundidad de 15 cm, para hacer una mezcla compuesta y homogénea. Los suelos muestreados tienen historial de cultivo de alfalfa, cacahuate, nogal, papa, chile, durazno o manzano. Las muestras de suelo se secaron y conservaron en refrigeración hasta su uso. Simultáneamente, se colectaron nódulos radiculares de cacahuate y alfalfa, presentes en terrenos ubicados en los municipios de Ojinaga y Delicias. De estos nódulos se obtuvieron aislamientos, que fueron purificados y conservados en glicerol a -70 °C. Las colonias se seleccionaron en primera instancia con base en la morfología colonial, aquellas que presentaron características de los rhizobia, como aspecto húmedo, bordes regulares, lisas, convexas, translúcidas u opacas a la luz transmitida, brillantes a la luz reflejada, mucoides, principalmente.

Aislamiento de Cepas de Rhizobia

Los nódulos se rehidrataron con 1 mL de agua destilada estéril durante 30 min. Enseguida se desinfectaron superficialmente con peróxido de hidrógeno al 70% durante 5 min, después se practicaron varios lavados con agua destilada estéril. Los nódulos se maceraron con ayuda de una varilla de vidrio

Cuadro 1. Ubicación de las localidades muestreadas en el estado de Chihuahua, México.

Localidad	Coordenadas		Altitud msnm	Temperatura máxima y mínima °C
	Latitud Norte	Longitud Oeste		
Casas Grandes	30° 23'	107° 57'	1480	41.5 y -17.5
Delicias	28° 11'	105° 28'	1170	38.0 y -8
Ojinaga	29° 34'	104° 24'	800	44.9 y -14

y la suspensión obtenida fue utilizada para inocular cajas de Petri con medio TY (Vincent, 1974). Las cajas se incubaron a 28 °C, durante 5 días. Las colonias con morfología característica de bacterias del grupo rhizobia se sembraron pro estría cruzada en medio de cultivo sólido hasta su purificación.

Estimación de las Poblaciones Bacterianas en las Muestras de Suelo

El número de unidades formadoras de colonias (UFC), se estimó por triplicado en cada una de las muestras compuestas de suelo mediante la técnica de dilución decimal seriada y siembra por el método de difusión en cajas Petri (por triplicado). Los medios de cultivo utilizados fueron agar nutritivo y TY (Álvarez-Solis y Anzueto-Martínez, 2004; Zuberer, 1994). Las cajas se incubaron a 28 °C durante 5 días, al cabo de los cuales se efectuó el conteo en placa de las colonias presentes en cada dilución.

Identificación de Cepas Aisladas

La caracterización de los aislamientos se efectuó con base en características morfológicas y bioquímicas (Garrity *et al.*, 2004), así como por análisis de secuencias del gen 16S rDNA. El aislamiento de DNA se efectuó utilizando el Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El DNA extraído se amplificó utilizando los oligonucleótidos FGPS-6 and FGPS-1509 (Normand, 1992) en un termociclador Master Cycler gradient (Eppendorf). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 3 min a 94 °C durante un ciclo, desnaturalización por 30 s a 94 °C, alineamiento 45 s a 60 °C, elongación enzimática por

1:30 min a 72 °C, durante 25-30 ciclos, y extensión final por 10 min a 72 °C durante un ciclo. El producto de amplificación de 1500 pares de bases (pb) se verificó en geles de agarosa al 1% a 100 mV, teñidos con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se cortaron y se purificaron utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), según instrucciones del proveedor. Los productos obtenidos se secuenciaron directamente con los oligonucleótidos FGPS6 y 16S-1924r (5'-GGC ACG AAG TTA GCC GGG GC-3') (Sy *et al.*, 2001) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Cuernavaca, México, (www.ibt.unam.mx/sintesis).

