

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**ALGUNOS ASPECTOS ECOLOGICOS DE LA
SIMBIOSIS AZOSPIRILLUM-GRAMINEAS**



T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :**

MARIA DEL SOCORRO MARTINEZ PRIETO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS 1977
AUTOR M. T.
FECHA 216
PROC



ALGUNOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA
SINBIOSIS BACTERIANA



1 1 1 1 1 1
CÓDIGO PARA ORDENAR EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIENES
ESTADOS
MATERIA DEL CÓDIGO, MANTENER TRINCO

JURADO ASIGNADO.

Presidente: Prof. LILIA VIERNA GARCIA
Vocal: Prof. CARLOS DEL RIO ESTRADA
Secretario: Prof. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
1er. Suplente: Prof. ROSA MA. RAMIREZ GAMMA
2o. Suplente: Prof. JORGE SOTO SORIA

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Microbiología Experimental.
Facultad de Química.

Sustentante: MARIA DEL SOCORRO MARTINEZ PRIETO.

Asesor del tema: M. en C. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.

I.- INTRODUCCION

A1.- IMPORTANCIA DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO.

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico, es un fenómeno de vital importancia, ya que a través de ésta, el nitrógeno gaseoso el que se encuentra abundantemente en la atmósfera, es incorporado a las proteínas de las plantas.

Dicha fijación se realiza también a través de la producción industrial de amoníaco, pero resulta ser de un costo relativamente elevado, ya que para su elaboración requiere de un donador de hidrógeno como el metano o nafta, los cuales son recursos no renovables, además de necesitar de una presión de 200 atmósferas y una temperatura de 400°C, utilizando 18,252 K cal. por kilogramo de fertilizante elaborado.

La urgente necesidad de la conservación de energía en el mundo, ha creado un renovado interés en la fijación biológica de nitrógeno, ya que ésta hace uso de la energía solar, en vez de los energéticos no renovables como lo es el gas natural, utilizado en la manufactura de los fertilizantes nitrogenados. (20)

El nitrógeno gaseoso necesita de 222 Kcal para romperse, pero tan sólo algunas células procariontes tienen la capacidad de romperlo y transformarlo a nitrógeno asimilable, contribuyendo hasta con 150×10^6 toneladas de nitrógeno por año adicionado al suelo.

Debido a esto, el estudio de la fijación biológica del nitrógeno, ha alcanzado un gran desarrollo debido a la importancia agronómica y económica que ésta representa y por su tendencia a reabastecer las fuentes de nitrógeno del suelo sujetas a un continuo agotamiento. (24)

A2.- MICROORGANISMOS QUE FIJAN NITROGENO.

La fijación biológica de nitrógeno es característica solamente de microorganismos procariontes, los cuales pueden ser de vida libre o encontrarse en simbiosis con organismos superiores.

Estos comprenden a varios géneros de bacterias, así como de cianofíceas (algas azul verdes), los cuales se mencionan a continuación:

Microorganismos de vida libre (44) (32) (51).

I. BACTERIAS HETEROTROFICAS.

a) Aerobias:

familia	género	especie
Azotobacteriaceae	<u>Azotobacter</u>	<u>A. chroococcum</u> , <u>A. vinelandi</u> <u>A. beijerinckia</u>
	<u>Azotomonas</u>	<u>A. insignis</u> , <u>A. macrocytoger</u>
	<u>Azotococcus</u>	<u>A. agilis</u>
	<u>Beijerinckia</u>	<u>B. indica</u> , <u>B. fluminensis</u> <u>B. mobilis</u> , <u>B. lacticoqenes</u>
	<u>Derxia</u>	<u>D. gummosa</u>
Pseudomonadaceae	<u>Pseudomonas</u>	<u>Pseudomonas sp.</u>
Achromobacteraceae	<u>Achromobacter</u>	<u>Achromobacter sp</u>
Corynebacteraceae	<u>Corynebacterium</u>	<u>Corynebacterium sp</u>

b) Anaerobias facultativas:

Enterobacteraceae	<u>Klebsiella</u>	<u>K. pneumonie</u>
	<u>Enterobacter</u>	<u>E. cloaceae</u>
	<u>Escherichia</u>	<u>E. intermedia</u>
Bacillaceae	<u>Bacillus</u>	<u>B. polymyxa</u> , <u>B. circulans</u> <u>B. macerans</u>

c) Anaerobias estrictas

Bacillaceae	<u>Clostridium</u>	<u>C. pasteurianum</u> , <u>C. butyricum</u> <u>C. butylicum</u> , <u>C. beijerinckia</u>
	<u>Desulfovibrium</u>	<u>D. desulfuricans</u>
Spirillaceae	<u>Desulfotomaculum</u>	<u>Desulfotomaculum sp</u>

II. BACTERIAS FOTOSINTETICAS.

Chromaticeae	<u>Chromatium</u>	<u>Ch. thiosulfato-philum</u>
	<u>Ectothiorhodospira</u>	<u>E. mobilis</u>
	<u>Thiospirillum</u>	<u>Thiospirillum sp.</u>
Rhodospirillaceae	<u>Rhodospirillum</u>	<u>R. rubrum, R. esferoides</u>
	<u>Rhodopseudomonas</u>	<u>Rhps. capsulata</u>
	<u>Rhodomicrobium</u>	<u>Rhodomicrobium sp</u>
Chlorobiaceae	<u>Chlorobium</u>	<u>Chlorobium sp</u>
	<u>Chloropseudomonas</u>	<u>Chlorops. ethylicum</u>

III. ALGAS VERDE AZULES.

Nostococaceae	<u>Anabaena</u>	<u>A. cylindrica, A. variabilis</u>
		<u>A. humicola, A. gelatinosa</u>
		<u>A. azollae</u>
	<u>Cylindrospermum</u>	<u>C. licheniformi, C. sphaerica</u>
	<u>Anabaenopsis</u>	<u>A. circularis, Anab. sp</u>
	<u>Nostoc</u>	<u>N. punctiforme, N. muscorum</u>
		<u>N. comune, N. calcicola</u>
		<u>N. paludosum, N. sphaericum</u>
		<u>A. fertilissima</u>
		<u>C. fritschii</u>
Scytonemataceae	<u>Scytonema</u>	<u>S. arcanqelii, S. hofmanii</u>
	<u>Tolypothrix</u>	<u>T. tenuis</u>
Rivulariaceae	<u>Calothrix</u>	<u>C. brevissima, C. parietina</u>

<u>Fischerella</u>	<u>F. major, F. muscicola</u>
<u>Mastiglocadus</u>	<u>M. laminosus</u>
<u>Stigonema</u>	<u>S. dendroideum</u>
<u>Hapalosiphon</u>	<u>H. fontinalis</u>
<u>Westiellopsis</u>	<u>W. prolifica.</u>

IV. BACTERIAS QUE FIJAN NITROGENO EN LA RIZOSFERA.

a) Zonas templadas: Especies

A. chroococcum, A. vinelandi, A. beijerinckia
Pseudomonas sp., Klebsiella pneumonie

b) Zonas tropicales

A. paspali, B. indica, B. mobilis, D. gumosa.

V. BACTERIAS QUE FIJAN NITROGENO EN LA FILOSPERA.

Azotobacter sp., Beijerinckia sp., Derxia sp.
Klebsiella sp., Bacillus sp.

Los organismos de vida libre son los más abundantes, sin embargo éstos no han tenido el impacto social y económico que han desarrollado las bacterias simbióticas.

Organismos simbióticos (44).

I. DEPENDIENTES U OBLIGADOS .

Familia	Género	Especie	Huésped
Rhizobiaceae	<u>Rhizobium</u>	<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago, Melilotus</u> <u>Trigonela</u>
		<u>R. trifolii</u>	<u>Trifolium</u>
		<u>R. phaseoli</u>	<u>Phaseolus vulgaris</u>
		<u>R. leguminosarum</u>	<u>Pisum, Vicia,</u> <u>Cicer Lens y Lathyrus.</u>
		<u>R. lupini</u>	<u>Lupinis, Ornithopus</u>
		<u>R. japonicum</u>	<u>Glycine max</u>
		<u>Rhizobium sp</u>	<u>Centrosema, Vigna</u> <u>Stylosanthes etc.</u>
		Frankiaceae	<u>Frankia</u>
		<u>F. casuarinae</u>	<u>Casuarina</u>
		<u>F. brunchorstii</u>	<u>Myrica</u>
		<u>F. ceanothus</u>	<u>Ceanothus</u>
		<u>F. hippophae</u>	<u>Hippophae</u>
		<u>F. cercocarpus</u>	<u>Cercocarpus</u>
		<u>F. discaria</u>	<u>Discaria</u>

II. FACULTATIVOS

Azospirillum - gramineas

(Azo spirillaceae

A. brasilense Brachiaria

y

Digitaria

- A. lipoferum Panicum
- Paspalum
- Pennisetum
- Zea mais
- Triticum

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en organismos simbióticos, puede considerarse la más estudiada debido a la importancia económica y social que ésta representa.

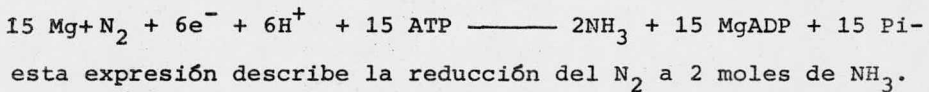
A2.- MECANISMOS GENERALES DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO.

En la fijación biológica de nitrógeno primeramente el triple enlace de la molécula de nitrógeno es roto y después tres átomos de hidrógeno son transferidos y fijados al átomo de nitrógeno para posteriormente incorporarse a las proteínas de las plantas. La transferencia de átomos de hidrógeno es a partir de carbohidratos tales como la glucosa, siendo el sitio de transferencia la enzima nitrogenasa, la cual se puede considerar la molécula clave en la fijación biológica de nitrógeno.

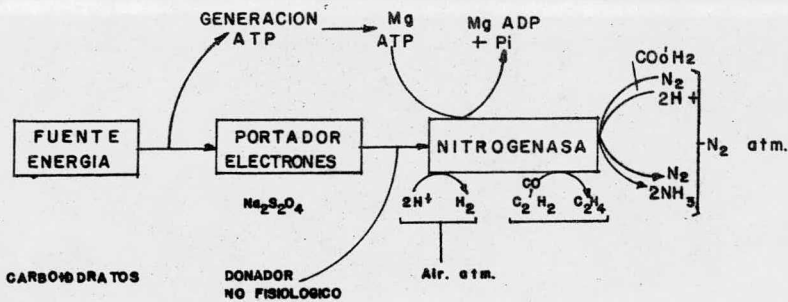
Dicha enzima es una proteína compleja, con dos componentes principales sensibles al oxígeno. El componente molibdeno-ferro formado por cuatro unidades con peso molecular entre 200,000 a 270,000 daltons y el componente hierro de dos unidades, con un peso molecular entre 56,000 y 69,000 daltons. Estas dos proteínas junto con Mg^{++} , ATP y un donador de electro-

nes son esenciales para la actividad de la nitrogenasa. (8)

La nitrogenasa, ha sido aislada, purificada y fraccionada en la mayor parte de los microorganismos fijadores de nitrógeno, que al caracterizarlos se ha observado la existencia de un solo tipo de nitrogenasa, siendo la reacción estequiométrica que efectúa la siguiente:



El sistema nitrogenasa se encuentra relacionado con procesos metabólicos que proveen de energía a la enzima, según el diagrama que se muestra (29)

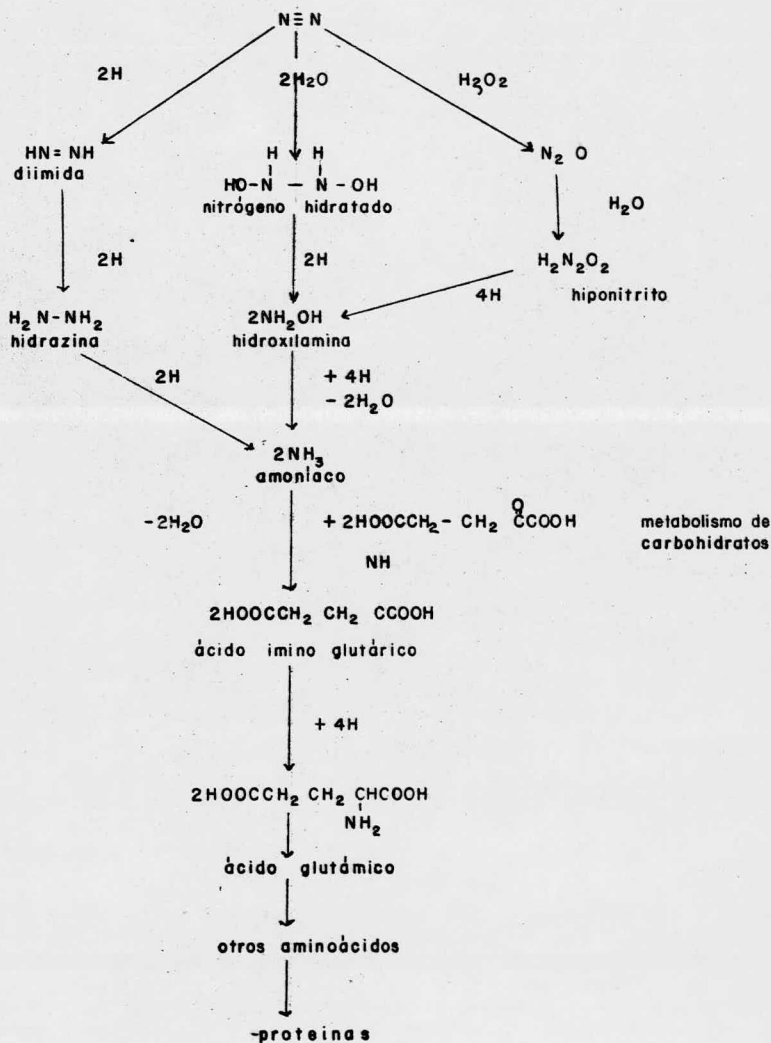


En las plantas la energía solar fijada durante la fotosíntesis es almacenada, o puede ser translocada, a órganos respiratorios como energía de enlaces en los carbohidratos, de tal manera que, en general, flujo de energía y flujo de carbono -- son sinónimos. Los carbohidratos pueden ser utilizados direc-

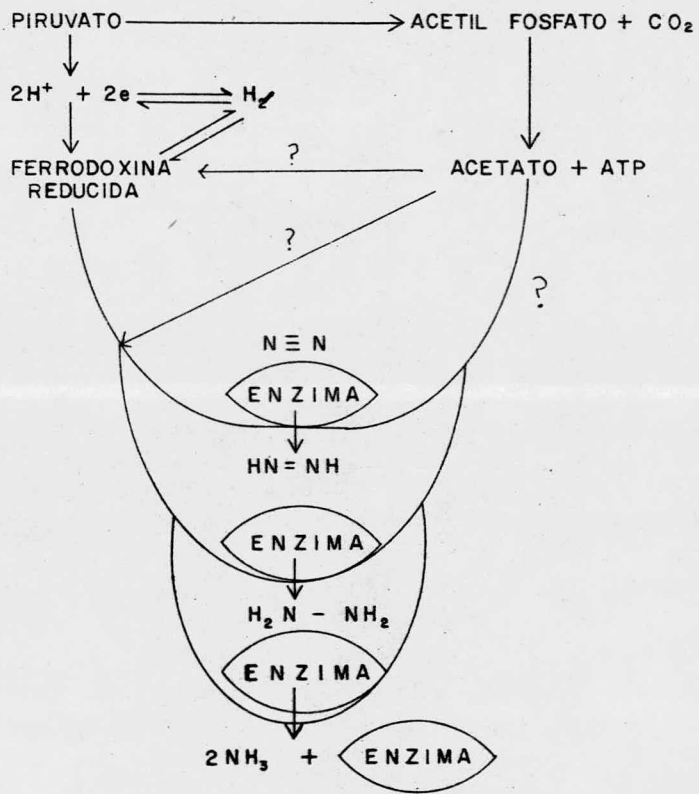
tamente para el crecimiento de la parte aérea de la planta o bien translocadas para dar soporte al metabolismo de raíces y nódulos. Una porción de la energía del ATP y de los compuestos reducidos generados por la actividad respiratoria de los nódulos, sirve para efectuar la reducción del nitrógeno a amoníaco, reacción catalizada, como ya antes se mencionó, por la nitrogenasa. El amoníaco es incorporado en los aminoácidos y transportados inicialmente al tallo; éstos son destinados a ser, finalmente, un componente de la proteína de las semillas. Esto constituye un requerimiento especial de carbono, desde que cada átomo de nitrógeno es transportado unido a un esqueleto carbonado. (30)

