

61
2eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y OPTIMIZACION
DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA UNA CEPA NATIVA
DE VICIA VILLOSA (VEZA DE INVIERNO) PARA LA
ELABORACION DE UN INOCULANTE.

T E S I S

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

ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. STELLA MARIS REGINENSI

COASESOR DE TESIS: M. en C. JORGE BERMUDEZ ESTEVEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

aislamiento, identificación y caracterización de un cultivo de cul-
tivo para una cepa atípica de Virus Villoso (Virus de Injerto)
en la elaboración de un inoculante.

que presenta el pasante Alberto Manuel Voto Guevara
con número de cuenta: 8511359-0 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Abril de 1994

PRESIDENTE	<u>G.F.J. Andrea Becerra Osnaya</u>	<i>Andrea Becerra Osnaya</i>
VOCAL	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	<i>Gerardo Cruz Jiménez</i>
SECRETARIO	<u>M. en C. Stella María Regisneri Rivera</u>	<i>Stella María Regisneri Rivera</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>M.V.Z. Luz Ma. Ortega Leyva</u>	<i>Luz Ma. Ortega Leyva</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>C.F.B. Marcela Hernández V...</u>	<i>Marcela Hernández V...</i>

AGRADECIMIENTOS

Primero doy gracias a Dios por darme vida y salud para alcanzar una de mis metas propuestas.

A mis padres Dalla y Mario por la confianza y apoyo que me dieron en momentos difíciles.

Al Sr. Bulmaro y al Sr. Juan, ya que sin sus conocimientos no hubiera logrado esto.

A mis hermanos, Anahny, Ludin y Marité por su paciencia , apoyo y colaboración.

A la Sra. Catalina Calderón y Sr. Agustín Soto por su apoyo siempre y en todo momento.

Con respeto y cariño a Stella Maris Reginensi por su amistad y asesoría en este trabajo de tesis.

A Jorge Bermúdez, por su participación y apoyo en Análisis Estadístico.

A Yolanda García y Ricardo Hernández por su cooperación en la parte experimental y por su amistad.

A todos aquellos profesores, que tuvieron mucho que ver en mi formación profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán" por pertenecer a esta institución y ser un egresado

GRACIAS.

Índice general

RESUMEN

1. INTRODUCCION	7
2. GENERALIDADES	9
2.1 CARACTERISTICAS DEL GENERO <u>Rhizobium</u>	9
2.2 CICLO BIOLÓGICO DE NITRÓGENO.	12
2.3 FIJACION SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO.	13
2.4 ENZIMÁS QUE INTERVIENEN EN LA FIJACION DEL NITRÓGENO.	14
2.5 PROCESO DE NODULACION.	15
2.6 LEGHEMOGLOBINA	17
2.7 NODULINAS.	18
2.8 REGULACION DE LA FIJACION DEL NITRÓGENO.	19
2.9 INOCULACION DE LEGUMINOSAS.	20
2.10 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DEL GENERO <u>Rhizobium</u>	21
2.11 ESTRUCTURA ANTIGENICA DEL GENERO <u>Rhizobium</u>	25
3. OBJETIVOS.	26
3.1 OBJETIVO GENERAL	26
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	26

4.	MATERIALES Y METODOS	27
4.1	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA CEPA	31
4.2	OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO	32
4.3	OPTIMIZACION DE LOS FACTORES AMBIENTALES.	33
4.4	DETERMINACION DE PESO SECO.....	33
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
5.1	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA CEPA DE <u>Rhizobium</u> EN LOS CULTIVOS DE VEZA DE INVIERNO.	34
5.2	OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO.	35
5.2.1.	EVALUACION DEL CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE FOSFATO DIBASICO DE POTASIO. .	35
5.2.2	EVALUACION DEL CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	39
5.2.3.	EVALUACION DEL CRECIMIENTO DEL <u>Rhizobium</u> <u>leguminosarum</u> FESC-L1 VARIANDO LOS NIVELES DE CLORURO DE SODIO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	42
5.2.4.	EVALUACION DEL CRECIMIENTO CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO.	45
5.2.5.	EVALUACION DEL CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL MEDIO DE CULTIVO.	48

5.2.6. EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 VARIANDO LOS NIVELES DE MANITOL COMO FUENTE DE CARBONO.	51
5.3. MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO.	54
5.4 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1.....	55
5.4.1. EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DEL <u>Rhizobium leguminosarum</u> EN EL MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO.	55
5.4.2. EFECTOS DE LA MODIFICACION DEL pH EN EL CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium</u> <u>leguminosarum</u> FESC-L1 EN EL MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO.	60
5.5 PRODUCCION DE INOCULANTE PARA VEZA DE INVIERNO (VICIA VILLOSA)	65
6.0 CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA.....	68

Indice de tablas.

4

Tabla No. 1.	MEDIO BASE CALCULADO PARA <u>Rhizobium</u>	29
Tabla No. 2.	MEDIO ROJO CONGO.....	30
Tabla No. 3.	CARACTERISTICAS DEL <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESCL-1.....	35
Tabla No. 4.	EFFECTOS DEL FOSFATO DIBASICO DE POTASIO A DIFERENTES CONCENTRACIONES, SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION.....	37
Tabla No. 5.	RESUMEN DE LOS TIEMPOS DE DUPLICACION Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO CON DIFERENTES NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO.....	40
Tabla No. 6.	CINETICA DE CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO.....	43
Tabla No. 7.	EFFECTOS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO FERRICO SOBRE μ Y t_d EN EL CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1.....	46
Tabla No. 8.	PROMEDIOS DE μ Y t_d EN HORAS CON DIFERENTES NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1.....	49
Tabla No. 9.	EFFECTOS DE MANITOL A DIFERENTES NIVELES DE CONCENTRACION SOBRE μ Y t_d EN HORAS EN <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1.....	52
Tabla No. 10.	VELOCIDAD Y TIEMPO DE DUPLICACION VARIANDO LA TEMPERATURA DEL MEDIO OPTIMIZADO.....	56
Tabla No. 11.	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION EN HORAS VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO.....	61
Tabla No. 12.	MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L.....	54
Tabla No. 13.	COMPARACION DEL MEDIO OPTIMIZADO Y EL MEDIO BASE CALCULADO.....	66

Indice de figuras.

