

# ACTIVIDAD NITROGENASA, PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS, SIDERÓFOROS Y ANTIBIOSIS EN CEPAS DE *Azospirillum* Y *Klebsiella* AISLADAS DE MAÍZ Y TEOCINTLE

Nitrogenase Activity, Production of Phytohormones, Siderophores and Antibiosis in Strains of *Azospirillum* and *Klebsiella* Isolated from Maize and Teosintle

Moisés Graciano Carcaño-Montiel<sup>1†</sup>, Ronald Ferrera-Cerrato<sup>2</sup>, Jesús Pérez-Moreno<sup>2</sup>, José D. Molina-Galán<sup>2</sup> y Yoav Bashan<sup>3</sup>

## RESUMEN

Las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella*, conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, son fijadoras de nitrógeno y productoras de sustancias reguladoras del crecimiento, por lo que ejercen un efecto benéfico en las plantas con las cuales interactúan. Esta asociación microorganismo-planta puede mejorar el crecimiento de los cultivos a través de la combinación de fijación biológica de nitrógeno, producción de sustancias hormonales, incremento de la disponibilidad de los nutrientes del suelo y supresión de enfermedades, con un uso reducido de recursos no renovables. En el presente trabajo, se aislaron 43 cepas de *Azospirillum* spp. y 50 cepas de *Klebsiella* spp. de la rizosfera, rizoplaneo, raíz estéril, tallo y semillas de maíz y teocintle, las cuales presentaron una actividad de la enzima nitrogenasa mayor de 10 nanomoles de etileno por hora por mililitro. Todos los aislamientos sintetizaron diferentes proporciones de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Dos cepas de *Azospirillum* spp. (ATt3 y ATt26) y tres de *Klebsiella* spp. (KTt2, KMRz10-2 y KMR12b) presentaron antibiosis intragenérica. En adición, se encontró que la cepa KTt2 de *Klebsiella* inhibió a todas las cepas de *Azospirillum*. Se detectó la producción de sideróforos en 20 y 90% de las cepas estudiadas de *Azospirillum* y *Klebsiella*,

respectivamente. La presencia de bacterias en el suelo y en tejido interno de las plantas sugiere que las bacterias diazotrofas endofitas colonizan los tejidos de la planta, por lo que pueden ser potencialmente importantes para las especies anuales, como el maíz y teocintle, con varios efectos benéficos, como la promoción del crecimiento de la planta y el incremento de la resistencia contra patógenos de la planta.

**Palabras clave:** diazotrofos, sustancias hormonales, antagonismo, fijación de nitrógeno.

## SUMMARY

Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the genera *Azospirillum* and *Klebsiella* are able to fix nitrogen, produce plant growth-promoting compounds, increase availability of soil nutrients and, to some extent, influence control of plant diseases. Through the combination of these mechanisms, the association between PGPR and some crops can be beneficial for plants of agricultural importance, and therefore contribute to reducing the use of non-renewable resources. Forty-three and fifty strains of *Azospirillum* spp. and *Klebsiella* spp., respectively, were isolated from the rhizosphere, rhizoplane, sterile root, stem, and seeds of maize and teosinte. All of the studied isolations showed enzyme nitrogenase activity above 10 nanomoles of ethylene per hour per milliliter and synthesized plant growth regulators in different amounts. Two strains of *Azospirillum* spp. (ATt3 and ATt26), and three of *Klebsiella* spp. (KTt2, KMRz10-2, and KMR12b) presented intragenetic antibiosis. Additionally, it was found that the *Klebsiella* strain KTt2 was able to inhibit the growth of all the strains of *Azospirillum*. Siderophore production was detected in 20 and 90% of the studied *Azospirillum* spp. and *Klebsiella* spp. strains, respectively. The presence of bacteria in the soil and in

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Apdo. Postal 1622, 72000 Puebla, México.

<sup>†</sup> Autor responsable (mgcarca@siu.buap.mx)

<sup>2</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, 56230 Montecillo, estado de México.

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Apdo. Postal 128, 23000 La Paz, B.C.S., México.

the internal tissue of the plants suggest that these bacterial endophyte diazotrophs can colonize plant tissues and, therefore, are potentially important for annual species such as maize and teosinte, with several beneficial effects, such as promoting plant growth and increasing resistance against plant pathogens.

*Index words:* diazotrophs, hormonal substances, antagonism.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una demanda de producción de alimentos que utilice tecnologías menos contaminantes para el ambiente, la cual incluye reducción del uso de fertilizantes químicos y búsqueda de alternativas a través de microorganismos benéficos para las plantas. Las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella* son fijadoras de nitrógeno de vida libre que viven asociados con la rizosfera, caulosfera y filosfera de plantas de interés agrícola. Se ha demostrado que estas bacterias incrementan el desarrollo vegetal y promueven el rendimiento de cultivos en diferentes tipos de suelos y regiones edafoclimáticas (Haahtela *et al.*, 1990; Okon y Labandera-González, 1994). A pesar de que se conoce que *Azospirillum* y *Klebsiella* son microorganismos fijadores de nitrógeno, todavía no existe evidencia de que esta característica sea la única que determina el mejor desarrollo de las plantas. Las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, llamadas fitohormonas, como el ácido indol-3-acético y otros indoles de origen microbiano también pueden influir benéficamente en muchas plantas (Patten y Glick, 1996). Por esta razón, es más apropiado considerar a estos microorganismos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, categoría en la cual se incluyen los microorganismos que presentan la capacidad de producir fitohormonas, sideróforos y bacteriocinas.