Con el fin de esclarecer los pasos efectuados en la fijación de nitrógeno, en los últimos años se han propuesto muchos mecanismos, presentando a continuación algunos esquemas de ellos:

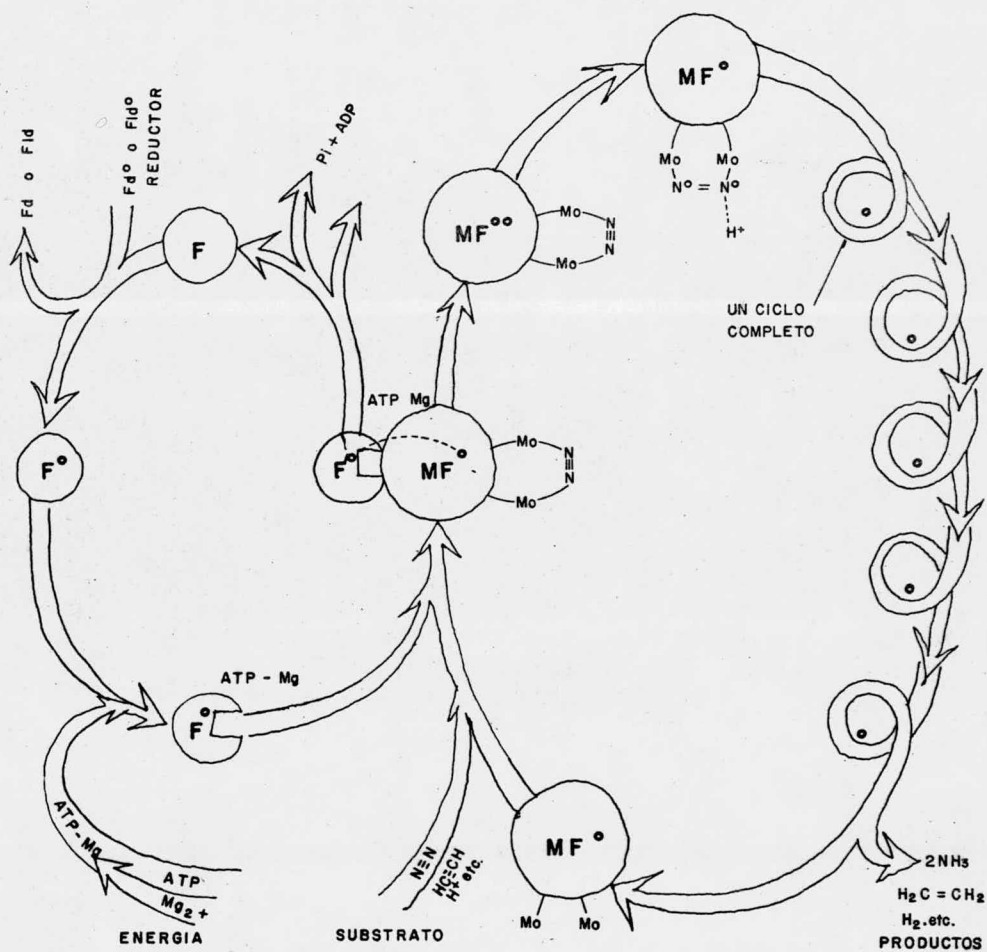
MODELO PARA EL MECANISMO DE LA FIJACION
BIOLOGICA DE N₂ PROPUESTO POR ALEXANDER (44)



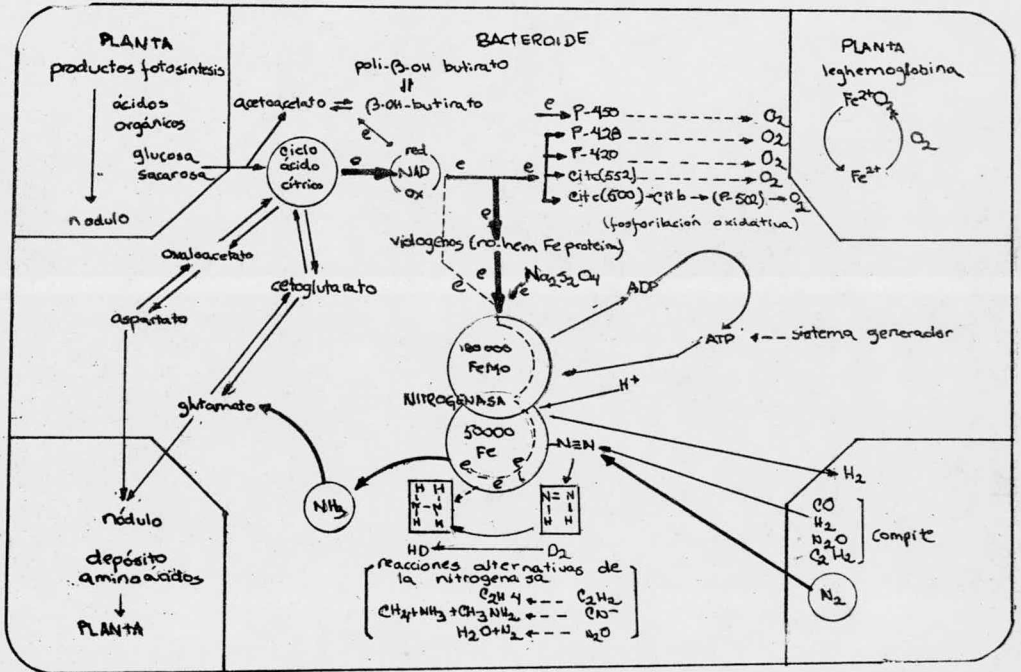
MODELO PARA EL MECANISMO DE LA FIJACION BIOLÓGICA DE N₂ PROPUESTA POR BURRIS (44)



MECANISMO DE LA FIJACION BIOLÓGICA
DE N_2 PROPUESTO POR POSTGATE (44)



MODELO PARA EL MECANISMO DE LA FIJACION BIOLÓGICA DE N₂ PROPUESTO POR BERGENSEN (44)



El control de la fijación biológica del nitrógeno, se lo gra aparentemente por medio de la regulación de los genes deno minados *nif*, que codifican la nitrogenasa. La molécula regula dora es la enzima glutamino sintetasa. El amoníaco que se for ma por fijación de nitrógeno, se combina con el glutamato por medio de una reacción catalizada por la glutamino sintetasa, - formándose el aminoácido glutamina. El mecanismo para el con trol de fijación del nitrógeno aún no se comprende en su tota lidad. (9)

B) FIJACION DE NITROGENO EN GRAMINEAS.

La fijación de nitrógeno atmosférico en pastos fué sugeri da hace muchos años en Australia, Nigeria y Brasil.

Un número de bacterias fijadoras de nitrógeno fueron en contradas en asociación con pastos tropicales y en relación -- desconocida con pastos de regiones templadas. Una de ellas -- fué *Azotobacter paspali*, que se presentaba en el 98% de la su perficie de las raíces de *Paspalum notatum*. (28) (15) (19)

En 1971, el método indirecto para medir actividad nitro genásica, la reducción de acetileno, ayudó a confirmar que raíz ces lavadas de este pasto, asociado con *A. paspali*, fijan ni-- trógeno atmosférico (17). Al mismo tiempo reportes provenien tes de Filipinas y de la Costa de Marfil, señalaron la fija - ción en otros pastos forrajeros, así como en el arroz. Esta -

lista se ha ido incrementando e incluye tanto a pastos tropicales, como a cereales de gran importancia como son el maíz, sorgo y otras. (1) (12) (20)

B1.- IDENTIFICACION DE BACTERIAS RESPONSABLES. (16) (24)

Aunque el microorganismo responsable de la fijación de nitrógeno en raíces de Paspalum notatum, se encontraba bien -- identificado, existía poca información acerca de los microorganismos de otros pastos.

En el intento de identificar a los microorganismos responsables de la fijación de nitrógeno en otros pastos, se ideó un método que trataba de simular las condiciones del habitat - suelo-raíz. Pequeños pedazos de raíces fueron colocados en un medio nutritivo semi sólido libre de nitrógeno con diferentes fuentes de carbón y a cada uno se les midió la actividad nitrogenásica. Simultáneamente, se midió actividad nitrogenásica a las raíces, colocándolas en dispositivos especiales donde se -- introducía una corriente de acetileno y se observó que existía una correlación positiva en la fijación de nitrógeno cuando se usaba en el medio de cultivo, como única fuente de carbón a malato y a partir de este medio se aislaron e identificaron los microorganismos responsables de la fijación.

De la mayoría de los pastos experimentados, se aislaron-

bacilos curvos característicos conteniendo muchos cuerpos grasos, los que no podían ser identificados.

Dicha bacteria se encontraba aproximadamente a dos milímetros abajo de la superficie del medio donde la concentración de oxígeno parecía ser la óptima. El aislamiento en cultivos puros no fué difícil, pero al observar al microscopio se encontraron muchas formas variables de movimientos característicos, con capacidad de desarrollarse en un medio de peptona.

En el intento de su identificación se encontró un reporte escrito en 1925 por M. W. Beijerinck, en el cual describía a dicha bacteria como Spirillum lipoferum, pero debido a la imposibilidad en aquella época, de evaluar la fijación de nitrógeno en cultivos puros, dicho microorganismo no aparece en la enorme lista de fijadores de nitrógeno. Una vez que los métodos adecuados fueron desarrollados, se demostró que Spirillum lipoferum es un habitante común en suelos y raíces especialmente en los trópicos, encontrándose en cantidades de millones -- por gramo de raíces de plantas como sorgo y maíz.

Asumiendo que la actividad de un cultivo enriquecido depende del contenido de bacterias fijadoras de nitrógeno en raíces, se concluye que Spirillum lipoferum es el responsable mayor para la fijación de nitrógeno en maíz, sorgo, trigo y muchos pastos forrajeros.

B2.- ECOLOGIA Y TAXONOMIA DE AZOSPIRILLUM. (20 (21)

a) Ecología,- Las asociaciones de Azospirillum con algunos pastos parecen ser muy comunes en las regiones tropicales. Esta bacteria se ha encontrado abundantemente en raíces de Panicum maximum, Brachiaria mutica, Pennisetum purpureum, maíz, sorgo, arroz y trigo en Brasilea, Maíz, sorgo y trigo en Londrina (Estado de Paraná) y trigo en Passo Fundo (extremo sur de Brasil). Estudios en la India han revelado la existencia de Azospirillum en raíces de arroz, sorgo, maíz, Panicum maximum y otras gramíneas. También fué aislado de las raíces de diversos pastos en México, Australia, Bélgica y U.S.A. Organismos similares se encontraron en malas hierbas tropicales y en manglares, las cuales muestran alta actividad nitrogenásica.

Estudios de la ocurrencia de Azospirillum en suelos revelan que más de la mitad de muestras de suelos colectadas en climas tropicales, como son Africa, Hawai, Filipinas y Brasil, contienen abundante poblaciones de Azospirillum y que menos del 10% de muestras de suelos templados (Europa, U.S.A. y Kenia) contienen el organismo. Su presencia en el extremo sur de Brasil es intermedia.

Existe un pronunciado efecto de vegetación y Panicum maximum parece ser el más favorable entre las forrajeras tropicales. Más del 80% de muestras de raíces de cereales como maíz, sorgo, trigo y centeno creciendo en campos fertilizados con P,

K y Mo en Río de Janeiro fueron positivas, mientras que en Wisconsin bajo las mismas condiciones, se encontró menos del 10% de plantas infectadas, incrementándose éste al inocular el maíz con Azospirillum, indicando ésto, una estimulación selectiva.

Se ha observado una marcada influencia del pH, en la presencia de Azospirillum en el suelo, siendo el pH óptimo entre 6 y 7. En suelos ácidos de pH 4.8 se han encontrado esporádicamente, sin embargo se ha notado, que el pH no tiene influencia en la ocurrencia de Azospirillum en raíces, indicándonos que dentro de ellas se mantiene un pH favorable para la bacteria, por lo que se puede encontrar en suelos ácidos. (19)

Se ha observado que la bacteria se encuentra dentro y entre las células de la corteza de las raíces o en la "endorrizósfera", de los pastos, describiéndose como un estado progresivo de descomposición en la superficie de las raíces internas, penetrando por la corteza a través de la lámina intermedia entre las células de la epidermis y a través de oberturas líticicas en la pared celular. También se ha sugerido su entrada debido a una actividad proteolítica por parte de Azospirillum. La actividad nitrogenásica asociada con pastos ha sido atribuída a la bacteria en la endorrizósfera, la cual ha sido aislada en repetidas ocasiones de superficies esterilizadas de raíces de pastos, de maíz y otras gramíneas (53). En raíces de Digitaria decumbens, con gran actividad nitrogenásica han sido de-

mostrados sitios de reducción dentro de la corteza, encontrándose en éstos, paquetes de células de Azospirillum, detectadas por la reducción de tetrazolio. Esto nos sugiere una simbiosis primitiva entre las células de las raíces y la bacteria como microorganismo microaerofílico diazotrófico. (41)

b) Taxonomía.- Como ya se mencionó, Beijerinck describe en 1923, a este organismo como Azotobacter spirillum, más tarde en 1925 lo denomina como Spirillum lipoferum, el cual se describe en el Manual de Bergey de 1957, dentro del género Spirillum, denominándosele como fijador parcial de nitrógeno atmosférico de vida libre. Posteriormente Schroder en 1932, no lo reporta como fijador de nitrógeno, pero Becking en 1963, muestra la capacidad de incorporar N_2 por Spirillum o Vibrio, el cual era idéntico al Spirillum lipoferum de Beijerinck.

Desde 1974, Spirillum lipoferum ha sido aislado en raíces de algunas variedades de pastos forrajeros, leguminosas, gramíneas y suelo, siendo un organismo Gram negativo, negativo, móvil, con forma de vibrión y con gránulos de poli-beta hidroxibutirato, además crece en medio libre de nitrógeno, pareciendo ser microaerofílico, para proporcionarle un mecanismo de protección a la enzima nitrogenasa. Sales de ácidos orgánicos como malato, succinato, lactato y piruvato son excelentes fuentes de energía y de carbón oxidable; pero ciertos estudios fisiológicos mostraron que ciertas cepas requerían bajos niveles de extractos de levadura para crecer en medio mineral y --

crecían donde la glucosa se usaba como única fuente de carbón, mientras que otras cepas no requerían del extracto de levadura y tampoco crecían en medio con glucosa. Basado en estas y algunas otras observaciones, se pensó en la posibilidad de la existencia de dos o tres grupos dentro de la especie Spirillum lipoferum. (22)

Estudios basados en el DNA homólogo realizados por Tarrand, Krieg y Dobereiner (1978) en 61 especies de Spirillum lipoferum asociados a raíces fijadoras de nitrógeno sugirieron la creación de un nuevo género Azospirillum con dos especies: Azospirillum brasilense y Azospirillum lipoferum. (52)

Azospirillum brasilense incluye a todas las cepas del grupo I y III y son encontrados más frecuentemente bajo condiciones de clima tropical, la mayoría no produce gas a partir de nitratos, pero acumula nitrito en medio semisólido o bajo condiciones de anaerobiosis. Las cepas del grupo tres bajo condiciones limitadas de oxígeno, no desnitrifican, pero acumulan nitrito a partir de nitrato. Además de no poseer la enzima nitrito reductasa (nir), son idénticas a las del grupo I incluyendo el DNA homólogo.

Azospirillum lipoferum incluye a todas las especies del grupo II, las cuales son diferentes por su capacidad de utilizar la glucosa como única fuente de carbono, por crecer en un medio libre de nitrógeno, por la producción de una reacción ácida sobre un medio a base de glucosa y de peptona, por la ne

cesidad de biotina, por la formación sobre un medio semisólido con malato de células en forma de ese, o de hélice largas y anchas y la evolución de sus formas al envejecer. Todas las cepas reducen el nitrato a nitrito con producción de gas.

B3.- ASPECTOS BIOQUIMICOS Y FISIOLÓGICOS DE AZOSPIRILLUM. (10), (20), (21), (35), (38).

a) Efectos del oxígeno.- Uno de los aspectos claves en la fijación de nitrógeno por Azospirillum es la concentración de oxígeno. La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno y a la vez el oxígeno es necesario para la generación de ATP. (Este es un problema común para todas las bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno, pero la mayoría poseen un mecanismo desarrollado de protección al oxígeno. En el caso de Azospirillum se ha demostrado que éste no posee un mecanismo de -- protección a la nitrogenasa.