5

Figura No. 1.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DIBASICO DE POTASIO.....	38
Figura No. 2.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO.....	41
Figura No. 3.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO.....	44
Figura No. 4.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO.....	47
Figura No. 5.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA	50
Figura No. 6.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE MANITOL.....	53
Figura No. 7.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON VARIACION EN LA VELOCIDAD AL MODIFICAR TEMPERATURA.....	57
Figura No. 8.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON VARIACIONES EN EL TIEMPO DE DUPLICACION AL MODIFICAR TEMPERATURA.....	58
Figura No. 9.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO.....	62
Figura No. 10.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON VARIACIONES DEL TIEMPO DE DUPLICACION AL MODIFICAR pH.....	63
Figura No. 11.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 VARIANDO LA TEMPERATURA DE INCUBACION.....	59
Figura No. 12.	CRECIMIENTO DE <u>Rhizobium leguminosarum</u> FESC-L1 CON VARIACIONES DE pH.....	64
Figura No. 13.	DIAGRAMA DE FLUJO. METODOLOGIA A SEGUIR PARA LA OBTENCION DE UN INOCULANTE.....	28

Abreviaturas

K_2HPO_4	FOSFATO DIBASICO DE POTASIO.
$MgSO_4$	SULFATO DE MAGNESIO.
NaCl	CLORURO DE SODIO.
$ClFe_3$	CLORURO FERRICO.
H ₂ O	AGUA.
pH	pH.
N ₂	NITROGENO.
ATP	ADENOSINTRIFOSFATO
e ⁻	ELECTRONES.
OH	HIDROXILO.
H	HIDROGENO
ADP	ADENOSINDIFOSFATO
Pi	FOSFATO MOLECULAR.
CO	MONOXIDO DE CARBONO.
g/l	GRAMOS POR LITRO.
SO	SULFATO
NAD	NICOTINAMIDA ADENINDINUCLEOTIDO
NADP	NICOTINAMIDA ADENINDINUCLEOTIDO FOSFATO
ug	MICROGRAMOS.
UFC/ml	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS POR MILILITRO.
u	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.
tD	TIEMPO DE DUPLICACION.
ee	ERROR ESTANDAR.
nm	NANOMETROS.
D.O.	DENSIDAD OPTICA.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el obtener un inoculante para veza de invierno a partir de la optimización de los nutrientes e H+ en un medio de cultivo específico para el género *Rhizobium* así como la temperatura de incubación requerida para la cepa nativa *Rhizobium leguminosarum* FESC-L1.

Para esto se aisló la bacteria de los nodulos de la raíz de veza de invierno se purificó e identificó para posteriormente hacer una variación de un medio base calculado, K_2HPO_4 1.66 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.76 g/l, NaCl 0.26 g/l, extracto de levadura 1.0 g/l, manitol 20 g/l y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.10 g/l, haciéndose las siguientes variaciones en la concentración K_2HPO_4 0.60, 1.26, 1.60, 2.2 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.26, 0.76, 1.01, 1.26 g/l; para NaCl 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 g/l; extracto de levadura 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 g/l; manitol 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 g/l; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05, 0.10, 0.15 g/l.

Se corrieron cinéticas de crecimiento para duplicar en matraces, determinándose 0 a 600 nm de absorvancia y se obtuvieron los tiempos de duplicación (tD) y velocidades de crecimiento (V) en la fase exponencial del crecimiento; se eligieron las concentraciones siguientes ya que estas nos permitieron las mayores V y menores tD, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, extracto de levadura, manitol y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ posteriormente se corrieron cinéticas de crecimiento de 26 y 34°C, y pH 5.0 a 8.5 con una unidad de variación de 0.5 para obtener la temperatura y pH óptimo para la mayor obtención de biomasa, los cuales fueron a 30°C y pH 7.5.

La obtención y optimización del medio de cultivo para la cepa de *Rhizobium leguminosarum* FESC-L1 nos permitió el conteo de UFC/ml indicando según la literatura para que funcione como un inoculante de buena calidad.

1. INTRODUCCION

El Oxígeno, Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno son los elementos más abundantes de los seres vivos, constituyendo alrededor del 99% de la masa total de muchas células, a excepción del oxígeno, los restantes son más abundantes en la materia viva que en la corteza terrestre (27). El Nitrógeno es uno de los elementos más importantes, el cual se puede ciclar a través de los seres vivos mediante sintropía, ya que es necesario para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. (35) El Nitrógeno molecular (N_2) se encuentra en grandes cantidades en la atmósfera, la mayor parte de los organismos no lo pueden utilizar como tal por lo que deben tomar el Nitrógeno en forma combinada, como nitratos, amoníaco, compuestos complejos de aminoácidos, siendo escaso éste en el agua y en el suelo. (4).