Pruebas Fisiológicas

Se estimó la capacidad de crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones de cultivo, temperaturas de incubación de 32 y 42 °C, pH del medio entre 4 y 8, y osmotolerancia (diferentes concentraciones de NaCl del medio de cultivo). Para llevar a cabo las cinéticas de crecimiento, se inocularon pre-cultivos en tubos con medio de cultivo líquido YMA. Las células fueron lavadas por centrifugación con una solución salina isotónica al 0.8% y resuspendidas en tubos conteniendo 5 mL de medio de cultivo YMA. El inóculo inicial fue una suspensión bacteriana ajustada a una $DO_{600} = 0.08-0.1$. El pH del medio se ajustó a 4.0, 5.5, 6.8 y 8.0, con HCl o NaOH. La concentración de NaCl se ajustó a 0.017, 0.51 y 0.85 moles L^{-1} en el medio de cultivo. Los tubos inoculados fueron incubados por una semana, durante la cual se midió la absorbancia cada 24 horas.

Inoculación y Evaluación de Cepas en Invernadero

La capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de los aislamientos obtenidos se estimó en condiciones de invernadero, en plántulas de alfalfa y frijol. Se utilizaron bolsas de plástico con suelo estéril procedente de la región muestreada con tres a cuatro plántulas por bolsa, mismas que fueron inoculadas. Previa a la inoculación de las plantas, los aislamientos se propagaron en medio líquido TY, durante 48 horas a 30 °C, en agitación orbital a 150 rpm. Cada plántula se inoculó con 1 mL de suspensión bacteriana a $DO_{600} = 0.8$. Los parámetros a evaluar fueron: altura de la planta, diámetro del tallo, altura del tallo, largo de la raíz, número y tamaño de los nódulos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimación del Número de Poblaciones Bacterianas

El conteo de UFC bacterianas en las muestras compuestas de suelo se efectuó tanto para poblaciones bacterianas totales, como para las colonias con morfología característica de rhizobia (Cuadro 2).

Se observó diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) en el número de UFC de las tres localidades. El número mayor de poblaciones bacterianas totales se estimó en suelos con cultivo de alfalfa de Ojinaga (4.0×10^5 UFC g^{-1}) y en suelo con nogal de la localidad de Casas Grandes (3.8×10^5 UFC g^{-1}); mientras que la menor población se detectó en el suelo con cultivo de

Cuadro 2. Estimación de la población bacteriana presente en las muestras de suelo del estado de Chihuahua.

Localidad	Cultivo	Población bacteriana total	Población presuntiva de rhizobia
		----- UFC g^{-1} -----	
Ojinaga	Alfalfa	4.0×10^5 a	6.0×10^3 a
	Algodón	1.1×10^5 bc	5.3×10^3 a
	Cacahuete	2.4×10^5 ab	6.3×10^3 a
Delicias	Cacahuete	2.9×10^4 c	6.6×10^3 a
	Alfalfa	1.4×10^5 bc	5.6×10^3 a
	Papa	4.0×10^3 c	0.1×10^3 c
	Chile	2.2×10^4 c	0.9×10^3 bc
Casas Grandes	Durazno	3.4×10^4 c	0.7×10^3 bc
	Manzano	2.7×10^4 c	0.3×10^3 bc
	Nogal	3.8×10^5 a	6.3×10^3 a
	Chile	2.6×10^5 ab	1.6×10^3 b

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

papa, en la localidad de Delicias (4×10^3 UFC g^{-1}), suelo sometido a la aplicación intensiva de agroquímicos.

En cuanto a la población del grupo rhizobia, el número de UFC fue mayor en el suelo con el cultivo de cacahuete de la localidad de Delicias (6.6×10^3 UFC g^{-1} suelo) y menor en el suelo con el cultivo de papa de esta misma localidad (0.1×10^3 UFC g^{-1} suelo). Al efectuar el aislamiento de las colonias con características morfológicas relacionadas con el grupo rhizobia, algunas presentaron una baja tasa de supervivencia *in vitro*, obteniéndose una colección de 24 aislamientos bacterianos provenientes de suelo donde se cultivó alfalfa, cacahuete, algodón, papa, chile, durazno y manzano, y siete aislamientos obtenidos directamente de nódulos radiculares de alfalfa. Lo que dio un total de 31 aislamientos que se identificaron preliminarmente con base en sus características morfológicas (como ya se describió en la sección de materiales y métodos), presentaron colonias rojas, rosas y blanquecinas (en medio con rojo Congo), apariencia húmeda y mucosa, de superficie convexa. Se han demostrado diferencias, en la población microbiana del suelo, relacionadas con cambios en el contenido de agua, niveles de carbono, nitrógeno y pH del suelo (Doran, 1980; Reis *et al.*, 2004), sin embargo, es difícil determinar la cantidad de microorganismos en un suelo, y cuál es la población microbiológica necesaria para que un suelo agrícola funcione de manera óptima (Tate III, 1995).