La utilización biotecnológica de estos microorganismos benéficos requiere de su caracterización fisiológica previa, con la finalidad de seleccionar aquellas cepas con mayor potencial de uso en las plantas con las cuales se asocian. Dentro de los aspectos ecológicos y fisiológicos de *Azospirillum* y *Klebsiella* que han sido pobremente explicados se encuentran: i) su presencia y distribución en plantas de teocintle; ii) su capacidad antibiótica inter e intragenérica; y iii) su capacidad como productores de sideróforos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar fisiológicamente

43 cepas de *Azospirillum* y 50 cepas de *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle, evaluando la capacidad para la fijación biológica del nitrógeno a través de la actividad de la enzima nitrogenasa, la producción de ácido indol-3-acético e indoles relacionados, sideróforos y la actividad antibiótica inter e intragenérica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de plantas de maíz criollo arrocillo, cacahuacintle, negro y el híbrido H-30, en el ejido de San José Teacalco, localizado en el sureste del estado de Tlaxcala, a 19° 19' 38" N y 98° 03' 36" O, a una altitud de 2600 m) en las faldas de La Malinche, cuyos suelos se clasifican como Cambisoles crómicos. También se tomaron muestras de plantas de maíz criollo chalqueño y maíz silvestre (teocintle) raza Chalco en el municipio de San Juan Atenco, Puebla, localizado a 19° 20' 11" N y 97° 27' 04" O a 2440 m de altitud, en Andosoles de textura franco arenosa. Las plantas de maíz y teocintle se procesaron de acuerdo con la metodología descrita por Mascarúa-Esparza *et al.* (1988). Para la obtención de las bacterias del interior de raíz y tallo, las muestras se lavaron con agua destilada; luego se esterilizaron de forma superficial, mediante la inmersión en cloramina T a 1% durante 5 min. A continuación, las raíces y los tallos se enjuagaron con solución estéril reguladora de fosfatos 0.025 M, pH 6.8 y cinco lavados con agua destilada estéril. Después, la raíz y el tejido interno del tallo se trituraron con una licuadora estéril hasta formar una suspensión. Para el aislamiento a partir de semillas, éstas se esterilizaron superficialmente con cloramina T a 1% por 10 min. Posteriormente, se hicieron germinar en dos soportes estériles de Grow Mixture 2 y arena, humedecidos con agua destilada y solución nutritiva de Hoagland estériles (Kapulnik *et al.*, 1983). Las plántulas completas así obtenidas, de una semana de crecimiento en condiciones de esterilidad, la raíz y la parte aérea se cortaron en fragmentos y se trituraron hasta formar una suspensión. De las suspensiones de suelo de la rizosfera, raíz, tallo y semilla, se inocularon 100 µL en los medios de cultivo Nfb semigelificado y caldo MacConkey para *Azospirillum* spp. y *Klebsiella* spp., y se incubaron a 32 °C y 28 °C, respectivamente, de 48 a 72 h. La selección y purificación de las colonias típicas de *Azospirillum* spp. y *Klebsiella* spp. se hizo en agar rojo Congo para *Azospirillum* spp. (Rodríguez-Cáceres, 1982) y agar MacConkey para *Klebsiella* spp.

Se tomaron en cuenta las características morfológicas y fisiológicas típicas de cada género (Tarrand *et al.*, 1978; Dalton, 1980), confirmando con el ensayo de reducción de acetileno la presencia de *Azospirillum* (Hartmann, 1989) y de *Klebsiella*. Este último es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativo y con movilidad negativa que utiliza los carbohidratos: D-adonitol, lactosa, *myo*-inositol y sacarosa (Holt *et al.*, 1994).

La actividad de la enzima nitrogenasa se determinó en los cultivos por el método de actividad reductora de acetileno (ARA). Para *Azospirillum* spp. se utilizó el medio de cultivo Nfb semigelificado (Mascarúa-Esparza *et al.*, 1988) y para *Klebsiella* spp. el medio líquido de Hino y Wilson's con 48 h de incubación (Dalton, 1980). Se substituyó en los medios de cultivo Nfb semigelificado e Hino y Wilson 12% y 35% v/v de espacio gaseoso de aire por gas acetileno; cada cepa se ensayó por triplicado. Para cuantificar el etileno formado, se empleó un cromatógrafo de gases Varian Modelo 3700 con detector de ionización de flama y columnas de 2 m x 3.17 mm (1/8") y soporte tipo poropak N de 80 a 100 mallas (Mascarúa-Esparza *et al.*, 1988). De las aproximadamente 200 cepas aisladas, en el presente trabajo, sólo se consideran aquéllas que presentaron una actividad de la enzima nitrogenasa mayor de 10 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, excepto la cepa AMS02 que tuvo 8.62 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, pero una considerable producción de indoles totales de 39.11 µg mL<sup>-1</sup>.

Las cepas de *Azospirillum* spp. y *Klebsiella* spp. se propagaron en el medio de cultivo con base en sales minerales, ácido succínico, fructosa y triptófano (SFS) y se analizó la producción de AIA e indoles relacionados con el método de Salkowski (Jain y Patriquin, 1985). De cada cepa con 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colonias por mililitro), se inoculó 1.0 mL de cultivo bacteriano al medio SFS. Los cultivos se mantuvieron a 30 °C, durante 96 h en agitación a 220 rpm y se centrifugaron a 9500 g por 15 min a 4 °C. El AIA y los indoles se extrajeron del sobrenadante con acetato de etilo, el cual se evaporó a sequedad al vacío a 37 °C, resuspendido el residuo con 1.0 mL de metanol. La determinación cuantitativa de AIA e indoles se realizó con el reactivo de Salkowski, en un espectrofotómetro Varian modelo DMS 90 a 535 nm (Tien *et al.*, 1979; Hartmann *et al.*, 1983).

Para las pruebas de antibiosis, se utilizó el procedimiento de doble capa de medio de cultivo descrito por Tapia-Hernández *et al.* (1990). Las 43 cepas de *Azospirillum* spp. y las 50 cepas de *Klebsiella* spp.

se propagaron en el medio líquido Nfb y caldo nutritivo, respectivamente, y se incubaron a 32 °C por 18 h. De cada cepa se inocularon 10 µL de cultivo bacteriano con 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> a placas Petri con el medio de cultivo para detectar antibiosis, utilizando un multiinoculador de Steers. Después de 48 h de incubación, el crecimiento se removió con un portaobjetos por deslizamiento sobre las colonias. El remanente de células se trató por inversión de la placa Petri sobre vapores de cloroformo por 30 min; el residuo de cloroformo se evaporó en condiciones de esterilidad. Las cepas indicadoras de antagonismo se propagaron en las mismas condiciones que las cepas anteriores, pero se incubaron por 48 h; 0.1 mL (10<sup>6</sup> UFC) de estos cultivos se mezclaron con 4.9 mL del medio de cultivo y se vertieron uniformemente sobre la capa de agar. Las zonas de inhibición alrededor de las colonias bacterianas muertas después de 18 h se consideraron indicadoras de antagonismo entre ellas. Se realizaron las combinaciones: i) *Azospirillum* spp. versus *Azospirillum* spp.; ii) *Azospirillum* spp. versus *Klebsiella* spp.; iii) *Klebsiella* spp. versus *Klebsiella* spp.; y iv) *Klebsiella* spp. versus *Azospirillum* spp.