Se ha observado que la presión parcial de oxígeno óptima para obtener un máximo crecimiento de Azospirillum, se encuentra entre 0.005 y 0.007 atmósferas y dicha presión es posible proporcionársela in vitro, utilizando el medio semisólido ya que el organismo es muy móvil y por lo tanto migra hacia la región donde la concentración de oxígeno es la óptima, formándose en dicho nivel una densa película de crecimiento característico para dicho microorganismo. Esta tendencia de aglomerarse

en grupos, posiblemente represente un mecanismo de protección al oxígeno ya que en ese punto el oxígeno es consumido rápidamente. Cuando el cultivo es movido y la película se rompe, la actividad nitrogenásica cesa.

La sensibilidad al oxígeno en otras especies de Spirillum que no fijan nitrógeno ha sido atribuída a problemas en la asimilación del hierro.

b) Temperatura y pH.- Los requerimientos de temperatura para el crecimiento de Azospirillum son generalmente considerados importantes. El mejor crecimiento para la mayoría de las cepas se ha observado entre 32 y 36°C y la actividad nitrogenásica es máxima entre 33 y 34°C con una pronunciada caída abajo de 33°C. Casi ninguna actividad es observada a 10°C pero a -- 17°C cerca de la mitad de la actividad máxima es mantenida durante un período de 8 horas. Al exponer a 42°C inicialmente incrementa la actividad, pero después de 5 horas la actividad nitrogenásica es fuertemente inhibida. A los 45°C la actividad nitrogenásica es completamente inhibida. La exposición durante 4 horas a 45°C resulta ser letal para todas las cepas.

(34)

Los requerimientos de pH para la nitrogenasa en cultivos puros y en células, son muy limitados, encontrándose una actividad máxima entre 6.8 y 7.8.

La ocurrencia de Azospirillum en suelo es altamente dependiente del pH, aunque como ya se mencionó una vez introducida a la raíz, este factor no le afecta, ya que en simbiosis encuentra el pH adecuado.

c) Metabolismo del carbón (39). En contraste a la mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno, los azúcares son sustratos pobres para Azospirillum, aunque como ya se mencionó A. lipoferum, crece en glucosa. Los mejores sustratos son ácidos orgánicos como el malato, lactato, succinato y piruvato y ha sido comprobado que la concentración de malato en las raíces está correlacionado con la actividad nitrogenásica, además de incrementar la absorción de oxígeno indicando que el ciclo del A+C, es operativo en estos organismos.

El organismo parece ser incapaz de fermentar azúcares -- aunque produce ácido en cantidad escasa a partir de fructosa y galactosa así como de glucosa en el caso de A. lipoferum, pero un crecimiento acelerado de este último en glucosa no se encuentra acompañado de un incremento en la producción de ácido.

Azúcares y azúcares fosfatados como son glucosa, fructosa, galactosa, glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato no incrementa la absorción de oxígeno en extractos celulares de Azospirillum. La glucosa sostiene un crecimiento y una actividad nitrógenásica en cepas de A. lipoferum y la galactosa sostiene un crecimiento lento en células intactas. Lo anterior nos sugiere que la glucólisis y el camino de pentosa fosfato son de-

menor significado en Azospirillum.

d) Metabolismo de nitrógeno. (36), (39), (41). Azospirillum, parece tener la habilidad de participar en varios procesos en la transformación de nitrógeno en la naturaleza. Todas las cepas de ambas especies son capaces de usar NO_3^- en vez de nitrógeno y no hay fijación de nitrógeno con más de 1 mM de NO_3^- ó NH_4^+ , bajo condiciones de aerobiosis. (37)

Bajo condiciones limitadas de O_2 , el NO_3^- es desasimilado a NO_2^- y se acumula en el medio cuando las cepas no poseen la enzima nitrito reductasa (nir^-). Cerca de la mitad de las cepas de *A. brasilense* y todas las cepas de *A. lipoferum*, pueden desasimilar NO_2^- a gas. Aunque se han aislado mutantes (nr^- , nir^- o ambas), por la selección de cepas resistentes a ClO_3^- , en ambas especies, las cuales en presencia o ausencia de 10mM de NO_3^- fijan la misma cantidad de nitrógeno, pero mutantes nr^+ pero nir^- no fijan nitrógeno en presencia de NO_3^- indicando que la acumulación de NO_2^- y no la asimilación de NO_3^- , es la responsable de la inhibición de la nitrogenasa, ya que ésta se ha inhibido por NO_2^- en extractos celulares. (33)

Ya ha sido establecido que *Azospirillum*, no crece en condiciones de anaerobiosis, pero cuando es adicionado al medio NO_3^- (10 mM) hay actividad nitrogenásica similar a la observada con oxígeno en ambas especies, además de presentarse una acumulación de NH_4^+ , tanto en presencia de nitrógeno o helio indicando una desasimilación de NO_3^- a NH_4^+

En cepas nr^+ nir^- se presenta una dependencia de la actividad nitrogenásica al NO_3^- y en todas se presenta una acumulación de NO_2^- . Esto nos muestra que no es necesario, para la desasimilación de NO_2^- a forma gaseosa volver a reponer el oxígeno para la respiración y la actividad nitrogenásica. La tolerancia de la nitrogenasa de Azospirillum al NO_2^- , bajo limitadas concentraciones de oxígeno es atribuido a que el NO_2^- da un mecanismo de exclusión. Esta característica es única en Azospirillum y es la primera bacteria conocida aeróbica fijadora de nitrógeno que también desnitrifica.

e) Nitrogenasa. - Azospirillum contiene una nitrogenasa muy activa, la cual ha sido aislada de A. brasilense y mostrando los mismos requerimientos que otras nitrogenasas, como son sistema generador de ATP, Mg^{++} , donador de hidrógenos, factor de activación (Mn) entre otros. (8)

La incorporación de NH_4^+ y la regulación de la nitrogenasa es igual que en otros fijadores de nitrógeno. La actividad de la glutamino sintetasa es necesaria para la represión de la enzima. Excesos de NH_4^+ reprime la glutamino sintetasa y la síntesis de nitrogenasa.

La producción de nitrógeno por las células muestra una elevada actividad GS y GOGAT (glutamato sintetasa) y una baja actividad GDH al igual que la producción de NH_4^+ .

f) Especificidad hospedera en la infección de Azospiri-

llum.- La especificidad hospedera es el resultado de una interacción cerrada entre planta y la bacteria, siendo un caso de éstos los que presentan las diferentes especies de Rhizobium con los grupos de las leguminosas. Otro ejemplo típico es la especificidad que se presenta en la asociación de Azotobacter paspali con Paspalum notatum, la cual fué demostrada hace mucho tiempo que no se encontraba el organismo en cualquier parte, excepto en asociación con esta planta o donde ésta crece.

Para la asociación de Azospirillum sp. con Digitaria sp. y maíz, hay una correlación muy significativa entre la actividad nitrogenásica de raíces con la actividad del cultivo enriquecido con Azospirillum, indicándonos que este organismo es el mayor responsable para la fijación de nitrógeno en dichas plantas. Además como ya se ha mencionado su ocurrencia en suelos y raíces de maíz, sorgo, trigo, arroz y otras forrajeras en zona tropical y sub-tropical es muy elevada.

Baldani y Dobereiner de acuerdo a estas observaciones y a la confirmación de la infección en endorrizósfera, realizaron una serie de estudios sobre especificidad hospedera. Esta fué estudiada con 4 experimentos en invernadero, usando suelo no esterizado y 2 en campo, con plantas de maíz, trigo y arroz. En todos los experimentos de invernadero se encontró que Azospirillum lipoferum fué más frecuentemente reaislado de raíces esterilizadas de maíz, mientras que A. brasilense nir⁻ de raíces de trigo y arroz, A. brasilense nir⁺ fué aislado con mode-

rada frecuencia a partir de raíces de maíz y raramente de raíces de trigo y arroz.

Los experimentos en campo, inoculados con cepas resistentes a estreptomicina, confirmaron la aparente especificidad de A. lipoferum en la infección de maíz y A. brasilense para trigo.

Dichos experimentos nos dan un indicio de la especificidad hospedera de Azospirillum, sin embargo es necesario realizar más estudios sobre dicho aspecto para poder confirmar lo anterior. (3)

g) Infección selectiva de Azospirilla resistentes a antibióticos.- En los estudios sobre especificidad hospedera realizados por Dobereiner y Baldani, utilizaron para inocular en campo Azospirilla resistentes a estreptomicina, con el fin de identificarlos, una vez que infectaran las raíces de trigo o maíz. Al retirar las raíces de las plantas inoculadas, así como los testigos no inoculados, encontraron que ambas presentaban infección por Azospirilla resistentes.

Estas observaciones indicaron la posibilidad de una selección no sólo por ciertas cepas, sino también a cepas resistentes a estreptomicina durante el período de infección.

En estudios posteriores encontraron que el porcentaje de bacterias resistentes a estreptomicina así como a otros antibióticos en la rizósfera se incrementaba 10 veces, en raíces -

lavadas y esterilizadas a más de 100 veces independientemente del número de bacterias y además que la alta proporción de Azospirillum se mantenía durante todo el período de infección.

Una posible explicación para el enriquecimiento de dichas bacterias y especialmente en raíces es la estimulación de actinomicetos en la rizósfera y en la superficie de las raíces de ciertas plantas. Además ha sido observado que la estreptomycina es asimilada selectivamente por las algas, pudiendo persistir hasta por 8 semanas, mientras que en el suelo es rápidamente inactivada.

La importancia de este aspecto, presenta nuevas posibilidades para introducir cepas seleccionadas o para manipular bacterias fijadoras de nitrógeno. (27)

B4.- POSIBILIDADES DE INOCULACION.

La fijación de nitrógeno en gramíneas, es un fenómeno de gran importancia para el hombre, ya que dentro de éstas, se encuentran cereales como el maíz, trigo, centeno y sorgo que constituyen la base de la alimentación mundial, además de incluirse forrajeras primordiales en la alimentación ganadera, por lo que la posibilidad de incrementar rendimientos en la producción de dichas plantas es el objeto de estudio de muchos investigadores. (23)

En algunos ensayos de inoculación se han encontrado resultados contradictorios, por una parte se han señalado ganan-

cias de 1 Kg N/ha/día en Pennisetum y 2 Kg N/ha/día en algunos genotipos de maíz (17). R. L. Smith, S. C. Schank, J. H. Bouton y K. H. Quesenberry (51), logran incrementar el contenido en materia seca, hasta un 150% con respecto a los controles no inoculados, en plantas de Panicum maximum y Digitaria decumbens implicando una ganancia de 40 Kg N/ha.

Otros experimentos de inoculación en maíz, realizados -- por Burris (1976); Stumpf et al (1977) Albrecht et al (1978) = en Wisconsin y Beltsville., muestran resultados variables ya - que en dos hay efectos positivos a la inoculación y en otros - dos los efectos son negativos. (54) (58)

Por otra parte la Dra. Dobereiner, la cual se podría con- siderar la pionera en estos campos, opina que la práctica de - inoculación en gramíneas no se encuentra dentro de las más pro- metedoras, ya que estadísticamente un incremento significativo en invernadero, es muy difícil de demostrar en campo, excepto- donde las condiciones sean las específicas para dicho microor- ganismo. (21)

Para lograr resultados constantes y positivos creo es ne- cesario realizar una serie de estudios sobre los factores que- afectan dicha simbiosis. Entre los anteriores podríamos consi- derar la intensidad de luz, potencial del aparato fotosintéti- co, temperatura del aire, humedad del aire, temperatura del -- suelo, potencial Redox en suelo y contenido de humedad, otros facto- res del suelo, genética de las plantas y fisiología de las --

bacterias (2), la existencia de cepas que además de fijar nitrógeno desnitrifican, la especificidad hospedera, la selección de cepas estreptomycinas resistentes, la presencia de cepas nativas, la respuesta a N, P, K, efecto de herbicidas y otras sustancias agregadas al suelo, además de considerar que el incremento o decremento debido a la inoculación depende del nitrógeno asimilable en el suelo y muestra una significativa correlación negativa con el por ciento de nitrógeno. (43)

Uno de los aspectos importantes a considerar entre los estudios de campo, es la interacción del fertilizante nitrogenado con la actividad nitrogenásica, ya que alguna contribución, por parte de la fijación de nitrógeno, en complementación con los fertilizantes nitrogenados puede ser un punto relevante.

Es obvio que de encontrarse la solución para el problema que presenta la simbiosis Azospirillum-gramíneas, este sistema revolucionará la agricultura, ya que los requerimientos nitrogenados de los cultivos agrícolas más importantes del mundo podrán abastecerse parcial o totalmente. Además, en el caso de gramíneas forrajeras como Digitaria, Panicum, etc., se eliminará la necesidad de asociarse con leguminosas para suministro del nitrógeno evitándose los problemas de agresividad por parte de los pastos.

De acuerdo a esto y a otros aspectos que quizá no haya -

mencionado, pienso que manipulando adecuadamente a dichos microorganismos, se puede obtener resultados satisfactorios y - - prometedores en la lucha por incrementar el sustento humano.

II. BREVE DESCRIPCION.

Se estudiaron algunos aspectos sobre la simbiosis Azospirillum-gramíneas, como son:

- a) Viabilidad de Azospirillum en la rizósfera de Panicum --
maximum.
- b) Tiempo en el cual Azospirillum, infecta a las plantas de
Panicum maximum.
- c) Efecto de la inoculación en el peso seco de las plantas-
de Panicum maximum.
- d) Presencia de Azospirillum, en plantas gramíneas de algu-
nas zonas del país.
- e) Viabilidad de Azospirillum en un soporte de turba.

III. OBJETIVO.

En el sistema simbiótico fijador de nitrógeno Azospirillum-gramíneas, existen pocos datos sobre la infección de las raíces de las plantas por las bacterias, como son los factores físicoquímicos que afectan dicha infección, sobrevivencia de Azospirillum en la rizósfera, entre otros. Indudablemente que es necesario conocer una serie de datos, para que la inoculación de las gramíneas sea una práctica agronómica común.

Es por lo cual, que el objetivo de este trabajo sea el de contribuir al conocimiento de algunos aspectos sobre dicha simbiosis, que nos oriente y ayuden en la inoculación de gramíneas en el campo, en un futuro próximo.

IV- MATERIALES Y METODOS.

A.- Muestras de suelo.

Para evaluar la viabilidad de Azospirillum en la rizósfera de Panicum maximum, el tiempo de infección y el efecto de la inoculación en el peso seco de dichas plantas se usaron las siguientes unidades de suelo:

a) Luvisol.- Suelos con acumulación de arcilla aluvial, procedente de Tilzapotla Morelos.

b) Vertisol.- Suelos que sufren inversión de la superficie del suelo, arcillosos y de textura pesada, procedente de Puente de Ixtla, Morelos .

c) Arena de feldespato y cuarzo obtenida comercialmente.

d) Mezcla de componentes del suelo.- Vertisol-arena en proporción 1:1.

Se colocaron tres kilogramos de cada uno de estos soportes en macetas de barro y se esterilizaron a 120°C por treinta minutos, según el diagrama de tratamiento.

e) Para realizar el experimento preliminar del efecto de la inoculación en el peso seco de la planta se utilizó arena,-

la cual fué colocada en jarras de Leonard según se describe en el Manual Práctico de Rizobiología de J. M. Vincent (53).

f) Se utilizó turba, para evaluarla como material inerte de inoculantes para gramíneas, determinando la sobrevivencia - en dicho soporte.

La turba fue secada, molida, tamizada a 200 mallas, neutralizada con CaCO_3 y esterilizada a 120°C por treinta minutos y posteriormente fué repartida en tres bolsas de polietileno -- conteniendo 100 gramos cada una.

g) Para efectuar el aislamiento de Azospirillum, buscando la incidencia de dicho microorganismo en algunas zonas del país, se muestrearon suelos de rizósfera de cultivos de maíz localizados en:

- 1.- Uruapan Michoacán.
- 2.- Tenancingo, Edo. de México.

B.- Semillas.

Semillas de Panicum maximum, se germinaron en almácigos con suelo fértil húmedo a 25°C en el invernadero durante dos - semanas, y cuando las plántulas alcanzaron una longitud entre 1 y 2 cm. fueron esterilizadas y transplantadas a las macetas y jarras de Leonard (2 plántulas por recipiente).

Para observar la incidencia de Azospirillum en el país-- se estudiaron las raíces de las siguientes plantas:

Digitaria	Tampico Tamps.
Estrella	Tampico Tamps.
Guinea	Tamazunchale S.L.P.
Estrella	Tamazunchale S.L.P.
Pangola	Tamazunchale S.L.P.
Maíz	Jalisco
Maíz	Culiacán, Sin.
Sorgo	Culiacán, Sin.

