

Ref. 61



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO DE CEPAS
DE AZOSPIRILLUM EN TURBA**

TESIS MANCOMUNADA

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A N :

**HERNANDEZ PATIÑO SILVIA
RUIZ SOTELO HILDA MA. DEL CARMEN**

MEXICO, D. F.

1987



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 está 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.

INDICE GENERAL

- I.- INTRODUCCION
- II.- GENERALIDADES
- III.- OBJETIVOS
- IV.- PARTE EXPERIMENTAL
- V.- DISCUSION DE RESULTADOS
- VI.- RESUMEN
- VII.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- VIII.- BIBLIOGRAFIA
- IX.- APENDICE

I.- INTRODUCCION

La agricultura tiene gran importancia para la humanidad, pues de ella depende su sobrevivencia. El actual aumento en la población ha preocupado a los investigadores y ha causado que se intensifiquen los estudios sobre el aumento en la producción agrícola. Pero esto ha llevado a la utilización de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados, lo que implica la contaminación de las tierras, además del gasto de recursos no renovables y grandes costos en la producción de dichos fertilizantes.

Este problema ha provocado que muchos investigadores se interesen más en el fenómeno de la fijación biológica del nitrógeno y su repercusión, en la productividad agrícola y la conservación de la fertilidad del suelo. Dentro de estos estudios son de particular importancia los efectuados por Döbereiner y Day quienes reportaron la existencia de la simbiosis de un grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno con gramíneas y pastos forrajeros, lo que constituiría una posible alternativa para aumentar la producción de gramíneas que son la base de la alimentación mundial. (23) (31)

A partir de entonces se ha generado abundante literatura sobre las características morfológicas y bioquímicas de

estas bacterias, así como su eficiencia en la fijación de nitrógeno y el efecto de la inoculación sobre la producción y contenido de nitrógeno de vegetales superiores.

La mayoría de los investigadores se han interesado en la capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno pero algunos están estudiando la respuesta de la planta a las hormonas producidas por la bacteria (9) (28). Existiendo a la fecha discrepancias sobre el verdadero efecto sobre el desarrollo vegetal y una inquietud común por aclarar si su efecto es causado por la capacidad de fijación de nitrógeno o la producción de fitohormonas.

Lo anterior indica la importancia de realizar estudios que conduzcan al establecimiento de las condiciones adecuadas para producir inoculantes. Por lo que este trabajo se enfocó a la determinación del comportamiento de cepas de Azospirillum en diferentes medios de cultivo y en tres diferentes tipos de soportes que se recomiendan para la producción de otros inoculantes biológicos.

H I P O T E S I S

- Las diferentes fuentes de carbono afectarán el tiempo de generación del microorganismo.
- Habrá una fuente de carbono más adecuada para el desarrollo de estos microorganismos
- Las características físicas y químicas de los soportes tendrán diferentes efectos en la sobrevivencia de la bacteria.

II.- GENERALIDADES

2.1.- ASPECTOS GENERALES

Azospirillum efectúa la fijación de nitrógeno como organismo de vida libre o asociado con las raíces de una gran variedad de plantas no leguminosas; principalmente algunas gramíneas como maíz, trigo, sorgo, caña de azúcar y pastos forrajeros. Esto ha sido estudiado intensivamente desde el redescubrimiento de este microorganismo como fijador de nitrógeno. Esta bacteria reduce el nitrógeno molecular del aire a amonio y excreta sustancias que estimulan el crecimiento de la planta. citado (28) (38).

En comparación con Azotobacter, Azospirillum sp se encuentra en mayor cantidad en la rizosfera y en la superficie de raíces de cereales con metabolismo C3 y C4 y pastos, aún en suelos alcalinos donde Azotobacter es encontrado usualmente en mayor número.

Cuando esta asociado a vegetales superiores no forma estructuras especiales visibles en la raíz como en la simbiosis Rhizobium-leguminosas, por esta razón esta relación ha sido llamada "asociativa". (37)

Se ha comprobado que la bacteria se encuentra intracelularmente en la raíz, lo que determina una relación estrecha entre la bacteria y las células de la raíz. Queda por explicar si esta asociación ocurre al azar o existen factores - que determinen y aseguren su establecimiento. (3)

2.2.- TAXONOMIA

Beijerinck en 1922 aisló a un microorganismo fijador de nitrógeno al que llamó Azotobacter spirillum porque lo consideró un organismo que eslabona al género Azotobacter con el género Spirillum pero en 1925 lo llamó Spirillum lipoferum. (7), (41).

Estos organismos fueron olvidados por muchos años, excepto por algunos reportes dispersos, se les dió poca atención: Schroder (1932), Giesberg (1936), Becking (1963) y finalmente en 1976 Döbereiner y Day lo aislaron de raíces de ciertos pastos tropicales en Brasil. Esto causó mucho interés e indujo a realizar estudios más detallados.

En 1978, Tarrand propuso un nuevo género, Azospirillum, con dos especies, lipoferum y brasiliense. (7) (41).

En adición a esta descripción, una nueva especie - aislada de varias regiones de Brasil, Azospirillum amazonense, fué propuesta recientemente (1983). Esta especie es reconocida en su aislamiento por la formación de una película difusa y profunda en medio semisólido con malato libre de nitrógeno, llamado medio Nfb. Esta bacteria no se mueve a la superficie y manifiesta poca actividad de su nitrogenasa. Esto puede ser debido a que este microorganismo es sensible a la alcalinidad del medio. (11). Este medio con sacarosa produce poco cambio de pH, formando una gruesa película en la superficie y la actividad de la nitrogenasa llega a ser tan alta como en las otras especies de Azospirillum ya citadas - (11).

Las principales características de las tres especies de Azospirillum se resumen en la tabla 2.1

2.3.- ASPECTOS MORFOLOGICOS DE AZOSPIRILLUM

Estas bacterias son cortas, regordetas, ligeramente curvas ó de aspecto vibroide, miden de 1.0 a 1.7 μm de diámetro y de 2.1 a 3.8 μm de largo. Tienen gránulos intracelulares de poli-beta-hidroxibutirato. Gram negativo a Gram variable. Presentan movilidad, su distribución flagelar es de tipo monótrico y a veces peritrico. En medio lí-

TABLA 2.1 DIFERENCIAS ENTRE AZOSPIRILLUM SPP (11)

	<u>A. amazonense</u>	<u>A. lipoferum</u>	<u>A. brasilense</u>
Crecimiento en medio agar con papa. Colonias típicas	blancas, planas con bordes elevados	rosas elevadas	rosas elevadas
Crecimiento en medio con pH arriba de 6.8	muy pobre	bueno	bueno
Tolerancia de oxígeno para la actividad de la nitrogenasa	muy baja	baja	baja
Desasimilación de:			
NO ₃ - - - - NO ₂	+ a	+	+
NO ₂ - - - - N ₂ O	-	±	±
Ancho de las células (nm. creciendo con N ₂)	0.68 ± 0.08	1.0 a 1.5 b	0.9 ± 0.03
Flagelo polar	+	+	+
Flagelos laterales en medio alcalino	-	+	+
Células pleomorficas en medio alcalino	-	+	+
Requerimiento de Biotina	-	+	-
Uso de sacarosa	+	-	-
Tiempo de generación para crecimiento dependiente de N ₂ a una pO ₂ óptima	10 hrs	5 - 6 hrs	6 hrs
Comp. DNA base (mol% G+C)	67-68	69-70	69-70

a) + positivo en más de 90% de las cepas
 ± positivo en menos del 50% de las cepas
 - negativo

b) Las células de A. lipoferum pueden llegar a ser más largas y anchas en cultivos alcalinos viejos.

quido las células poseen un flagelo polar simple, en medio de agar a 30°C presentan numerosos flagelos laterales de corta longitud que aparecen en adición al flagelo polar (25) - (26).

Aunque la movilidad es una característica taxonómica de este género, en Francia se reportaron cepas de Azospirillum, aisladas de la rizosfera de arroz, que no son móviles. (20)

- El % de G + C en el DNA es de 67-71%

En condiciones alcalinas ó tensiones de oxígeno reducidas y en cultivos viejos, pueden ocurrir formas largas, encapsuladas, ovoides o pleomorficas. Las bacterias pleomorficas presentan de tres a cinco gránulos de materia de reserva, PHB. Cuando se les cultiva en medios pobres de nitrógeno con extracto de levadura se desarrollan como espirilos de forma larga, (30-40 μ de largo). En estos espirilos los gránulos son escasos o ausentes. Bajo ciertas circunstancias, especialmente en medio líquido se producen estructuras de microquistes. (7)

En general, las células cultivadas en medio con azúcar dan lugar a la formación de bastones curvos que contienen gotitas de lipoides. (25)

En agar sólido libre de nitrógeno las colonias son pequeñas, duras, opacas, usualmente secas y tienen bordes completos. En medio BMS son rosas, opacas, irregulares o redondeadas, con frecuencia rugosas y típicamente elevadas -- (Döbereiner, 1976; Döbereiner y Baldani, 1979). En el medio BMS, la pigmentación es mayor cuando se incuba a la luz.

En agar nutritivo o en medio con nitrógeno las colonias son brillantes, elevadas, tienen bordes lobulados y las colonias viejas muestran una pigmentación rosa característica en la mayor parte de los medios. (2), (6), (7), (41)

Las células en forma de S se presentan en placas de agar de cultivos viejos, después de 3-4 semanas estas bacterias pierden su forma de espirilos dando formas casi esféricas. (41)

Este género ha demostrado tener la capacidad de enquistación. Las células enquistadas difieren de las vegetativas en su resistencia a la desecación por su forma esférica y por su inmovilidad. (6)

Los cultivos viejos desarrollan células vegetativas que pasan a quistes y al ser resembradas en condiciones microaeróbicas forman otra vez células vegetativas. (6) (35).

A. brasilense.- Mide cerca de 1.0 μ m de diámetro, - son vibroides cortos y móviles. En cultivos alcalinos las - células permanecen principalmente como vibroides, en contraste con A.lipoferum. A veces presenta las formas de C, que - son aglomeradas de bacterias. Ciertas cepas y variantes de A.brasilense forman colonias que son mucho más intensas en - matiz rosa que en el caso usual, en esas cepas este color intenso es atribuido a la formación de varios pigmentos carotenoides lo cual sólo ocurre bajo condiciones aerobias y podría relacionarse a la protección de la nitrogenasa del daño de la oxidación. La más típica coloración rosa de otras cepas puede deberse posiblemente a su contenido de citocromo c. (26), (41)

A.lipoferum.- Las células tienden a ser más anchas, 1.4-1.7 μ m y más largas, tienen un espiral con una y media - vueltas, tienen varios cuerpos de lipoides que llenan la mayor parte de las células, son poco móviles. En cultivos alcalinos con extracto de levadura, presentan pleomorfismo; las células largas pasan eventualmente por una fragmentación en células cortas y ovoides. (41)

A.amazonense.- Mide cerca de 0.60 - 0.68 μ m de diámetro, presenta flagelo polar no presenta formación de flagelos laterales en agar nutritivo. No presenta formas pleomor-ficas en medio alcalino. Forma colonias blancas planas, con

con bordes elevados en medio de agar con papa. (11)

2.4.- ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE AZOSPIRILLUM

2.4.1 Temperatura

Aún cuando el rango de temperatura para crecimiento de Azospirillum es de 4-45°C se observa mayor crecimiento entre los 30-37°C. Parece ser que una temperatura menor de 37°C es favorable para la formación de flagelos laterales. (26) (41)

La temperatura óptima para la actividad de la nitrógenasa corresponde a los 33 y 34°C, ésta actividad se inhibe arriba de 45°C (Döbereiner y Day). (40)

2.4.2 pH

Los organismos crecen mejor a un pH cercano a la neutralidad, el rango para crecimiento óptimo es de 6.8-7.8 y no hay crecimiento abajo de 5.5 y arriba de 8.7. Con ácidos orgánicos como fuente de energía el pH asciende rápidamente, este problema se reduce con la adición de 10g/l de sales de fosfato al medio para aumentar la capacidad amortiguadora, pero concentraciones excesivas de estas sales actúan como inhibidoras. Los buffer orgánicos no son recomendados para el -

control del pH por su tendencia a interferir con estudios metabólicos.