Las 43 cepas de *Azospirillum* spp. y las 50 cepas de *Klebsiella* spp. se propagaron en el medio de cultivo peptona-succinato-sales (PSS), adicionado de biotina y piridoxal en una concentración de 2 mg mL<sup>-1</sup> (1 mL L<sup>-1</sup>) y tiamina 0.04 mg mL<sup>-1</sup> (1 mL L<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron a 32 °C durante 24 h en agitación a 220 rpm. Se inocularon 10 µL de cultivo bacteriano con 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> en cajas Petri, con el medio cromo azul S (CAS), utilizando el multiinoculador de Steer. Las cajas Petri se incubaron a 32 °C durante siete días, tomando lecturas cada 24 h. Se utilizó como testigo negativo la cepa Cd (ATCC 29729) de *Azospirillum brasilense*, la prueba positiva para la producción de sideróforos fue el vire del medio de azul a anaranjado (Neilands y Leong, 1986; Alexander y Zuberer, 1991).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 43 cepas de *Azospirillum* spp., de las cuales 22 procedieron de plantas de maíz (Cuadro 1) y 21 de las plantas de teocintle (Cuadro 2). En ambos casos, la mayor proporción de cepas, 45% y 52%, se aislaron de la rizosfera de maíz y teocintle, respectivamente, y, en menor proporción, del rizoplano, raíz estéril y tallo de ambas plantas. Fue interesante observar que una proporción importante provino de semillas de dichas plantas, con 32% y 19%,

**Cuadro 1. Actividad nitrogenasa, producción de indoles totales, procedencia geográfica y planta de aislamiento de las cepas estudiadas de *Azospirillum* spp.**

Clave de la cepa <sup>†</sup>	Planta de origen	Procedencia geográfica <sup>†</sup>	Actividad nitrogenasa <sup>§</sup>	Indoles totales <sup>#</sup>
			nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>
AMRz1	Maíz criollo	Puebla	70.08 ± 7.41 a	21.22 ± 10.48 defg
AMRz2	Maíz criollo	Puebla	42.23 ± 13.11 abcde	41.55 ± 12.71 ab
AMRz3	Maíz criollo	Puebla	39.46 ± 2.68 bcde	23.55 ± 4.87 defg
AMRz4	Maíz criollo	Puebla	66.59 ± 4.22 ab	31.44 ± 3.12 bcde
AMRz5	Maíz criollo	Puebla	56.59 ± 3.88 abcd	24.33 ± 2.91 defg
AMRz6	Maíz criollo	Puebla	58.13 ± 5.39 abc	22.11 ± 2.84 defg
AMRz10	Cacahuacintle	Tlaxcala	50.69 ± 3.95 abcd	24.00 ± 2.78 defg
AMRz10a	Cacahuacintle	Tlaxcala	29.62 ± 20.63 def	19.66 ± 3.08 efghi
AMRz11	Cacahuacintle	Tlaxcala	55.68 ± 1.10 abcd	22.55 ± 12.38 defg
AMRz16	Negro	Tlaxcala	39.06 ± 20.83 bcde	2.00 ± 0.00 j
AMRp10	Maíz criollo	Tlaxcala	54.35 ± 13.72 abcd	49.66 ± 10.01 a
AMR3	Maíz criollo	Puebla	47.00 ± 2.04 abcde	26.22 ± 5.10 cdefg
AMR7	Maíz criollo	Tlaxcala	57.02 ± 4.29 abcd	29.33 ± 3.87 bcdef
AMR12	H-30	Tlaxcala	44.08 ± 5.48 abcde	31.44 ± 3.97 bcde
AMR13	H-30	Tlaxcala	44.24 ± 15.75 abcde	26.77 ± 5.73 cdefg
AMS01	Maíz criollo	Puebla	62.33 ± 1.85 abc	32.55 ± 10.03 bcd
AMS02	Maíz criollo	Puebla	8.62 ± 1.63 f	39.11 ± 20.52 abc
AMS03	Maíz criollo	Puebla	51.70 ± 4.16 abcd	8.44 ± 1.81 ij
AMS04	Maíz criollo	Puebla	56.71 ± 6.21 abcd	9.22 ± 1.39 hij
AMS05	Maíz criollo	Puebla	38.14 ± 2.55 cde	16.33 ± 2.39 ghi
AMS07	Maíz criollo	Puebla	36.72 ± 10.11 cde	16.77 ± 4.99 fghi
AMS10	Maíz criollo	Puebla	19.46 ± 2.74 ef	14.66 ± 1.80 ghij

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

<sup>†</sup> A = *Azospirillum*; M = maíz; Rz = rizosfera; Rp = rizoplano; R = raíz estéril; S = semilla; <sup>†</sup> San Juan Atenco, Puebla; San José Teacalco, Tlaxcala; <sup>§</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3; <sup>#</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3 con tres lecturas de cada una.

respectivamente. En el caso de *Klebsiella* spp. se aislaron 50 cepas, de las cuales 33 (66%) procedieron de plantas de maíz (Cuadro 3). Se aislaron 17 cepas de *Klebsiella* spp. de teocintle (Cuadro 4); cuatro procedieron de rizosfera, dos de raíz estéril y 11 de tallo.