D.- Medios de cultivo.

1) Medio de propagación de Azospirillum (26).

ácido málico	5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$CaCl_2$	0.02g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.002 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01 g
FeEDTA	4 ml #
KOH	4.5 g
Extracto de levadura	20 mg

Solución acuosa 1.64%

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH (10%), Completar a un litro con agua destilada, y colocar 100 ml. de este medio en matraces de 500 ml. y esterilizar a 120°C por 15 minutos.

(2) Medio semisólido (Nfb) libre de nitrógeno, para aislamiento de Azospirillum, a partir de suelo y raíces. (26)

ácido málico	5 g
K_2HP0_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$CaCl_2$	0.02g
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.002g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01 g
FeEDTA	4 ml. # (Sol. acuosa 1.64%).
KOH	4.5 g
biotina	1 ml.*
Azul de bromotimol	2 ml (Sol. 0.5% en alcohol)

#* Sol al 0.01%

Ajustar el pH con una solución de NaOH al 10%, agregar - 1.75 g de agar previamente disuelto, completar a un litro y colocar en tubos de ensaye o en matraces para posteriormente vaciar en placa y esterilizar a 120°C por 15 minutos.)

(3) Medio sólido (Nfb), para aislamiento de Azospirillum (26).

ácido málico	5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$CaCl_2$	0.02 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.002 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01 g
FeEDTA	4 ml (1.64%) *
KOH	4.5 g
Azul de bromotimol	2 ml (sol 0.5% alc)
Extracto de levadura	20 mg

Ajustar el pH con una solución de NaOH al 10%, agregar 15-g de agar, completar a un litro de agua y esterilizar a 120°C- por 15 minutos.)

(4) Medio de papa para aislamiento. (26)

Cocer 200 g de papa cortada con cáscara, filtrar por algodón, añadir 5 g de ácido málico, 4 g de KOH, 5g de azúcar-comercial, ajustar el pH a 6.8, adicionar 1 ml de una solución de biotina (10 mg/100 ml) y 15 g de agar. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.)

E.- Solución para plantas.

1) Solución nutritiva de Crone.

K_2HP0_4	1g
KCl	7g
$CaSO_4$	2.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5g
$Ca(H_2PO_4)H_2O$	7.2g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.9g
Oligoelementos	1 ml.

Solución madre de oligoelementos.

Boro	0.05 %
Manganeso	0.05 %
Zinc	0.005%
Molibdeno	0.005%
Cobre	0.002%
Agua	

Se proporcionó 1.5 gramos de la mezcla anterior, - disuelta en el agua necesaria para cada recipiente, adicionada del mililitro de la solución de oligoelementos.

F.- Cepas microbianas utilizadas.

Las cepas microbianas utilizadas fueron la K22, y- K24 de A. brasilense y otras de A. brasilense y A. lipoferum proporcionadas por el Dr. Manuel Julián Quintero R.

METODOS

A.- Análisis físicoquímico de los suelos.

Dichos análisis se efectuaron utilizando los siguientes métodos:

Color	Según las tablas de Munsell
Textura	Método modificado por G. J. Bouyoucos (7)
pH	se midió en potenciómetro utilizando una suspensión de suelo agua 1:1
Materia orgánica	Método de Walkley- Black. (31)
N ₂ total	Método de Kjeldahl. ()
Fósforo	Método de Olsen et al (31)
Potasio	Descrito por Jackson M. L. (31)
Calcio	Descrito por Cheng y Bray (11)
Magnesio	Descrito por Cheng y Bray (11)
Azufre	Método de Chesnin y Yien modificado por Hesse (31)
Boro	Modificación del método 73 B, publicado por el Departamento de Agricultura de U.S.A. (6)
Cu, Fe, Mn, Zn.	Descrito por Robinson J.A. (45)
Molibdeno	El descrito en Soil Science Vol 81
Conductividad eléctrica	Jackson M. L. (31)

B.- Caracterización de los microorganismos.

A las cepas K22, K24, A. brasilense y A. lipoferum se le efectuaron los siguientes estudios:

a) Observación de características macroscópicas.

1. Formación de película y cambio de pH en el medio Nfb-semisólido.

2. Características coloniales en Nfb sólido.

b) Observación de características microscópicas.- Utilizando una asada de la película formada se observó en seco fuerte la:

Movilidad

Forma

Tamaño

C.- Inoculación de plántulas.

Una vez extraídas cuidadosamente las plántulas de los almácigos, fueron lavadas superficialmente con agua corriente, - para eliminar las partículas de suelo, luego se introdujeron - en una solución de bicloruro mercuríco al 1%, durante dos minutos y finalmente en un recipiente estéril, se lavaron varias veces con agua destilada estéril, con el fin de eliminar el bicloruro de mercurio.

Las plántulas estériles se colocaron dos por recipiente, ya fuera en jarras y macetas previamente humedecidas con la so

lución de Crone, con la cantidad de agua necesaria para proporcionar un 50% de capacidad de campo (las macetas fueron pesadas, para poder mantener la humedad constante).

A la semana de transplantadas, fueron inoculadas, según el diagrama de tratamiento, con una mezcla de las cepas K22, K24 y A. brasilense, propagadas por sepado en el medio descrito (26), conteniendo una población de 1×10^9 células/ml - (ésto se determinó por el método de dilución y vaciado en placa) utilizando la cantidad necesaria de cultivo, para proporcionar una cantidad de 1×10^6 células por gramo de soporte.

En el experimento preliminar del efecto de la inoculación de Azospirillum en el peso seco de las plantas de Panicum maximum, se utilizaron 4 jarras de Leonard, para cada tratamiento, incluyéndose entre ellos el inoculado, el testigo y el fertilizado.

En el inoculado, las jarras fueron inoculadas con la cepa K22 de A. brasilense, de la misma forma que antes se ha mencionado, en el testigo a las jarras se les adicionó una cantidad igual de medio de cultivo pero carente de Azospirillum y al fertilizado se le agregó KNO_3 para obtener una concentración de 0.05%.

C.- Preparación del inoculante de Azospirillum, usando turba como material inerte.

Se pusieron 100 g. de turba secada, molida, tamizada a-

DIAGRAMA DE TRATAMIENTO

Soporte	estéril		inoculado	
	si	no	si	no
Luvisol	x		x	
Luvisol	x			x
Luvisol		x	x	
Luvisol		x		x
Vertisol	x		x	
Vertisol	x			x
Vertisol		x	x	
Vertisol		x		x
Arena	x		x	
Arena	x			x
Arena		x	x	
Arena		x		x
Mezcla	x		x	
Mezcla	x			x
Mezcla		x	x	
Mezcla		x		x

En este experimento se usaron 8 repeticiones de cada uno.

200 mallas y neutralizada con CaCO_3 y esterilizada, en las -- bolsas de polietileno, la cual fué mezclada con 100 ml. de -- cultivo de bacterias, con una población 1×10^9 microorganismos por mililitro de cultivo, se homogenizó perfectamente y se incubó a 36°C durante una semana.

A la semana se cuantificó la población y se guardó en el refrigerador a una temperatura de 4°C .

Posteriormente cada mes durante un período de seis meses, se determinó la población microbiana por gramo de inoculante, utilizando el método de dilución y vaciado en placa.

D.- Determinación de la viabilidad de Azospirillum en los diferentes soportes.

A la 1a., 2a., 3a., 5a., y 7a. semana después de haber inoculado, se cuantificó el número de bacterias por gramo de soporte. Para ésto se tomaron 10 g. de una muestra de rizósfera y se determinó el número de células de Azospirillum por medio de la técnica de dilución y vaciado en placa.

E.- Determinación del tiempo de infección.

Se extrajeron las raíces de las plantas de los diferentes soportes y tratamientos, lavándose con agua corriente y esterilizándose superficialmente según la técnica antes indicada, para la esterilización de las plántulas, se fraccionaron en porciones de 0.5 a 1 cm. y se colocaron en cajas de pe

tri con medio Nfb semisólido.

La infección fué confirmada al apreciar películas de crecimiento de Azospirillum alrededor de los cortes de los fragmentos de las raíces.

F.- Determinación del peso seco.

En el experimento preliminar del efecto de la inoculación en el peso seco, se realizaron cortes del pasto Panicum maximum al primer y tercer mes, se secaron al horno a 70°C y posteriormente fueron pesadas.

En el experimento posterior, las plantas extraídas para observar la infección de las raíces por la bacteria fueron utilizadas también en la determinación del peso seco.

G.- Aislamiento de Azospirillum de plantas y suelos.

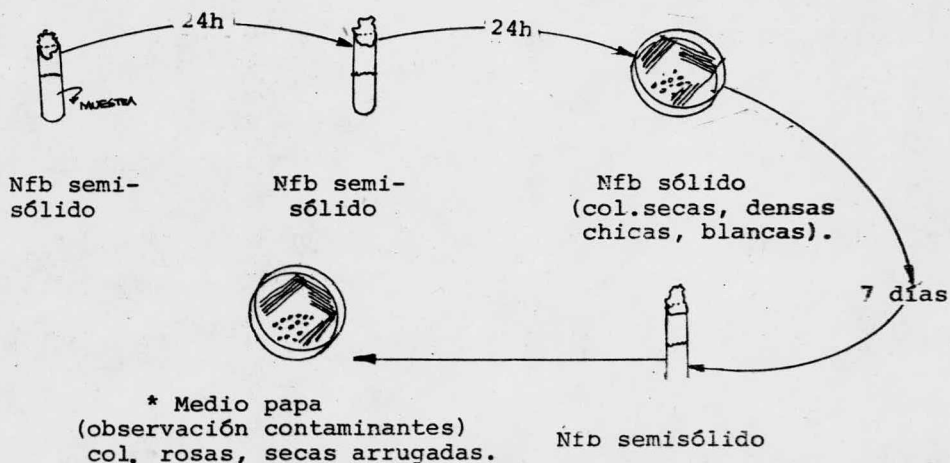
Para observar la incidencia de Azospirillum en el país, se efectuó su aislamiento de la siguiente manera:

a).- Plantas.- A las plantas muestreadas, se les cortaron las raíces centrales, se lavaron perfectamente, se esterilizaron con una solución de bicloruro de mercurio al 1% durante dos minutos, se lavaron y se cortaron en fragmentos de 0.5 - 1 cm. y se colocaron en caja de petri con medio Nfb semisólido, una vez formada la película se inoculó una pequeña parte a tubos con el mismo medio, donde se observó, la for

mación de película, cambio de pH, morfología microscópica y -
movilidad, posteriormente se resembraron a medio Nfb sólido y
se observaron características coloniales.

b).- Suelos.- Para efectuar el aislamiento de Azospiri-
llum a partir de suelos, se pusieron los suelos en macetas de
plástico y se sembraron con semillas de maíz. Al mes de la -
siembra, las plantas se sacaron del suelo y de las raíces se-
aisló la bacteria según el diagrama.

DIAGRAMA DE AISLAMIENTO A PARTIR DE RAICES Y SUELOS.



V.- RESULTADOS.

A.- ANALISIS FISICOQUIMICO DE LOS SUELOS.

1. Pruebas Físicas:

	Luvisol	Vertisol
Color	Café o.	Gris n.
% Arena	50	64
% Limo	18	13
% Arcilla	32	26
Textura	Mig.arc.aren.	Mig.arc.aren.

2. Pruebas Químicas.

	2.1%	1.2%
% M. O.		
N. aprovechable	53 Kg/Ha.	30 Kg/Ha
Fósforo (P_2O_5)	92 "	58 "
Potasio (K_2O)	1044 "	720 "
Calcio	5370 "	3939 "
Magnesio	1502 "	1510 "
Azufre	177 "	273 "
Boro	1.0 "	0.3 "
Cobre	0.7 "	0.2 "
Fierro	12 "	6 "

Manganeso	46 Kg/Ha.	94 Kg/Ha.
Zinc	3 "	9 "
pH	6.3 "	6.4 "
Conductividad eléctrica	0.75 m ohms /ms 0.92 m ohms/ms.	

B.- Caracterización de los microorganismos.

a) Observación de características macroscópicas.

Las tres cepas presentaron colonias blancas, chicas, redondas o algo irregulares, densas, secas y con cambio de pH - en el medio.

- Formación de película y cambio de pH

Cepa	pH alcalino	película
K22	+	+
K24	+	+
<u>A. brasilense</u>	+	+

b) Observación de características microscópicas.

Movilidad; las tres cepas presentaron gran movilidad, como bailando samba.

Forma y tamaño; se presentaron como vibriones pequeños - con dos acumulaciones de poli-beta-hidroxibutirato.

Estas características corresponden a Azospirillum brasi-

lense, aunque para afirmarlo es necesario realizar otras pruebas fisiológicas, que lo confirmen.

C.- Viabilidad de Azospirillum en la rizósfera de Panicum maximum.

Los resultados se pueden apreciar en el cuadro número 2 y en las gráficas número 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12.

D.- Tiempo en el cual Azospirillum, infecta a las plantas de Panicum maximum.

Los resultados se pueden observar en el cuadro número 3.

E.-Efecto de la inoculación en el peso seco de las plantas de Panicum maximum.

1. Experimento preliminar de inoculación.

En el primer corte se obtuvieron los siguientes resultados de peso de planta:

Fertilizados	Inoculados	Testigos
0.1163 g/planta	0.1390 g/planta	0.05 g/planta
0.3978 "	0.1014 "	0.0214 "
0.47 "	0.15 "	0.12 "
0.1426 "	0.14 "	0.09 "

El promedio de dichos datos es:

Fertilizado	0.28 g/planta
Inoculado	0.1326 g/planta
Testigo	0.0735 g/planta

En el segundo corte efectuado, mostró los siguientes resultados promedio:

Fertilizado	1.10 g/planta
Inoculado	0.37 g/planta
Testigo	0.15 g/planta

El registro de temperatura es el invernadero, nos muestra que ésta varió entre 9 y 45°C, pero fluctuando la mayoría entre 30 ± 5 C.

2.- Experimento posterior.

Los resultados de peso seco de las plantas de Panicum maximum, se pueden ver en el cuadro número 3.

F.- Viabilidad de Azospirillum en turba.

Para observar la sobrevivencia de Azospirillum, en turba, se utilizaron dos cepas; una de Azospirillum lipoferum, otra de Azospirillum brasilense y una mezcla de las dos.

Después de inocular e incubar a 36°C una semana se cuantificaron las siguientes poblaciones:

CUADRO No. 1

CEPA	1a. Semana	1 mes	2 mes	3 mes	4 mes	6 mes
<u>A. brasilense</u>	170×10^7 cel/g	65×10^6 cel/g	10×10^7 cel/g	68×10^6 cel/g	106×10^5 cel/g	96.7×10^6
<u>A. lipoferum</u>	60×10^7 "	12×10^6 "	10.6×10^7 "	60×10^6 "	41×10^5 "	16.9×10^5 "
<u>Mezcla</u>	21×10^7 "	6.3×10^6 "	9×10^7 "	93×10^6 "	32×10^5 "	29.6×10^5 "

G.- Presencia de Azospirillum, en plantas gramíneas de algunas zonas del país.

Entidad	Huésped	Microorganismo
Tampico, Tamps.	Digitaria	----
Tampico, Tamps.	Digitaria	----
Tampico, Tamps.	Estrella	<u>A. basilense</u>
Tampico, Tamps.	Estrella	<u>A. brasilense</u>
S. L. P.	Guinea	<u>A. brasilense</u>
S. L. P.	Guinea	<u>A. brasilense</u>
S. L. P.	Estrella	<u>A. brasilense</u>
S. L. P.	Estrella	<u>A. brasilense</u>
S. L. P.	Pangola	----
Jalisco	Maíz	<u>A. lipoferum</u>
Jalisco	Maíz	<u>A. lipoferum</u>
Culiacán	Maíz	<u>A. lipoferum</u>
Culiacán	Maíz	<u>A. lipoferum</u>
Culiacán	Sorgo	<u>A. lipoferum</u>
Culiacán	Pangola	----
Uruapan	Maíz	<u>A. lipoferum</u>
Tenancingo	Maíz	<u>A. lipoferum</u>

CUADRO No. 2.- VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM (NUMERO DE MICROORGANISMOS POR GRAMO DE SOPORTE).