La presencia de Azospirillum en el suelo es altamente dependiente del pH aunque una vez introducida la bacteria en la raíz este factor no le afecta. (2)

Algunas cepas aisladas de raíces parecen preferir el medio ácido, recientes observaciones indican que no solo A. amazonense sino también algunas cepas de A. lipoferum y A. brasilense crecen mejor a pH de 6.3 o aún de 5.7. Lo cual es debido, posiblemente, a que algunas cepas colonizan los vasos del xilema, donde el pH de la savia oscila entre 5 y 6. El orden de sensibilidad a la reacción alcalina es: A. amazonense, A. lipoferum, A. brasilense. (11)

2.4.3 Requerimiento de Oxígeno

Azospirillum posee sobre todo un tipo de metabolismo respiratorio con oxígeno o nitrato como aceptor final de electrones. Bajo severas limitaciones de oxígeno el nitrato es desasimilado a nitrito, NO, N₂. Se ha observado que a la pO₂ de 0.003 - 0.008 atm, se efectúa la fijación de nitrógeno; esta presión se proporciona in vitro utilizando un medio semisólido (26). En estas condiciones Azospirillum forma -

una zona de células de mucha movilidad a cierta distancia de bajo de la superficie en donde produce una película de partículas de CaCO_3 indicando su preferencia por las condiciones microaerofílicas. Esto se observa en medio libre de nitrógeno en donde se comportan como microaerofílicas porque carecen de un mecanismo de protección del oxígeno, para la nitrógenasa (Day y Döbereiner, 1976; Döbereiner, 1977; Okon et al, 1976). (7)

En cultivos continuos un aumento de oxígeno proporciona un aumento en la fijación de nitrógeno y en el crecimiento de las células con tal que no exceda de $2.5\mu\text{m}$. (41)

Un mecanismo de protección contra los niveles de oxígeno desfavorables bajo condiciones de fijación de nitrógeno es la formación de una cápsula externa de la membrana de la célula. (26)

La fijación de nitrógeno esta usualmente acoplada con la actividad de la hidrogenasa porque es un proceso de reducción, donde hay un flujo de protones al N_2 produciendo NH_3 . El oxígeno, el azul de metileno y el N_2O mantienen la asimilación de hidrógeno, indicando la presencia de transportadores de electrones.

La respiración dependiente de hidrógeno es sensitiva al oxígeno y parecida en la fase estacionaria, la ausencia de un sustrato oxidable o las condiciones microaerofílicas (0.75% de O₂ aprox.) son suficientes para inactivar el sistema de absorción de hidrógeno. (42)

2.4.4 Metabolismo

a) Fuentes de Carbono

Azospirillum brasilense y A. lipoferum crecen bien en ácidos orgánicos tales como málico, succínico, láctico, -pirúvico o cis-acetónico. El acetato mantiene un crecimiento moderado y crece pobremente en citrato, α -cetoglutarato, oxaloacetato, fumarato e isocitrato como fuentes de carbono (2). Sin embargo el crecimiento en carbohidratos es más restringido, los monosacáridos tales como glucosa, fructuosa y galactosa son utilizados por Azospirillum pero los di, oligo y polisacáridos no son metabolizados (26) (29). A. brasilense es particularmente exigente, no crece en D-glucosa, D-manosa, D-sorbosa o en sacarosa; pero crece en D-fructuosa, D-galactosa y L-arabinosa. A. lipoferum es menor exigente, crece en los mismos carbohidratos que A. brasilense y además en glucosa, manosa, sorbosa, α -cetoglutarato, arabinosa, galactosa, maltosa, lactosa, ramnosa y xilosa. La manosa y el glicerol

son utilizados para mantener cierto crecimiento. (26), (43).
En etanol también aparece ligero crecimiento (2), (26).

Ambas cepas A. brasilense y A. lipoferum parecen crecer bien en metano, metanol o formato como única fuente de energía. (26)

Se ha reportado que A. amazonense es capaz de utilizar malato, sacarosa y trans-aconitato como fuentes de carbono. (11), (40)

Algunas cepas aisladas de A. lipoferum crecen litoautotroficamente con hidrógeno ya que contienen una hidrogenasa de asimilación. (21), (26)

Muñoz García y Caballero Mellado de la Universidad de Puebla, en 1983, reportaron que Azospirillum es capaz de fijar nitrógeno molecular utilizando CO₂ como única fuente de carbono. Aislaron Azospirillum sp de la rizosfera de arroz y de Panicum maximum logrando el 100% de aislamientos -- utilizando el medio de Nfb semisólido con CO₂ como única fuente de carbono y lo recomiendan por su rapidez para lograr el aislamiento y por su bajo costo. (*)

* Resúmenes del XIV Congreso Nacional de Microbiología, Asociación Mexicana de Microbiología. Rev. Latinoam. de Microb. En-Mar, 1983. Vol. 25, No. 1, pág. 41.

b) Fuentes de Nitrogeno

En condiciones de cultivo Azospirillum utiliza un amplio rango de fuentes de nitrógeno incluyendo: N_2 , NO_3 , extracto de levadura, peptona, aminoácidos y cloruro de amonio.

Azospirillum utiliza el N_2 sólo en condiciones microaerofílicas, produciendo altos niveles de poli-beta-hidroxibutirato. Cuando se le cultiva en presencia de NH_4 su morfología cambia, las células son más largas y con menor diámetro y presentan más espirales que cuando crecen en N_2 .

(2)

La adición de pequeñas cantidades de nitrógeno combinado (niveles iniciales de 0.01 - 0.005%) aumentan el grado de crecimiento y acortan la fase lag. El nitrato de potasio y el extracto de levadura son más efectivos que la peptona y los casaminoácidos.

La adición de 0.25% de NH_4Cl a medio líquido o semisólido mejora el crecimiento bacteriano, inhibe la reducción de acetileno porque reprime completamente a la nitrógenasa, pero mejora el grado de crecimiento bajo condiciones aerobias. (33)

Otro de los factores que requiere Azospirillum -

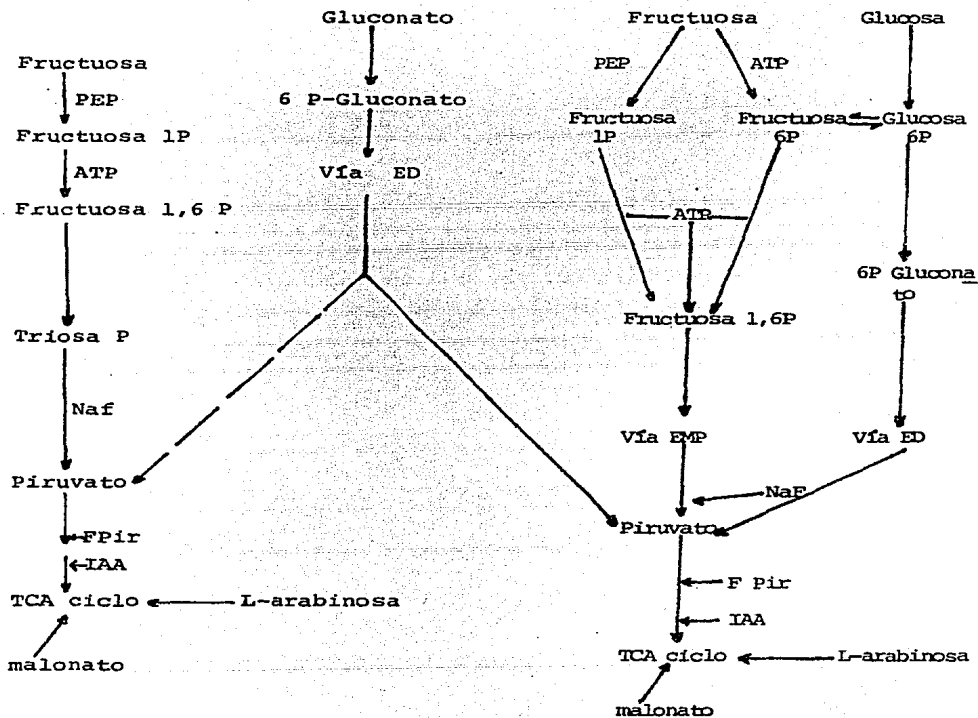
para su crecimiento es la biotina, se ha sugerido que la biotina es liberada por las raíces de la planta y utilizada por Azospirillum lipoferum. Se ha comprobado que A. brasilense y A. amazonense no requiere de biotina para su crecimiento. (11).

c) Metabolismo del Carbono

Con base en la actividad metabólica se han establecido dos grupos del género Azospirillum y un tercer grupo - A. amazonense está en estudio. Esta subdivisión concuerda con la clasificación de Tarrand y colaboradores para estas especies. (3) Esquema 2.1

Ambas especies muestran todas las enzimas de la vía EMP y algunas de A. lipoferum muestran todas las enzimas de la vía, E.D.

Una combinación del ciclo del Ac. tricarbóxilico, ha sido reportada como estimulante de la actividad de la nitrogenasa, también se ha propuesto que A. brasilense no utiliza o desarrolla pobremente las vías glucolíticas y de las pentosas fosfato (26). La arabinosa es utilizada en el crecimiento de A. brasilense, se encontró que en ciertos casos la actividad de la nitrogenasa en A. brasilense aumenta al suplementar el medio que contiene ácido orgánico con arabinosa. Oko et al, de nos-



A. brasilense

A. lipoferum

ESQUEMA 2.1 Posibles vias para metabolismo de carbohidratos (30)

IAA - iodoacetato
 FPir- fluoropiruvato

tró la atracción quimotáctica a la arabinosa por A. brasilen
se, y se ha encontrado que la arabinosa es una excelente -
fuente de carbono y energía para el crecimiento y fijación -
de nitrógeno, obteniéndose tiempos de generación y reducción
de acetileno en rangos comparables a los que se encuentran -
en malato. (32)

En A. brasiliense y A. lipoferum se detectó la fos-
forilación de la fructuosa a fructuosa IP por medio de un -
sistema de fosfoenol piruvato transferasa. (43)

Ambas cepas poseen glucocinasa, pero únicamente A.
lipoferum es permeable a la glucosa. La actividad de la He-
xocinasa ocurre únicamente en A. lipoferum. Las enzimas de
la vía EMP y de ED intervienen en el crecimiento en fructosa
de ambas cepas; sin embargo, A. brasiliense carece de la acti-
vidad de la glucosa 6P deshidrogenasa y por eso probablemente
no cataboliza la fructuosa por la vía ED.

Ninguna de las dos especies poseen la vía de la he-
xosa monofosfato, pero si contienen piruvato deshidrogenasa,
un ciclo de Krebs completo, una desviación del glioxilato y -
enzima málica. En medio de cultivo con glucosa o fructosa -
como fuente de carbono y una fuente de nitrógeno en condicio-

nes anaeróbicas A. brasilense muestra una habilidad fermentativa débil. A. lipoferum acidifica la glucosa y fructuosa formando pequeñas cantidades de gas. (14), (26), (30), (32), (43).

d) Metabolismo del Nitrogeno

Azospirillum sp participa en casi todos los pasos del ciclo del nitrógeno excepto en la nitrificación. Azospirillum fija nitrógeno molecular y efectúa la asimilación (reducción) y la respiración (oxidación) de nitratos. Las condiciones bajo las cuales el nitrato es usado como aceptor - final de electrones en la respiración o como fuente de nitrógeno para su crecimiento son diferentes. (8)

Bajo condiciones limitadas de oxígeno, los nitratos son desasimilados a nitritos, cepa nir^+ . Azospirillum posee un mecanismo de exclusión de los nitritos, con el cual previene la inhibición de la nitrogenasa. Cuando las cepas poseen la enzima nitritoreductasa, cepas nir^+ , los nitritos son desasimilados a productos gaseosos; cuando las cepas carecen de la enzima, cepas nir^- , los nitritos permanecen en el medio. Cerca del 50% de las cepas de A. brasilense y la mayoría de A. lipoferum son capaces de desasimilar los ni-

tritos a nitrógeno gaseoso (9) (13).

En la asimilación de amonio estan involucradas tres enzimas, la glutamino sintetasa GS, la glutamato sintetasa - GOGAT y la glutamato deshidrogenasa. Pero se ha encontrado que la expresión de la nitrogenasa necesita de la actividad de la enzima glutamino sintetasa y la glutamato sintetasa. (5).

e) Nitrogenasa

En la fijación biológica de nitrógeno, primeramente el triple enlace del nitrógeno es roto y después tres átomos de hidrógeno se transfieren y reducen al átomo de nitrógeno para después incorporarse a las proteínas (31).

La transferencia de los átomos de hidrógeno es a partir de carbohidratos tales como la glucosa, siendo el sitio de transferencia la enzima nitrogenasa, considerada como la molécula clave en la fijación biológica del nitrógeno (31).

El sistema de la nitrogenasa de Azospirillum está integrado por tres componentes: la proteína MoFe, la proteína Fe y un factor de activación para la proteína Fe. Las dos proteínas son sensibles al oxígeno y son esenciales para la actividad enzimática además de ATP (que es hidrolizado a ADP + Pi), un metal bivalente (generalmente Mg^{2+}), una fuente de electro-

nes ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in vitro) y un medio ambiente anaerobio (Postgate 1982). El proceso de activación es similar al encontrado en - Rhodospirillum rubrum (Kanemoto 1984; Ludden, 1976) (citado en 26).

La síntesis y la expresión de la nitrogenasa son reguladas por diferentes factores entre estos el oxígeno que la inhibe fuertemente y fuentes de nitrógeno como NH_4 y nitratos (5) (26).

En condiciones anaerobias y en medio Nfb con 10 mM de nitrato Azospirillum después de 30-60 min. muestra actividad de la nitrogenasa dependiendo del nitrato, pero no hay crecimiento, durante este período el nitrito es acumulado en el medio. Después de cuatro horas las células empiezan a asimilar el nitrito, a crecer y dejan de fijar nitrógeno (26).