*Azospirillum* y *Klebsiella* poseen una amplia distribución en la naturaleza (Haahtela, 1985; Roper y Ladha, 1995). Por lo que el relativamente alto número de cepas aisladas de la rizosfera, rizoplano, raíz, tallo y semilla de maíz y teocintle no resulta sorprendente. Durante los últimos años, diversas bacterias diazotróficas incluidas en los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Aquaspirillum*, se han aislado de la rizosfera o del rizoplano de una gran variedad de plantas no leguminosas (Döbereiner, 1992; Roper y Ladha, 1995; Volkogon *et al.*, 1995; Kirchhof *et al.*, 1997). En el caso específico de maíz, existen múltiples reportes de la presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno en su rizosfera y caulosfera (Fisher *et al.*, 1992; Palus

*et al.*, 1996). Esta situación es contrastante con la que ocurre en teocintle (planta ancestro del maíz de enorme importancia, desde el punto de vista genético, para el maíz), del cual los reportes son escasos (Ruschel y Da Silva, 1981). Así, el presente estudio constituye uno de los pocos registros del aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno en teocintle (Palus *et al.*, 1996; Triplett, 1996). Es importante hacer notar que en algunas muestras no se aislaron bacterias, lo cual pudo deberse a que *Azospirillum* y *Klebsiella* representaron sólo una pequeña proporción de la población bacteriana total de la rizosfera de las plantas, o a la poca selectividad de los medios, ya que en los medios usados creció una gran cantidad de microorganismos, algunos de los cuales crecen más rápido que *Azospirillum* y *Klebsiella*, limitando así el desarrollo de éstas. En este sentido, es de interés mencionar que, al parecer, éste constituye el primer registro de la presencia de *Klebsiella* como endófito de plantas de teocintle. En *Azospirillum* ya se había

**Cuadro 2. Actividad nitrogenasa y producción de indoles totales en 21 cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de plantas de teocintle de la raza Chalco.**

Cepa <sup>†</sup>	Actividad nitrogenasa <sup>†</sup>	Indoles totales <sup>§</sup>
	nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>
ATRz1	49.67 ± 12.87 bc	21.88 ± 5.88 de
ATRz2	41.50 ± 6.41 bcd	15.22 ± 1.20 fgh
ATRz3	14.57 ± 5.82 g	13.77 ± 1.71 gh
ATRz10	49.88 ± 12.40 bc	11.44 ± 1.22 h
ATRz10a	51.14 ± 3.13 bc	26.00 ± 1.41 cd
ATRz11	38.88 ± 8.75 bcde	41.22 ± 7.24 a
ATRz13	53.08 ± 4.32 bc	2.00 ± 0.00 I
ATRz16	78.22 ± 4.70 a	21.11 ± 3.62 def
ATRz18	76.58 ± 7.22 a	28.88 ± 4.98 bc
ATRz19	42.03 ± 6.35 bcd	32.33 ± 2.64 b
ATRz20	35.40 ± 0.39 bcdefg	14.00 ± 1.00 gh
ATR08	17.70 ± 1.90 fg	16.88 ± 3.44 efg
ATR20	33.42 ± 1.66 cdefg	16.66 ± 2.64 efg
ATt1	44.71 ± 4.68 bcd	18.33 ± 2.00 efg
ATt3	40.22 ± 4.94 bcde	16.88 ± 5.66 efg
ATt5	54.64 ± 11.63 b	33.00 ± 4.35 b
ATt26	20.14 ± 2.04 efg	13.77 ± 3.96 gh
ATS01	37.63 ± 11.40 bcdef	26.00 ± 2.64 cd
ATS02	28.40 ± 1.65 defg	20.55 ± 2.78 def
ATS03	17.01 ± 1.74 fg	21.66 ± 3.16 de
ATS04	16.36 ± 1.67 g	46.44 ± 3.24 a

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

<sup>†</sup> A = *Azospirillum*; T = teocintle; Rz = rizosfera; R = raíz estéril; t = tallo; S = semilla. <sup>‡</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3; <sup>§</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3 con tres lecturas de cada una.

reportado previamente (Rao y Venkateswarlu, 1988; Volkogon *et al.*, 1995) como endófito en semillas de maíz; en el presente trabajo, se reporta por primera vez en semillas de teocintle. A pesar de que la función que pueden tener estas bacterias diazótrofes en dichas áreas no está totalmente entendida, la colonización interna de las plantas por dichas bacterias endófitas podría estar relacionada con efectos benéficos para las plantas, como la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Cocking, 2003) y sustancias antibióticas, en las cuales las bacterias endófitas interactúan con patógenos o estimulan una resistencia sistémica de las plantas (Hallmann *et al.*, 1997; Kirchhof *et al.*, 1997).

#### Actividad de la Enzima Nitrogenasa

La actividad nitrogenasa de las 22 cepas de *Azospirillum* aisladas de maíz varió de 8.62 a 70.08

nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> y se encontraron diferencias significativas entre las cepas aisladas (Cuadro 1). Estos valores extremos se presentaron en la cepa AMS02, aislada de semilla, y la cepa AMRz1, aislada de la rizosfera, respectivamente. En las 33 cepas de *Klebsiella* spp., aisladas de las plantas de maíz de las dos zonas de muestreo (Cuadro 3), la actividad nitrogenasa mostró valores de 42.0 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, en la cepa KMRz2d, a 122.46 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, en la cepa KMR11-3.

#### Producción de Indoles Totales

En relación con la producción de indoles totales en *Azospirillum*, se encontraron valores que variaron desde 2 hasta 49.66 µg mL<sup>-1</sup>, en las cepas AMRz16 y AMRp10, respectivamente; se observó que todas las cepas con actividad nitrogenasa también produjeron indoles (Cuadro 1). En el caso de indoles totales, los valores registrados variaron de 9.11 µg mL<sup>-1</sup>, en la cepa KMT14, a 40.55 µg mL<sup>-1</sup>, en la cepa KMT10-2. Se observaron diferencias estadísticas entre las cepas, tanto en fijación de nitrógeno, como en producción de indoles totales, independientemente de su origen, sin encontrar relación. Por ejemplo, la cepa KMRz2d de *Klebsiella* spp. presentó alta actividad de la enzima nitrogenasa (122.46 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>) y baja producción de indoles totales (26.55 µg mL<sup>-1</sup>).

La actividad nitrogenasa en las 21 cepas de *Azospirillum* aisladas de teocintle varió de 14.57 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, en la cepa ATRz3, a 78.22 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, en la cepa ATRz16 (Cuadro 2). Al evaluar la producción de indoles totales en estas cepas, se halló un valor de 2.0 µg mL<sup>-1</sup>, en la cepa ATRz13, y de 46.44 µg mL<sup>-1</sup>, en la cepa ATS04, aislada de semilla. En 17 cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de plantas de teocintle (Cuadro 4), se encontró una actividad de la enzima nitrogenasa mínima de 24.07 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, en la cepa KTt1a, aislada de tallo y un valor máximo de 110 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, en la cepa KTt1g. En la producción de indoles (Cuadro 4), el valor más bajo (2.22 µg mL<sup>-1</sup>) correspondió a la cepa KTt2, mientras que el valor máximo (42.33 µg mL<sup>-1</sup>) se obtuvo con la cepa KTRz4, la cual no presentó actividad de la enzima nitrogenasa.