Suelo	Tratamiento	1a. sem.	2a. sem.	3a. sem.	5a. sem.	7a. sem.
Luvisol	inoc- estéril	2×10^3	7×10^4	4×10^5	1.3×10^4	1.3×10^5
Vertisol	inoc- estéril	4×10^5	8×10^5	2×10^4	1.7×10^3	1×10^2
Mezcla	inoc- estéril	5×10^4	2.3×10^5	3×10^5	7×10^5	2.1×10^6
Arena	inoc- estéril	---	---	3.8×10^3	1.5×10^3	2×10^3
Luvisol	inoc- no est.	7×10^4	2×10^5	4×10^4	7×10^3	---
Vertisol	inoc- no est.	---	5×10^5	1×10^4	4×10^3	1.3×10^5
Mezcla	inoc- no est.	5×10^3	1.3×10^5	1×10^3	1.2×10^4	---
Arena	inoc- no est.	---	1.6×10^4	1.2×10^4	1.4×10^4	1×10^3
Luvisol	no inoc- est.	---	---	---	4×10^3	5×10^4
Vertisol	no inoc- est.	---	---	---	---	---
Mezcla	no inoc- est.	---	---	---	3×10^3	5×10^4
Arena	no inoc- est.	---	---	---	---	---
Luvisol	no inoc- no est.	---	---	---	---	1.2×10^5
Vertisol	no inoc- no est.	---	---	1×10^3	4×10^3	---
Mezcla	no inoc- no est.	2×10^3	1×10^5	2×10^3	---	1×10^3
Arena	no inoc- no est.	7.4×10^2	---	2×10^3	6×10^3	---

CUADRO No. 3
 TIEMPO DE INFECCION DE AZOSPIRILLUM A PLANTAS DE
PANICUM MAXIMUM.

Suelo	Tratamiento	1a. sem.	2a. sem.	3a. sem.	9a. sem.
Luvisol	inoc-estéril	+	+	+	+
Vertisol	inoc-estéril	+	+	+	-
Mezcla	inoc-estéril	+	+	+	+
Arena	inoc-estéril	-	-	+	+
Luvisol	inoc-no est.	+	+	+	+
Vertisol	inoc-no est.	-	+	+	-
Mezcla	inoc-no est.	-	-	-	-
Arena	inoc-no est.	-	-	-	-
Luvisol	no inoc-est.	-	+	-	+
Vertisol	no inoc-est.	-	-	-	-
Mezcla	no inoc-est.	-	-	-	-
Arena	no inoc-est.	-	-	-	-
Luvisol	no inoc-no est.	-	+	-	+
Vertisol	no inoc-no est.	-	-	-	-
Mezcla	no inoc-no est.	-	-	-	-
Arena	no inoc-no est.	-	-	+	-

+ = infección

- = no hay infección

CUADRO No. 4

PESO SECO DE PANICUM MAXIMUM (gramos por planta)

Suelo	tratamiento	2a sem.	4a sem.	4a sem.	7a sem.	9a sem.
Luvisol	inoc-estéril	0.037	1.0525	2.13	4.01	6.1917
Vertisol	inoc-estéril		0.7141	2.18	3.796	14.56
Mezcla	inoc-estéril	0.0563	0.6723	1.6072	2.177	3.317
Arena	inoc-estéril		0.0821	0.13	0.2855	0.4541
Luvisol	inoc-no estéril	0.0135	1.11	0.5759	1.89	5.3845
Vertisol	inoc-no estéril		0.5795	1.3242	1.8941	4.192
Mezcla	inoc-no estéril		1.0082	1.0525	1.0465	3.6204
Arena	inoc-no estéril		0.0834	0.1358	0.38	0.5227
Luvisol	no inoc- est.	0.1241	0.8244	1.87	5.36	10.1446
Vertisol	no inoc- est.		0.7667	1.895	4.7394	7.478
Mezcla	no inoc- est.	0.0136	1.2	1.643	2.1618	3.6505
Arena	no inoc- est.		0.027	0.2688		1.0495
luvisol	no inoc- no est.	0.0289	0.24	0.1759	0.6142	1.49
Vertisol	no inoc- no est.		0.5521	1.2433	2.91	8.67
Mezcla	no inoc- no est.	0.02	0.7282	0.645	0.956	2.6212
Arena	no inoc- no est.		0.1936	0.1979	0.1092	0.2063

VI. ANALISIS DE RESULTADOS

A.- Viabilidad de Azospirillum en la rizósfera de Panicum maxi
mun.

Se puede apreciar en el cuadro número 2 y gráficas número 1, 2, 3, y 4 que la mezcla en la mayoría de los casos, mantiene una buena reproducción y persistencia de la bacteria en la rizosfera.

El luvisol, también propicia el desarrollo y la persistencia de la bacteria, aunque en el tratamiento inoculado no estéril, hay un decremento muy marcado en su número, debido -- probablemente a la competencia de microorganismos existentes -- en el soporte.

En los análisis químicos efectuados, el luvisol presentó un contenido más elevado de nutrimentos, pudiendo ser el -- motivo por el cual la bacteria, tanto en la mezcla luvisol-arena, como en dicho suelo, se reproduzca y persista en número -- adecuado para infectar la planta.

El vertisol, se puede considerar intermedio en favorecer el crecimiento de Azospirillum, ya que en dos de los cuatro tratamientos, la población decrece con mayor rapidez que --

en la mezcla y el luvisol.

La arena probablemente por fenómenos de lixiviación, tamaño de partícula y superficie activa pequeña, no puede retener a las bacterias, no existiendo respuesta a la inoculación.

B.- Tiempo en el que Azospirillum, infecta a las plantas de Panicum maximum.

De acuerdo con el cuadro número 3, en todos los casos en que se inoculó y esterilizó el soporte, las plantas presentaron infección por la bacteria desde la primera semana, a excepción de la arena debido a que este soporte, no fué propicio para la reproducción activa de Azospirillum en la rizosfera y por lo tanto no hubo infección hasta la tercera semana.

En el caso del tratamiento de soporte, inoculado, no estéril, solamente en el luvisol se presenta una infección constante desde la primera semana encontrándose por lo tanto una buena respuesta en el peso seco de la planta, mientras que en los otros soportes, tanto la infección como el peso seco de la planta son variables.

Para el tratamiento no inoculado estéril, como era de esperarse no hubo infección por Azospirillum en tres de los soportes, excepto en el caso del suelo luvisol, probablemente por

contaminación de partículas de suelo de los otros tratamientos en el invernadero, notándose en este caso un aumento en el peso seco de la planta.

En el tratamiento, no inoculado no estéril, también se encuentra infección por Azospirillum en el luvisol, pero en este caso no hay respuesta a la infección, ya que dichas plantas no observan incremento en su contenido de peso seco, pudiendo deberse esto a la presencia en el suelo, de cepas de Azospirillum nativas infectivas, pero ineficientes en la fijación de nitrógeno, lo cual es posible ya que en dichos suelos, fueron utilizados para el cultivo de maíz.

C.- Efecto de la inoculación con Azospirillum, en el peso seco de las plantas de Panicum maximum.

1) Experimento preliminar.- En la sección de resultados, se puede observar que el peso seco de las plantas inoculadas, es de más o menos el doble que el de las no inoculadas, existiendo una respuesta a la inoculación, sin embargo el peso seco de las plantas fertilizadas con KNO_3 , es el doble de las inoculadas, indicándonos que el nitrógeno proporcionado por la simbiosis, no es el suficiente para el óptimo desarrollo de la planta.

En dicho experimento las temperaturas fluctuaron entre 9° y 45° C., encontrándose la mayoría de las plantas alrededor-

de 19° C., afectando indudablemente esto, la actividad nitrogenosa de la bacteria y consecuentemente los resultados obtenidos.

2) Peso seco obtenido en el experimento de viabilidad y tiempo de infección.- Observando el cuadro número 4 y las gráficas número 5 y 9, correspondientes al luvisol, se puede apreciar que en el caso de los testigos no inoculados, en el momento en que aparece Azospirillum en la rizosfera debido probablemente a alguna contaminación, el peso seco sufre un buen incremento, mientras que los testigos inoculados tienen un incremento más o menos constante, al igual que las bacterias, las cuales permanecen con una determinada población, principalmente en el caso del soporte esterilizado, en el cual no hay ninguna competencia en el inicio, mientras que el soporte no esterilizado la población de Azospirillum, viene creciendo en forma constante.

En las gráficas número 6 y 10, el vertisol inoculado no estéril, mantiene la población de Azospirillum más o menos constante, mientras que el peso seco de las plantas es el menor, pudiéndose pensar en la probabilidad de la existencia en dicho soporte, de cepas nativas, que tienen la capacidad de denitrificar o que son ineficientes en la fijación de nitrógeno. Esto se puede confirmar en el tratamiento inoculado y estéril, ya que aquí a pesar de haber baja población de Azospirillum, -

las plantas observan un buen incremento en el contenido de peso seco, por la infección de las cepas inoculadas. En cuanto a los tratamientos no inoculados el incremento en peso seco, con pendientes semejantes a la anterior, aunque con valores menores, probablemente se deba a la respuesta del nitrógeno contenido en el suelo.

En la mezcla de vertisol-arena, gráficas número 7 y 11, no se observa gran diferencia en el peso seco de las plantas, pero el análisis de los resultados es parecido en algo al anterior, ya que en el caso mezcla inoculada no estéril, el peso seco es menor en comparación con el inoculado estéril, pero cuando la población bacteriana disminuye, hay un buen incremento en el peso seco, confirmando tal vez lo anteriormente dicho, de la probabilidad de cepas nativas. En el caso de soporte inoculado estéril, la población se mantiene constante, y el incremento en peso seco también se mantiene constante. Para los tratamientos no inoculados las pendientes son semejantes, pero en el caso de no esterilizar, esta se encuentra más abajo con respecto al esterilizado.

Cuando se usó arena como soporte (gráficas 8 y 12), no se observa ninguna respuesta a ningún tratamiento, ya que las pendientes casi son iguales en todas las curvas, y la población de Azospirillum más o menos sufre la misma variación a los diferentes tratamientos.

E.- Presencia de Azospirillum en algunas gramíneas muestreadas en diferentes zonas del país.

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, - Azospirillum, se encuentra en alta proporción en suelos de zonas tropicales y semi-tropicales, y en mucho menor en regiones templadas. De los resultados obtenidos, se puede decir, - que dicho microorganismo, logró ser aislado de suelos de diversos climas, como son el semi tropical, templado cálido, sin embargo no se puede dar ninguna conclusión definitiva, ya que dicho muestreo no es estadísticamente representativo y solo nos da un indicio de la presencia del microorganismo en diferentes regiones del país.

F.- Viabilidad de Azospirillum en turba.

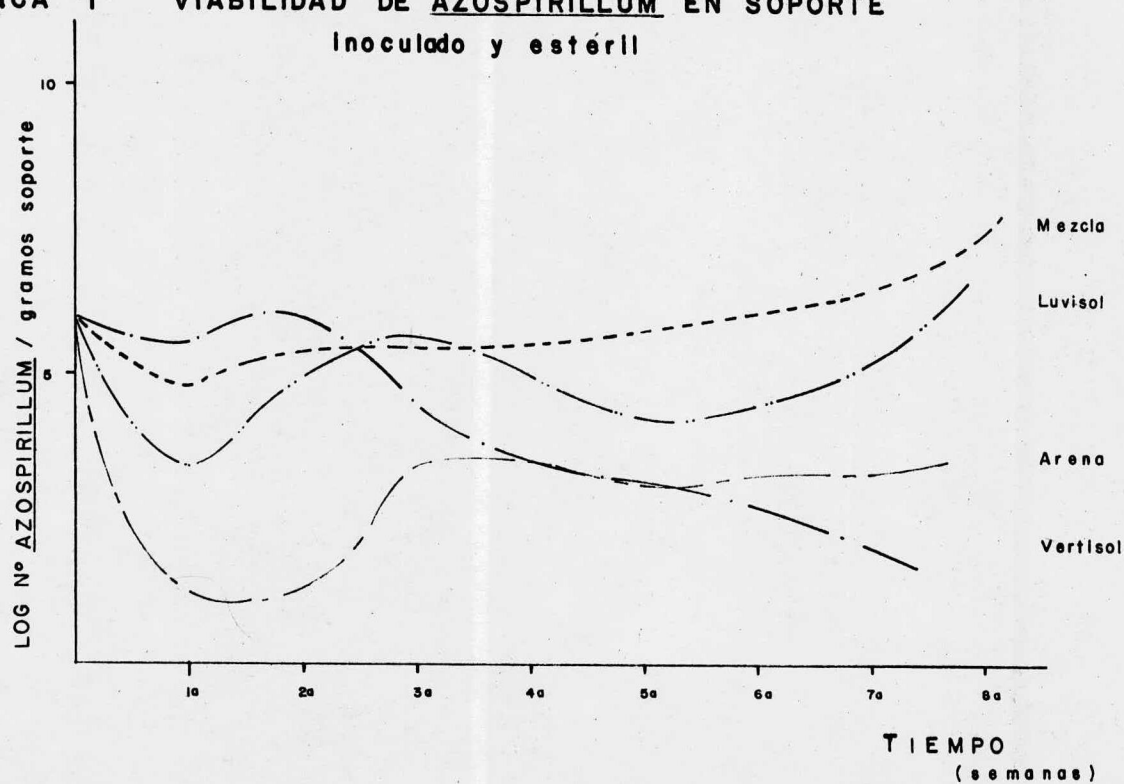
Para la posible preparación de inoculantes de Azospirillum, es necesario utilizar un material excipiente que mantenga viable al microorganismo.

En el caso de inoculantes de Rhizobium, se han usado como soportes, suelo, bagazo de caña de azúcar, composta, cultivos líquidos, agar, pero el material que ha proporcionado mejores resultados es la turba, ya que sus características influyen mucho en su capacidad de mantener viva a la bacteria, como son un alto contenido en materia orgánica, alta retención de -

humedad, pH aproximadamente de 7.

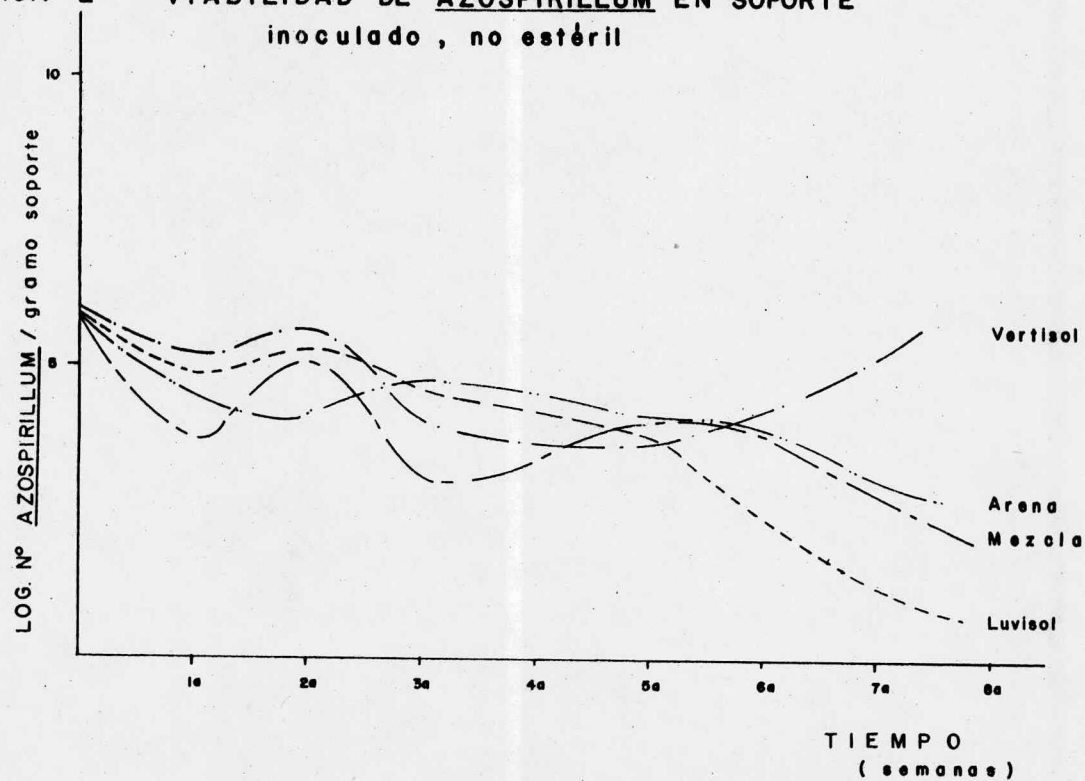
Por las razones antes expuestas, se usó la turba, para observar la viabilidad de Azospirillum en dicho excipiente. De los resultados de la gráfica número 13, se puede considerar -- que la turba es adecuada, ya que mantiene hasta por seis meses una población más o menos constante, en las dos cepas probadas así como en la mezcla de cepas, aunque en ésta, durante los -- primeros meses tuvo una población menor en relación a las otras dos, debido probablemente a una adaptación de dichos microorganismos a el habitat en el que estuvieron expuestos, pero al -- final la población llegó a igualarse, confirmando la capacidad de este sustrato para la reproducción de Azospirillum.