Reis *et al.* (2004), destacaron como condicionante de la mayor o menor abundancia de microorganismos benéficos en el suelo, el manejo del cultivo y la época del muestreo combinado con el tipo de planta hospedera, debido a la composición de los exudados radiculares y la relación C/N de la rizósfera. Otro factor en la detección de microorganismos es el medio de cultivo utilizado para evaluar estas poblaciones, ya que cualquier modificación en la humedad, materia orgánica o el pH del suelo, puede influir. Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen ventaja sobre otras bacterias en condiciones donde el nitrógeno disponible es limitante o completamente deficiente; sin embargo, se ha encontrado que los fertilizantes nitrogenados añadidos a los cultivos tienen efectos negativos sobre estas poblaciones. Además, la distribución de microorganismos fijadores de nitrógeno no está completamente dictada por la disponibilidad de nitrógeno en el ambiente, sino que es aleatoria, y puede predecirse con base en las características del hábitat (Zehr *et al.*, 2003).

Identificación de Cepas Aisladas

Se analizaron las secuencias del gen 16S rDNA de las 31 cepas, mostrando que la mayoría de las obtenidas del suelo cultivado con alfalfa, cacahuete y manzano se agrupaban con *Ensifer meliloti* (antes *Sinorhizobium meliloti*). Las bacterias pertenecientes al género *Ensifer* también se encontraron en el suelo cultivado con papa, chile y durazno. Se identificó *Rhizobium* sp. en la rizósfera de cacahuete. Las bacterias que nodularon las variedades de frijol y alfalfa fueron identificadas como *E. meliloti*.

Pruebas Fisiológicas

Al cultivar las cepas bajo diferentes condiciones fisiológicas, destacó la cepa LMS485 (*Ensifer* sp.) aislada del suelo con cultivo de chile, proveniente de la localidad de Delicias, alcanzando una DO_{600} de 0.547 en sólo 24 h bajo incubación a diferentes temperaturas y en presencia de diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. En medio de cultivo con diferentes valores de pH, destacó la cepa LMS479, capaz de crecer en pH desde 4.0 hasta 8.0, ésta cepa fue aislada de nódulos de cacahuete de Ojinaga e identificada como *E. meliloti*. La inestabilidad de los aislamientos en condiciones de laboratorio, su capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas, pH y concentración de sales del medio, y la utilización de diferentes compuestos de carbohidratos y nitratos son características de éstas poblaciones. Este comportamiento, integrado con la información proporcionada por los agricultores, sugiere que las poblaciones microbianas presentes en los suelos estudiados se han adaptado al medio, respondiendo al uso de agroquímicos, y otros factores bióticos y abióticos. Este es uno de los principales obstáculos que limitan los beneficios de las biotecnologías basadas en el uso de microorganismos, como los fijadores de N_2 , debido a que su metabolismo se ve alterado por las condiciones edáficas y ambientales. Dado que la fertilidad del suelo es dependiente de la acción de los organismos del suelo que reciclan los nutrientes, es necesario favorecer las condiciones óptimas para el funcionamiento de estos organismos. La interacción positiva entre las plantas y los microorganismos puede mejorar la nutrición de los cultivos agrícolas, aumentando su tolerancia a limitaciones ambientales y ayudando a controlar biológicamente a los patógenos, en consecuencia, reduciendo la necesidad de fertilizantes y pesticidas.

Evaluación de Cepas en Invernadero

Los parámetros evaluados en las plantas de frijol mostraron que las cepas inoculadas influyeron de manera independiente: 1) en la altura de las plantas, se observó que la cepa LMS497 presentó diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al resto de las cepas inoculadas; 2) en diámetro del tallo, la cepa LMS489 presentó mayor diferencia con respecto al resto de las cepas inoculadas; 3) en la altura del tallo la cepa LMS486 mostró ser la mejor ($P \leq 0.05$) respecto al resto de los aislamientos; 4) mientras que para largo

de la raíz, la cepa LMS470 causó el mayor aumento, respecto al resto de los aislamientos (Cuadro 3).