Los cereales y pastos forrajeros de importancia agrícola han sido objeto de numerosos estudios sobre fijación de nitrógeno asociativa como una fuente del elemento en la agricultura. Hasta hoy este tema es

**Cuadro 3. Actividad nitrogenasa, producción de indoles totales, procedencia geográfica y plantas de origen de las cepas estudiadas de *Klebsiella* spp.**

Clave de la cepa <sup>†</sup>	Planta de origen	Procedencia geográfica <sup>†</sup>	Actividad nitrogenasa <sup>§</sup>	Indoles totales <sup>#</sup>
			nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>
KMRz2d	Maíz criollo	Puebla	42.00 ± 8.92 g	13.33 ± 1.00 fghi
KMRz3a	Maíz criollo	Puebla	91.82 ± 7.95 abcdef	14.44 ± 0.88 efghi
KMRz3b	Maíz criollo	Puebla	106.04 ± 11.02 abcde	12.77 ± 1.20 fghi
KMRz4d	Maíz criollo	Puebla	60.98 ± 26.26 efg	14.88 ± 2.93 efghi
KMRz10-2	Cacahuacintle	Tlaxcala	112.41 ± 11.87 abc	21.33 ± 2.44 cdefg
KMRz11-4	Cacahuacintle	Tlaxcala	89.67 ± 7.03 abcdefg	11.33 ± 1.65 ghi
KMRz12b	H-30	Tlaxcala	105.88 ± 5.93 abcde	22.77 ± 2.68 bcdef
KMRz13	H-30	Tlaxcala	73.34 ± 10.28 bcdefg	11.88 ± 3.05 ghi
KMRz13a	H-30	Tlaxcala	84.53 ± 10.85 abcdefg	20.77 ± 4.60 cdefgh
KMR1a	Maíz criollo	Puebla	62.36 ± 8.35 defg	19.00 ± 6.57 defghi
KMR2d	Maíz criollo	Puebla	66.11 ± 6.48 cdefg	13.00 ± 1.22 fghi
KMR3c	Maíz criollo	Puebla	89.53 ± 7.83 abcdefg	10.66 ± 1.87 hi
KMR10-3	Cacahuacintle	Tlaxcala	73.06 ± 7.32 bcdefg	11.88 ± 1.90 ghi
KMR11-1	Cacahuacintle	Tlaxcala	92.43 ± 30.83 abcdef	22.88 ± 2.71 bcdef
KMR11-3	Cacahuacintle	Tlaxcala	122.46 ± 29.40 a	26.55 ± 3.77 bcd
KMR12a	H-30	Tlaxcala	90.16 ± 25.86 abcdef	16.77 ± 2.10 defghi
KMR12b	H-30	Tlaxcala	107.94 ± 22.45 abcde	20.22 ± 4.14 defghi
KMR13a	H-30	Tlaxcala	91.31 ± 9.20 abcdef	29.66 ± 4.60 bc
KMR13d	H-30	Tlaxcala	65.00 ± 20.06 cdefg	12.66 ± 2.06 fghi
KMR14b	Negro	Tlaxcala	93.74 ± 4.30 abcdef	13.66 ± 2.69 efghi
KMR14c	Negro	Tlaxcala	89.31 ± 0.12 abcdefg	20.55 ± 1.33 cdefgh
KMT1b	Maíz criollo	Puebla	48.00 ± 9.76 bcdefg	10.77 ± 1.39 hi
KMT2c	Maíz criollo	Puebla	71.81 ± 6.02 bcdefg	19.00 ± 1.58 defghi
KMT4a	Maíz criollo	Puebla	72.52 ± 7.68 bcdefg	10.88 ± 1.53 hi
KMT4c	Maíz criollo	Puebla	110.87 ± 20.92 abc	11.00 ± 2.34 hi
KMT10-2	Cacahuacintle	Tlaxcala	75.70 ± 0.52 abcdefg	40.55 ± 18.80 a
KMT11-1	Cacahuacintle	Tlaxcala	109.38 ± 29.16 abcd	23.66 ± 7.79 bcde
KMT11-2	Cacahuacintle	Tlaxcala	65.32 ± 21.18 cdefg	18.22 ± 4.94 defghi
KMT12b	H-30	Tlaxcala	117.02 ± 25.76 ab	13.66 ± 2.95 efghi
KMT13a	H-30	Tlaxcala	49.89 ± 8.71 fg	19.66 ± 1.14 cdefgh
KMT13c	H-30	Tlaxcala	95.71 ± 12.96 abcdef	12.88 ± 1.61 fghi
KMT14	Negro	Tlaxcala	69.79 ± 6.10 bcdefg	9.11 ± 1.16 i
Kpue2Rz	Maíz criollo	Puebla	69.16 ± 5.87 cdefg	32.44 ± 5.36 ab

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

<sup>†</sup> K = *Klebsiella*; M = maíz; Rz = rizosfera; R = raíz estéril; T = tallo; <sup>†</sup> San Juan Atenco, Puebla; San José Teacalco, Tlaxcala; <sup>§</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3; <sup>#</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3 con tres lecturas de cada una.

controversial, debido, en parte, a las limitaciones percibidas en los métodos usados para estimar cuantitativamente la fijación (Boddey, 1987). Es importante reconocer que la medición de la actividad de la enzima nitrogenasa, mediante la técnica de reducción de acetileno, demuestra la existencia de la fijación de nitrógeno, pero no es una medida de la incorporación de nitrógeno fijado en la planta, y las proporciones no pueden ser fácilmente o con precisión extrapoladas para

obtener las estimaciones cuantitativas del nitrógeno fijado. Sin embargo, a pesar de su limitación para medir cuantitativamente los valores exactos del nitrógeno fijado, el ensayo de reducción de acetileno es sumamente útil para la selección de bacterias diazótroficas y especies o variedades para usarse como plantas de referencia (Boddey y Victoria, 1986). La distribución de microorganismos fijadores de nitrógeno, aunque no está completamente dictada por la disponibilidad de nitrógeno

**Cuadro 4. Actividad nitrogenasa y producción de indoles totales en 17 cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de plantas de teocintle de la raza Chalco.**