GRAFICA I VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN SOPORTE
Inoculado y estéril

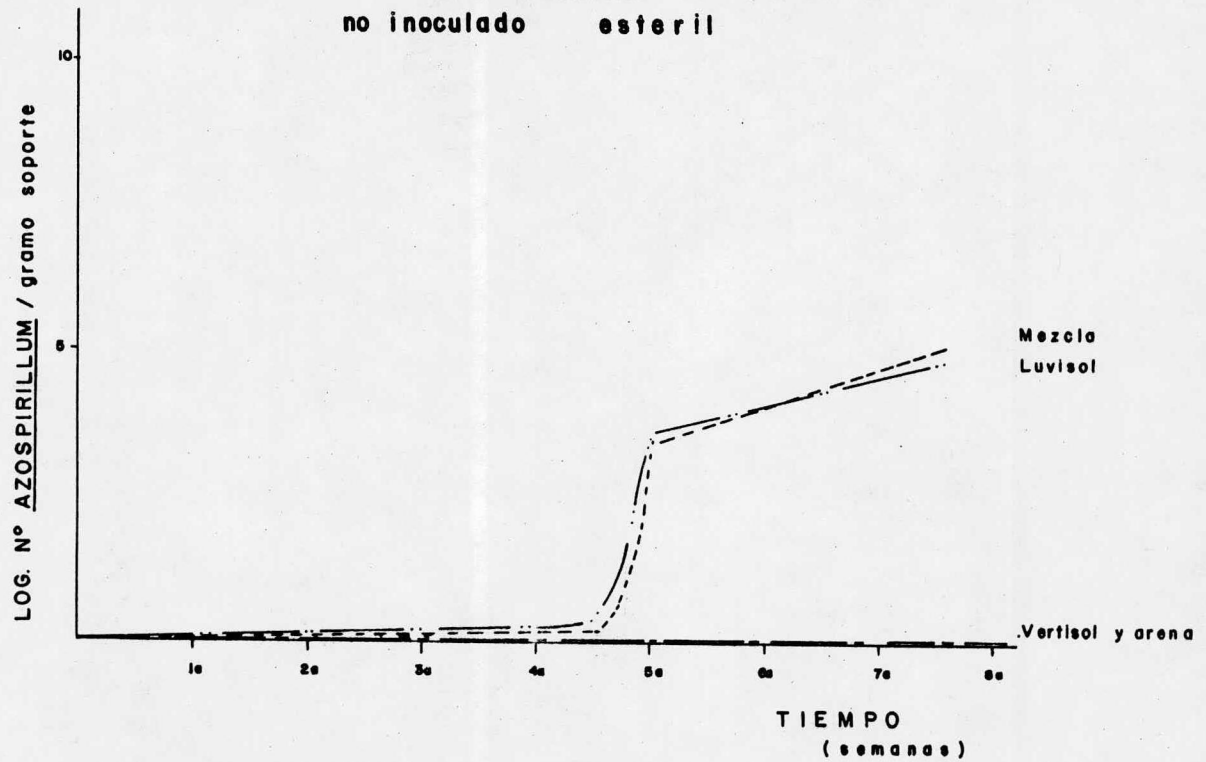


GRAFICA 2

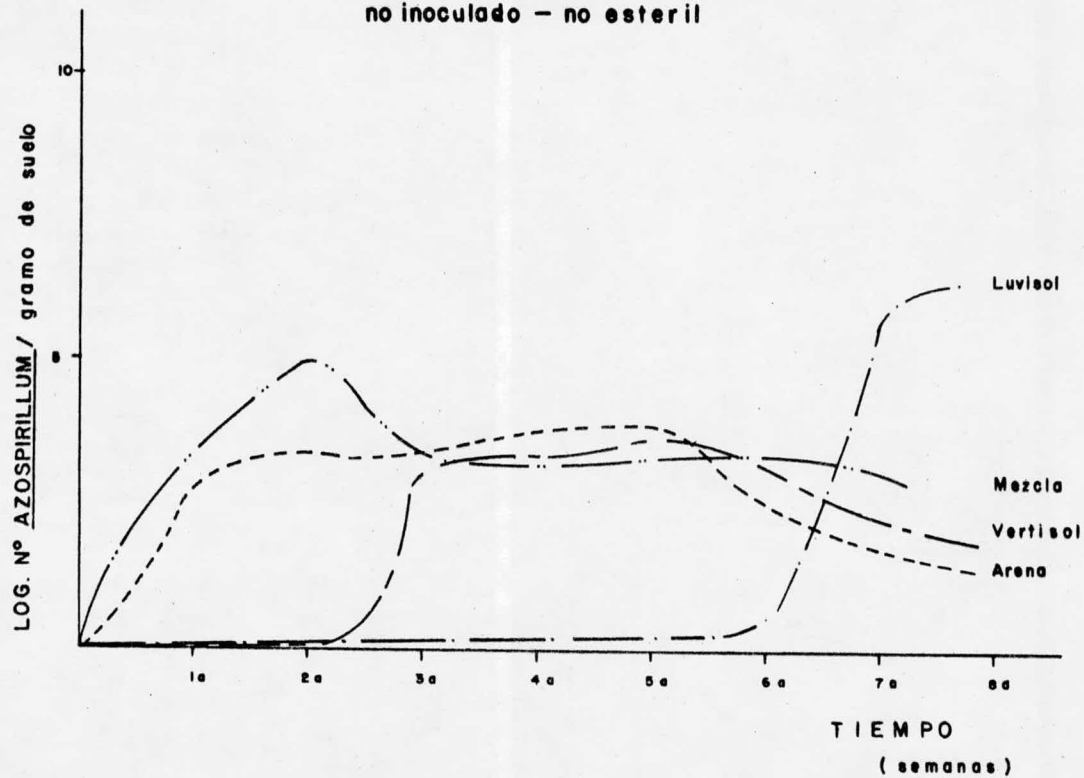
VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN SOPORTE
inoculado , no estéril



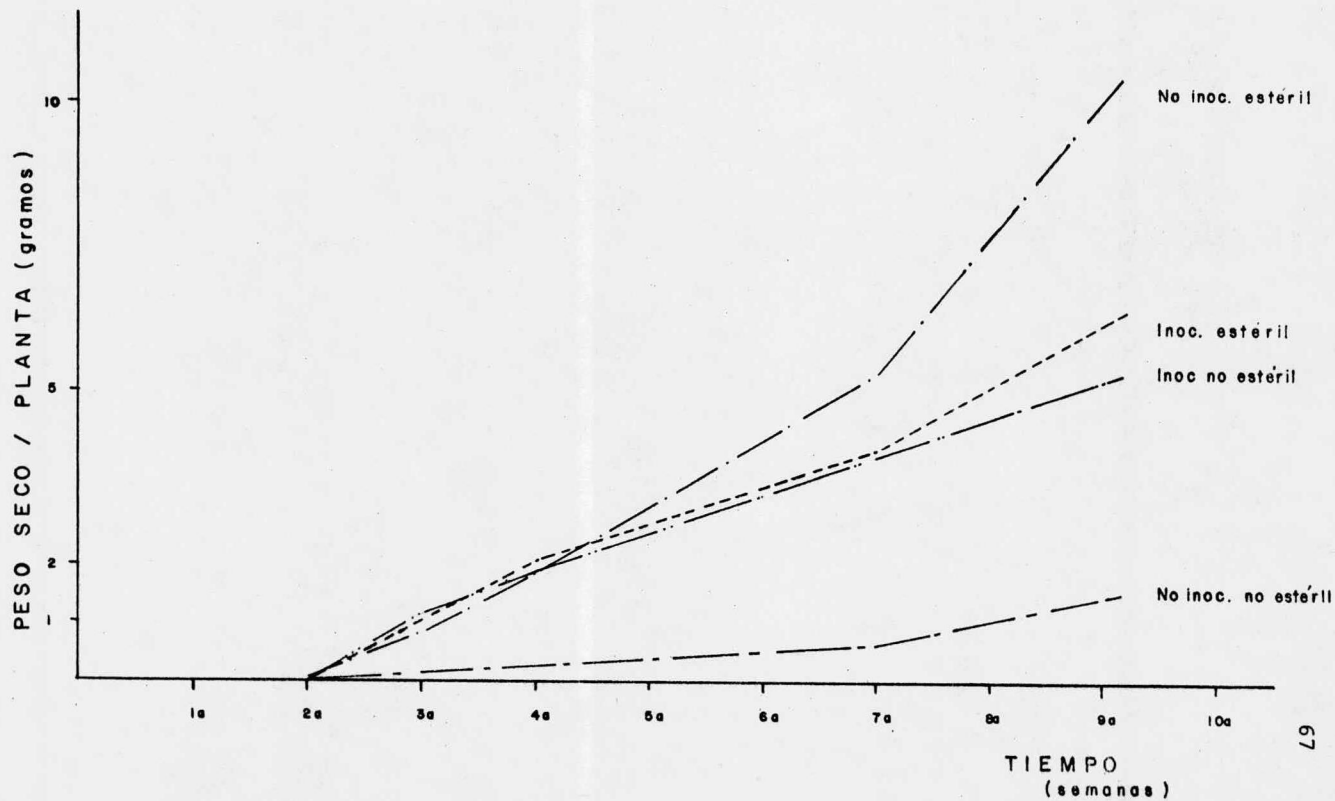
GRAFICA 3 VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN SÓPORTE
no inoculado esteril



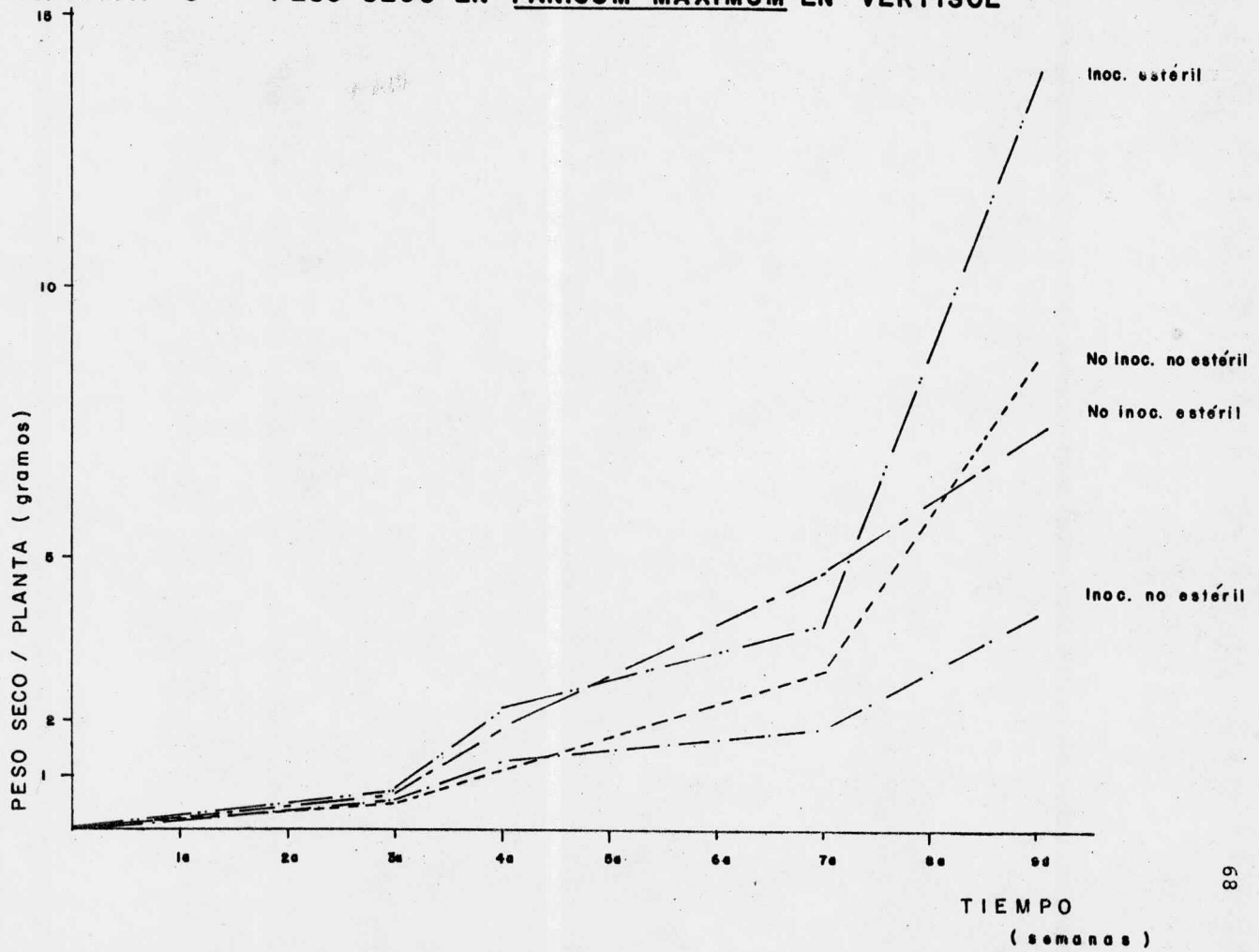
GRAFICA 4 VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN SOPORTE
no inoculado - no esteril



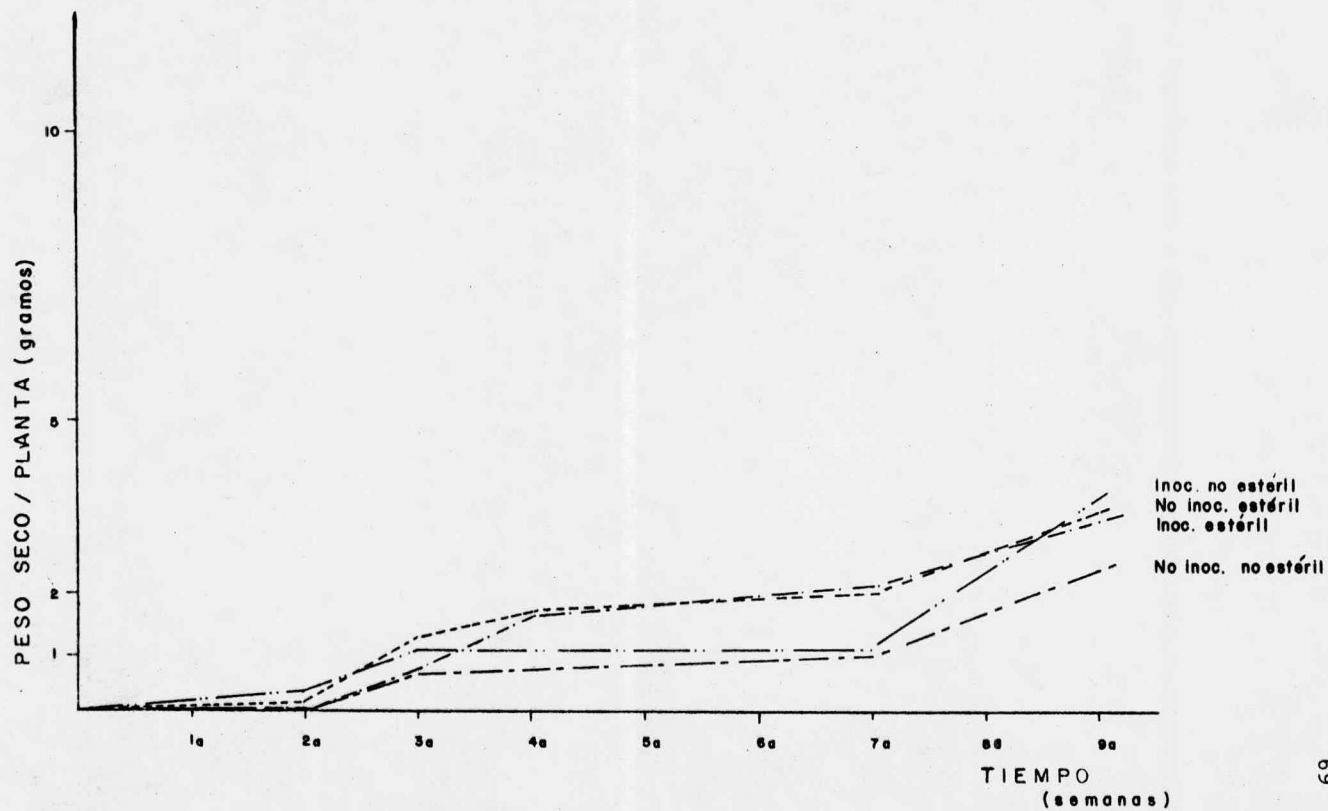
GRAFICA 5 PESO SECO DE PANICUM MAXIMUM EN LUVISOL



