

# INCIDENCIA DE *Azospirillum* EN ALGUNAS GRAMINEAS DEL TROPICO SUBHUMEDO CALIDO DE MEXICO<sup>1</sup>

JESUS CABALLERO MELLADO\*  
MARIA VALDES\*\*

## Summary

*Number and identification of Azospirillum species were determined in the rhizosphere and roots of maize in 3 different grasses (Panicum maximum, Hypparrhenia rufa and Cynodon dactylon) collected in the field. We observed differences in the number of isolated strains in relation to the sampling area. A. lipoferum was predominant in maize roots and A. brasilense in C. dactylon roots; roots of the other two grasses do not show a marked incidence of any of the two species. A. lipoferum strains were predominantly present in the rhizosphere of all studied plants. The percentage of denitrifying A. brasilense strains in the roots of Cynodon and H. rufa was 12.9 and 9.2 while in maize 6.1 and in Panicum only 1.2%.*

## Introducción

**E**n años recientes se ha insistido mucho en la necesidad del consumo de las proteínas y por ende de los aminoácidos. Las proteínas son las moléculas más abundantes en el interior de las células, pues constituyen el 50% o más de su peso seco. Son fundamentales en todos los aspectos de la estructura celular y de su función, puesto que son los instrumentos moleculares mediante los cuales se expresa la información genética. Todas contienen un porcentaje entre el 15 y 18 de nitrógeno (1). Sin embargo, aunque el nitrógeno es un elemento muy abundante, que constituye casi el 80% de la atmósfera terrestre es una fuente nutricional escasa, debido a que las moléculas de este elemento atmosférico son muy inertes, porque el enlace que une a los dos átomos es excepcionalmente fuerte y estable; se trata de un triple enlace al que debe suministrarse

una gran cantidad de energía si se quiere romper, y no pueden aprovecharlo la mayoría de los organismos. El nitrógeno únicamente se incorpora en los sistemas biológicos cuando ha sido "fijado" o combinado con ciertos elementos, como el hidrógeno o el oxígeno.

En la actualidad, esta fijación puede realizarse industrialmente, mediante el proceso de Haber y Bosch, el cual consiste en combinar el nitrógeno atmosférico con el hidrógeno a temperaturas y presiones elevadas, la energía necesaria es proporcionada por los combustibles fósiles, obteniéndose como producto de la reacción, el amoníaco, este se combina para formar otros compuestos usuales en la fertilización nitrogenada como lo son, la urea, nitratos o bien como sulfato de amonio. Por lo tanto, el costo energético del proceso de Haber, toma gran importancia al considerar la fuente del hidrógeno requerido; por cuya razón, el precio de los fertilizantes nitrogenados está íntimamente correlacionado con el precio de los combustibles fósiles (2). Aunado a lo anterior y como una consecuencia de la crisis mundial de energéticos, y una serie de problemas por contaminantes, ligados al uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados minerales, se ha visto un aumento en el interés en favor de realizar estudios sobre la posibilidad de suprimir la mayor parte del nitrógeno nece-

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 30 de enero de 1981

\* Escuela de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Puebla. Calle 4 Sur 104 Puebla, Pue. México

\*\* Laboratorio de Microbiología Agrícola. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México 17 D.F.

sario para la producción de proteínas vegetales y animales a través de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Además de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas de grano y forrajeras, una posibilidad más, parece surgir de los recientes descubrimientos sobre asociaciones de gramíneas tropicales con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, que pueden, bajo condiciones aún no bien definidas, fijar cantidades de N<sub>2</sub> equivalentes a las fijadas por la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (3).

Buen número de pastos y cultivos de grano están adaptados a clima cálidos y han desarrollado la habilidad de utilizar eficientemente elevadas intensidades lumínicas en ambientes con altas temperaturas. Su distinta vía fotosintética, la llamada vía de los ácidos dicarboxílicos C<sub>4</sub>, les capacita para fijar dióxido de carbono formando malato, mediante enzimas capaces de funcionar a concentraciones de CO<sub>2</sub> muy bajas comparadas a las de otras plantas. Este sistema, permite la fotosíntesis con los estomas casi cerrados durante parte del día y es por eso más económico en términos del uso de agua. Bajo temperatura óptima, las gramíneas con vía C<sub>4</sub> pueden convertir dos veces una elevada intensidad lumínica usando la mitad de la cantidad de agua que necesitarían plantas de clima templado.