Cepa <sup>†</sup>	Actividad nitrogenasa <sup>‡</sup>	Indoles totales <sup>§</sup>
	nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>
KTRz1g	38.41 ± 0.75 cde	35.44 ± 21.77 abc
KTRz3-2	76.21 ± 20.80 abcd	33.11 ± 10.69 abc
KTRz3-3	53.38 ± 45.09 bcde	29.33 ± 2.34 bcd
KTRz4	N.D.	42.33 ± 7.95 a
KTR3-2	80.45 ± 13.86 abc	39.55 ± 11.79 ab
KTR4	68.35 ± 12.86 abcde	24.77 ± 0.97 cde
KTt1	101.17 ± 5.50 ab	13.66 ± 1.80 efg
KTt1a	24.07 ± 5.95 e	15.22 ± 1.39 ef
KTt1d	70.48 ± 15.18 abcde	12.00 ± 1.87 fg
KTt1f	72.73 ± 24.65 abcde	19.11 ± 2.02 def
KTt1g	110.84 ± 5.60 a	15.66 ± 1.80 ef
KTt1i	26.43 ± 4.39 de	13.44 ± 1.94 efg
KTt2	37.93 ± 5.91 cde	2.22 ± 0.44 g
KTt3	99.75 ± 21.58 ab	9.88 ± 2.14 fg
KTt3-2	85.72 ± 13.99 abc	13.33 ± 1.11 efg
KTt3-4	81.11 ± 14.01 abc	17.00 ± 2.78 ef
KTt4	64.05 ± 11.12 abcde	11.88 ± 2.89 fg

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

<sup>†</sup> K= *Klebsiella*; T= teocintle; Rz= rizosfera; R= raíz estéril; t= tallo.  
<sup>‡</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3; <sup>§</sup> valores promedio ± desviación estándar, n = 3 con tres lecturas de cada una. N.D. = no detectada.

en el ambiente, es aleatoria y puede predecirse con base en las características del hábitat (Zehr *et al.*, 2003).

Aunque, originalmente, se sugirió que el mecanismo de acción de *Azospirillum* para promover el crecimiento de las plantas era su habilidad para fijar el nitrógeno atmosférico, en la actualidad se han propuesto mecanismos alternativos, como la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. La fitohormona más importante producida por *Azospirillum* y *Klebsiella* es la auxina (AIA), la cual causa cambios morfológicos en la raíz y, además, se ha relacionado con la absorción de minerales (El-Khawas y Adachi, 1999; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). La producción de auxinas varía entre especies y cepas del género *Azospirillum* y es afectada por las condiciones de cultivo, la etapa de crecimiento, la disponibilidad de sustratos y las diferentes vías biosintéticas de producción de auxinas. Estudios *in vitro* han demostrado que algunos cultivos microbianos pueden producir pequeñas cantidades de AIA, en ausencia de un precursor fisiológico. Sin embargo, en presencia de triptófano, la microbiota muchas veces libera gran cantidad de AIA y sus derivados (Frankenberger y Arshad, 1995).

Varios estudios han demostrado la producción *in vitro* de AIA y otras hormonas fisiológicamente activas derivadas del triptófano, como una característica de las cepas de *Azospirillum brasilense* (Tien *et al.*, 1979; Jain y Patriquin, 1985). Existen diferencias entre especies y cepas de *Azospirillum* en su capacidad para sintetizar AIA en medio de cultivo. Esta capacidad depende de las condiciones del cultivo; por ejemplo, de la etapa de crecimiento, la constitución genética y la concentración del sustrato (Fallik *et al.*, 1989). En adición, se ha observado que la cantidad de oxígeno y la limitación de nitrógeno, condiciones ampliamente distribuidas en el suelo, elevan la producción de AIA y la fijación de nitrógeno (Frankenberger y Arshad, 1995). Los análisis con cromatografía de líquidos (HPLC) han revelado que la producción de AIA en cepas de *A. lipoferum* puede variar de 0.04 a 4.1 µg mL<sup>-1</sup> y en *A. brasilense* de 0.01 a 4.5 µg mL<sup>-1</sup> (Crozier *et al.*, 1988). Por su parte, Khalid *et al.* (2004), realizando un análisis colorimétrico de auxinas en diferentes rizobacterias aisladas, encontraron una gran variación en su eficiencia para producir auxinas en medio de cultivo, en presencia y ausencia del aminoácido triptófano.

En las bacterias entéricas, como *Klebsiella*, se ha demostrado con el método de dilución de <sup>15</sup>N que el nitrógeno se fija y transfiere a la planta, lo cual aumenta el rendimiento de materia seca y el contenido de nitrógeno (Haahtela *et al.*, 1988). Haahtela *et al.* (1990) encontraron que *Klebsiella*, además de fijar nitrógeno, es capaz de adherirse y colonizar las raíces de pastos y que su colonización induce alteración en la morfología de la raíz, aumentando el número de pelos radicales debido a la producción de sustancias bioactivas del tipo de las auxinas en 80% de las cepas aisladas. Asimismo, Mascarúa-Esparza *et al.* (1988) encontraron resultados similares a los reportados en el presente trabajo, en cuanto a la reducción de acetileno y producción de indoles totales en cepas de *Azospirillum* aisladas de cactáceas. En *Klebsiella*, Haahtela *et al.* (1990) al hacer un estudio comparativo en la producción de fitohormonas, en cepas de origen clínico y agrícola, mediante la técnica de cromatografía en capa fina, se detectó que el ácido indol-3-acético se produce en diferentes concentraciones por ambos grupos de aislados.

#### **Antibiosis *in vitro* entre *Azospirillum* spp. y *Klebsiella* spp.**

La evaluación de la antibiosis entre 43 cepas de *Azospirillum* spp. y 50 de *Klebsiella* spp. mostró que

las cepas ATt3 y ATt26, de *Azospirillum* (Cuadro 5), presentaron antibiosis hacia cepas del mismo género.

El mismo efecto ocurrió con las cepas KTt2, KMRz10-2 y KMR12b, de *Klebsiella* (Cuadro 6), donde se encontró que la cepa KTt2, de *Klebsiella*, aislada de teocintle, presentó, además de su autoinhibición, la inhibición de todas las cepas de *Azospirillum*. Cuando se enfrentaron cepas de *Azospirillum* contra *Klebsiella* spp., no se observó ningún efecto.