GRAFICA 6 PESO SECO EN PANICUM MAXIMUM EN VERTISOL

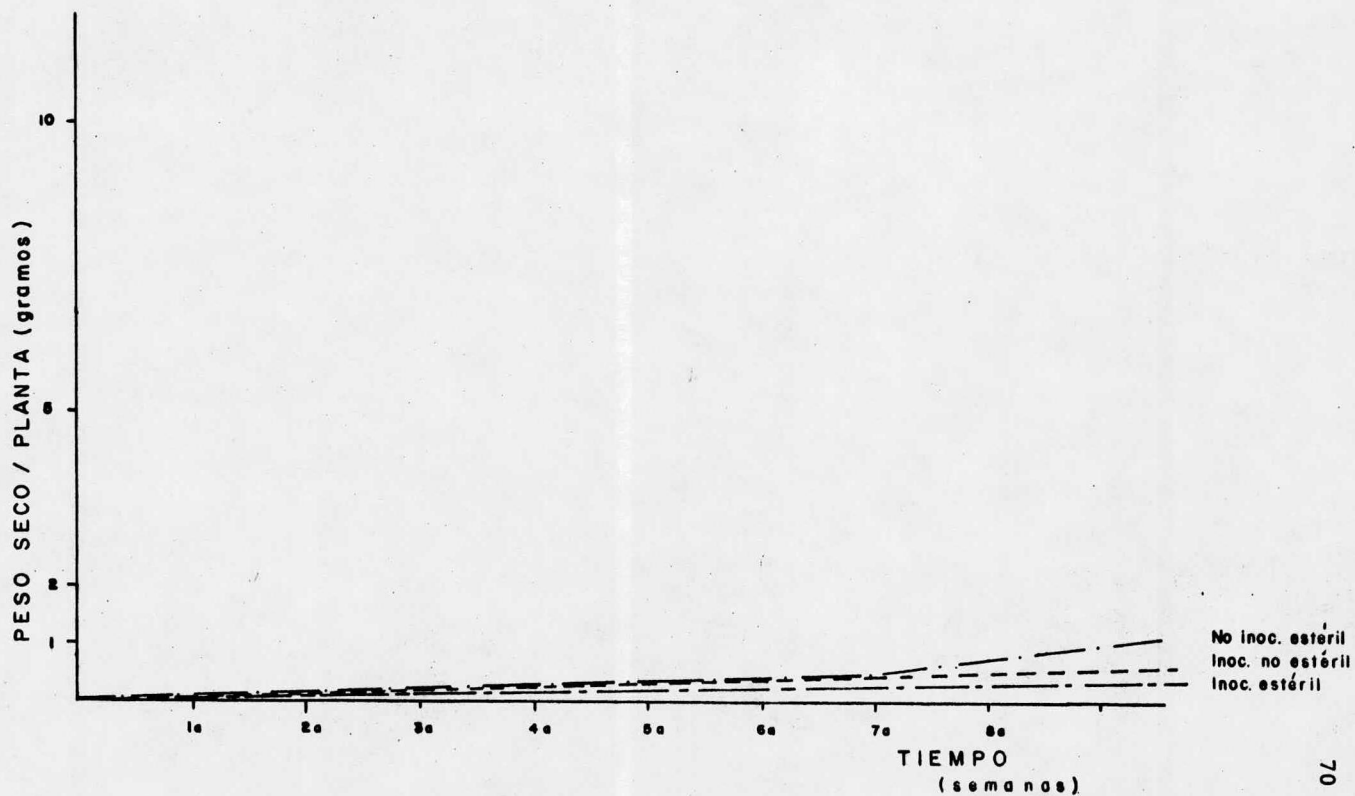


GRAFICA 7 PESO SECO DE PANICUM MAXIMUM EN MEZCLA

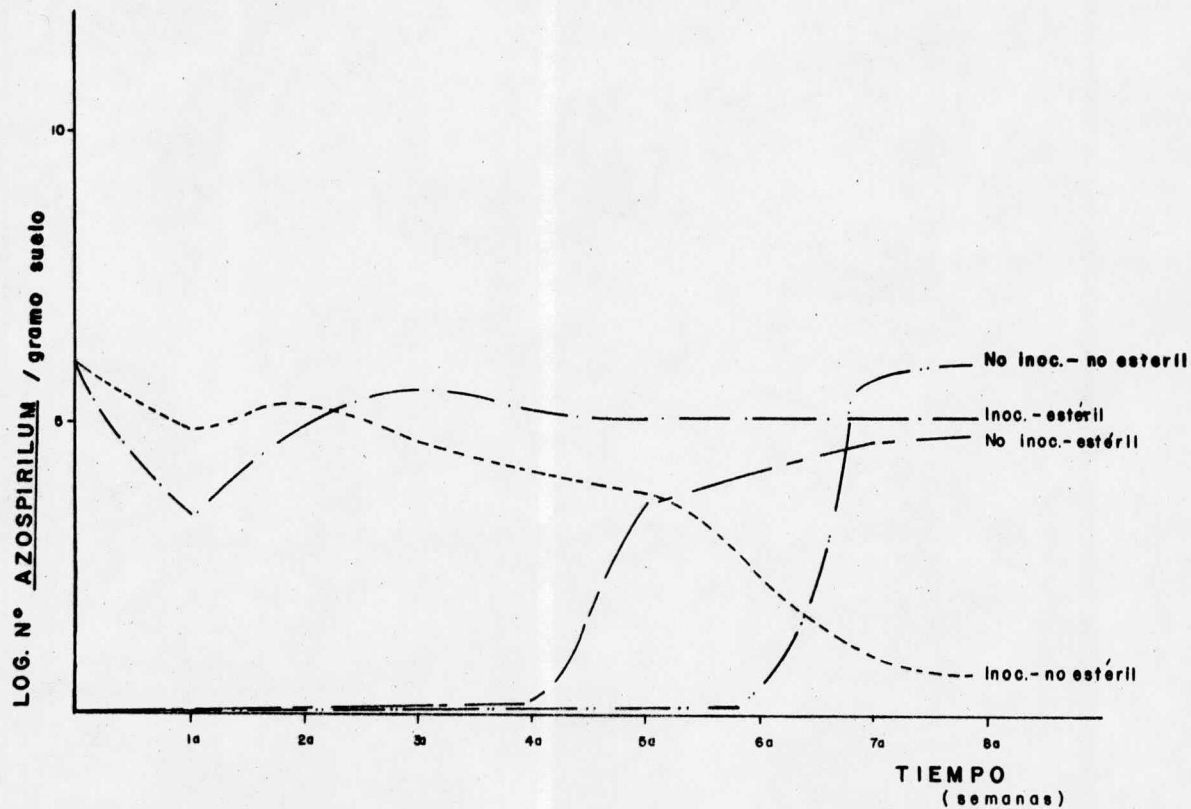


GRAFICA 8

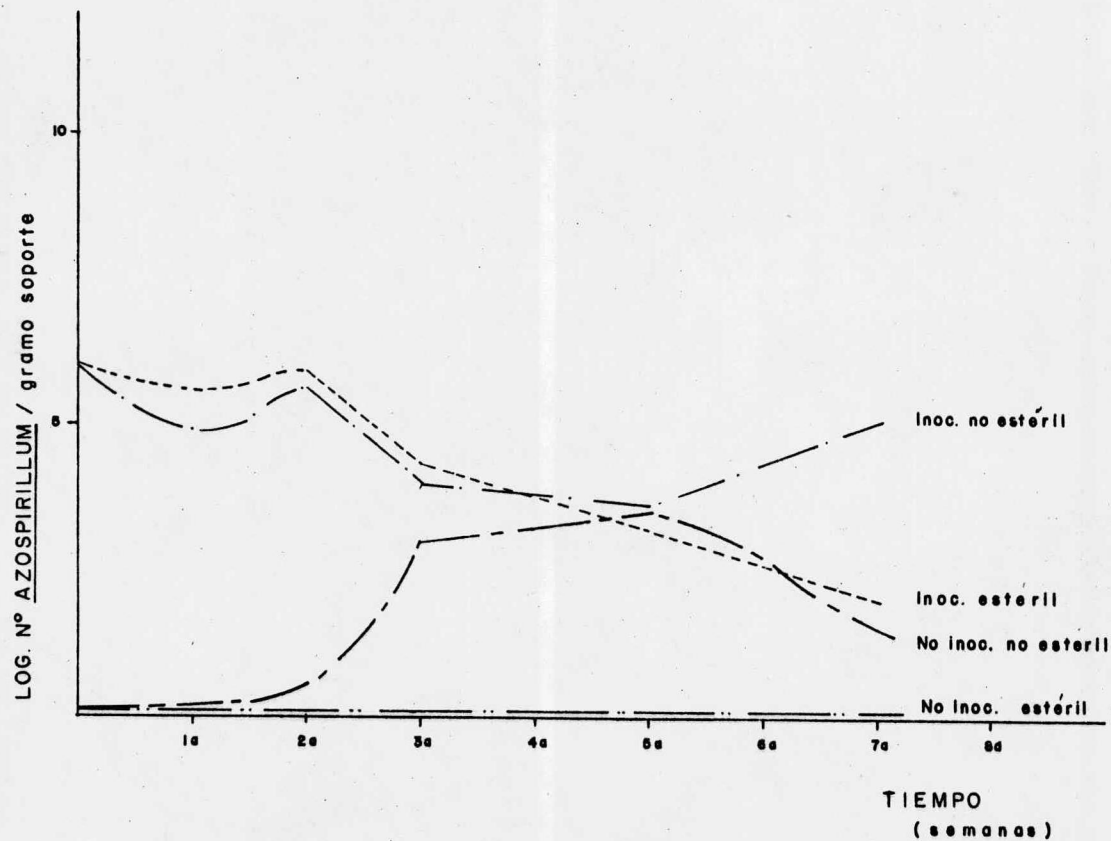
PESO SECO DE PANICUM MAXIMUM EN ARENA



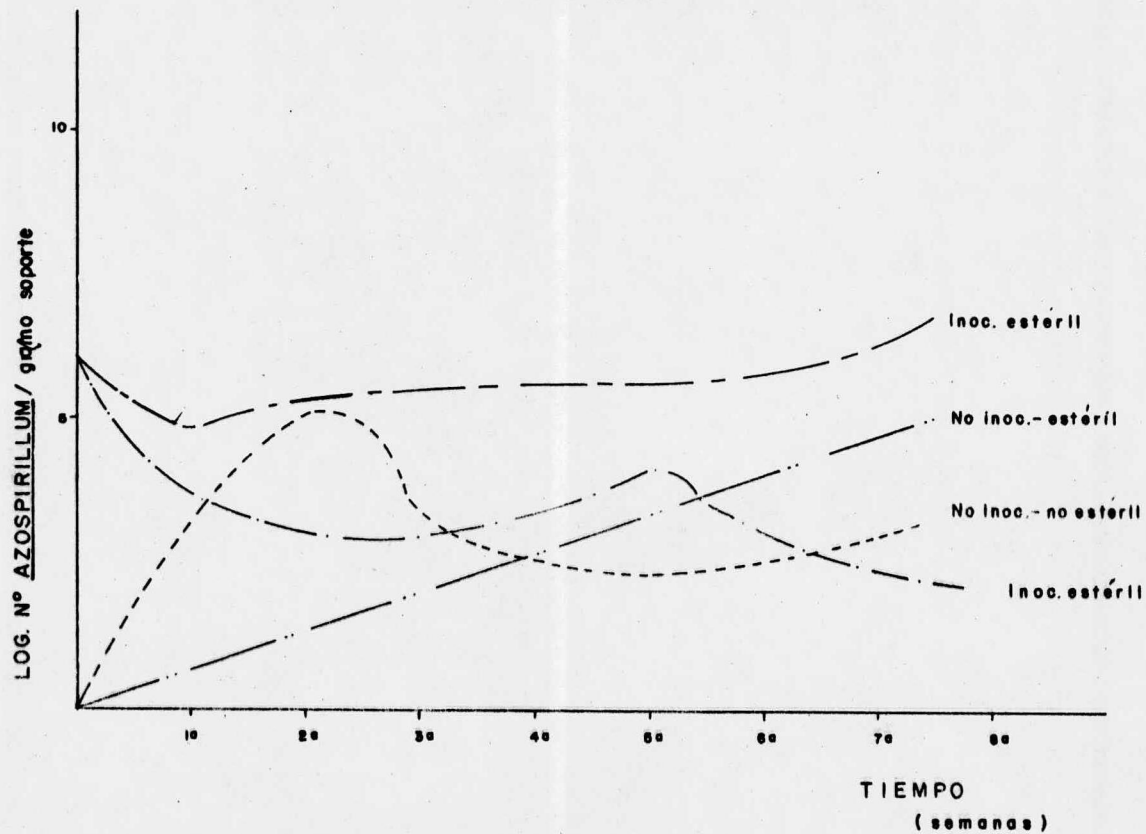
GRAFICA 9 VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN LUVISOL



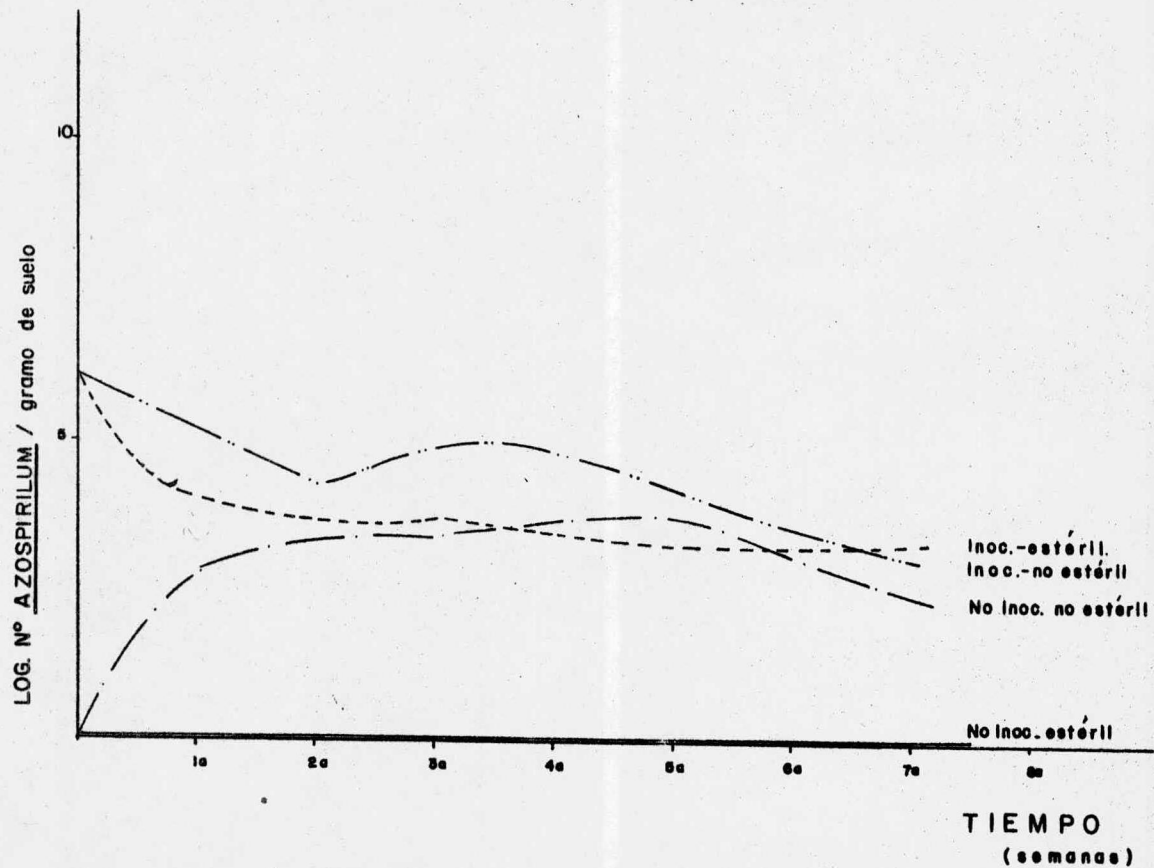
GRAFICA 10 VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN VERTISOL