En frijol, la cepa LMS488 indujo un mayor número de nódulos, siendo estadísticamente significativa la diferencia ($P \leq 0.05$) respecto al resto. Esta cepa fue aislada de nódulos de alfalfa de Delicias, e identificada como *Ensifer meliloti*. El tamaño y color de los nódulos, fue variable, destacando la cepa LMS481, aislada del suelo con cultivo de cacahuate en Delicias, por inducir los nódulos de mayor tamaño. La inoculación en leguminosas, con rhizobia y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, ha tenido una interacción positiva

Cuadro 3. Características de plantas de frijol inoculadas con las cepas seleccionadas, bajo condiciones de invernadero.

Cepa	Origen de las cepas	Altura	Diámetro de tallo	Altura de tallo	Largo de raíz	Número de nódulos	Tamaño de nódulos
----- cm -----							
LMS469	Suelo con alfalfa	43.33 bcd	0.40 b	20.00 de	19.00 cdef	48.67 cdefg	0.25 abcde
LMS470		54.33 abcd	0.28 bcd	34.33 abcd	28.67 a	35.67defgh	0.30 abc
LMS471		41.00 bcd	0.37 bc	16.00 e	16.67 ef	35.67defgh	0.25 abcde
LMS472		53.00 abcd	0.29 bcd	34.33 abcd	26.00 abc	60.67 bcde	0.30 abc
LMS473		41.00 bcd	0.40 b	20.00 de	16.67 ef	60.33 bcde	0.25 abcde
LMS474		53.00 abcd	0.28 bcd	35.00a bc	26.00 abc	44.33 cdefgh	0.30 abc
LMS475	Suelo con cacahuate	37.67 cd	0.33 bcd	31.00 abcd	18.33 def	52.00 cdef	0.35 a
LMS476	Suelo con algodón	36.00 d	0.23 cd	22.67 cde	19.00 cdef	17.33 gh	0.30 abc
LMS477		41.00 bcd	0.37 bc	16.00 e	16.67 ef	59.00 bcde	0.25 abcde
LMS478		53.00 abcd	0.28 bcd	34.33 abcd	26.00 abc	56.67 bcde	0.30 abc
LMS479	Nódulo con cacahuate	47.67 abcd	0.28 bcd	29.67 abcde	24.67 abcd	63.33 bcde	0.30 abc
LMS480	Suelo con cacahuate	36.67 d	0.37bc	29.00 abcde	18.00 def	53.67 bcdef	0.35 a
LMS481		43.00 bcd	0.33 bcd	27.00 abcde	19.00 cdef	49.00 cdefg	0.35 a
LMS482		37.67 cd	0.33 bcd	31.00 abcd	18.33 def	52.00 cdef	0.35 a
LMS483		47.33 abcd	0.33 bcd	37.67 ab	21.67 abcdef	61.33 bcde	0.35 a
LMS484	Suelo con papa	39.00 bcd	0.37 bc	34.00 abcd	20.33 bcdef	52.00 cdef	0.35 a
LMS485	Suelo con chile	42.33 bcd	0.40 b	36.33 abc	22.33 abcde	67.33 bcd	0.33 ab
LMS486		54.00 abcd	0.27 bcd	41.00 a	17.33 def	58.67 bcde	0.35 a
LMS487	Nódulo con alfalfa	39.00 bcd	0.37 bc	24.00 bcde	17.00 ef	17.60 gh	0.65 abc
LMS488		62.00 ab	0.28 bcd	32.33 abcd	27.00 ab	137.67 a	0.22 bcde
LMS489		42.33 bcd	0.67 a	29.67 abcde	20.67 bcdef	44.00 cdefgh	0.25 abcde
LMS490		40.33 bcd	0.30 bcd	26.67 abcde	16.67 ef	36.00 defgh	0.30 abc
LMS491		48.00 abcd	0.37 bc	26.67 abcde	16.67 ef	69.33 bc	0.15 e
LMS492		49.00 abcd	0.28 bcd	23.33 bcde	22.67 abcde	35.00 defgh	0.17 de
LMS493	Suelo con durazno	43.33 bcd	0.27 bcd	36.67 abc	19.33 cdef	13.33 h	0.23 abcde
LMS494		40.00 bcd	0.20 d	34.00 abcd	21.33 abcdef	13.00 h	0.28 abcd
LMS495		55.00 abcd	0.38 bc	32.67 abcd	14.33 ef	34.00 efg	0.15 e
LMS496		37.33 cd	0.33 bcd	24.33 bcde	19.33 cdef	32.33 efg	0.20 cde
LMS497	Suelo con manzano	70.00 a	0.37 bc	33.67 abcd	23.33 abcde	86.00 b	0.30 abc
LMS498		48.00 abcd	0.37 bc	20.00 de	16.67 ef	36.00 defgh	0.15 e
LMS499		60.33 abc	0.33 bcd	33.00 abcd	16.33 ef	23.00 egh	0.32 abc