Un aumento en la concentración del amortiguador de fosfatos a 10 g/l prolonga el crecimiento y la actividad de la nitrogenasa, concentraciones más altas los inhiben (33).

Papen y Werner sugieren una actividad bifásica de la nitrogenasa la cual puede ser debida a la excreción de succinato o a la enquistación de Azospirillum (35).

El sistema de la nitrogenasa de Azospirillum in vivo no libera H_2 porque este es reciclado por la hidrogenasa (26).

Seung-Dal Song y Hartmann (1985) consideraron importante aislar y caracterizar el sistema de nitrogenasa de A. amazonense Y1, porque el organismo difiere de los otros Azospirilla en tolerancia a los ácidos, pO_2 óptima, crecimiento y fijación de nitrógeno en presencia de sacarosa (Magalhaes, 1983). Ellos realizaron la purificación y caracterización molecular de los componentes de la nitrogenasa, encontrando que presenta los dos sistemas de proteínas: proteína -MoFe y proteína -Fe, lo cual es semejante en otros organismos, pero A. amazonense - no presenta el sistema enzimático activante -inactivante para la proteína que regula la proteína-Fe de R. rubrum y A. brasilense.

Los autores concluyeron que esta nitrogenasa está - más relacionada a la nitrogenasa de Azotobacter vinelandi que a la nitrogenasa de A. brasilense . (40)

Shöllhorn, Burris y Dilworth, encontraron que la nitrogenasa reduce el acetileno a etileno y que esto puede ser usado como indicador del grado de fijación de nitrógeno. Hardy y Knight surgieron el uso de esta reacción para cuantificar -

la actividad fijadora de nitrógeno. La cantidad de etileno que se forma por reducción de acetileno se determina por cromatografía de gases. Este método tiene la ventaja de ahorrar tiempo y reactivos, es un método indirecto, por lo que muchos dudan de su efectividad, sin embargo los resultados obtenidos han coincidido con los de incorporación de N_2^{15} . (7) (24)

El método de incorporación de N_2^{15} es el más seguro para demostrar la capacidad para fijar el nitrógeno. Con este método se ha demostrado que aunque el H_2 inhibe la fijación de nitrógeno no se reprime completamente la actividad de la enzima. (7) (19)

2.5.- OTRAS CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS DE IMPORTANCIA

Azospirillum presenta actividad pectolítica a través de las enzimas pecticaliasa y endogalacturonasa (Umali - García et al. 1981).

Acido poligalacturónico y transaminasa (Gien et al. 1981) han sido reportadas en algunas cepas de Azospirillum, esto puede tener significado en la colonización de la mitad laminar del tejido de la raíz (Umali-García, 1981). Y se considera que esta es una de las razones por las que Azospirillum se desarrolla en cultivos de tejidos. (citado en (6) (26) .

Floculación

En estudios recientes se demostró que Azospirillum es capaz de producir exopolisacáridos, particularmente β -polisacáridos, la producción de estos y la formación de cápsula - son prerequisites para la formación de quistes maduros. La producción de exopolisacáridos es la causa de la formación de agregados celulares durante el crecimiento y da lugar al fenómeno llamado "floculación", el cual ocurre en cepas de A. brasilense y A. lipoferum, especialmente en cultivos líquidos con fuente de nitrógeno en forma de KNO_3 . Se comprobó que estos agregados celulares pueden ser desecados para conservación de las cepas ya que se encontraron viables hasta seis meses después. (39)

Pruebas Bioquímicas

Las siguientes pruebas bioquímicas son positivas para Azospirillum; oxidasa, fosfatasa, ureasa, hidrólisis de esculina, habilidad para crecer anaeróbicamente con nitrato en medio con peptona, desasimilación de nitrito, nitrato, óxido nitroso y nitrógeno gaseoso.

Las siguientes pruebas son negativas: hidrólisis de almidón y gelatina, producción de pigmentos solubles en agua,

producción de indol, acidificación del medio con: lactosa, sacarosa, ramnosa, celobiosa, eritritol, dulcitol o melobiosa.

La actividad de la catalasa se encuentra en un rango desde fuerte actividad hasta indetectable. (26)

Azospirillum amazonense si es capaz de crecer en sacarosa. (11)

Resistencia a los Antibioticos

Algunas de las cepas de Azospirillum son tolerantes a algunos antibióticos como el clorafenicol (30 microgramos), a bajos niveles de estreptomina (10 y 20 microgramos), en cambio si son sensibles a gentamicina (10 microgramos). También se han realizado pruebas con "sensi-disco" y se encontraron sensibles a tetraciclina (30 microgramos) y a eritromicina (15 microgramos) (Döbereiner-Baldani, 1979). (citado en 13)

Se han hecho estudios con mutantes de Azospirillum resistentes a algunos antibióticos, como reporta Maroco, que utilizó dos mutantes, una cepa tolerante a gentamicina y otra cepa mutante resistente a sulfaguanidina. Estas mutantes son muy útiles en estudios en campo porque ayuda a reconocer las

bacterias aplicadas y así poder estudiar el verdadero efecto que tienen sobre las plantas. (28)

Técnicas Inmunológicas para identificar Azospirillum

Las especies y grupos de Azospirillum fueron caracterizadas serológicamente por Schank et al, 1979 y De Polli et al, 1980 (citado en (23) (27))

Ellos utilizan antisueros preparados contra las células integras para la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes para distinguir entre las especies y también entre los grupos de las cepas de Azospirillum.

Ladha, Barroquio y Watanabe en 1982, reportan el uso de técnicas de inmunodifusión e inmunofluorescencia. En la inmunodifusión se encontró que A. lipoferum producen precipitación mínima con la mayor parte de cepas aisladas de A. lipoferum y también con A. brasilense; en tanto que A. brasilense produce bandas sólo con las cepas de su especie. La reacción de inmunofluorescencia con Azospirillum se mostró como específica de especie. Los antígenos de cultivos viejos presentaron mejor la reacción de inmunofluorescencia, es decir con mayor intensidad. (27).

2.6.- RELACION PLANTA-BACTERIA

Azospirillum se encuentra en la rizosfera del suelo y en asociación con las raíces de plantas de metabolismo C3 y C4, y aún cuando se reporta en las raíces de diversas familias vegetales (gramíneas, cactáceas, etc.), parece existir cierta especificidad, reportándose que los vegetales de metabolismo C4 son infectados selectivamente por A. lipoferum, mientras que cereales de metabolismo C3 (trigo, avena, cebada y centeno) son infectados por cepas nitr⁻ de A. brasilense. (26)

La presencia de Azospirillum en la raíz no forma estructura especiales visibles como en la simbiosis Rhizobium-leguminosas, por eso esta relación es conocida como simbiosis asociativa.

Al ser inoculado, los azospirilla forman velos alrededor de las semillas y circundan las raíces como guantes, encontrándose directamente en la superficie de la raíz y en la parte externa del córtex y del estele (Patriquin y Döbereiner, 1987) (18). La infección hacia el interior del córtex y estele ocurre en ausencia de una colonización significativa de bacterias o colapso de un falso tejido externo. El paraxilema puede ser completamente tapado con bacterias. La infección ocurre inicialmente en ramificaciones de la raíz y se extiende lon

gitudinalmente en la raíz principal. (26)

En cultivos monoaxénicos de Pearl Millet y Pasto Guinea, azospirilla está dentro de la capa de mucigel de las raíces y comienza firmemente a atacar los pelos radiculares.

La penetración de las bacterias a la raíz se efectúa a través de puntos lisados por las mismas bacterias o a través de espacios creados por la descamación epitelial o por la raíz lateral emergente. Azospirillum ha sido observado dentro del tejido laminar de la raíz y también intracelularmente, algunas veces en gran número, pudiendo incluso representar una invasión de muerte para las células de la planta donde la pared sufre de autólisis. (26)

Quimiotaxis

Entre los factores que afectan la iniciación de las asociaciones planta-bacteria, la quimiotaxis juega un papel muy importante. (24)

En trabajos realizados por Alvarez Morales, (3), se menciona que el fenómeno contribuye al encuentro entre la bacteria y las células de la raíz, y que no es un fenómeno al azar que resulte de la alta incidencia de estas bacterias en

suelos tropicales.

También reportan que la quimiotaxis no esta intimamente asociada a la cantidad de un sólo componente de los exudados, sino probablemente a la clase de compuestos presentes y a la acción conjunta de los mismos. (3)

En trabajos más recientes realizados por Reinhold, Hurek y Fendrick en 1984, reportan que la respuesta quimiotáctica no esta relacionada con la habilidad de la bacteria para metabolizar el atrayente, por el contrario, depende de la concentración de este y su estereoconfiguración. Azospirillum es atraído específicamente por sustratos de bajo peso molecular, los que son de diferente naturaleza y se encuentran en diferentes concentraciones dependiendo de las plantas hospederas que los exuden. (37)

El oxalato ha sido detectado en los exudados de pastos Kallar, raíces de trigo y arroz, en tanto que el malato es liberado en cantidades más pequeñas o indetectables en estas plantas. Este fenómeno puede contribuir a la especificidad de las plantas hospederas en estas asociaciones. (4) (16) (18) (29).

Producción de Fitohormonas

Azospirillum, como Azotobacter y Rhizobium, es capaz de producir sustancias como son: el ácido indolacético - (auxina), ácido indol-láctico, giberelina y citocina que promueven el crecimiento de algunas plantas.

Se han reportado especialmente en cepas de A. brasilense (1), (26).

Hartmann, en 1982 trabajó con mutantes de Azospirillum que secretan mayor cantidad de triptofano y ácido indol acético y reportó que A. brasilense sintetiza la hormona Ac. indol acético a partir de triptofano, lo cual puede ser de gran utilidad en estudios para promover el crecimiento de vegetales superiores. (15) (28)

El aumento del crecimiento y del rendimiento de trigo en campo demuestra claramente el potencial agrícola de los sistemas de infección de la raíz, por Azospirillum. Observamos que el aumento del rendimiento coincide con el aumento en la cantidad de cosecha, lo que hace suponer que la producción de sustancias promotoras del crecimiento es de mayor importancia agrícola que la actividad de la fijación del nitrógeno. (38)

2.7.- IMPORTANCIA AGRICOLA

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico es un fenómeno de vital importancia, ya que a través de este el nitrógeno gaseoso, que se encuentra abundantemente en la atmósfera, es incorporado a las proteínas de las plantas. (31)

La fijación de nitrógeno en el género Rhizobium es parecido a Azospirillum en estar asociadas estas bacterias a plantas, y la interacción bacteria-planta está más altamente especializada en el caso de Rhizobium que en el caso de Azospirillum. (25)

Azospirillum sp ha sido encontrado en suelos y raíces de plantas de todas partes del mundo. Las gramíneas tales como el maíz, trigo, sorgo, caña de azúcar y pastos forrajeros son los más frecuentemente citados como hospederos, y parece no ser fácil demostrar la actividad de la nitrogenasa en una gran variedad de pastos.

Aún cuando se reportan aumentos en el contenido de nitrógeno en las plantas como respuesta a la inoculación con Azospirillum esto no puede ser atribuido automáticamente a la fijación de nitrógeno, ya que es bien conocida la capacidad

de Azospirillum de producir fitohormonas que influyen en el crecimiento de la planta y afectan la población de la rizosfera. Aún cuando faltan datos que aclaran las causas de la elección de los genotipos de la planta y bacteria. (28)

En el cuadro 2.2 se muestra el efecto de la inoculación de Azospirillum en diferentes cultivos.

2.8.- PRODUCCION DE INOCULANTES

Beijerinck en 1898 indicó la necesidad de suministrar artificialmente bacterias a los suelos, hecho que motivó el desarrollo de la industria de los inoculantes.

Los inoculantes son cultivos vivos y concentrados de una bacteria seleccionada e impregnada a un soporte estéril. El soporte es un material vehículo cuyas características físicas y químicas deben ser adecuadas para mantener viable al microorganismo el tiempo necesario para llevar a cabo la inoculación de semillas sin que lleguen a perder sus propiedades infectantes y de crecimiento.

El soporte debe presentar las siguientes características:

- Alto contenido de materia orgánica
- Alta retención de humedad
- pH cercano a la neutralidad
- Fácil pulverización
- Buena adhesión a las semillas
- Disponibilidad a bajo costo.
- Fácil esterilización

La turba es el soporte más utilizado, se forma en climas húmedos y con temperaturas bajas y resulta de la acumulación y descomposición parcial de los depósitos vegetales, acumulación de plantas de la familia Sphagnaceae, que se han conservado bajo condiciones de escasa aereación en los remansos de lagos, estanques y pantanos.

Los depósitos de turba no son abundantes en el mundo y su calidad es variable dependiendo de su origen botánico, edad, capacidad de retención de agua y microflora presente.
(10) (17) (36).