Por esta razón, los pastos y cultivos de grano, con vía C<sub>4</sub>, sugieren una gran posibilidad de usar elevadas cantidades de la energía luminosa en beneficio de la fijación biológica del N<sub>2</sub>. Si solamente un 10% de la materia seca incorporada por estas plantas fuera usada como un substrato energético y si es tomada la mitad de la eficiencia en la conversión del substrato por las leguminosas, podrían ser fijados 200 kg de nitrógeno por hectárea substituyendo la mitad de la cantidad necesaria para tales cultivos. Afortunadamente las condiciones climáticas que permitan estos rendimientos altos son encontrados en los trópicos, regiones donde los incrementos substanciales en rendimiento son aún posibles y además muy necesarios (4).

Tomando en consideración los elementos anteriormente expuestos el presente trabajo se ha realizado utilizando diferentes gramíneas de la región denominada Costa Grande del Estado de Guerrero, México.

### Material y métodos

#### Muestras analizadas:

El aislamiento de *Azospirillum* fue realizado a partir de raíces de maíz (*Zea mays*) zacatón o guinea

(*Panicum maximum*), pará (*Hypparrhia rufa*)\* y grama (*Cynodon dactylon*).

El suelo de aislamiento fue de la zona de rizosfera de los mismos cultivos.

#### Localización de la región de muestreo:

Los cultivos empleados se encuentran localizados en la región denominada Costa Grande del Estado de Guerrero, que abarca desde el puerto de Acapulco hasta Zihuatanejo, siendo las zonas de muestreo:

1) Atoyac de Alvarez 2) San Jerónimo de Juárez y 3) Tecpan de Galeana, situado entre los 17 y 18° de latitud Norte y entre los 100 y 101° de longitud oeste (5)

#### Climatología:

Las zonas mencionadas presentan un clima tropical (Subhúmedo cálido), con una pluviosidad anual de 1 000 a 1 100 mm en promedio y temperatura que oscilan en el Estado entre los 22.3°C como mínimo en el mes de diciembre y 26.2°C en los meses de abril y mayo (5). Sin embargo, es necesario hacer mención que en los últimos 3 años, el régimen pluviométrico ha disminuido grandemente, presentándose así mismo temperaturas muy superiores a las mencionadas anteriormente (observaciones personales)

#### Suelos:

El tipo de suelo que se encuentra en esta región es el denominado de Pradera, que se caracteriza por su color café (5). Las características del mismo en las 3 zonas presentan una textura arenosa, aún cuando los suelos de la zona de Tecpan de Galeana son muy ricos en materia orgánica y humedad habitual alta, en tanto que las otras dos zonas presentan pobre cantidad de materia orgánica y humedad habitual baja, con excepción de aquéllos donde existe riego por canales.

El pH de los mismos, en lo general es tendiente a la neutralidad. Los suelos de Atoyac presentan un pH de 6.8 a 7.3 con la excepción del suelo de rizosfera de maíz que tiene 6.1. El pH de los suelos de la zona de San Jerónimo entre 6.7 y 7.2. Los suelos de la zona de Tecpan presentan un pH entre 6.8 y 7.2.

\* En esta zona se ha reportado con diferentes nombres científicos al llamado vulgarmente "pará"; parece ser que el más aceptado es *Brachiaria mutica*

Estos suelos soportan cultivos de pastos varios, o bien cultivos de un solo de ellos, siendo también frecuente el cultivo de pastos entre los cocoteros, año tras año. En tanto que los terrenos donde se cultiva el maíz, se utiliza solo para esta gramínea durante todo el año.

En la actualidad, es una de las zonas ganaderas más importantes de la región, además de cultivares grandes extensiones de terreno con maíz.

#### Esterilización de las raíces:

Las raíces muestreadas de las diferentes gramíneas, fueron lavadas con agua corriente y posteriormente se esterilizó la superficie de las mismas con cloramina T (6).