La capacidad de utilizar el Nitrógeno por los vegetales es de gran importancia ya que la productividad agrícola está limitada por el bajo aporte de compuestos nitrogenados (4). En el suelo, un pequeño número de microorganismos son capaces de utilizar el Nitrógeno molecular en un proceso biológico llamado fijación de Nitrógeno (11), lo que se puede realizar también químicamente en la atmósfera en pequeñas cantidades se puede obtener mediante descargas eléctricas, o por el uso de fertilizantes nitrogenados y por parte de los procesos de combustión artificial. El 60% de la fijación biológica se realiza en los suelos y el 40% en los océanos. Los microorganismos encargados de la fijación simbiótica del Nitrógeno pertenecen al género Rhizobium: la asociación simbiótica Rhizobium-leguminosas, es de gran importancia para la agroecología, ya que se incrementan considerablemente la producción y calidad de las plantas a un bajo costo y sin la necesidad de utilizar fertilizantes químicos. La incidencia de los últimos se refleja en el daño de las propiedades físicas de los suelos, dejándolos inservibles para la agricultura. (7).

El uso de inoculantes a base de bacterias del género Rhizobium es una alternativa tecnológica para obtener mejores cosechas a un bajo costo (4).

En México, no es una práctica usual la inoculación de semillas con bacterias simbióticas lo cual debe ser transformado a los nuevos conceptos ecológicos ya arraigados en otras partes del mundo con buenos resultados.

2. GENERALIDADES

2.1 CARACTERISTICAS DEL GENERO Rhizobium.

Las bacterias del género Rhizobium junto con las del género Agrobacterium pertenecen a la familia Rhizobiaceas, ambas se caracterizan por causar hipertrofia cortical en las raíces de la planta y las cuales se diferencian por su naturaleza. Los nódulos organizados que se forman en las raíces de leguminosas pertenecen al género Rhizobium y los no organizados al género Agrobacterium. (26)

El género Rhizobium está constituido por seis especies las cuales reciben el nombre de la especie vegetal hospedadora (52). Las seis especies son :

- a). Rhizobium leguminosarum. (Pisum, Vicia, Thyrus, Lens, Civer.)
- b). Rhizobium trifoli (Trifolium)
- c). Rhizobium phaseoli (Phaseolus vulgaris)
- d). Rhizobium meliloti (Medicago, Melilotus, Trigonella.)
- e). Rhizobium lupini. (Lopinus, Ornitropus, Lotus)
- f). Rhizobium japonicum. (Glicine max)

Otra clasificación del género Rhizobium se realiza en base a su velocidad de crecimiento y el cambio de pH en el medio, lo cual lleva a los siguientes subtipos:

a). Especies de crecimiento rápido;

- Subgrupo 1) Rhizobium leguminosarum.
- Subgrupo 2) Rhizobium phaseoli
- Subgrupo 3) Rhizobium meliloti
- Subgrupo 4) Algunas cepas aisladas de Lotus, Lupinus, Scer y Leucana.

b). Especies de crecimiento lento.

Rhizobium japonicum, Rhizobium lupini.

El género Rhizobium está constituido de bacterias bacilares gram negativas de $0.5 \text{ a } 0.9 \times 1.2 \text{ a } 3 \text{ }\mu\text{m}$, simples o en pares; móviles cuando son jóvenes por flagelos peritricos polares o subpolares, no forman endosporas, aún cuando son viejos están ocupados por gránulos refráctiles de poli-B-hidroxiburato(53). Las especies del género Rhizobium producen colonias características incoloras, blancas o de un color crema en agar-manitol-extracto de levadura, el tiempo promedio de generación es de 2 a 4 horas, las colonias forman un mucílago aunque se encuentran variantes no gomosas (53).

Estas bacterias son quimiorganotróficas y crecen en medios complejos, a 25 y 30 grados centígrados de incubación, aunque son aeróbicas crecen mejor a parciales de oxígeno relativamente bajos (13,27).

Las bacterias que crecen de 1 a 5 días son de crecimiento rápido, su movimiento es por medio de flagelos peritricos en cepas de Rhizobium, mientras que otras crecen más lento de 6 a 8 días con movimiento por flagelos polares o subpolares pertenecientes al género Bradirhizobium (3).

Las técnicas de laboratorio que se utilizan para su identificación son: la tinción de gram, la prueba de leche tornasolada en la cual se observan reacciones de alcalinidad o de acidez así como la digestión del suero de la misma, característico de algunas cepas del género Rhizobium. Así mismo el uso del azul de bromotimol en los medios de cultivo como indicador de pH (53,38,20).

La bacteriólisis por medio de la aplicación de fagos es otra técnica para la identificación de cepas la cual no es específica, ya que algunas cepas no son lisogénicas. Otra prueba de identificación son las pruebas inmunológicas como la aglutinación, precipitación o inmunodifusión las cuales pueden ayudarnos para diferenciar diferentes cepas de Rhizobium con los antisueros específicos (10,12, 22), así como por anticuerpos monoclonales.

2.2 CICLO BIOLÓGICO DE NITRÓGENO

El Nitrógeno existente en nuestro planeta está dotado de gran movilidad, continuamente está circulando hacia el interior y el exterior de la biósfera (4,6,29).

El conjunto de las reacciones químicas, transformaciones enzimáticas y su aprovechamiento por las plantas y animales, da lugar al ciclo biológico-mineral del Nitrógeno, el cual comprende el aporte y la pérdida de los elementos del suelo así como las transformaciones intermedias con las cuales se completa el ciclo(30,28,32).