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

en el desarrollo radical de frijol y, en general, se favorece la nodulación y fijación de nitrógeno de las leguminosas (Aguirre-Medina *et al.*, 2005).

En alfalfa (Cuadro 4), sólo se midieron las plantas que presentaron nódulos radiculares, en las cuales al evaluar la altura se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). Las plantas inoculadas con las cepas LMS473 y LMS499 presentaron mayor altura respecto al resto de las cepas inoculadas. En cuanto al diámetro del tallo, no se encontró diferencia significativa. En el largo de la raíz, las cepas LMS496, LMS497 y LMS498 presentaron los valores más altos. En frijol, la experiencia de inoculación ha tenido resultados muy variables, en general, las bacterias introducidas son responsables de una proporción pequeña de los nódulos formados, debido a que el resto lo forman las cepas nativas. Por otra parte, al ensayar capacidad de nodulación en alfalfa, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) con la cepa LMS499, aislada del suelo rizosférico de manzano (Casas Grandes), que presentó mayor cantidad de nódulos respecto a todas las cepas inoculadas. En el tamaño de nódulo se encontró diferencia estadísticamente significativa en las cepas LMS488 y LMS491 con respecto a las demás cepas.

Se sabe que hay respuestas diferentes en la interacción microorganismo-planta y obedecen, en parte, a la especificidad simbiótica, es decir, al hecho de que algunos rhizobia forman nódulos en las raíces o tallos de ciertas leguminosas, donde se establecen, proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno. Así, una especie de leguminosa establece simbiosis con un número ilimitado

de especies de rhizobia y sus características derivan de elementos genéticos que pueden ganarse o perderse, con la consecuente modificación de la capacidad simbiótica (Oldroyd y Downie, 2008). Lo anterior lleva a pensar en la posible transferencia lateral de material genético, que podría explicar el hecho de que por primera vez se aísle una cepa de *E. meliloti* capaz de nodular frijol, y aunque se presenta una tasa muy baja, la simbiosis es fijadora de nitrógeno.

Hay factores que intervienen en el desarrollo de los nódulos, como es la concentración de metales en el medio, cuando falta molibdeno se forman más nódulos, pero son menos eficientes y su estructura se asemeja a la de los nódulos inactivos, la dificultad para la asimilación de molibdeno parece ser una de las principales limitaciones en la fijación del N_2 , especialmente en los suelos ácidos (Burdman *et al.*, 2000; Aguirre-Medina y Kohashi-Shibata, 2002; Aguirre-Medina *et al.*, 2005). Durante este estudio se encontró que plantas inoculadas con las cepas procedentes de suelo de cultivo de manzano con pH 4.7 generaron el mayor número de nódulos radiculares, en comparación con el resto de las cepas. Sin embargo, debe resaltarse que el número de nódulos es resultado de cierta disponibilidad fisiológica-genética de la planta (Martínez-Scott *et al.*, 2002).

La respuesta de las plantas fue independiente del tamaño de la población, en ensayos con suelos de Ojinaga y Casas Grandes, la población relativa de rhizobia fue muy baja en comparación con la población bacteriana total, sin embargo se obtuvieron resultados positivos a la nodulación e incluso a la fijación de nitrógeno (tasas

Cuadro 4. Características de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas seleccionadas, bajo condiciones de invernadero.