#### Aislamiento a partir de raíces:

Una vez esterilizada la superficie de la raíz se cortaron piezas de 5 a 8 mm de longitud (de las raíces que presentaban mayor número de raíces secundarias) (3), y se colocaron en frascos tipo antibiótico de 8.0 ml de capacidad conteniendo 4.0 ml de medio NFb semigelificado (7). Se incubaron a 32°C durante 48 horas, procediéndose a sembrar en el mismo medio todos los frascos que presentaban vire del indicador hacia la alcalinidad (azul), observándose la formación de una fina película, densa y blanquesina en forma de "Sombriilla" que se hace apreciable poco después de las 14-18 horas de incubación de 2 a 4 mm por abajo de la superficie del medio. Todos los cultivos que presentaron la formación de esta película y vire del indicador fueron sembrados por estría cruzada en placas con medio NFb-agar conteniendo 20 mg de extracto de levadura e incubándose a 32°C durante una semana. Después de los 7 días, se aislaron las colonias de tamaño pequeño (1-2 mm), blancas, duras opacas, o bien, en ausencia de éstas, se aislaron las que predominaban en el cultivo, siendo transferidas nuevamente a frascos con 4.0 ml de medio NFb semigelificado, incubando durante 36 horas a 32°C. La formación de la película en este medio indica el éxito del aislamiento.

Para la comprobación de la pureza del cultivo, se procedió a sembrar en placa en el medio de agar infusión, de papa (BMS), incubándose a 32°C durante 7 días, creciendo al término de este tiempo colonias con una coloración rosa, amarilla o naranja. Siendo éstas sembradas para su conservación en tubo, en el medio de EMS, para su posterior identificación (6).

#### Aislamiento a partir de suelo de rizosfera

Se siguió el mismo procedimiento que para el

aislamiento a partir de raíz, sólo que las piezas de 0.5 a 0.8 mm se substituyeron por granitos de suelo de 3 a 5 mm de diámetro.

#### Cuantificación

La cuantificación de *Azospirillum* sp. por gramo de raíces de gramíneas, se realizó utilizando el medio NFb-semigelificado, con el ácido málico disminuido a 0.5 gramos y el hidróxido de potasio de 0.3 g, adicionando 0.5 g de azúcar comercial (8).

La superficie de las raíces fue esterilizada y triturada con 9.0 ml de agua destilada estéril en un mortero. Se hicieron diluciones decimales en serie, con medio NFb sin malato, sin agar y sin indicador. Se inoculó en el medio citado para la cuantificación 0.1 ml de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , haciendo 3 repeticiones de cada dilución. Después de 2, 3 y 5 días se observó si existía la formación de la película en forma de "sombriilla" y alcalinización del medio, tomándose la presencia de *Azospirillum* como positivo, cuando existían éstas dos características (8). Se procedió a calcular el número más probable (NMP) con las tablas de Mc Grady (9).

#### Identificación

La identificación de especie de *Azospirillum* se realizó con base en el crecimiento en medio NFb semigelificado, substituyendo el ácido málico y el indicador por glucosa al 0.5% (NFb-glucosa) (6).

Otras de las pruebas de identificación de especies que fue empleada, es la desamiliación de los nitratos, utilizando para tal fin el medio NFb-semigelificado, complementando con nitrato de amonio 5mM (6).

Ambas pruebas fueron incubadas a 32°C durante 48 horas.

Las características usadas para determinar la especie de *Azospirillum* sp. se basaron en el siguiente Cuadro (6).

#### Resultados y discusión

En el interior de todas las raíces de las 4 gramíneas analizadas se encontró *A. lipoferum* y *A. brasilense*, hallándose también estos microorganismos en todos los suelos de rizosfera de las mismas gramíneas.

Los resultados del aislamiento de *Azospirillum* sp. a partir de raíz y suelo se muestran en el Cuadro 1. Se observó que existen variaciones en el número de aislamientos para un mismo tipo de gramíneas, dependiendo de la zona de muestreo de donde provienen. Lo

anterior se puede explicar con base en que no existe una distribución uniforme en el sistema radicular de sitios con actividad nitrogenásica, es decir, ausencia de microorganismos capaces de llevarla a cabo, pues sólo un 10% de las muestras analizadas presentan actividad elevada, y más de la mitad es inactiva (3). No se puede pensar que estas variaciones sean debido al mayor o menor número de *Azospirillum* en el suelo que puedan infectar la raíz, dado a que los porcentajes de aislamiento a partir de los suelos que estudiamos son mucho muy homogéneos en cuanto a No. de estos microorganismos, como se puede apreciar en el mismo Cuadro 1.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto podemos decir, que el 100% de aislamientos a partir de piezas de raíz, será posible cuando se identifique con precisión los sitios donde se localiza el microorganismo responsable de la actividad nitrogenásica.