Los principales procesos que se llevan a cabo en el ciclo del Nitrógeno se muestran a continuación:

Denitrificación: Son los procesos microbianos mediante los cuales los nitratos o nitritos son reducidos a su estado gaseoso (N_2 , NO, NO_2), los cuales ocurren en condiciones de anaerobiosis y es realizado por microorganismos capaces de utilizar los nitratos como aceptor final de electrones (35).

Fijación atmosférica: La luz solar y las radiaciones ultravioleta causan la formación de óxido de Nitrógeno, especialmente en la atmósfera superior, la combustión y la energía eléctrica generan óxidos a nivel superficial (35) Los gases son disueltos y arrastrados por la lluvia contribuyendo al incremento total del Nitrógeno en la capa de suelo.

Las plantas verdes, así como muchos microorganismos convierten los nitratos en Nitrógeno orgánico para posteriormente reducir el grupo amino de los aminoácidos cerrándose el ciclo en la planta (4).

Nitrificación: El amoníaco se produce durante la descomposición de compuestos orgánicos del Nitrógeno, la Nitrificación es un proceso estrictamente aeróbico que ocurre fácilmente en suelos drenados a pH neutros, y es inhibido en presencia de condiciones contrarias (41). Algunos microorganismos están adaptados a las condiciones de escasez de Nitrógeno y desarrollaron un sistema fermentativo adquiriendo la capacidad de realizar la fijación biológica del Nitrógeno atmosférico, la cual es realizada por los organismos simbióticos y asimbióticos (4,35).

2.3 FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO.

El fenómeno de la fijación simbiótica del N_2 es característico de las leguminosas y, en gran parte la importancia de éstas se explica en los sistemas de rotación de cultivos, ya que tal práctica no requieren de cantidades grandes de fertilizantes nitrogenados. El proceso se realiza por bacterias nitrificantes del género Rhizobium, siempre y cuando en el suelo existan una menor cantidad de Nitrógeno que el aire. Es necesario que la bacteria exista en el suelo, cuando no existen cepas nativas se pueden añadir por medio de inoculación de la semilla (4, 5, 42, 43).

Entre más fértil sea el suelo mayor será el número de rhizobios, sin embargo si el suelo tiene altas concentraciones de Nitrógeno o una cantidad mayor que la del Nitrógeno atmosférico no se realiza la nodulación y por lo tanto tampoco la fijación de nitrógeno. El fósforo debe existir en cantidades adecuadas para que haya una buena concentración de bacterias. El calcio y el molibdeno son indispensables para que se realice la fijación del Nitrógeno (53).

Las plantas leguminosas aportan el 20% de la cantidad total fijada anualmente en nuestro planeta,(4) y están extendidas por todo el mundo constituyendo una de las dos familias de plantas con mayor número de especies, teniendo especies que nodulan en tres de las cuatro subfamilias de Leguminosae (5).

La simbiosis depende del intercambio de carbono y Nitrógeno entre la planta hospedadora y el nódulo, antes de la fijación del dinitrógeno la provee de sustratos carbonados y nitrogenados para así poder soportar el desarrollo y crecimiento del nódulo (7, 51).

Los factores que afectan la relación Rhizobium-simbiosis son la temperatura, la humedad, el Nitrógeno combinado, el nivel de microelementos en el suelo, el pH del suelo lo cual afecta considerablemente a la simbiosis Rhizobium - leguminosa (4, 35).

2.4 ENZIMÁS QUE INTERVIENEN EN LA FIJACION DEL NITROGENO

1.- Nitrogenasa: Sistema enzimático capaz de fijar Nitrógeno, no se trata de una enzima simple, sino de dos componentes proteícos; una proteína Mo-Fe (azofermo) la cual es compuesta por dos subunidades idénticas codificadas por el gen nifH (6, 15). Con un peso molecular de aproximadamente 220 KDa. Esta enzima esta solo presente en Rhizobium, Bradirhizobium y Frankia, durante la fijación biológica de Nitrógeno; y en algunas bacterias de vida libre como Azotobacter, Clostridium y Klebsiella, catalizando la siguiente reacción.



El ATP se deriva a través de la fosforilación oxidativa que llevan a cabo las bacterias. La regulación de la Nitrogenasa se realiza por los genes *nifA* y *nifL* siendo el primero un regulador positivo y el segundo negativo (14). Esta enzima es relativamente inespecífica, reduce Nitrógeno a amoníaco y otros compuestos y triples enlaces (6).

2.- Hidrogenasa: Es un sistema de utilización de Nitrógeno en el cual se ha visto la presencia de un sistema Hup el cual oxida el hidrógeno a agua. Se describió primero en *Rhizobium leguminosarum*; actualmente se sabe que todo este género la presenta, lo que le da características de ventaja como la protección de la Nitrogenasa a oxígeno e hidrógeno, así como en la producción de ATP y sustancias reducidas (61).

Esta enzima es de gran importancia en el nódulo ya que como se mencionó anteriormente protege a la Nitrogenasa libre de oxígeno e hidrógeno, y se produce un balance adecuado para que no se inhiba la Nitrogenasa.

2.5 PROCESO DE NODULACION

Para estimular una eficiente nodulación es necesario una adecuada preparación de la tierra, para que tenga una buena aireación. En los suelos vírgenes que no presentan cepas nativas es necesario una aplicación de cultivos bacterianos propios del mismo. En las nodulaciones deficientes se observan los nódulos pequeños, duros y esféricos, de color blanco, que se distribuyen a lo largo del sistema radicular, las raíces son alargadas y tienen pocas ramificaciones laterales (13, 23, 56).

En las nodulaciones eficientes los nódulos son grandes, carnosos y rosados, en su interior, el número como la distribución de los nódulos esta relativamente restringido y se alojan principalmente en las proximidades del cuello de las primeras raíces secundarias (13, 56).