A pesar de que *Azospirillum* no se ha considerado tradicionalmente como un agente directo de control biológico contra patógenos del suelo (Bashan y Holguin, 1997), se le podría considerar como un agente indirecto, dado que produce bacteriocinas y sideróforos que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas. Los extractos de sideróforos purificados de *Azospirillum lipoferum* mostraron actividad bactericida y fungicida al inhibir la esporulación (Shah *et al.*, 1992).

Por su parte, Tapia-Hernández *et al.* (1990) encontraron que 27 cepas de *Azospirillum* producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de varias cepas del mismo género. Oliveira y Drozdowicz (1981) encontraron que 16 de 24 cepas de *Azospirillum lipoferum* y 10 de 21 cepas de *Azospirillum brasilense* mostraron la capacidad de producir bacteriocinas, las

cuales inhibieron el crecimiento de las cepas de enterobacterias, estreptococci y bacterias Gram negativas no identificadas. Por esta razón, dichos autores consideraron que *Azospirillum* puede jugar un importante papel adicional en la composición de la microbiota de la rizosfera. De Freitas y Fredrickson (1978) mostraron, a través de modelos simples de crecimiento, que dos poblaciones compiten por un solo nutrimento y pueden coexistir si al menos una de las poblaciones produce un autoinhibidor. Sus resultados mostraron que la producción de autoinhibidores juega un papel importante en el mantenimiento de diversas especies de diferentes ecosistemas microbianos. Lo anterior corrobora los datos obtenidos, ya que la cepa KTt2, de *Klebsiella*, inhibió a 42 cepas de las 50 aisladas del mismo género y a las 43 cepas de *Azospirillum*.

Se ha demostrado que *Azospirillum* produce ácido fenil acético, una molécula tipo auxina con actividad antagónica "in vitro" hacia bacterias Gram negativas como *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* y *E. coli*, así como actividad antifúngica contra *Alternaria brassicola*, *Fusarium oxysporum* y *Neurospora crassa*. Sin embargo, se desconoce la significancia ecológica del ácido fenil acético producido por *Azospirillum brasilense* (Somers *et al.*, 2005).

**Cuadro 5. Cepas de *Azospirillum* spp. causantes de antibiosis sobre cepas del mismo género.**

Cepas causantes de antibiosis	Cepas sensibles a antibiosis con halo de inhibición menor de 1 cm	Cepas sensibles a antibiosis con halo de inhibición mayor de 1 cm
ATt3		ATRz2, ATRz10a, ATRz11, ATRz18, AMRz2
ATt26	AMRz10a, AMR3, AMR13	ATRz16, ATS04, AMRz16, AMR12

A = *Azospirillum*; T = teocintle; t = tallo; M = maíz; Rz = rizosfera; R = raíz estéril; S = semilla.

**Cuadro 6. Cepas de *Klebsiella* spp. causantes de antibiosis sobre cepas del mismo género.**

Cepas causantes de antibiosis	Cepas sensibles a antibiosis con halo de inhibición menor de 1 cm	Cepas sensibles a antibiosis con halo de inhibición mayor de 1 cm
KTt2	KTRz1g, KTRz3-2, KTRz3-3, KTRz4, KTR3-2, KTR4, KTt1, KTt1a, KTt1d, KTt1f, KTt1g, KTt1i, KTt2, KTt3, KTt3-2, KTt3-4, KMRz2d, KMRz3a, KMRz3b, KMRz4d, KMRz10-2, KMRz11-4, KMRz12b, KMR1a, KMR2d, KMR3c, KMR11-1, KMR11-3, KMR12a, KMR12b, KMT1b, KMT2c, KMT4a, KMT4c, KMT10-2, KMT11-1, KMT11-2	KTt4, KMR10-3, KMR13a, KMT12b, KMT13c
KMRz10-2	KTRz1g, KTt3, KTt4, KMRz3b, KMR1a, KMR10-3, KMR13d, KMT1b, KMT4a, KMT12b, KMT13a, KMT13c	
KMR12b	KMRz4d	

K = *Klebsiella*; T = teocintle; t = tallo; M = maíz; Rz = rizosfera; R = raíz estéril.

## Detección de Sideróforos

Uno de los mecanismos por medio de los cuales puede presentarse antibiosis es la producción de sideróforos, sustancias orgánicas de bajo peso molecular, con alta afinidad a  $Fe^{3+}$ . Los sideróforos son producidos por microorganismos y plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, pero ellos difieren en su eficiencia de producción (Neilands y Leong, 1986). Los sideróforos quelatan al ion férrico, en la rizosfera, y puede originar la inhibición del crecimiento de otros microorganismos, incluyendo microorganismos patogénicos, cuya afinidad por el hierro es baja. La competencia por el hierro es probablemente más importante en la rizosfera que en el resto del suelo. Glick y Bashan (1997) mencionan que la producción de sideróforos por bacterias inhibe a patógenos de plantas *in vitro* y también promueve el crecimiento de plantas en el suelo. La habilidad de los sideróforos para actuar como agentes efectivos supresores de enfermedades es afectada por el tipo de planta, la especificidad del fitopatógeno a suprimir, la composición del suelo y la bacteria que sintetiza el sideróforo. La capacidad de las bacterias del suelo de producir y utilizar los sideróforos puede conferir ventajas ecológicas en la colonización de la rizosfera y la superficie de las plantas.

Los resultados de la prueba con el medio CAS mostraron que 20% de las cepas en *Azospirillum* spp. y 90% de las cepas *Klebsiella* spp. presentaron producción de sideróforos. *Azospirillum* y otras rizobacterias como *Klebsiella* no son agentes de control biológico típicas, sin embargo, pueden considerarse como microorganismos rizocompetentes, capaces de multiplicarse para formar grandes poblaciones en determinadas condiciones o por preferencia de algunos sustratos, por lo que podrían desplazar a otros microorganismos, dentro de ellos a algunos patógenos y, en este proceso, reducir la severidad de la enfermedad y mejorar el crecimiento de la planta (Bashan y de-Bashan, 2002).