Otros soportes que se emplean en la fabricación de inoculantes corresponden a suelos orgánicos o enriquecidos con harina de alfafa, paja molida, levadura y sacarosa; carbón vegetal, algunas variedades de carbón mineral como antracita y la lignita suplementada con bentonita, vermiculita, harina de maíz, sacarosa y extracto de levadura; aserrín descompuesto,

TABLA 2.2.- EFECTO DE LA INOCULACION DE AZOSPIRILLUM

CULTIVO	TRATAMIENTO		INCREMENTO	REFERENCIA
	TESTIGO	INOCULADO		
<u>Digitaria decumbens</u>	S/inocular	inoculando solo la bacteria	ganancia de N 200 Kg/Ha	Shanck 1975
<u>Pennisetum panicum</u>	S/fertili - zante	C/fertili- zante de N	en peso seco	Smith 1976
<u>Pennisetum sp.</u> <u>Panicum maximum</u>	S/inocular	con una pe- queña canti- dad de N	en materia seca	Taylor 1979
<u>Triticum aestivum</u>	S/inocular	en planta	peso seco altura No. espigas	Rennier y Larson 1979
<u>Zea mays</u>	S/inocular	en diferen- tes tipos de suelo	% de reduc- ción de ace- tileno. peso seco contenido de N	Cohen et al 1980
<u>Panicum</u> Sorgo Trigo	S/inocular	en plantas	peso seco de raíces. Cre- cimiento de la planta y contenido de N	Kapulnik et al 1981
<u>Triticum aestivum</u>	S/nitrógeno	nitrógeno en fertili- zante + ino- culante	30-36% en producción de grano	Rai y Gaur 1982
Pearl Millet <u>Pennisetum a.</u>	S/fertilizan- te	con ferti- lizante ni- trogenado	materia se- ca 18% de N/Ha	Albrecht y Gaskins 1983

perlita, roca fosfórica molida, compostas de cáscaras de café, de cáscara de arroz, de mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar y compostas en general.

Los soportes varían de su capacidad para absorber la humedad, lo cual determina la cantidad de cultivo líquido que debe ser agregado al hacer la inoculación. Se debe tener una humedad del 50-60%. (10) (17) (36).

La producción de inoculantes se divide en cinco etapas.

- 1.- Recolección y preparación de los soportes
- 2.- Propagación del inóculo en cultivo líquido
- 3.- Mezcla del cultivo líquido con el soporte
- 4.- Empacado adecuado
- 5.- Control de calidad de los inoculantes

Muchos trabajos han sido publicados acerca de la fisiología y fijación de nitrógeno por Azospirillum, el modo de asociación con raíces de plantas y su efecto después de la inoculación de semillas o raíces, pero muy poco acerca de su sobrevivencia en un soporte.

Lo anterior tiene gran importancia porque si se piensa aplicar un programa de inoculación de Azospirillum a nivel -

agrícola, lo más conveniente es hacerlo por medio de inoculantes y no con cultivos líquidos como se hace a nivel invernadero.

Hay muy pocos reportes sobre esto: Jagnow en 1982, reporta la sobrevivencia de Azospirillum utilizando suelo estéril como soporte pero lo somete a diversas condiciones de stress y no a una condición normal de almacenamiento. (22)

Sin embargo Albrecht, en 1983 reporta algunos experimentos en los cuales utiliza turba como soporte y una mezcla de turba y arena. El inoculante de turba lo utiliza para inocular semillas de Pearl Millet y se hacen algunos tratamientos con fertilizantes, finalmente se determina la población de la rizosfera a diferentes períodos de tiempo. Con la mezcla de turba y arena se hizo la determinación de sobrevivencia y dicho inoculante fue conservado en frascos (1)

Por lo tanto es importante seguir haciendo pruebas para determinar si en un futuro es posible utilizar inoculantes con Azospirillum para aplicarlo a nivel agrícola, ya que se han hecho numerosos estudios sobre las ventajas que representa la asociación Azospirillum-planta

III.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Determinar algunas de las condiciones adecuadas para producir inoculantes con Azospirillum.

3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estudiar el comportamiento de diversas cepas de Azospirillum en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono
- 2.- Determinar la temperatura óptima de crecimiento de algunas cepas de Azospirillum
- 3.- Establecer la fase de crecimiento adecuada y el inóculo apropiado para efectuar la inoculación del soporte
- 4.- Determinar el tiempo de maduración del inoculante
- 5.- Evaluar el tiempo de sobrevivencia de dos cepas de Azospirillum en los soportes a diferentes periodos de tiempo

IV.- PARTE EXPERIMENTAL

Este trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM.

Se estudiaron siete cepas de Azospirillum, una de referencia y seis aisladas de suelos y raíces muestreados en diferentes partes de la República Mexicana. La especie y origen de las cepas empleadas se indican en la tabla 1.

Se emplearon tres soportes que corresponden a turba sola (proporcionada por FERTIMEX) y paja de maíz molida mezclada con turba en proporciones de P/P y V/V.

En la fig. 2 se esquematiza el plan de trabajo efectuado.

4.1.- COMPROBACION DE PUREZA Y ACTIVACION DE LAS CEPAS

A los cultivos stock proporcionados se les verificó pureza mediante observaciones en fresco y tinciones de Gram.

La activación de las cepas se llevó a cabo mediante dos o tres resiembras sucesivas, cada 72 hrs, en medio Nfb semisólido (apéndice 1), incubando a 28 °C y se comprobó su

TABLA 1.- CEPAS

Se emplearon 7 cepas de *Azospirillum* de la colección de la Facultad de Química, las Claves, especie y procedencia se indican a continuación

CLAVE	ESPECIE	PROCEDENCIA	REF.
Sp - 7	<u>A. brasilense</u>	ATCC	13,23
Pox	<u>A. brasilense</u>	Aislada de pasto Pangola, Matías Romero, Oaxaca	13,23
C ₄	<u>A. brasilense</u>	Aislada de tri - go, Celaya Gto.	13
VT-1	<u>A. Brasilense</u>	Aislada de maíz Metepec, Edo. de Méx.	34
VS-1	<u>A. lipoferum</u>	Aislada de sorgo Valle de Santiago Gto.	13
5 sc	<u>A. sp lipoferum</u>	Aislada de avena Metepec, Edo. de Méx	23
VT-2	<u>A. lipoferum</u>	Aislada de maíz. Metepec, Edo. de Méx.	34

FIGURA 2.- ESQUEMA DEL PLAN DE TRABAJO

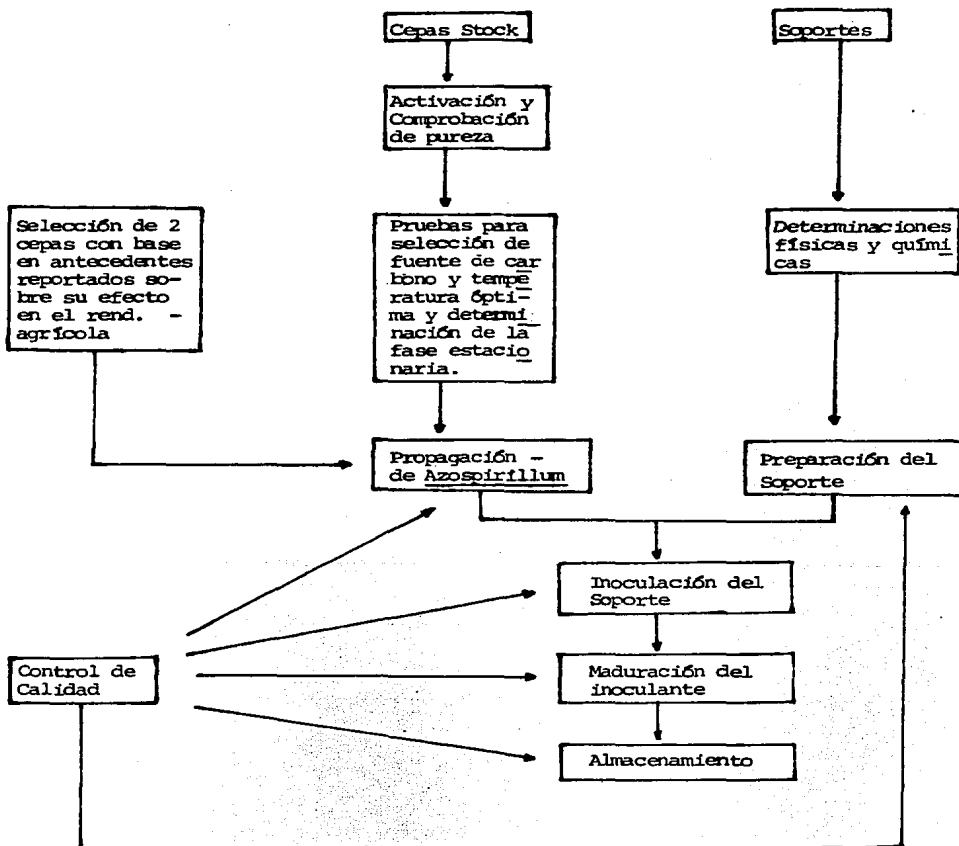
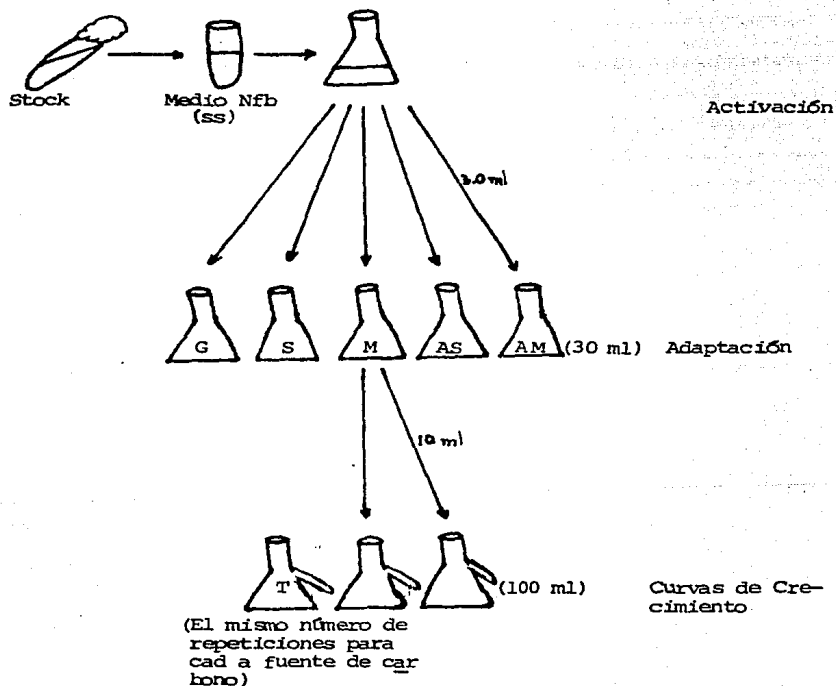


FIGURA 3.-



Condiciones de incubación: Temperatura de 33 -34 °C y en agitación a 250 rpm.
Se realizó el mismo procedimiento para cada cepa en las fuentes de carbono a probar.

actividad mediante la observación en fresco de la morfología y movilidad típica de cada cepa.

4.2.- CURVAS DE CRECIMIENTO

4.2.1.- Selección de la fuente de carbono y temperatura más adecuadas para el desarrollo de Azospirillum.

Se probaron cinco fuentes de carbono: glucosa, sacarosa y manitol al 1.0% y ácido succínico y ácido málico al 0.5% (apéndice 3), las que se esterilizaron por filtración y posteriormente se mezclaron con el medio basal (apéndice 2) previamente esterilizado en autoclave.

En la fig. 3 se muestra el esquema del proceso de activación, adaptación y desarrollo de las curvas de crecimiento que se realizó con cada una de las cepas.

La determinación de turbiedad para las curvas de crecimiento se realizó en un nefelómetro Klett-Sumerson con filtro verde. Las lecturas se hicieron al tiempo 0 y cada 3 horas durante un período de 72 horas.

La pureza de los cultivos se verificó a diferentes períodos de incubación mediante tinción de Gram y observaciones en fresco.

Una vez seleccionada la fuente de carbono para cada cepa se procedió a repetir el experimento variando en este caso las temperaturas (28,30,33 y 36 °C) a fin de determinar la temperatura óptima de desarrollo para las cepas Sp₇ y VT-1

4.3.- DETERMINACION DE ALGUNAS CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LOS SOPORTES

4.3.1.- pH

Se determinó con un potenciómetro Beckman Mod. H2

Las relaciones de soporte: agua empleadas corresponden para turba 5.0 : 12.5 ml, para paja de maíz 2.5 : 32 ml. y para la mezcla de turba y paja 2.5 : 12.5 ml.

4.3.2.- Determinación de Humedad (12)

Mediante eliminación de humedad a temperatura de - 105-110 °C, hasta obtener un peso constante.

4.3.3.- % de Materia Orgánica

Se determinó de acuerdo al método de Walkley y Black modificado (12) realizándose por quintuplicado con las siguientes cantidades de muestra, turba 0.05 g. paja maíz 0.01 g y mezcla 0.05 g.

4.3.4.- Retención de Humedad

Para determinar la cantidad de líquido necesario por gramo de soporte y obtener la consistencia recomendada para los inoculantes.