El mecanismo de infección de las bacterias del género Rhizobium a la planta huésped se describe a continuación:

I.- El movimiento de la bacteria mediante sus flagelos ayuda a infectar las raíces, ya que estos se encuentran en la rizósfera muy cercanos a la semilla.

II.- El Rhizobium se dirige hacia los pelos absorbentes de la raíz y se acomodan en un lugar del pelo, por la atracción de las sustancias, de las plantas ya que los Rhizobium son quimiotácticos, el nódulo se empieza a formar sólo cuando han brotado las primeras hojas verdaderas, ya que en el proceso de fotosíntesis, las hojas producen sustancias que llegan a la raíz del nódulo atrayendo al Rhizobium.

III.- Las bacterias proliferan cerca de los pelos absorbentes. El pelo secreta auxinas que rizan los pelos penetrando las bacterias por donde se ha rizado el pelo. Una vez que las bacterias penetran en el pelo empiezan a multiplicarse creando un hilo de infección que une las células Xilemáticas de la raíz.

IV.- Posteriormente hay una destrucción en la pared celular del tejido del hospedador con la formación de un nuevo meristemo. El nuevo meristemo desarrolla un complejo vascularizado que constituye al nódulo en el cual se contienen formas diferenciadas de Rhizobium los cuales van a fijar el Nitrógeno (37, 42, 49).

2.6 LEGHEMOGLOBINA

Es una proteína roja parecida a la hemoglobina ya que es la encargada del transporte del oxígeno, se encuentra siempre en los nódulos fijadores de Nitrógeno, la síntesis de esta proteína se induce por la asociación simbiótica del Rhizobium-leguminosa (9). La leghemoglobina es codificada en los cromosomas de la planta huésped (15) y es una hemoproteína monomérica de peso molecular aproximadamente de 150000 - 170000 daltons, la cual contiene un protohemo IX como grupo prostético, es una proteína totalmente soluble. En los nódulos se localiza la leghemoglobina la cual varía en su punto isoeléctrico y la secuencia en aminoácidos siendo esto característico para cada especie de leguminosa de la que se aísle (31, 48, 50).

La leghemoglobina se encuentra dentro de las membranas peribacterianas y la transferencia del oxígeno al bacteroide se realiza directamente.

Los gradientes de presión de oxígeno que se generan, son los apropiados para que se realice por medio de una difusión facilitada (17, 50) y participe así en reacciones redox, conduciendo la oxidación del Nitrógeno hasta hidroxilamina con reducción del amonio o el grupo amino de los aminoácidos, la leghemoglobina actúa como portador de oxígeno transformándose en leghemoglobina oxigenada en un ciclo redox (30, 57).

2.7 NODULINAS

En las leguminosas se ha detectado una proteína específica que interactúa con Rhizobium y a esta proteína se le ha denominado nodulina.

Estas son proteínas nódulo específicas sintetizadas por las plantas(35), son expresadas en la raíz a unos pocos días después de la asociación planta - microorganismo la cual se cree que es producida por esta interacción a nivel de la superficie.

La función de estas nodulinas se relaciona con el desarrollo de los nódulos después de la diferenciación de la bacteria a bacteroide (33) y éstas se relacionan probablemente con la función de los genes nod (Gover, et.al 1986) y otras nodulinas tempranas en el desarrollo de los nódulos como la N-75 (29, 34)

Los genes bacterianos que se han descrito pertenecen a dos grupos: los genes de nodulación común y los específicos, los primeros se han encontrado en todas las Rhizobiaceas que interactúan con las leguminosas y son intercambiables entre diferentes especies, mientras que los específicos, determinan el espectro de nodulación de cada una de las especies bacterianas en las diferentes leguminosas (8,12, 45, 49).

En Rhizobium leguminosarum bv phaseoli tipo 1 se demostró que los genes nod comunes nod ABC no se encuentran formando un operón, sino que se encuentran separados creyéndose que puede tener funciones diferentes (33).

2.8 REGULACION DE LA FIJACION DEL NITROGENO

El proceso de fijación biológica de Nitrógeno implican la interacción de plantas leguminosas con bacterias del género Rhizobium presentes en el suelo. Esta interacción comprende el reconocimiento por parte de la bacteria de la planta hospedadora, la penetración de la bacteria a través de los pelos radiculares hasta las células de la corteza de la raíz, y la formación de un nuevo tejido denominado nódulo. En este tejido la bacteria es capaz de incorporar el Nitrógeno de la atmósfera, reducirlo y proporcionarlo a la planta como amonio (1, 29).

Este proceso denominado fijación biológica de Nitrógeno permite el crecimiento de la planta sin la aplicación de fertilizantes nitrogenados, aún en suelos carentes de este compuesto. El amonio es asimilado y transportado a las partes aéreas de la planta para su utilización. La disponibilidad de carbono en el nódulo es uno de los elementos limitantes de la fijación de Nitrógeno, esto debido a la alta demanda de éste elemento en la formación del nódulo, la asimilación de amonio y la síntesis de ATP (4, 35, 38).

Por otro lado la principal fuente de carbono para las plantas es el dióxido de carbono (CO₂) atmosférico (7), mientras que el amonio regula (inhibe) la inducción de los nódulos por bacterias ya que se han aislado mutantes de Rhizobium que inducen a la formación de nódulos en presencia de amonio (3, 23).