Cepa	Origen de las cepas	Altura	Diámetro de tallo	Largo de raíz	Número de nódulos	Tamaño de nódulos
----- cm -----						
LMS472	Suelo con alfalfa	48.33 bc	0.30 a	15.67 abc	21.67 bcd	0.19 c
LMS473		52.33 a	0.30 a	16.33 ab	15.00 de	0.27 b
LMS478	Suelo con algodón	41.00 cd	0.37 a	11.67 c	26.00 b	0.14 c
LMS479	Nódulo con cacahuete	41.00 cd	0.37 a	11.67 c	24.00 b	0.30 ab
LMS485	Suelo con chile	42.33 cd	0.30 a	12.33 bc	24.33 b	0.33 ab
LMS488	Nódulo con alfalfa	42.33 cd	0.30 a	12.33 bc	14.67 e	0.33 a
LMS491		42.33 cd	0.30 a	12.33 bc	24.33 b	0.33 a
LMS496	Suelo con durazno	39.00 d	0.33 a	18.33 a	25.00 b	0.18 c
LMS497	Suelo con manzano	55.67 ab	0.33 a	16.67 a	23.00 bc	0.18 c
LMS498		53.33 ab	0.30 a	17.00 a	17.00 cde	0.18 c
LMS499		58.00 a	0.33 a	16.00 ab	58.00 a	0.18 c

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

muy bajas), estas respuestas reflejan la influencia de las prácticas de cultivo a que se someten los suelos en estas regiones de Chihuahua.

Wang y Martínez-Romero (2000) sostienen que la búsqueda de bacterias con potencial biofertilizante se debe efectuar a partir de la población nativa del sitio donde se aplicarán, tesis defendida por otros autores (Silva y Vinuesa, 2007). Ello debido a que se favorece el aprovechamiento de la especificidad simbiótica y la capacidad de adaptación de las cepas de rizobia para establecer una simbiosis efectiva a partir de cepas nativas. Además, debe considerarse que la fertilidad del suelo afecta directamente la actividad microbiana, por lo que para lograr un mayor estímulo en el desarrollo vegetal se requiere diseñar un inóculo multicepa que responda favorablemente a las condiciones ambientales. En el presente trabajo encontramos dos cepas de rizobia con alto potencial biofertilizante (LSM479 y LSM485) por su tolerancia a condiciones adversas del medio, éstas deben acoplarse con otros microorganismos para que en conjunto se favorezca el desarrollo vegetal.

CONCLUSIONES

- El análisis de poblaciones bacterianas en muestras de suelo, en tres localidades del estado de Chihuahua, reflejó el efecto de las diferentes prácticas agrícolas, incluida la aplicación de fertilizante químico. Se observó una mayor población bacteriana en suelos con cultivo de alfalfa de Ojinaga y de nogal de la localidad de Casas Grandes, mientras que la menor población se detectó en un suelo dedicado al cultivo de papa con aplicación de agroquímicos, en la localidad de Delicias.

- En este estudio se aislaron cepas con capacidad de crecimiento en condiciones que se consideran adversas y que sugieren una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales.

- La cepa *Ensifer* sp. LMS485, aislada de un suelo con cultivo de chile en Delicias, destacó por su capacidad de crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl en medio de cultivo, y a diferentes temperaturas de incubación. Mientras que la cepa *E. meliloti* LMS479, aislada de nódulos de cacahuate de Ojinaga, mostró capacidad de crecimiento en un medio de cultivo con diferentes niveles de pH, uno de los principales factores limitantes del aprovechamiento de los inoculantes.

- El aislamiento de cepas identificadas como *Ensifer meliloti* a partir de nódulos de cacahuate, y con capacidad de nodular al frijol, lleva a considerar

la transferencia lateral de material genético como una herramienta de adaptación para la sobrevivencia de las poblaciones bacterianas en ausencia de su hospedero original. Aunque el número de nódulos radiculares obtenidos fue bajo, resalta el hecho de que fueron los de mayor tamaño y dieron resultados positivos en la reacción de reducción de acetileno.