## CONCLUSIONES

- Se aislaron 43 cepas de *Azospirillum* spp. y 50 cepas de *Klebsiella* spp. de la rizosfera, rizoplano, raíz estéril, tallo y semilla de plantas de maíz y teocintle (maíz ancestral) y se observó que dichos microorganismos pueden vivir en el suelo y en las plantas como endófitos.

- Se demostró que las cepas aisladas de *Azospirillum* spp. y *Klebsiella* spp. secretan sustancias que regulan el crecimiento vegetal en diferentes concentraciones, las cuales dependen de la zona de aislamiento de la planta. En adición, se detectaron sideróforos en 20 y 90% de las cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella*, respectivamente. - Dentro de las 93 cepas estudiadas, las que presentaron: i) mayor producción de indoles totales fueron AMRp10 y ATS04; ii) mayor actividad nitrogenasa fueron KMRz10-2 y KMR11-3; y iii) mayor actividad antibiótica fueron KTt2 y ATt3. Debido a estas propiedades, estas cepas podrían tener un enorme potencial para usarse en la inoculación de plantas de maíz o de otros cultivos de interés agrícola.

## LITERATURA CITADA

- Alexander, B. D. y A. D. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fert. Soils* 12: 39-45.
- Bashan, Y. y L. E. de-Bashan. 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2637-2643.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relations: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
- Boddey, R. M. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation with Gramineae. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 209-266.
- Boddey, R. M. y R. L. Victoria. 1986. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* y *Paspalum* grasses using  $^{15}N$  labeled organic matter and fertilizer. *Plant Soil* 90: 265-292.
- Cocking, E. C. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252: 169-175.
- Crozier, A., P. Arruda, J. M. Jasmin, A. M. Monteiro y G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2833-2837.
- Dalton, H. 1980. The cultivation of diazotrophic microorganisms. pp. 13-64. *In*: F. J. Bergersen (ed.). *Methods for evaluation biological nitrogen fixation*. John Wiley. New York, NY, USA.
- De Freitas, M. y A. G. Fredrickson, 1978. Inhibition as a factor in the maintenance of the diversity of microbial ecosystems. *J. Gen. Microbiol.* 106: 307-320.
- Döbereiner, J. 1992. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* 13: 1-13.
- El-Khawas, H. y K. Adachi. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol. Fert. Soils* 28: 377-381.
- Fallik, E., Y. Okon, E. Epstein, A. Goldman y M. Fischer. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21: 147-153.
- Fisher, P. J., O. Petrini y S. H. M. Lappin. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.* 122: 299-305.

- Frankenberger Jr., W. T. y M. Arshad. 1995. Phytohormones in soils: microbial production and function. Marcel Dekker. New York, NY, USA.
- Glick, B. R. y Y. Bashan. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotech. Adv.* 15: 353-378.
- Haahtela, K. 1985. Nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated cold-climate species of *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* growing at various temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 211-214.
- Haahtela, K., T. Laakso, E. L. Nurmiaho-Lassila y T. K. Korhonen. 1988. Effects of inoculation of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* with root-associated, N<sub>2</sub>-fixing *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Azospirillum*. *Plant Soil* 106: 239-248.
- Haahtela, K., R. Ronkko, T. Laakso, P. H. Williams y T. K. Korhonen. 1990. Root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* in *Poa pratensis*: characterization of an iron-scavenging system and a substance stimulating root hair production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 358-365.
- Hallmann, J., A. Quadt-Hallman, W. F. Mahaffee y J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Hartmann, A. 1989. Ecophysiological aspects of growth and fixation in *Azospirillum* spp. pp. 123-136. In: F. A. Skinner, R. M. Boddey e I. Fendrik (eds.). Nitrogen fixation with non-legumes. Kluwer Academic Publishers. London, UK.
- Hartmann, A., M. Singh y W. Klingmuller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants, excreting high amounts of indolacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley y S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth edition. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, MD, USA.
- Jain, D. K. y D. G. Patriquin. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.
- Kapulnik, Y., R. Gafny y Y. Okon. 1983. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO<sub>3</sub> uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hidroponic systems. *Can. J. Bot.* 63: 627-631.
- Khalid, A., M. Arshad y Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.
- Kirchhof, G., V. M. Reis, J. I. Baldani, B. Eckert, J. Döbereiner y A. Hartman. 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant Soil* 194: 45-55.
- Mascarúa-Esparza, M. A., R. Villa-González y J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. *Plant Soil* 106: 91-95.
- Neilands, J. B. y S. A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 187-208.
- Okon, Y. y C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world wide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Oliveira, R. G. B. y A. Drozdowicz. 1981. Bacteriocins in the genus *Azospirillum*. *Rev. Microbiol.* 12: 42-46.
- Palus, J. A., J. Borneman, P. W. Ludden y E. W. Triplett. 1996. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. *Plant Soil* 42: 207-220.
- Patten, Ch. L. y B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Rao, A. V. y B. Venkateswarlu. 1988. Seeds of graminaceous plants as carriers of *Azospirillum*. *Current Sci.* 57: 257-258.
- Rodríguez-Cáceres, E. A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 4: 990-991.
- Roper, M. M. y J. K. Ladha. 1995. Biological N<sub>2</sub> fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. *Plant Soil* 174: 211-224.
- Ruschel, A. P. y W. J. Da Silva. 1981. N<sub>2</sub>-fixing populations in seeds and plant parts of teoside and mazoide plants from *Zea mays* x *Zea mexicana* (teosinte) crosses. pp. 185-190. In: P. B. Vose, y A. P. Ruschel (eds.). Associative N<sub>2</sub>-fixation. Vol. I. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Shah, S., V. Karkhanis y A. Desai. 1992. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. *Curr. Microbiol.* 25: 347-351.
- Somers, E., D. Ptacek, P. Gysegom, M. Srinivasan y J. Vanderleyden. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenyl acetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1803-1810.
- Steenhoudt, O. y J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487-506.
- Tapia-Hernández, A., M. A. Mascarúa-Esparza y J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* 64: 73-83.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of *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.
- Tien, T. M., M. H. Gaskins y D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- Triplett, E. W. 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant Soil* 186: 29-38.
- Volkogon, V. V., A. E. Mamchur, S. V. Lemeshko y V. G. Minyailo. 1995. *Azospirillum* as endophytes of cereal seeds. *Mikrobiologicheskii Zhurnal* 57: 14-19.
- Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short y G. F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: across-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539-554.