2.9 INOCULACION DE LEGUMINOSAS

Una simbiosis eficiente depende de la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas por cepas de Rhizobium efectivas en la fijación de dinitrógeno, cuando tales cepas no se encuentran en el suelo deben ser suministradas mediante el uso de inoculantes, y donde existen naturalmente debe ser evaluada su habilidad para fijar dinitrógeno (4, 8, 12, 32).

Los primeros métodos de inoculación de semillas consiste en la transferencia de suelo infectado a las nuevas áreas de siembra. Así mismo se utilizan cultivos líquidos de las bacterias con las que se quiere repoblar la tierra, en el cual se sumergen las semillas y se siembra directamente o se mezclan con turba como soporte (5, 53).

Hay pocas cepas de Rhizobium que en condiciones normales son incapaces de fijar dinitrógeno en un macrosimbionte apropiado, igualmente es muy raro que una especie de leguminosa sea capaz de nodular, sin una cepa de Rhizobium con la cual pueda asociarse exitosamente. Sin embargo, no existen las cepas capaces de infectar eficientemente todas las especies y nodular, ni hay leguminosas compatibles con todas las cepas nodulantes (44, 32).

Por lo que se hacen inoculaciones cruzadas en las cuales se mezclan dos o más especies de Rhizobium donde todas pueden nodular pero su efectividad es variable, debido a las condiciones del suelo, clima, semilla y viabilidad de la cepa (35, 25).

2.10 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DEL GENERO RHIZOBIUM.

Las bacterias en los nódulos de las raíces de la leguminosa son heterótrofos y capaces de utilizar una amplia variedad de carbohidratos, en general los compuestos inorgánicos del Nitrógeno (NH, NO), son suficientes para su desarrollo aunque existen cepas que pueden tener requerimientos específicos por uno o más aminoácidos y/o vitaminas para lograr crecimientos óptimos (29, 35).

Las bacterias del género Rhizobium pueden crecer en diversos extractos complejos de origen vegetal, por lo general, la levadura es la fuente más conveniente. La fuente de carbono más común es el manitol, pero puede ser sustituido por glucosa o sacarosa. Las cepas de lento crecimiento crecen mejor en fuentes de galactosa o arabinosa (53, 38, 19).

El medio de crecimiento líquido más común para el género Rhizobium presenta la siguiente composición:

K_2HPO_4	0.5	g
$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.1	g
Manitol	10.0	g
Agua de levadura	100	ml
Agua destilada	900	ml

Se esteriliza en autoclave a 121 grado centígrados por 15 minutos y a 15 libras de presión. El medio sólido (agar-levadura-manitol) contiene 15 g de agar por litro de medio (53).

La mayor parte del peso de los microorganismos consiste en materia orgánica iones inorgánicos como potasio, sodio, magnesio, calcio, cloro. Los cuales le sirven para facilitar la catálisis enzimática y conservar los gradientes químicos a través de la membrana celular, regulando la presión osmótica a excepción de magnesio. Con un exceso del ion cloro se puede inhibir el crecimiento bacteriano.

Los microorganismos satisfacen sus requerimientos de azufre si son incorporados en el medio de cultivo en forma de sal SO_4 . El fósforo en ácidos nucleicos y de coenzimas como NAD, NADP y flavinas.

Es necesaria la adición de minerales para las funciones enzimáticas como magnesio, hierro; éste último es parte de las coenzimas de los citocromos y las peroxidasas. Mientras que el magnesio y el potasio son esenciales para la función y la integridad de los ribosomas. Las trazas necesarias como de manganeso, cobre, y zinc, se pueden encontrar como contaminantes de otros ingredientes en el medio de cultivo.

Las cepas de Rhizobium pueden utilizar nitratos como única fuente de Nitrógeno, pero también pueden utilizar NH_4 , pero su eliminación selectiva del medio de cultivo, a un agregado como NH_4 , NO_3 , disminuye el pH a un nivel inhibitorio. Puede ser necesario o estimulante uno o más aminoácidos tales como el ácido glutámico, histidina, o serina y extracto de levadura.

El desarrollo de unos microorganismos en medio de cultivo definido el cual contiene Nitrógeno posibilita la demostración más directa de los requerimientos de carbono y la producción de ácido es una medida indirecta y no muy confiable de la utilización de este elemento (36).

A continuación se describe la composición de un medio que puede servir como base para el crecimiento de cepas Rhizobium:

K_2HPO_4	1.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.01 g
$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g
Fuente de Nitrógeno	0.08 g
Azúcar	10.0 g
Vitaminas	1-100 ug
Oligoelementos	2-50 ug

Se afora a 1000 ml con agua destilada y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos (53).

La concentración de cada sustancia requiere de ajustes a fin de obtener las condiciones óptimas para los diferentes requerimientos de las diferentes cepas de Rhizobium. La capacidad de crecimiento de un micro-organismo cuando se cambia a un medio reciente de cultivo depende en parte del potencial redox del medio. Los microorganismos aerobios toleran potenciales redox mayores que los anaerobios (35).

La temperatura de un medio de cultivo rige los índices o velocidades de crecimiento, multiplicación y muerte de los organismos. Cada microorganismo crece solamente en límites de temperatura característicos de la especie. La temperatura óptima de crecimiento es aquella en la que la velocidad de crecimiento bacteriano es la mayor (53, 35).

Para las bacterias del género Rhizobium es generalmente de 30 a 35 grados centígrados (9, 53, 35). El crecimiento y la actividad microbiana son alterados notablemente por el pH del medio; cada especie crece solamente en ciertos límites de pH y al optimizarlo se obtienen mayor cantidad de biomasa. El carácter de las actividades metabólicas microbianas es tal que el pH de un medio de cultivo no permanece constante después de que se inicia el crecimiento bacteriano. La degradación de proteínas y otros compuestos nitrogenados, frecuentemente de origen amoniacal y otros productos secundarios alcalinos elevan el pH, mientras las fermentaciones de carbohidratos producen ácidos orgánicos los cuales disminuyen el pH (20, 53, 11).