4.4.- PRODUCCION DE INOCULANTES. Se esquematiza en la figura 4

4.4.1.- Preparación de los Soportes

Neutralización.- El pH de la turba se ajustó mediante la adición de carbonato de calcio en una concentración del 5%. La paja presentó un pH alcalino por lo que se mezcló con turba que tiene pH ácido. Se hicieron mezclas: peso-peso y volumen-volumen, con el fin de obtener un pH cercano a la neutralidad.

Tamizado y Esterilización. Una vez neutralizados los soportes se pasaron por un tamiz de 200 mallas. Ya tamizados se repartieron en frascos de vidrio, en cantidades de 100 g/ frasco y se procedió a la esterilización en autoclave a temperatura de 121 °C durante 2 horas.

4.4.2.- Preparación del Inóculo

Las cepas Sp₇ y VT-1 fueron utilizadas para la preparación de los inoculantes, debido a que en estudios previos, en tiempo, estas cepas proporcionaron los mejores resultados

en cuanto a su efecto en el aumento del rendimiento agrícola.

Las cepas fueron inoculadas en medio Nfb líquido - con la fuente de carbono más adecuada y se incubó a la temperatura previamente seleccionada. Se mantuvieron en agitación a 250 rpm hasta alcanzar el final de la fase log, de acuerdo a las UK obtenidas en las curvas de crecimiento.

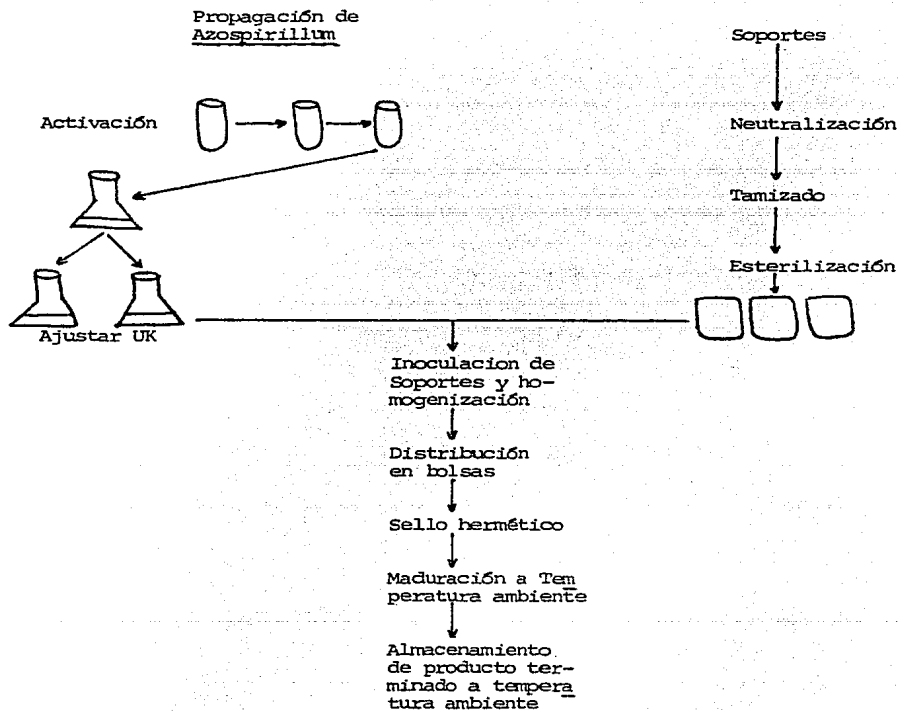
La población microbiana se ajustó con la adición de medio Nfb líquido y estéril hasta obtener una turbiedad de - 220 y 280 UK para las cepas Sp₇ y VT-1 respectivamente, y se procedió a la inoculación de los soportes.

4.4.3.- Inoculación de los Soportes

A cada soporte se le agregó un volumen de inóculo - previamente establecido para obtener el % de humedad y consistencia adecuados para favorecer la multiplicación y supervivencia del microorganismo introducido y facilitar la adhesión del inoculante a las semillas durante su aplicación en las - prácticas agrícolas. Estas cantidades corresponden a 100 g - de turba 60 ml de inóculo; a 100 g de turba + paja (P/P) 95 ml de inóculo y a 100 g de turba + paja (V/V) 100 ml de inóculo.

De cada soporte se prepararon 3 lotes de 100 g , uno

FIGURA 4.- ESQUEMA DE PRODUCCION DE INOCULANTES



de ellos fué usado como control y a este se agregó medio de cultivo estéril, los otros fueron inoculados con los cultivos de las Sp₇ y VT-1.

Las mezclas se homogenizaron y se procedió a distribuir el contenido de cada lote en 10 bolsas de polietileno, las que fueron selladas y almacenadas a temperatura ambiente.

4.5.- CONTROL DE CALIDAD Y DETERMINACION DE SOBREVIVENCIA DE AZOSPIRILLUM A DIFERENTES PERIODOS DE ALMACENAMIENTO.

Se realizó mediante la técnica de diluciones y cuenta en placa, empleando Gelosa Nutritiva (apéndice 7). Se determinó el número de microorganismos contaminantes. Esto se realizó al tiempo cero y después de 15, 30, 60 y 90 días de almacenamiento.

También se hizo cuenta en placa de los controles para verificar la esterilización de los soportes y el medio de cultivo.

Los criterios que se siguieron para este control fueron: observación de las características macroscópicas de las colonias desarrolladas; observación en fresco de las colonias para verificar morfología celular y movimiento caracte-

ristico y tinción de Gram

4.6.-PRUEBA ADICIONAL

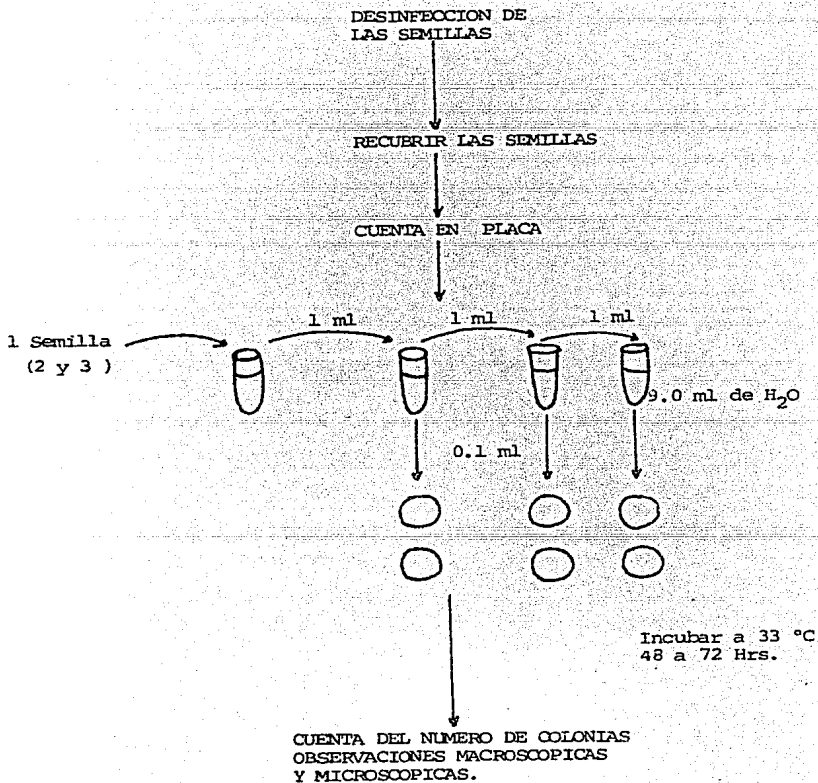
Determinación del número de Azospirilla adherida por semilla de trigo (fig. 5)

4.6.1.- Calcular la cantidad de inoculante y adherente necesaria para recubrir las semillas.

Se determinó la cantidadde adherente e inoculante adecuados para lograr el total recubrimiento de las semillas. Las determinaciones de cada volumen y peso se hicieron por quintuplicado.

	1	2	3	4	5
Semillas	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g
Adherente	0.1 ml	0.2 ml	0.3 ml	0.4 ml	0.5 ml
Inoculante	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g
Resultado X cantidad de Adherente.					

FIGURA 5



	1	2	3	4	5
Semillas	10 g	10 g	10 g	10 g	10 g
Adherente	X	X	X	X	X
Inoculante	0.2 g	0.4 g	0.6 g	0.8 g	1.0 g

Con base en los resultados obtenidos se procedió a la desinfección e inoculación de las semillas y posterior determinación de células bacterianas adheridas por semilla.

Semillas de trigo desinfectadas	Adherente	Inoculante
10 g	0.3 ml	1.0g de turba
10 g	0.15 ml	1.2g de T+P (V/V)
10 g	0.2 ml	0.8g de T+P (P/P)

Se utilizó inoculante del tiempo 15 días porque es el período en que se consideró maduro y como adherente se utilizó goma arábiga (Apéndice 8)

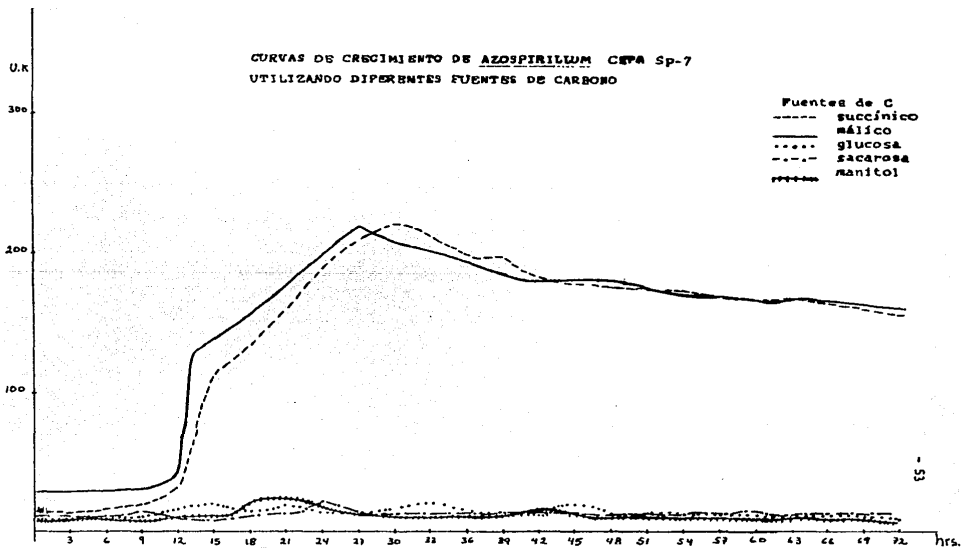
CUADRO 6.- CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS Y CULTURALES DE 7 CE
PAS DE AZOSPIRILLUM

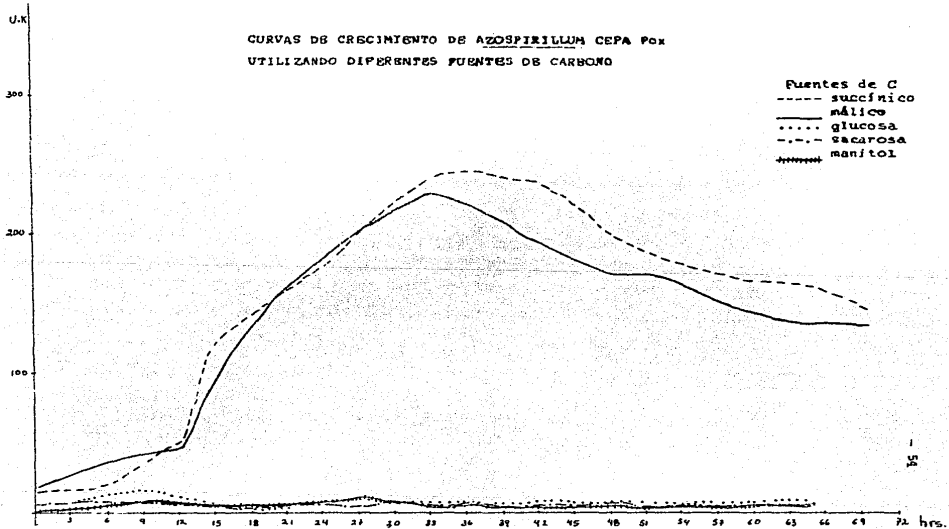
Cepa	Tinción de Gram	Morfología y Movilidad celular	Desarrollo en Nfb ss		
			Formación de película	Req. de biotina	Alcaliniza el medio
Sp-7 Colección	-	bacilos cortos curvos con gránulos de PBH, muy móviles, movimiento en S y como espiral, tamaño 1.0 X 3.8 μ .	+	-	+
Pox	-	bacilos curvos, presentan gránulos de PBH, movimiento en espiral y como S. Tamaño 1.47 X 5.88 μ	+	-	+
C ₄	-	igual al anterior pero miden 0.35 X 2.9 μ	+	-	+
VT-1	-	igual al anterior muy móviles	+	-	+
VS-1	-	bacilos largos ligeramente curvos, con gránulos de PBH tamaño 0.9 X 5.0 μ movimiento lento en forma de S	+	-	+
5sc	-	células largas, ligeramente curvas, gruesas, presencia de gránulos de PBH, movimiento muy lento.	+	+	+
VT-2	-	Células grandes, pleomorfas, gruesas con gránulos movimiento lento y como en S	+	+	+