Dichas variaciones en el porcentaje de aislamiento pueden también ser debidas a la susceptibilidad a la infección de la planta hospedera para ser infectada por un mayor o menor número de microorganismos, como sucede en la predominancia de una especie u otra de *Azospirillum* en una misma gramínea (6).

En el Cuadro 2 se puede apreciar el predominio de *A. lipoferum* sobre *A. brasilense* en todas las muestras de raíces de maíz de donde se realizó el aislamiento, siendo aproximadamente el doble de *A. lipoferum* (28.39%), que de *A. brasilense* (14.79%).

De los aislamientos realizados tanto de *Panicum* como de *Hypparremia*, se identificaron como *A. lipoferum* 18.51 y 37.0% y como *A. brasilense* 24.68 y 44.44% respectivamente (Cuadro 2). Es decir, se

manifiesta a través de la técnica empleada una ligera predominancia de *A. brasilense* sobre *A. lipoferum* en el interior de las raíces de estos dos pastos.

La predominancia de *A. brasilense* (38.88%), se encontró claramente mayor que la de *A. lipoferum* (25.92%), en todas las muestras de raíz de grama analizadas (*Cynodon dactylon*), Cuadro 2).

Un alto porcentaje de desnitrificadores (Nir<sup>+</sup>) dentro de las raíces, fueron encontrados en maíz (6.16%) y en grama (12.97%) en comparación con el porcentaje de no desnitrificantes (Nir<sup>-</sup>) aislados de estas gramíneas (Cuadro 2). Esto lo consideramos de importancia pues bajo ciertas condiciones ambientales, podría inducir a una competencia entre bacterias y plantas asociadas por la fuente nitrogenada (nitratos), pudiendo provocar serias deficiencias nutricionales para la planta, fundamentalmente en el renglón de la síntesis proteica, y po lo mismo, serios problemas si se piensa en el uso de estas gramíneas para el consumo humano en el caso del maíz, o para el consumo del ganado, como lo es la grama. En tanto que los porcentajes encontrados de los desnitrificantes, en *Panicum* (1.23%) y en *Hypparremia* (9.25%) pueden considerarse "despreciables" en función del número bastante mayor de bacterias no desnitrificantes.

El estudio de *Azospirillum* en la rizosfera de las plantas analizadas (Cuadros 1 y 2), muestra claramente la similitud de los porcentajes de aislamiento encontrados de *A. lipoferum* y *A. brasilense* Nir<sup>+</sup> y Nir<sup>-</sup> las 3 distintas zonas, con la excepción de las cepas Nir<sup>+</sup> aislados de la rizosfera de *Cynodon dactylon*.

Así mismo se observa que existe dominancia en todos los casos de *A. lipoferum* sobre *A. brasilense*.

Cuadro 1. Determinación del número de *Azospirillum* sp. por gramo de raíz por el método del número más probable (NMP).

Gramínea	Localid	No. de <i>Azospirillum</i> sp. por gramo de raíces	No. de <i>A. lipoferum</i> por gramo de raíces	No. de <i>A. brasilense</i> por gramo de raíces
<i>Z. mays</i>	1	9.33 x 10 <sup>6</sup>	5.08 x 10 <sup>6</sup>	4.24 x 10 <sup>6</sup>
<i>Z. mays</i>	2	8.50 x 10 <sup>6</sup>	6.07 x 10 <sup>6</sup>	2.42 x 10 <sup>6</sup>
<i>Z. mays</i>	3	11.00 x 10 <sup>6</sup>	7.76 x 10 <sup>6</sup>	3.22 x 10 <sup>6</sup>
<i>P. maximum</i>	1	35.00 x 10 <sup>6</sup>	20.41 x 10 <sup>6</sup>	14.58 x 10 <sup>6</sup>
<i>P. maximum</i>	2	32.66 x 10 <sup>6</sup>	14.84 x 10 <sup>6</sup>	17.81 x 10 <sup>6</sup>
<i>P. maximum</i>	3	42.00 x 10 <sup>6</sup>	10.50 x 10 <sup>6</sup>	31.50 x 10 <sup>6</sup>
<i>H. rufa</i>	2	11.00 x 10 <sup>6</sup>	3.66 x 10 <sup>6</sup>	7.39 x 10 <sup>6</sup>
<i>H. rufa</i>	3	8.66 x 10 <sup>6</sup>	5.05 x 10 <sup>6</sup>	3.60 x 10 <sup>6</sup>
<i>C. dactylon</i>	2	5.23 x 10 <sup>6</sup>	1.74 x 10 <sup>6</sup>	3.48 x 10 <sup>6</sup>
<i>C. dactylon</i>	3	1.40 x 10 <sup>5</sup>	0.65 x 10 <sup>5</sup>	0.74 x 10 <sup>5</sup>

Para cada una de las determinaciones se utilizaron 3 muestras, realizándose 3 repeticiones de cada dilución empleada.