Los fosfatos y carbonatos son amortiguadores importantes que se emplean en los medios de cultivo, retrasando notablemente el desarrollo de las condiciones no favorables para el crecimiento bacteria

2.11. ESTRUCTURA ANTIGENICA DEL GENERO Rhizobium.^{2b}

Para la identificación de cepas nativas del género Rhizobium son utilizadas diferentes técnicas inmunológicas. En la superficie de la célula bacteriana existen antígenos que pueden ser reconocidos por su capacidad de producir anticuerpos en animales, los cuales a su vez pueden ser utilizados para determinar la presencia o ausencia de antígenos específicos de la bacteria en una suspensión o si existe reacción cruzada con bacterias del mismo género (10, 18, 20, 53).

Existen dos formas simples para evaluar la capacidad antigénica del Rhizobium; aglutinación la cual depende de los antígenos localizados en la superficie bacteriana y aumenta esta por el reconocimiento separado flagelar y somática.

La otra prueba es la de precipitación de antígenos solubles, de la cual una variante es la de difusión en gel, y que se ha vuelto la más utilizada ya que ésta puede reconocer antígenos somáticos, flagelares y exopolisacáridos.

La técnica de inmunodifusión depende de antígenos solubles capaces de difundir en el medio y formar bandas de precipitación al llevarse a cabo la reacción antígeno-anticuerpo (22, 18).

3. OBJETIVOS.

26

La agricultura requiere de desarrollo tecnológico y bajo costo y por supuesto que no dañen los suelos, para leguminosas, que se usan como forrajes; se usan inoculantes elaborados con Rhizobium, siendo una buena alternativa.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Optimización de un medio de cultivo y condiciones de crecimiento para la producción de un inoculante a base de Rhizobium leguminosarum FESC-L1 biovariedad viciae, para cultivos de veza de invierno.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 3.2.1 Aislamiento, purificación e identificación de una cepa nativa Rhizobium leguminosarum a partir de cultivos de *Vicia villosa*.
- 3.2.2 Diseño de un medio de cultivo específico para la cepa FESC-L1 de Rhizobium leguminosarum biovariedad vicia, a partir de un medio base calculado.
- 3.2.3 Optimización de las condiciones ambientales (pH y temperatura) para el mejor crecimiento de Rhizobium leguminosarum FESC-L1.
- 3.2.4 Producción de un inoculante para Veza de invierno (*Vicia villosa*), evaluando el rendimiento de la biomasa en medio líquido.

4. MATERIALES Y METODOS

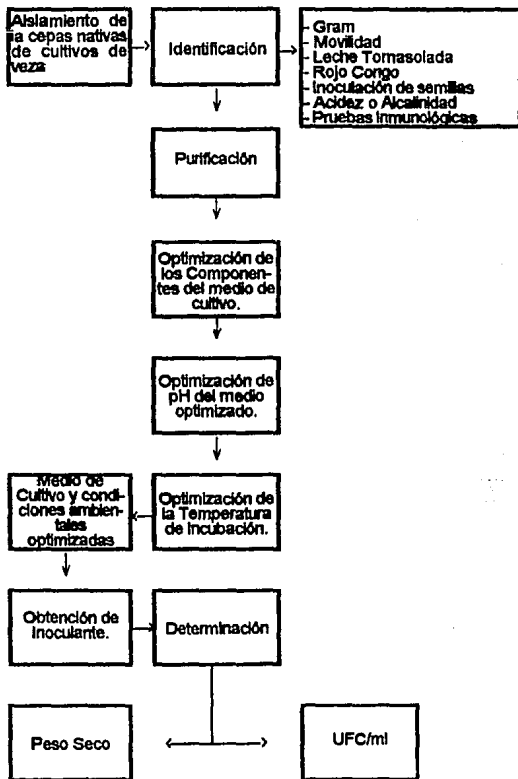
Este trabajo se realizó en el laboratorio de biotecnología de la división de posgrado C1, de FESC-CUAUTITLAN, UNAM. Las cepas que se utilizaron para el desarrollo experimental fueron: aisladas de nódulos y se identificaron como *Rhizobium leguminosarum* biovariedad *viciae* que se obtuvieron de los sembradíos de Campo 4 correspondiendo a cepas nativas.

El cultivo de Veza de invierno es un leguminosa usada como forraje y es nodulada por inoculantes, se dice que deben tener un número de 10 células/ml para poder infectar las semillas y producirse la nodulación. Para lograrlo se requiere tener un medio de cultivo adecuado cuyos componentes estén a una concentración tal que nos permitan obtener mayor concentración posible de biomasa.

Para conocer las concentraciones adecuadas se deben hacer variaciones de los componentes del medio de cultivo base, (44); así como de las condiciones ambientales pH y temperatura evaluando éste rendimiento por litro y medio.

El material utilizado en éste trabajo experimental se esterilizó a 121°C, 21 lb de presión por 15 minutos en autoclave.

Diagrama de Flujo Metodología a Seguir para la obtención de un Inoculante.