μ = micras

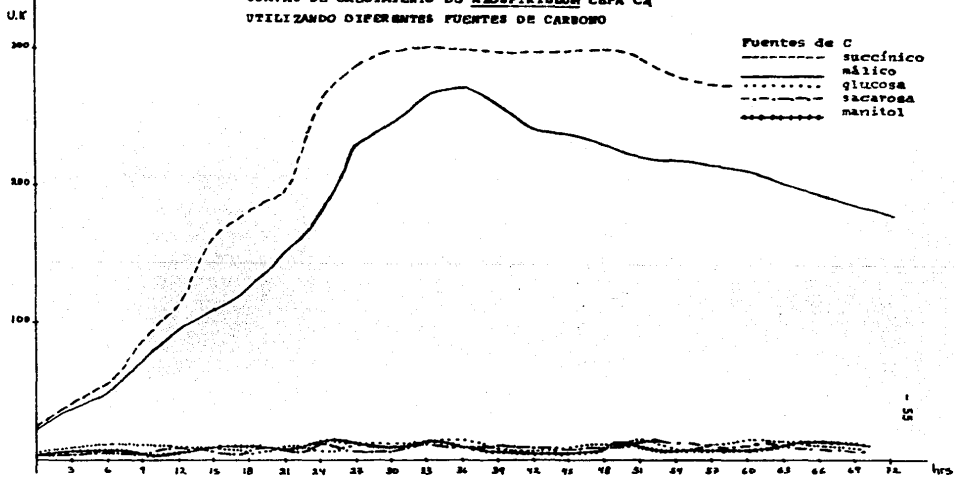
ss = semisólido

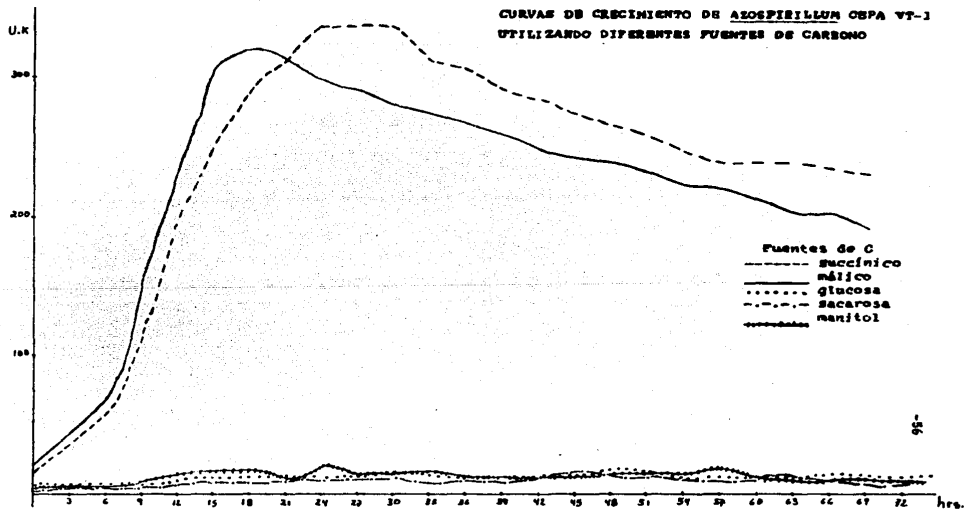
Observaciones efectuadas en la 3a. resiembra de la activación.

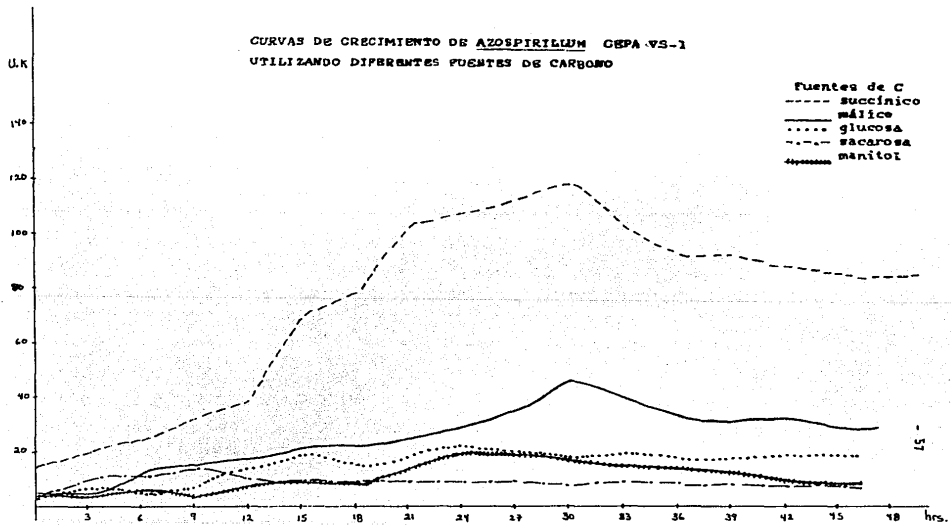




CURVAS DE CRECIMIENTO DE ASPERGILLUM CBPA CA
UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO







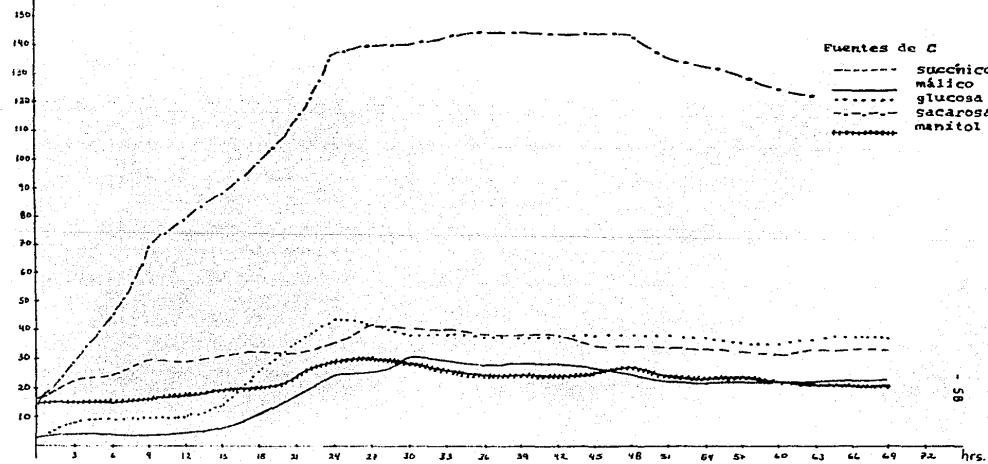
U.K.

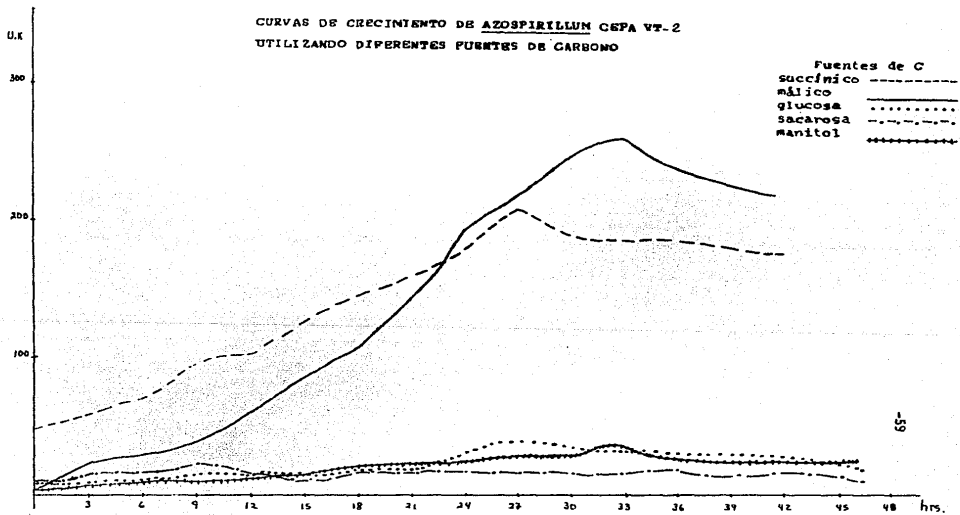
CURVAS DE CRECIMIENTO DE AZOSPIRILLUM CEPA 5cc

UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

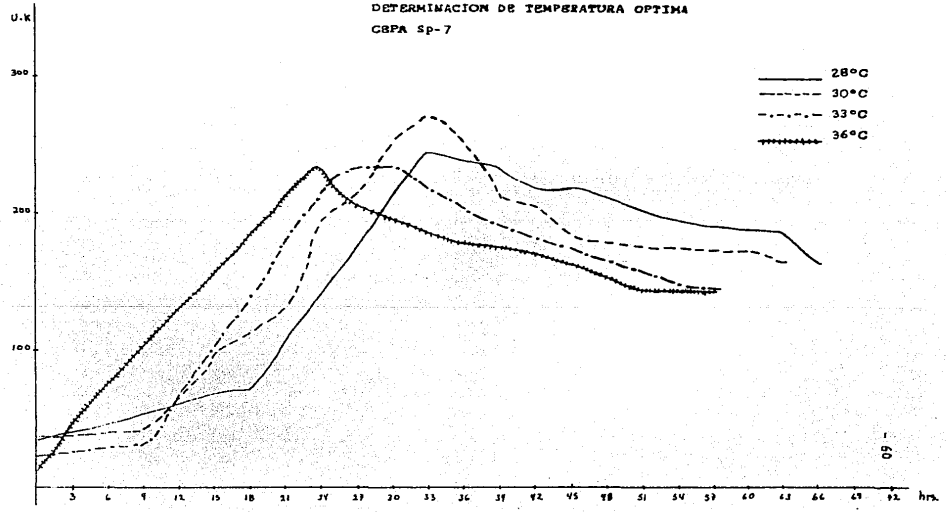
Fuentes de C

- succínico
- málico
- glucosa
- sacarosa
- manitol

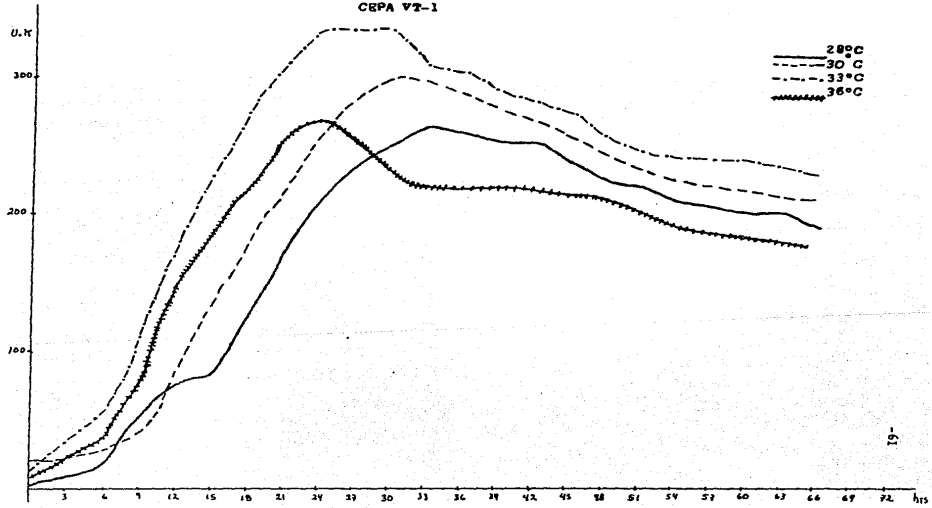




DETERMINACION DE TEMPERATURA OPTIMA
CBPA Sp-7



DETERMINACION DE TEMPERATURA OPTIMA
CEPA VT-1



CUADRO 7.- DESARROLLO DE AZOSPIRILLUM EN LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Cepa	Ac. Succínico	Ac. Máfico	Manitol	Glucosa	Sacarosa
A*					
<u>lipoferum</u>	100	100	80 y 7v	100	0
A*					
<u>brasilense</u>	100	100	0	9	0
Sp-7					
Colección	+++	++	+	+	+
Pox	+++	++	+	+	-
C ₄	+++	++	-	-	-
VI-1	+++	++	+	+	+
VS-1	+++	++	+	+	-
5 sc	++	+	++	++	+++
VI-2	++	+++	+	+	-

*Reportado en (41) (% de cepas positivas)

V= Variable

+++ Abundante ++ Moderado + Escaso - Sin desarrollo

CUADRO 8.- VARIACIONES MORFOLOGICAS DE AZOSPIRILLUM EN LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

CLAVES	Características Morfológicas				
	Ac.Succínico	Ac. málico	Glucosa	Manitol	Sacarosa
Sp-7 colecc.	típica	típica	Células ovoides y esféricas		
Pox	típica	típica	Células ovoides y esféricas		
C ₄	típica	bacilos cortos	Células ovoides y esféricas		
VT-1	típica	bacilos largos	Células ovoides y esféricas		
VS-1	típica	típica	Células ovoides y esféricas		
5sc	típica	formas redondas	Células ovoides y esféricas	típica	
VT-2	típica	típica	Células ovoides y esféricas		

CUADRO 9.- NUMERO DE CELULAS DE AZOSPIRILLUM POR ML DE MEDIO DE CULTIVO EN EL PUNTO MAXIMO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO CON LA FUENTE DE CARBONO MAS ADECUADA Y A 33°C

Cepa	Tiempo * (hrs)	Fuente de carbóno	No. aproximado de <u>Azospirillum</u> por ml
Sp-7 colección	30	Ac. succínico	2.6×10^9
Pox	36	Ac. succínico	2.7×10^9
C ₄	36	Ac. succínico	3.1×10^9
VT-1	24	Ac. succínico	3.4×10^9
VS-1	36	Ac. succínico	1.4×10^9
5sc	36	Sacarosa	1.6×10^9
VT-2	33	Ac. málico	2.9×10^9

* Tiempo en el que alcanzó el máximo crecimiento
El número de células por ml se determinó interpolando las lecturas en la curva de Mc Farland. (apéndice 9)

Nota: Se observaron cambios morfológicos en las cepas desarrolladas en los medios como manitol, glucosa y sacarosa, únicamente la cepa 5sc no cambio al crecer en sacarosa.