Cuadro 2. Determinación promedio del número de *Azospirillum* sp. por gramos de raíz de cada gramínea por el método del número más probable (NMP), de las tres zonas de muestreo.

Gramínea	Promedio del No. de <i>Azospirillum</i> sp. por gramo de raíces	Promedio del No. de <i>A. lipoferum</i> por gramo de raíces	Promedio del No. de <i>A. brasilense</i> por gramo de raíces
<i>Z. mays</i>	9.61 x 10 <sup>6</sup>	6.30 x 10 <sup>6</sup>	3.29 x 10 <sup>6</sup>
<i>P. maximum</i>	36.55 x 10 <sup>6</sup>	15.25 x 10 <sup>6</sup>	21.29 x 10 <sup>6</sup>
<i>H. rufa</i>	9.83 x 10 <sup>6</sup>	4.35 x 10 <sup>6</sup>	5.46 x 10 <sup>6</sup>
<i>C. dactylon</i>	2.68 x 10 <sup>6</sup>	0.90 x 10 <sup>6</sup>	1.78 x 10 <sup>6</sup>

se en la rizosfera de las cuatro gramíneas, encontrándose que existe un porcentaje aproximado o superior a un 50% del primero con respecto al segundo, con la única excepción de la rizosfera de *C. dactylon*, donde el porcentaje de aislamiento es solamente superior en un 33%. Esto nos hace pensar fundamentalmente en la semejanza de condiciones ambientales en toda esa Región; condiciones tales como temperatura e intensidad, que influyen incrementando los exudados radiculares (11), así como condiciones microecológicas como los son la textura, aereación, acidez, etc. que afectan la densidad de la flora bacteriana (12). También podría pensarse, en la posibilidad existente, de que el tipo de substrato carbonado que sea excretado por las 4 gramíneas estudiadas, sean en cantidad y calidad muy semejantes y por lo tanto el número de microorganismos se encuentre en proporción constante, como se sugiere para la predominancia en la infectividad por una especie u otra de *Azospirillum* en gramíneas (6).

De los resultados obtenidos de la determinación del número de *Azospirillum* en raíces de gramíneas, observamos que el mayor número de ellos lo encontramos en *Panicum maximum* (36.55 x 10<sup>6</sup>/g de raíz). En tanto que el número de los mismos es aproximadamente igual para el maíz (9.61 x 10<sup>6</sup>), y el parí (9.83 x 10<sup>6</sup>), encontrándose el número más bajo por gramo de raíz en *Cynodon dactylon* (2.68 x 10<sup>6</sup>). La diferencia en número de *Azospirillum* por gramo de raíz, se puede deber, como ya se ha sugerido, a la susceptibilidad a la infección de la planta hospedera.

Con respecto a la determinación hecha en raíces de *C. dactylon* de la zona 3 (Tecpan), el número sumamente bajo de Azospirilos cuantificado en comparación con la determinación realizada con el mismo pasto de la zona 2 (San Jerónimo), considera que en esta determinación existió algún error que no fue detectado.

Con base en las colonias aisladas, tanto en medio de NFb-extracto de levadura, como en agar infusión de papa (BMS), se observó que existe una morfología colonial un poco diferente entre las cepas aisladas de *A. lipoferum*, sobre todo en lo relacionado al color y tipo de elevación, que no siempre corresponde a lo citado en la literatura (6, 8). Sin embargo, una característica que se observa siempre constante en todas las colonias aisladas, sean de *A. lipoferum* o *A. brasilense*, en los medios de cultivo arriba citados, es la capacidad de impedir el paso de luz, es decir, son opacas. Otra característica que se puede tomar muy en cuenta para la identificación de *Azospirillum* sp. aún cuando se presentan variaciones, es el aspecto de las colonias que generalmente son secas. Puede decirse que las colonias del género multicitado tienen una gran semejanza, en cuanto a su morfología, como las que desarrollan los actinomicetos sobre medios convencionales.