- La generación de una estrategia de desarrollo sustentable para el estado de Chihuahua requiere el diseño de inoculantes que permitan cubrir diferentes carencias nutricionales del suelo y la adaptación y supervivencia de las cepas bacterianas bajo diferentes esquemas de prácticas agrícolas.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, J. A. 2001. Comercialización y consumo de productos orgánicos en ferias y supermercados: Costa Rica 2001. pp. 24-29. In: J. A. Chaves V. (ed.). Memoria: Intercambio sobre comercialización de productos orgánicos. COPROALDE-CEDECO-UNED. Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica.
- Aguirre M., J. F. y J. Kohashi-Shibata. 2002. Dinámica de la colonización micorrizica y su efecto sobre los componentes del rendimiento y el contenido de fósforo en frijol común. Agr. Téc. Méx. 28: 23-33.
- Aguirre-Medina, J. F., J. Kohashi-Shibata, C. Trejo-López, J. A. Acosta-Gallegos y J. Cadena-Iñiguez. 2005. La inoculación de *Phaseolus vulgaris* L. con tres microorganismos y su efecto en la tolerancia a la sequía. Agr. Téc. Méx. 31: 125-137.
- Aguirre-Medina, J. F. 2006. Biofertilizantes microbianos: experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Libro Técnico Núm. 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México.
- Álvarez-Solís, J. D. y M. de J. Anzueto-Martínez. 2004. Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México. Agrociencia 38: 13-22.
- Bhattacharjee, R. B., A. Singh, and S. N. Mukhopadhyay. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 199-209.
- Burdman, S, Y. Okon, and E. Jurkevitch. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Crit. Rev. Microbiol. 26: 91-110.
- Castellanos, J. Z., J. X. Uvalle Bueno and A. Aguilar Santelises. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas agrícolas, plantas y ECP. Instituto de Capacitación para la Productividad Agrícola. Celaya, Gto. México.
- Casida, L. E. 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov. A bacterial predator of bacteria in soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 32: 339-345.
- Chen, W. X., G. H. Yan, and J. L. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 38: 392-397.