CUADRO 10.- RESULTADOS DE ALGUNOS ANALISIS FISICOS Y QUIMICOS
DE LOS SOPORTES

TIPO DE SOPORTE	pH	% de humedad	% de M.O	Ret. de humedad/100g
TURBA	6.7	13.2	41.2	60 ml
PAJA DE MAIZ	8.7	17.7	98.0	100 ml
T + P (P/P)	6.9	15.4	69.6	110 ml
T + P (V/V)	6.5	16.2	54.7	100 ml

CONTROL DE CALIDAD

CUADRO 11: CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE AZOSPIRILLUM EN GE
LOSA NUTRITIVA

CEPA	SOPORIE	MORFOLOGIA COLONIAL	OBSERVACION MICROSCOPICA	TINCION DE GRAM
Sp-7 coleccion.	Turba	blancas que pasan a rosa, planas, opacas, secas, bordes regulares.	bacilos pequeños ligeramente curvos movimiento típico más lento, presentan gránulos y algunos se ven como formas redondas.	-
	' T + P	Igual al anterior	bacilos un poco más rectos, movimiento más lento, con gránulos algunos se ven como forma redonda.	-
	" T + P (V/V)	Igual al anterior	bacilos poco activos pequeños, más rectos que en turba, con gránulos, algunos con forma redonda.	-
VT-1	TURBA	igual a la cepa anterior	igual a las características de la otra cepa	-
	T + P (P/P)	igual al anterior	igual al anterior	-
	T + P (V/V)	igual al anterior	igual al anterior	-

Las características se revisaron entre los 4 y 8 días de incubación a 30°C

' T + P (P/P) = mezcla de turba y paja relación peso a peso

" T + P (V/V) = mezcla de turba y paja relación volumen a volumen.

CUADRO 12.- NUMERO DE CELULAS DE AZOSPIRILLUM POR GRAMO DE
SOPORTE CEPA Sp-7 COLECCION.

TIEMPO (días)	TURBA	TURBA + PAJA (PESO/PESO)	TURBA + PAJA (VOL/VOL)
0	5.8×10^8	1.9×10^8	8.4×10^8
1	4.0×10^8	2.6×10^8	7.4×10^8
2	3.0×10^8	5.3×10^9	2.8×10^9
3	1.2×10^9	4.2×10^8	3.5×10^8
4	1.6×10^9	9.0×10^7	2.1×10^9
5	1.0×10^9	10.7×10^7	3.7×10^8
6	6.7×10^9	3.0×10^7	1.2×10^8
7	2.2×10^8	7.0×10^7	1.8×10^9
15	8.4×10^8	10.4×10^7	1.9×10^8
30	2.2×10^8	8.0×10^7	6.6×10^8
60	1.8×10^8	4.0×10^7	5.0×10^8
90	1.1×10^8	2.2×10^7	1.1×10^8

CUADRO 13.- NUMERO DE CELULAS DE AZOSPIRILLUM POR GRAMO DE SOPORTE CEPA VT-1

TIEMPO (Días)	TURBA	TURBA + PAJA (PESO/PESO)	TURBA + PAJA (VOL/VOL)
0	5.7×10^8	5.0×10^8	4.0×10^8
1	1.2×10^8	3.3×10^8	1.1×10^8
2	2.3×10^8	1.2×10^8	2.6×10^8
3	3.0×10^9	4.2×10^8	3.8×10^8
4	1.3×10^9	9.0×10^7	4.5×10^8
5	5.3×10^9	1.7×10^8	3.3×10^8
6	9.7×10^9	5.0×10^8	2.3×10^8
7	3.0×10^9	2.0×10^9	2.7×10^8
15	1.3×10^8	5.2×10^9	3.6×10^8
30	1.1×10^7	7.0×10^7	2.3×10^7
60	7.1×10^6	3.9×10^6	8.2×10^6
90	3.0×10^6	2.4×10^6	7.0×10^6

CUADRO 14.-NUMERO DE MICROORGANISMOS QUE SE ADHIEREN POR SEMI
LLA DE TRIGO

CEPA	TURBA	TURBA + PAJA (PESO/PESO)	TURBA + PAJA (VOL/VOL)
Sp-7 Colecc.	2.0×10^4	2.7×10^4	8.0×10^4
VT-1	1.5×10^4	3.9×10^4	1.2×10^5

V.- DISCUSION DE RESULTADOS

5.1.- CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS

En el cuadro 6 se reportan las características observadas en las cepas empleadas. Estos resultados concuerdan con las características reportadas en la literatura (11,13,23,26,41) lo que permitió comprobar la pureza de los cultivos y corroborar la presencia de Azospirillum.

5.2.- DESARROLLO DE AZOSPIRILLUM EN LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Varios autores reportan que Azospirillum sp. crece mejor en ácidos orgánicos que en carbohidratos, la mayor parte de estudios realizados con Azospirillum desarrollan los cultivos con malato como fuente de carbono. En el cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de las curvas de crecimiento, se observa que en las cepas: Sp-7, Pox, C₄ VT-1, y VS-1 se obtiene mayor desarrollo en el medio con ácido succínico, lo que representa una ventaja para la elaboración de medios de cultivo stock y de la propagación debido a que este ácido es de menor costo.

La cepa VT-2 desarrolló mejor en ácido málico, sin embargo la diferencia en el desarrollo no es muy grande (ver cuadro no. 9).

La cepa 5sc, reportada como A. lipoferum (23), presentó mejor desarrollo en el medio con sacarosa, este dato no concuerda con lo reportado en la literatura para A. lipoferum pues se dice que es incapaz de metabolizar este azúcar, en tanto que la nueva especie reportada como A. amazonense sí lo metaboliza (ver tabla 2.1).

Las cepas de A. brasilense: Sp-7, Pox, C₄ y VT-1 mostraron escaso desarrollo en manitol, glucosa y sacarosa, dato que concuerda con la literatura.

Las variaciones registradas en la utilización de fuentes de carbono se atribuyen a las reservas que conservan las células de ácido succínico ó por la excreción de éste, según lo reporta Papan (35).

Las cepas de A. lipoferum VS-1 y VT-2 presentan buen desarrollo en los ácidos empleados y poco crecimiento en manitol y glucosa, y no se desarrollan en sacarosa, en tanto que la cepa 5sc mostró un comportamiento atípico creciendo abundantemente en sacarosa.

En las observaciones microscópicas realizadas se comprobó el plemorfismo de Azospirillum y se nota que en ácido succínico ninguna cepa presentó cambios morfológicos, excepto la cepa 5sc que nuevamente en sacarosa presentó su forma típica - (Cuadro 8).

Estos cambios morfológicos pueden deberse a un mecanismo de resistencia ya que no se encuentran en su fuente de carbono más adecuada.

Una característica muy importante que presentaron - las cepas al desarrollarse en medio líquido con KNO_3 como fuente de nitrógeno fué la floculación. Este fenómeno se presentó más rápidamente en las cepas de A. lipoferum, pero después de cierto tiempo las cepas de A. brasilense también lo presentan. Se ha reportado que este fenómeno juega un papel importante en los mecanismos de resistencia y sobrevivencia de estas bacterias bajo condiciones de stress, tales como la desecación o limitación nutricional que es la que se presentó en estos casos (39).

5.3.- PREPARACION DE LOS INOCULANTES.-

Según los resultados del cuadro 9, las cepas alcanzan su máximo desarrollo en 24-36 horas, obteniéndose un desarrollo en todos los casos del orden de 10^9 células. Esto significa que para la preparación de inoculantes el tiempo de propagación del inóculo depende de cada cepa porque cada una presenta un ritmo diferente de metabolismo, lo cual es importante porque el inóculo debe agregarse al soporte un poco antes de que la cepa alcance su máximo desarrollo; ya que debe asegurarse que haya cierta cantidad de microorganismos y que estén activos.

El tiempo de incubación y temperatura elegidos para la preparación de inoculantes corresponden para la cepa Sp-7, 30 hrs a 30°C y para la cepa VT-1 24 hrs a 33°C.

Los resultados del cuadro 10 muestran las características de los soportes. Se utilizaron dos mezclas de turba + paja porque se pretendía utilizar la paja molida como soporte ya que esta última resulta más económica, de fácil adquisición y alto contenido en materia orgánica, pero su pH de 8.7 limita el desarrollo de Azospirillum, así que se trató de resolver este problema neutralizando con turba (pH 5.7) y se obtuvieron las dos mezclas.

Una vez preparados los inoculantes se conservaron en bolsas de plásticos nuevas pero no estériles y se presentaron algunos casos de contaminación. Por lo que se recomienda que las bolsas sean esterilizadas por medio de radiaciones ya que el uso de bolsas nuevas no asegura que estén libres de contaminantes. (10)

5.4.- CONTROL DE CALIDAD

Los cuadros 12 y 13 muestran el número de Azospirillum por gramo de soporte almacenado durante el tiempo 0-90 días. Las dos cepas presentan un comportamiento similar en los tres diferentes soportes. Ambas cepas en turba y en turba + paja (V/V) -

mantiene una cantidad de población semejante durante los 90 días. Pero en el caso de turba + paja (P/P) se observa una población ligeramente menor, los resultados en este caso no eran los esperados ya que este soporte tiene mayor cantidad de materia orgánica y pH cercano a la neutralidad, por lo que se esperaba una mejor sobrevivencia de los microorganismos en él. Esta diferencia puede atribuirse a que el soporte perdió más rápidamente humedad.

Se observa que la cepa Sp-7 no presenta cambios bruscos en la cantidad de población durante los 90 días.

La cepa VT-1 presenta un cambio más notable después de 30 días, probablemente sea una cepa más sensible a la desecación que la cepa Sp-7.

Los cambios morfológicos que presenta Azospirillum en los diferentes soportes se reportan en el cuadro 11 donde se observa que estos cambios no son muy significativos.

En el cuadro 14 se reporta el número de microorganismos que se adhieren por semilla de trigo, observándose diferencias insignificativas, lo que indica que los tres soportes inducen a una adhesión similar de microorganismos a la semilla.

VI.- RESUMEN

La utilización de las bacterias del género Azospirillum ofrece una alternativa para mejorar la producción de gramíneas.

Existe abundante literatura sobre las características morfológicas, fisiológicas y ecológicas de este microorganismo, así como de su efecto en el rendimiento agrícola, pero en estos estudios la aplicación del microorganismo se efectúa directamente con cultivos líquidos, los que se manejan fácilmente a nivel experimental pero que presentan grandes problemas de manejo a nivel agrícola, por lo que es de gran importancia conocer las variaciones de este microorganismo en el proceso de producción de inoculantes empleando diferentes soportes .

Con tales fines se estudió el comportamiento de varias cepas de Azospirillum aisladas en el laboratorio de Microbiología Experimental en trabajos previos. Para ello se variaron las fuentes de carbono, temperatura de incubación y soportes.

Determinándose que cinco de las cepas estudiadas desarrollan bien en ácido succínico y una en sacarosa; que la temperatura óptima fluctuó entre 30 y 33 °C, que la población máxima se alcanzó entre las 24 y 36 horas y que los tres soportes empleados fueron adecuados para que el microorganismos sobrevi-
viera durante un periodo de almacenamiento de tres meses.