En relación a la morfología microscópica observada, ambas especies se muestran según lo citado en la literatura (6, 10), *A. lipoferum*, se observa como células grandes y polimorfas, poco móviles, así como la presencia de granulaciones intracitoplásmicas muy refringentes; mientras que *A. brasilense* se observa como células pequeñas, muy móviles y en forma de ese (S)

### Conclusiones

Se muestra la presencia de ambas especies de *Azospirillum* en el interior de las raíces así como en la rizosfera de *Zea mays*, *Panicum maximum*, *Hyparrhenia rufa* y *Cynodon dactylon*, en muestras de la región de la Costa Grande del Estado de Guerrero, México.

Se comprueba lo citado por Dobereiner (6), en relación a la predominancia de *A. lipoferum* tanto en suelo de rizosfera como en raíces de maíz (*Zea mays*).

Observamos predominancia de *A. brasilense* en el interior de las raíces de *Cynodon dactylon* (grama); esta predominancia es solo ligera en *P. maximum* y en *H. rufa*, en tanto que *A. lipoferum* predomina en el suelo de rizosfera de las 3 gramíneas.

En cuanto al número de estas bacterias encontramos abundancia de ellas en el interior de las raíces de *P. maximum*, *H. rufa* y *Zea mays*, mientras que en *C. dactylon* este número es más bien, bajo.

Hay poca variación en la morfología colonial de *Azospirillum* en medios convencionales usados para aislamiento.

La morfología de *Azospirillum* se observa tal como lo ya reportado previamente (6, 10).

Una inoculación adecuada a las gramíneas estudiadas así como una interpretación mejor de los resultados de este trabajo. Sin embargo todavía se requiere de mucha investigación básica para una mejor comprensión del significado de esta asociación y de su utilización en las prácticas agrícolas.

#### Resumen

Se llevo a cabo un conteo e identificación de especies de *Azospirillum* en el interior de las raíces y en la rizosfera de maíz, zacatón, pará y grama (*Zea mays*, *Panicum maximum*, *Hyparrhenia rufa* y *Cynodon dactylon*) colectadas en campo. Se observó variación en el número de aislamientos para una misma gramínea, dependiendo de la zona de muestreo. Se pudo constatar el predominio de *A. lipoferum* en la raíz del maíz y de *A. brasilensis* en grama; en los otros 2 pastos no hay acentuada dominancia de una especie sobre otra. En la rizosfera de todas las plantas estudiadas domina *A. lipoferum*. El por ciento de cepas de *A. brasilensis* desnitrificantes es de 12.9 y de 9.2 en *Cynodon* y en *H. rufa* respectivamente, mientras que en maíz es de 6.1 y en *Panicum* de solo 1.2%.

#### Literatura citada

1. ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons. Inc. 1961. pp. 19-44 y 442-456.
2. BRILL, W. J. Biological Nitrogen Fixation. Scientific american, 1977. pp. 68-69.
3. DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas tropicais. Anais XV Congresso Brasileiro de la Ciencia do Solo, Campinas. 1975. pp. 539-602.
4. DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in tropical Grasses-Possibilities for partial replacement of mineral N fertilizers. AMBIO (Stockholm) 6:174-177. 1977.
5. SECRETARIA DE RECURSOS HIDRAULICOS. Estado de Guerrero, México Semblanza Socioeconómica pp. 10-12. 1975.
6. DOBEREINER, J. y BALDINI, V. L. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* sp. Canadian Journal of Microbiology. 25:1 264-1 262. 1979.
7. DOBEREINER, J. Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. Ecologia Bulletin. (Stockholm) 26:343-352. 1978.
8. DOBEREINER, J. Instructivo de prácticas del curso sobre *Azospirillum* y gramíneas. Instituto Politécnico Nacional/Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología. México. 1979.
9. LEHNIGER, A. L. Bioquímica, Ed. Omega, S. A. 1972. pp. 57-58.
10. POCHON, J., TARDIEUX, P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed. de la Tourelle, Paris. 1962.
11. TARRAND, J. J., KRIEG, N. R. and DOBEREINER, J. A. Taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology. 24:967-980. 1978.
12. WALKER, N. Soil Microbiology. A Critical Review. Butterworth and Co. Ltd. 1975. pp. 21-35.