- Chen, W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. de Vos, M. Mergeay, and P. Vandamme. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729-1735.
- Cong, P. T., T. Dang-Dung, T. Minh-Hien, N. Thanh-Hien, T.M.A. Choudhury-Abu, M. L. Kecskés, and I. R. Kennedy. 2009. Inoculant plant growth-promoting microorganisms enhance utilisation of urea-N and grain yield of paddy rice in southern Vietnam. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 52-61.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2004. Estadísticas semanales de incendios forestales en Chihuahua 1990-2004. Comisión Nacional Forestal, Gerencia Región VI Río Bravo. Chihuahua, Chihuahua, México.
- De Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kersters, B. Dreyfus, and M. Gillis, 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1277-1290.
- Dreyfus, B., J. L. Garcia, and M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 38: 89-98.
- Doran, J. W. 1980. Soil microbial and biochemical changes associates with reduce tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 765-771.
- Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. G. Lilburn. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag. New York, NY, USA.
- Jarvis, B. D. W., P. Van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernández, J. C. Cleyet-Marel, and M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 895-898.
- Jordan, D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Jourand, P., E. Giraud, G. Béna, A. Sy, A. Willems, M. Gillis, B. Dreyfus, and P. de Lajudie. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylophilic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2269-2273.
- Lin, D. X., E. T. Wang, H. Tang, T. X. Han, Y. R. He, S. H. Guan, and W. X. Chen. 2008. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1409-1413.
- Martínez-Scott, M. M., V. Hernández-Hernández, A. Palomo-Gil y J. Vásquez-Arroyo. 2002. Diversidad Genética de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del Noreste de México. *Rev. Chapingo serie Zonas Aridas* 3: 9-18.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948-950.
- Normand, P., B. Cournoyer, P. Simone, and S. Nazaret. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* 111: 119-124.
- Núñez E., R. 2001. Fertilidad de suelos. Área de Fertilidad. Edafología. IRENAT-CP. Montecillos, estado de México.
- Núñez-López, D., C. A. Muñoz-Robles, V. M. Reyes-Gómez, I. Velasco-Velasco y H. Gadsden-Esparza. 2007. Caracterización de la sequía a diversas escalas de tiempo en Chihuahua, México. *Agrociencia* 41: 253-262.
- Oldroyd, G. E. D and J. A. Downie. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with *Rhizobial* infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519-46.
- Reis, F. B., M. F. Silva, K. R. S. Teixeira, S. Urquiaga e V. M. Reis. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiaria* sp em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 28: 103-113.
- Rivas, R., E. Velázquez, A. Willems, N. Viscaino, N. S. Subba-Rao, P. F. Mateos, M. Gillis, F. B. Dazzo, and E. Martínez-Molina. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L. f.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5217-5222.
- Rivas, R., A. Willems, J. L. Palomo, P. Gracia-Benavides, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, M. Gillis, and E. Velásquez. 2004. *Brydzyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1271-1275.
- Silva, C. y P. Vinuesa. 2007. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los rizobios. *Ecol. Mol.* 11: 351-392.
- Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. García, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson, and B. Dreyfus. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.
- Tate III, R. L. 1995. *Soil microbiology*. John Wiley and Sons. New York, NY, USA.
- Thrall, P. H., D. A. Millsom, A. C. Jeavons, M. Waayers, G. R. Harvey, D. J. Bagnall, and J. Brockwell. 2005. Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. *J. Appl. Ecol.* 42: 740-751.
- Trinchant, J. C., J. J. Drevon, and J. Rigaud. 2001. Symbiotic nitrogen fixation. pp. 121-134. *In: J. F. MorotGaudry (ed.)*. Nitrogen assimilation by plants. Enfield, NH, USA.
- Trujillo, M. E., A. Willems, A. Abril, A. M. Planchuelo, R. Rivas, D. Ludeña, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, and E. Velázquez. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1318-1327.
- Urzúa, H. 2005. Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Cien. Inv. Agr.* 32: 133-150.
- Valverde A., E. Velázquez, F. Fernández-Santos, N. Vizcaino, R. Rivas, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, J. M. Igual, and A. Willems. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1985-1989.
- Vandamme, P. and T. Coenye. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2285-2289.
- Villegas, M. C. y A. Munive. 2005. Taxonomía y genética de la nodulación de los rhizobia, el grupo más importante de fijadores simbióticos de nitrógeno. *Biótica* 2: 55-106.
- Villegas, M. C., S. Rome, L. Mauré, O. Domergue, L. Gardan, X. Bailly, J. C. Cleyet-Marel, and B. Brunel, 2006. Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. medicaginis) of *S. meliloti*. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 526-538.

- Vincent, J. M. 1974. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. pp. 265-341. In: A. Quinspel (ed.). The biology of nitrogen fixation. North Holland Publ. Co. Amsterdam, Holanda.
- Walley, F., G. Clayton, Y. Gan, and G. Lafond. 2004. Performance of rhizobial inoculant formulations in the field. On line. Crop Management doi:10.1094/CM-2004-0301-03-RV.
- Wang, E. T. and E. Martínez-Romero. 2000. *Sesbania herbacea-Rhizobium huaatlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea* nodulating rhizobia in different environments. Microbial Ecol. 40: 25-32.
- Weir, B. S., S. J. Turner, W. B. Silvester, P. Duck-Chul, and J. M. Young. 2004. Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. App. Environ. Microbiol. 70: 5980-5987.
- Weir, B. S. 2011. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. (Consulta: marzo 13, 2011).
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada. 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. Int. J. System. Evol. Microbiol. 53: 1689-1695.
- Zahir, A. Z., H. Yasin, M. Naveed, M. Anjum, and M. Khalid. 2010. L-Tryptophan application enhances the effectiveness of *Rhizobium* inoculation for improving growth and yield of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek. Pak. J. Bot. 42: 1771-1780.
- Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a ross-system comparison. Environ. Microbiol. 5: 539-554.
- Zuberer, D. A. 1994. Recovery and enumeration of viable bacteria. pp. 119-144. In: R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, S. Smith, A. Tabatabai, A. Wollum, S. H. Mickelson, and J. M. Bigham (eds.). Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties. Soil Science Society of America. Madison, WS, USA.