VII.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.- Se comprobó el comportamiento de las cepas de Azospirillum brasiliense y A. lipoferum en diversas fuentes de carbono
- 2.- Se recomienda efectuar más estudios sobre la cepa 5sc reportada como A. lipoferum y que mostró un comportamiento similar al de A. amazonense.
- 3.- Las cepas que corresponden a una misma especie tienen diferentes temperaturas óptimas de desarrollo por lo que se recomienda establecer los parámetros óptimos de propagación para cada cepa que vaya a ser utilizada en la producción de inoculantes.
- 4.- El tiempo de maduración de las dos cepas en turba es similar al reportado para Rhizobium y se recomiendan más estudios respecto a los otros soportes
- 5.- Los tres soportes empleados fueron adecuados ya que la población de Azospirillum tuvo un comportamiento similar durante el periodo de almacenamiento, y se adhieren bien a la semilla.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albrecht, L.S., Gaskins, H.M., Milam, R.J., Scank, C.S. and Smith, L.R. (1983). Ecological Factors Affecting Survival and Activity of Azospirillum in the Rhizosphere. Experientia Supplementum, vol. 48, pág. 138-148.
- 2.- Albrecht, L.S. and Okon, Y. (1980). Cultures of Azospirillum Methods in Enzymology, vol 69, part C. pág. 740-750
- 3.- Alvarez, Morales R.A. y Lemos Pastrana A. (1980). Quimiotaxis de Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense. Rev. Latinoamericana de Microbiología, vol. 22, pág. 131-135
- 4.- Barak, Rina., Nur, I., and Okon, Y. (1983). Detection of - Chemotaxis in Azospirillum brasilense. Journal of Applied Bacteriology, vol. 53, pág. 399-403.
- 5.- Barberio, C., Bazzicalupo, M., Gallori, E., and Polsinelli, M. (1982). Regulation of Ammonium Assimilation and N_2 -Fixation in Azospirillum brasilense. Experientia Supplementum, vol. 42, pág. 52-58
- 6.- Berg Howard R., Tyler, E. Max., Novick, J.N., Vasil, V., and Vasil, K.I. (1980). Biology of Azospirillum Sugarcane Association; Enhancement of Nitrogenase Activity. Applied and Environmental Microb. vol. 39, No. 3. pág. 642-649.
- 7.- Becking, H.J. (1982) Azospirillum lipoferum. A reappraisal. Experientia Supplementum, vol. 42, pág. 130-149.
- 8.- Bothe, H., Kelin, B., Stephan, M.P. and Döbereiner, J. (1981) Transformations of Inorganic Nitrogen by Azospirillum spp. Arch. of Microb., vol. 130, pág. 96-100
- 9.- Bothe, H., Kronenberg, A., Stephan, M.P. Zimer, W. and Ne ver, G. (1983). Nitrogen Fixation and Denitrification by wheat-Azospirillum Association. Experientia Supplementum, vol. 48, pág. 100-103.

- 10.- Cordova Uscanga Rubén. (1986). Evaluación de la Turba Nacional como soporte para Inoculantes de Leguminosas con Cepas de Rhizobium japonicum. Tesis Lic. Fac. Química UNAM.
- 11.- Döbereiner J. (1983). Ten Years Azospirillum. Experientia Supplementum, vol. 48, pág. 9-22
- 12.- Echegaray. A.A., Ramírez, G.R.M. (1978). Prácticas de Microbiología Agrícola, Facultad de Química. UNAM.
- 13.- Flores Ayala Abundio Angel. (1985). Aislamiento y caracterización de Azospirillum sp de la Rizosfera de Sorgo en Valle de Santiago, Gto. Tesis Lic. Fac. Química UNAM
- 14.- Haahrtela, K., Kari, K. and Sundman, V. (1983). Nitrogenase Activity (Acetylene Reduction) of Root-Associated, Cold Climate Azospirillum, Enterobacter, Klebsiella and Pseudomonas Species During Growth on Various Carbon Sources and Various Partial Pressures of Oxygen. Applied and Environmental Microbiology, vol. 45. No. 2 pág. 563-570.
- 15.- Hartmann, A. (1982). Antimetabolite effects on Nitrogen Metabolism of Azospirillum and properties of resistant mutants Experientia Supplementum. vol 42, pág. 59-68
- 16.- Heinrich, D. and Heb, D., (1983). Attraction of Azospirillum lipoferum by media from wheat-Azospirillum association. Experientia Supplementum. vol. 48, pág. 95-99
- 17.- Hernández Gutiérrez Ricardo. (1980). Estudio Comparativo de Soportes para la Elaboración de Inoculantes de Leguminosas en México. Tesis Lic. Fac. Química. UNAM.
- 18.- Hess, D. (1982). Induction of Nitrogenase Activity in Azospirillum by wheat. Experientia Supplementum. vol. 42, pág. 69-74
- 19.- Heulin, T., Bally, R. and Balandreau, J. (1982). Inoculation of a very efficient N_2 - Fixing Bacteria from the Rhizosphere of Rice. Experientia Supplementum. vol. 42, pág. 92-99

- 20.- Heulin, T., Weinhard, P. and Balandreau, J. (1983). Motility Changes in Azospirillum lipoferum. Experientia Supplementum. vol. 48, pág. 89-94.
- 21.- Jagnow, G. (1983). Nitrogen Fixation (C_2H_2 -Reduction) and Growth of Pure and Mixed Cultures of Azospirillum lipoferum, Klebsiella and Enterobacter sp. from Cereal Roots in Liquid and Semisolid media at Different Temperatures and Oxygen Concentrations. Experientia Supplementum. vol. 48, pág 127-137.
- 22.-- Jagnow, G. (1982). Growth and Survival of Azospirillum lipoferum in Soil and Rhizosphere as Influenced by Ecological Stress Conditions. Experientia Supplementum, vol.42 pág. 100-107.
- 23.- Jiménez Gerónimo Magnolia (1986). Efecto de la Inoculación de Azospirillum sp en dos variedades de trigo, realizada a Nivel de Invernadero. Tesis Lic. Fac. Química UNAM.
- 24.- Kaliniskaya, T.A., Red'kina, T.V., Belou, Yu. M., Ippolitov, L.T. and Kokunov, A.V.; (1981). Use of the Acetile - Method for Enumerating Various Groups of Nitrogen-Fixing Bacteria by the limiting Dilution Method; Mikrobiologiya, 50 (5), pág. 924-927.
- 25.- Krieg, R.N. (1984). Genus Spirillum. Ehrenberg 1832, 38 al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, pág. 90-93
- 26.- Krieg and Döbereiner. (1984). Genus Azospirillum. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1 pág. 94-104.
- 27.- Ladha, J.K., Barroquio, W.L., and Watanabe, I. (1982). Immunological Technique to Identify Azospirillum associated with Wetland Rice. Can. J. Microbiol., vol. 28, pág. 478-485
- 28.- Maroco, A., Bazzicalupo, M., and Perenzin, M. (1983). Forage Grasses Inoculation with Gentamicine and Sulfaguanidine Resistant Mutans of Azospirillum brasilense. Experientia Supplementum, vol. 48, pág. 149-154

- 29.- Martin, P., Glatzle, A. (1982). Mutual Influences of Azospirillum spp. and Grass. Experientia Supplementum, vol. 42, pág. 108-120.
- 30.- Martínez Drets, G., Del Gallo, M., Burpes, Ch., and Burris, R.H. (1984). Catabolism of Carbohydrates and Organic Acids and Expression of Nitrogenase by Azospirilla. Journal of Bacteriology, vol. 159, No. 1, pág. 80-85.
- 31.- Martínez Prieto Ma. del Socorro (1979). Algunos Aspectos Ecológicos de la Simbiosis Azospirillum-Gramíneas. Tesis de Lic. Fac. Química UNAM.
- 32.- Novick, J.N. and Tyler E. (1982). Arabinose Metabolism in Azospirillum brasilense. Journal of Bacteriology, vol. 149 No. 1 pág. 364-367.
- 33.- Okon, Y., Albrecht, L.S. and Burris, H.R. (1976). Factors Affecting Growth and Nitrogen Fixation of Spirillum lipoferum Journal of Bacteriology, vol. 127. No. 3. pág. 1248-1254.
- 34.- Otake, H.G., Echegaray, A.A., Ramírez, G.R.M. y Márquez, J.J. (1985). Evaluación de la Fijación del Nitrógeno en la Asociación Azospirillum-maíz, bajo condiciones de Temporal, en el Valle de Toluca. Resúmenes de la III Reunión sobre - Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. Química, UNAM. pág.36
- 35.- Papan, H. and Werner, D. (1982). Organic Acid Utilization Succinate excretion and Encystation During Nitrogenase Activity in Azospirillum brasilense Under Microaerobic Conditions. Experientia Supplementum, vol. 42, pág. 75-91.
- 36.- Ramírez Ramírez Martha. (1982) Estudio Comparativo de Rhizobium phaseoli en Compostas y Turba. Tesis Lic. Fac. Química. UNAM.
- 37.- Reinhold, B., Hurek, T. and Frendik Istvan (1985). Strain - Specific Chemotaxis of Azospirillum spp. Journal of Bacteriology, vol. 162, No. 1 pág. 190-195.
- 38.- Reynders, L. and Vlassak, K. (1982). Phisio-Ecological Aspects and Agricultural Importance of Azospirillum - Pant root Associations. Experientia Supplementum, vol. 42, pág. 121-149.

- 39.- Sadasivan, L. and Neyra, C.A. (1985). Flocculation in Azospirillum and Azospirillum lipoferum: Exopolysaccharides and Cyst Formation. Journal of Bacteriology. vol. 63, No. 2 - pág. 716-723.
- 40.- Seung-Dal Song, Hartmann, A. and Burris, H.R. (1985). Purification and Properties of Nitrogenase of Azospirillum amazonense. Journal of Bacteriology. vol. 154. No. 3 pág. 1271-1277.
- 41.- Tarrand, J.J. and Krieg, R.N. (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 Journal of Microb. vol. 42, pág. 962-980.
- 42.- Tibelius, H. K. and Knowles, R. (1984). Uptake Hydrogenase Activity in Denitrifying Azospirillum brasilense Growth Anaerobically with Nitrous Oxide or Nitrate. Journal of Bacteriology. vol. 157, No. 1, pág. 84-88
- 43.- Westby, A.C., Cutshall, S.D. and Vigil, V.G. (1983). Metabolism of Various Carbon Sources by Azospirillum brasilense Journal of Bacteriology. vol. 156, No. 3, pág. 1369-1372.

IX.- APENDICE

1.- MEDIO Nfb SEMISOLIDO LIBRE DE NITROGENO

Acido succínico	5.0 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$CaCl_2$	0.02g
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.002g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01 g
Azul de Bromotimol (sol. alcohólica al 0.5%)	2.0 ml
FeEDTA (sol. acuosa al 1.64%)	4.0 ml
Biotina (Sol. al 0.01%)	1.0 ml
NaOH ó KOH	4.5 g

Ajustar el pH a 6.8 - 7.0 con una solución de NaOH ó KOH al 10%, agregar 1.75-2.0 g de agar. Completar a un litro y colocar en tubos de cultivo o en matraces para posteriormente vaciar en placas y esterilizar a 120 °C durante 15 minutos.

2.- MEDIO Nfb LIQUIDO CON FUENTE DE NITROGENO

Igual al anterior pero sin azul de bromotimol y sin agar.
La fuente de nitrógeno es KNO_3 . . . 1.0 g/litro.

Para el caso del desarrollo de A. brasilense se sustituye la biotina por 20 mg/litro de extracto de levadura.

3.- SOLUCIONES AL 10% DE GLUCOSA, SACAROSA O MANITOL

Glucosa (sacarosa ó manitol) 10 g

H₂O destilada 100 ml

Filtrar en Equipo Millipore y conservarlas en refrigeración en frascos de vidrio con tapón de rosca, previamente esterilizados. Para comprobar la esterilidad de las soluciones se toma una muestra y se siembra en gelosa nutritiva.

4.- SOLUCION NORMAL DE $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Disolver 49.031 gde $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ seco en agua destilada y diluir a un litro.

5.- INDICADOR DE DIFENILAMINA

Disolver aproximadamente 0.5 g de difenilamina en 20 ml de agua y 100 ml de ácido sulfúrico concentrado.

6.- SOLUCION 0.5 N DE SULFATO FERROSO

Disolver 139.01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 800 ml que contienen -

20 ml de ácido sulfúrico concentrado y diluir a un litro.

7.- AGAR NUTRITIVO

Extracto de Carne	3.0 g/litro
Peptona	9.0 "
Agar	16.0 "
pH final	6.8-7.0

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

8.- GOMA ARABIGA

100 g de goma arábica en 230 ml de agua destilada

- 1) Poner 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitado
- 2) Adicionar lentamente la goma con agitación
- 3) Adicionar el agua restante
- 4) Ajustar a pH 7.0
- 5) Agitación durante 30 minutos
- 6) Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos
- 7) Conservar en frascos ámbar

9.- CURVA DE Mc FARLAND

Tubo	Sol. acuosa H_2SO_4 al 1%	Sol. acuosa $BaCl_2$ al 1%	Aproximadamente 10^6 cel/ml
1	9.9 ml	0.1 ml	300
2	9.8	0.2	600
3	9.7	0.3	900
4	9.6	0.4	1200
5	9.5	0.5	1500
6	9.4	0.6	1800
7	9.3	0.7	2100
8	9.2	0.8	2400
9	9.1	0.9	2700
10	9.0	1.0	3000