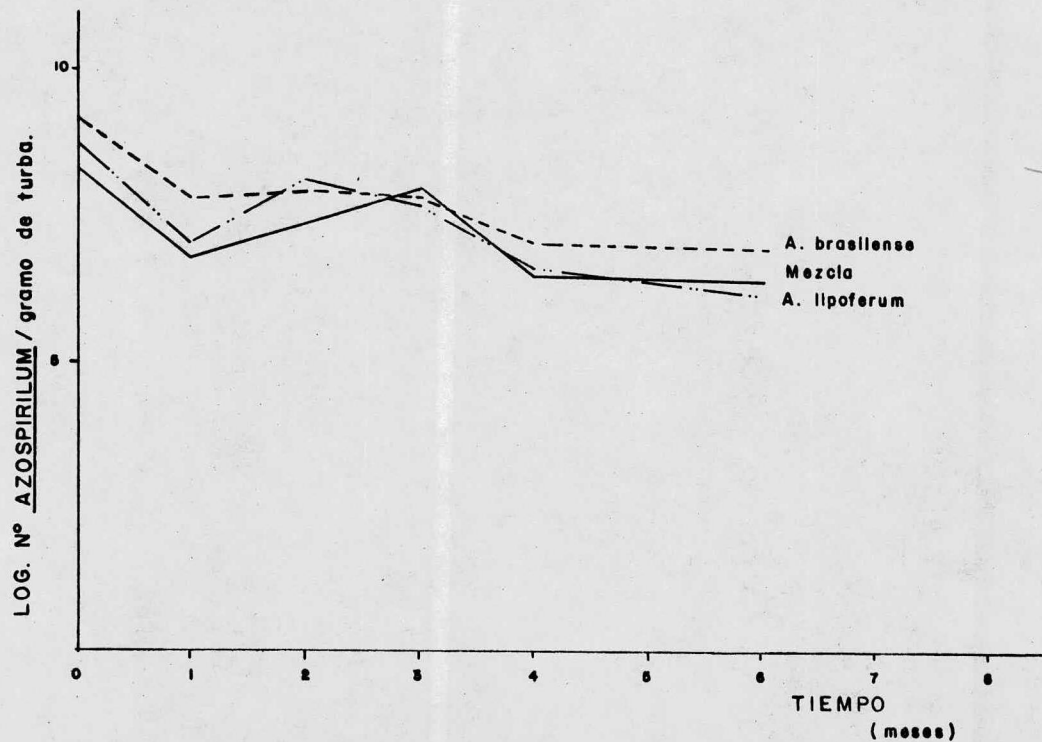
GRAFICA II VIABILIDAD DE AZOSPIRILUM EN MEZCLA



GRAFICA 12 VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN ARENA



GRAFICA 13 VIABILIDAD DE AZOSPIRILLUM EN TURBA



VII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

La fijación de nitrógeno en algunas gramíneas, como ya ha sido mencionado, es un fenómeno que puede ser de gran utilidad, siempre y cuando se manipule adecuadamente, ya que ésta presenta algunos problemas que la afectan tanto en su infectividad, como en su efectividad.

En los experimentos efectuados, se observó que al inocular Azospirillum, es capaz de reproducirse y mantenerse en la zona de la rizosfera y una vez alcanzado una población adecuada, infecta a las raíces de Panicum maximum, fijando nitrógeno y produciendo un incremento en el peso seco de dichas plantas.

En algunos casos las plantas se infectan en el invernadero, pero su peso seco no se incrementa, pudiendo deberse esto a la existencia en el suelo de cepas nativas infectivas pero no efectivas o en la presencia de mutantes de Azospirillum con la enzima nitrito reductasa, capaz de desasimilar los nitritos a nitrógeno gaseoso, fenómeno que fué observado en suelos no esterilizados provenientes de cultivo de maíz.

En el caso de la simbiosis Rhizobium - leguminosa, la -

existencia de cepas nativas en el suelo, es un serio problema en la práctica de inoculación, ya que debido a su competencia, los microorganismos inoculados no pueden infectar a su huésped y por lo tanto no se presenta una respuesta positiva a la inoculación.

Este problema puede presentarse también, en el caso de Azospirillum, por lo que es importante el estudiar la incidencia de estos microorganismos en el Territorio Nacional. De los aislamientos efectuados, se encontró que un 70% de las plantas estudiadas contienen Azospirillum en simbiosis con las gramíneas, cuya efectividad en la fijación de nitrógeno es desconocida, siendo necesario comprobarla y cuantificarla, tanto en laboratorio, invernadero y en campo, trabajo que correspondería a investigaciones posteriores. Como el número de plantas estudiadas es muy pequeño y las zonas muestreadas corresponden a diferentes climas, este resultado nos da una ligera información de la incidencia del microorganismo, dato que debe ser considerado para el caso de que se quieran efectuar inoculaciones a nivel de campo.

Para la preparación de inoculantes de gramíneas, es necesario contar con un soporte apropiado para Azospirillum, habiéndose encontrado que la turba puede servir a tal propósito, para preparar inoculantes, en el caso de que la inoculación de gramíneas se convierta en una práctica agrícola común.

Los datos reportados en este trabajo nos indican la posibilidad de la inoculación, pero antes de efectuarla en el campo, es necesario llevar a cabo una serie de estudios sobre los factores ecológicos limitantes de la simbiosis, así como de los aspectos manipulables para obtener mayores rendimientos en la producción de gramíneas, puesto que al encontrarse la solución para el problema que presenta la simbiosis Azospirillum - gramíneas, se revolucionará la agricultura, debido a que los requerimientos nitrogenados de los cultivos agrícolas más importantes del mundo podrán abastecerse parcial o totalmente.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abrantes G.T.V., Day J.M., Dobereiner J. (1975) Métodos - para o estudo de nitrógenasa em raices de gramíneas colhidas no campo ANAIS DO XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA-DO SOLO. Pág. 137-142
- 2.- Balandreau J., Ducerf P., et al (1978). Limiting factors- in grass nitrogen fixation. LIMITATIONS AND POTENTIALS - FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Sciences. Vol. 10. Plenum Press. New York U.S.A. Pág. 275-301.
- 3.- Baldani V.L.D. et Dobereiner J. (1979) Host plant specifity in the infection of cereals with Azospirillum sp. (No-publicado)
- 4.- Bergersen F.J. (1978) Leghaemoglobin, oxygen supply and nitrogen fixation studies with soybean nodules. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE -- TROPICS. Basic Life Sciences. Plenum-Press. New York. - U.S.A. Pags. 247-262
- 5.- Bergensen F.J., Gibson A.H. (1978) Nitrogen fixation by -



- Rhizobium spp in laboratory culture media. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Sciences. Plenum Press. New York -- Vol. 10. Pags. 263-273.
- 6.- Black C.A. et al (1965). Methods of Soil Analysis. AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY. No. 9 Vol. Pags.
- 7.- Bouyoucos G.J. (1951). A recalibration of the hydrometer-method for making mechanical analysis of soils. AGRONOMY-JOURNAL. Vol 42. Pags. 434-438.
- 8.- Burris R.H., Ljones T., Emerich D.W. (1978) Nitrogenasa - systems. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Sciences. Plenum Press. New York U.S.A. Vol. 10. Pags. 191-207.
- 9.- Brill J. Winston (1978) Genetics and regulation of nitrogen fixation. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Science. Plenum Press. New York. U.S.A. Vol. 10. Pags. 237-246.
- 10.- Burris R.H., Albrecht S.L., Okon Y. (1978) Physiology and biochemistry of Spirillum lipoferum. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS Basic Life Sciences. Plenum Press New York. U.S.A. Vol. 10. Pags. 303-315.
- 11.- Cheng Y Bray (1951) SOIL SCIENCE. Vol. 72. Pag. 449-458.

- 12.- Dart P.J., Day J.M. (1975) Non symbiotic nitrogen fixation in soil. SOIL MICROBIOLOGY. A critical review. Edited by N. Walker. Butterworths. London. Pag. 225-251.
- 13.- Day J.M. y Dobereiner J. (1976) Physiological aspects of N₂ fixation by Spirillum from Digitaria roots. SOIL BIOL - BIOCHEM. Vol 8 Pags. 45-50.
- 14.- Dobereiner J. (1966) Azotobacter paspali spn uma bacteria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. PESQ. -- AGROP. BRAS. Vol 1 Pags. 357-365.
- 15.- Dobereiner J., Day J.M., y Dart D.J. (1972). Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the Paspalum notatum -- Azotobacter paspali association. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY. Vol 71. Pags. 103-116.
- 16.- Dobereiner J. y Day J.M. (1974) Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF N₂ FIXATION. WASHINGTON STATE UNIVERSITY. Pag. 518-538.
- 17.- Dobereiner J., Day J.M., Von Bulow J.F.W. (1975) Associations of nitrogen fixing bacteria with roots of forage -- grass and grain species. PROC LL INTERN. WINTER CONF. Zagreb Yugoslavia. Univ. Nebraska. Pags. 221-237.
- 18.- Dobereiner J. (1975) Fixação de Nitrogênio atmosférico em gramíneas tropicais. ANAIS DO XV CONGRESSO BRASILEIRO DE

CIENCIA DO SOLO. Pag. 593-602.

- 19.- Dobereiner J., Marriel I.E. y Nery M. (1976) Ecological - distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck. CAN J. MICROBIOL. Vol. 22 Pags. 1464-1473.
- 20.- Dobereiner J. Fixação de nitrogênio em gramíneas (1977) -- REV. BRASIL CIENC. SOLO. Vol 1 No. 1.
- 21.- Dobereiner J. (1977). Nitrogen fixation in grass. Bacteria associations in the tropics. ADVISORY COMMITTEE MEETING. IAEA. Vienna.
- 22.- Dobereiner J. (1977). Nitrogen fixation in grass bacteria associations, a summarized review of recent progress. PROGRAM FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN TRAINING AND BASIC RESEARCH ON NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS.
- 23.- Dobereiner J. (1977). Plant genotype effects on Nitrogen fixation in grasses. GENETIC DIVERSITY IN PLANTS. Plenum Press New York U.S.A. Pags. 325-334.
- 24.- Dobereiner J. (1978) Biological Nitrogen fixation in tropical grasses. Possibilities for partial replacement of mineral N fertilizers. AMBIO Vol 6 No. 2-3 Pags. 174-177.
- 25.- Dobereiner J. (1978) Potential for Nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Sciences. Plenum Press. New York U.S.A. Vol 10 Pág 13-23.

- 26.- Dobereiner J. (1979) Forage grasses and grain crops. No - pub.
- 27.- Dobereiner J. Baldani V.L.D. (1979). Selective infection of maize roots by Streptomycin resistant Azospirillum lipoferum and other bacteria. En publicación.
- 28.- Dommergues Y., Balandreau J., Rinaudo G. y Weinhard (1973) Non symbiotic nitrogen fixation in the rhizosphere of rice maize and different tropical grasses. SOIL BIOL. BIOCHEM. Vol 5. Pag 83-89.
- 29.- Evans H.J., Ruiz Argüeso T., Russell S. A. (1978). Relationship between hydrogen metabolism and nitrogen fixation in legumes. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Sciences Plenum Press. New York. U.S.A. Vol 10 Pag. 209-221.
- 30.- Halliday J. (1976) Energía y fijación de nitrógeno VIII-REUNION LATINOAMERICANA SOBRE RHIZOBIUM. CALI COLOMBIA. Pag. 153-177.
- 31.- Jackson M.L. (1958). SOIL CHEMICAL ANALYSIS. Prentice - Hall. Englewood Cliffs. New Jersey. Pags. 38-49, 157 -- 153, 219-221, 312-314, 459-463.
- 32.- Knowles R. (1978). Free - living bacteria. LIMITATIONS- AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Sciences. Plenum Press. New York. U.S. A. Vol 10. Pag. 25-39.

- 33.- Magalhães L.M.S., Nery C.A., Dobereiner J. (1978) Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N_2 - fixing Azospirillum spp. ARCH. MICROBIOL. Vol 117 Pags. 247 -- 252.
- 34.- Neves M.C.P., Nery M., Day J.M. (1975) Effects of temperature on the N_2 - fixation of Spirillum strains isolated from Digitaria and Maize. XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO.
- 35.- Neyra C.A. y Dobereiner J. (1977). Nitrogen fixation in grasses. ADVANCES IN AGRONOMY. Academic Press Inc. Vol. 129.
- 36.- Neyra C.A., Van Berkum P. (1977) Nitrate reduction and nitrogenase activity in Spirillum lipoferum. CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY. Vol. 23 No. 3 Pags. 306-310.
- 37.- Neyra C.A., Dobereiner J., Larande R. y Knowles R. (1977) Denitrification by N_2 fixing Spirillum lipoferum CAN. J. MICROBIOL. Vol. 23 Pag. 300-305.
- 38.- Neyra C.A. (1978) Interactions of plant photosynthesis - with dinitrogen fixation and nitrate assimilation. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION- IN THE TROPICS. Basic Life Sciences. Plenum Press. New York, U.S.A. Vol. 10 Pag. 111-117.
- 39.- Okon Y., Albrecht S.L. y Burris R.H. (1976). Carbon -- and ammonia Metabolism of Spirillum lipoferum. JOURNAL-

OF BACTERIOLOGY. Vol. 10 Pag. 128

- 40.- Olsen, Cole, Watanabe y Dean (1958). Estimulation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. U.S. DEPT. AGR. CIRC. 939 Pag. 151-153.
- 41.- Patriquin D.G. y Dobereiner J. (1978) Light microscopy - observations of tetrazolium - reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brasil. CAN-J. MICROBIOL. Vol. 24 Pag. 734-742.
- 42.- Peña J.J., Dobereiner J. (1974) Efecto del nitrato y amonio en la actividad de la nitrogenasa de bacterias tropicales fijadoras de nitrógeno atmosférico. REV. LAT. AMER. MICROBIOL. Vol 16. Pag. 33-44.
- 43.- Pereira P.A.A., Von Bulow J.F.W. y Neyra C.A. (1978) Actividade da nitrogenase, nitrito reductase e acumulacao de nitrogênio en milho braquitica Zea mays L (CU piranao) em dois niveis de adubacao notrogenada R.BRAS. CI. SOLO. Vol. 2 Pags. 28-33
- 44.- Quintero Ramos M.J. (1978) Fijación biológica de nitrógeno. Tesis predoctoral E.N.C.B. I.P.N. México.
- 45.- Robinson J.A. Atomic absorption spectroscopy () Ed.- Dekker. New York. U.S.A.
- 46.- Scott D.B. (1978) Ammonia assimilation in N_2 fixing systems. LIMITATIONS AND POTENTIALS FOR BIOLOGICAL NITROGEN

FIXATION IN THE TROPICS. Basic Life Sciences. Plenum Press. New York. U.S.A. Vol. 10 Pag.

- 47.- Smith R.L., Bouton J.H., Schank S.C. (1975) Yield increases of tropical grain and forage grasses after inoculation with Spirillum lipoferum in Florida. INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE. Nigeria.
- 48.- Smith R.L. et al. (1976) Nitrogen fixation in grasses inoculated with Spirillum lipoferum. SCIENCE. Vol. 193 Pag. 1003-1005.
- 49.- Smith R.L. et al (1978). Grass-bacteria nitrogen fixation in Florida. Preliminary results.
- 50.- SOIL SCIENCE Vol. 81 Pág. 223-228.
- 51.- Stewart W.D.P. (1969) Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living microorganism. PROC. - ROYAL SOC. Vol. 172 - B. Pag. 367-388.
- 52.- Tarrand J.J., Krieg N.R. y Dobereiner J. (1978). A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus Azospirillum gen. nov. and two species Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. -- and Azospirillum brasilense sp. nov. CAN. J. MICROBIOL -- Vol. 24.
- 53.- Umali García M. et al (1976) Process of infection of Panicum maximum by Spirillum lipoferum. THE INTERNATIO--

NAL SYMPOSIUM IN ENVIRONMENTAL ROLE OF NITROGEN FIXING --
BLUE. GREEN ALGA AND ASYMBIOTIC BACTERIA. Uppsala. Swe-
den. Pag. 373-379.

54.- Vincent J.M. (1975) Nitrogen fixation in maize. SCIENCE-
Vol. 189 No. 368 Pag. 116-118.

55.- Vincent J.M. (1975) Manual práctico de Rizobiología 1a.
Ed. Ed. Hemisferio Sur. Argentina.

9. Cherg y Bray (1951) Determination of calcium and magne-
sium in soil and plant material. SOIN SCIENCE Vol. No. 72.
pág. 449-458.