MEDIO BASE CALCULADO PARA Rhizobium. (53)

29

TABLA No.1

COMPOSICION	CONCENTRACION g/l
Cloruro de sodio	0.26
Cloruro fèrrico	0.10
Extracto de levadura	1.00
Sulfato de magnesio	0.76
Fosfato de potasio	1.66
Manitol	20.00
Agar bacteriològico	20.00

pH. 7.2 a 7.4

MEDIO ROJO CONGO. (44)

Tabla No. 2

COMPOSICION	CONCENTRACION g/l
Soluci3n rojo congo	0.002
Cloruro de sodio	0.260
Cloruro f3rrico	0.100
Extracto de levadura	1.00
Sulfato de magnesio	0.760
Fosfato de potasio	1.660
Manitol	20.00
Agar bacteriol3gico	20.00

pH. 7.2 a 7.4

4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA CEPA

31

Para el aislamiento de la cepa de trabajo se extrajeron muestras de plantas con las mejores características de tamaño y de las cuales se tomaron las raíces para buscar los nódulos más grandes y rosados.

Se lavaron, desinfectaron y los nódulos se sembraron por estrias en el medio de cultivo rojo congo, (ver Tabla No. 2), el cual inhibe el crecimiento de los hongos, mientras que las colonias mucilaginosas de Rhizobium adquieren una coloración rosa pálido; se incubaron a 30°C de 1 a 4 días, buscando las colonias características del género en estudios como: colonias de color rosa, esféricas y productoras de goma.

Las pruebas de caracterización que se utilizaron para la identificación fueron: tinción de Gram, de las colonias características del género para ver morfología bacteriana; motilidad de gota suspendida; prueba de leche tomasolada; prueba de acidez en el medio de cultivo; azul de bromotimol (39, 59).

La cepa identificada fué evaluada en pruebas de nodulación específica en semillas de veza de invierno en botellas de Leonard (38, 53) modificada, usándose como soporte agrolita estéril.

Verificada la nodulación se prosiguió a aislar la cepa e identificar su pureza en el medio de cultivo base calculado a 30°C de 1 a 4 días de incubación y así mismo se usaron pruebas de identificación serológicas (precipitación) contra Rhizobium leguminosarum.

La optimización del medio de cultivo fue realizada a partir de un medio base calculado (44), (ver Tabla No. 1), conteniendo las siguientes variaciones en los componentes. El fosfato dibásico de potasio se manejó en un rango de 0.66 a 2.16 g/l con cuatro tratamientos con una variación de 0.5 g/l. El sulfato de magnesio hidratado en un rango de 0.26 a 1126 g/l con cinco tratamientos con una variación de 0.25 g/l. El cloruro de sodio en un rango de 0.05 a 0.45g/l con cinco tratamientos y una variación 0.1 g/l.

El cloruro férrico hidratado se manejó en el rango de 0.05 a 0.15 g/l con tres tratamientos y con una variación de 0.05 g/l. El extracto de levadura tuvo un rango de 1.00 a 1.5 g/l con cinco tratamientos con una variación de 0.25 g/l con cuatro tratamientos y una variación de 5 g/l.

Los medios de cultivo se prepararon por duplicado, en matraces de 500 ml con 150 ml de medio de cultivo ajustando a un pH de 7.0 para cada tratamiento, cada uno fue inoculado con 5 ml de una suspensión bacteriana de 2 días de crecimiento en un medio de cultivo sólido base.

Estos tratamientos se realizaron incubándose a 30°C en un agitador rotatorio provisto de controladores de temperatura y agitación, y 200 rpm de velocidad. Se evaluó la velocidad de crecimiento realizándose cinéticas con dichos medios preparados y tomándose muestras desde la hora cero hasta la fase estacionaria, se cuantificó por la densidad óptica la cantidad de microorganismos cada dos horas por medio del Espectrofotómetro a 600 nm de absorbancia.

Los resultados obtenidos se graficaron en el tiempo (horas) y la velocidad específica de crecimiento (μ) por regresión lineal, usándose el logaritmo natural de la densidad óptica sobre el tiempo de la base exponencial de crecimiento de acuerdo a Aliba (2), y el tiempo de duplicación (t_D) por medio de la siguiente ecuación:

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Se optimizó el medio de cultivo tomando en cuenta los mejores tiempos de duplicación para cada uno de los componentes del medio de cultivo, se analizaron por un diseño estadístico completamente al azar, así como para las variaciones de pH y temperatura por ecuaciones polinomiales de primer y segundo orden.

4.3 OPTIMIZACION DE LOS FACTORES AMBIENTALES.

33

Una vez optimizado el medio de cultivo se prosiguió a optimizar la temperatura de incubación usándose un rango de 26° a 34° C con una variación por tratamiento de 2°C. Posteriormente se prosiguió a optimizar el pH del medio con un rango de pH de 5.5 a 8.5 con una variación por tratamiento de 0.5 (para ajustar los pH de los medios de cultivo se utilizó ácido sulfúrico 0.1 M e hidróxido de sodio, 0.1 M). Cada una de las variaciones de temperatura y pH se manejaron de igual manera que como se optimizó el medio de cultivo.

4.4. DETERMINACION DE PESO SECO.

Se determinó la producción de biomasa (g/l) en fase exponencial por medio del peso seco de microorganismos/ml, en el medio optimizado y en las condiciones ambientales ideales para el crecimiento. Se utilizaron membranas millipore de 0.22 μ m filtrando 1 ml de cultivo y por diferencia de peso seco constante se obtuvo el rendimiento celular; esto se realizó en horno de microondas.

La cuenta viable en el inoculante se realizó por el método de Miles y Mishra en caja, lo cual nos indicó la cantidad de microorganismos que se obtuvieron en las mejores condiciones de trabajo para esta cepa de Rhizobium.

5.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA CEPA DE *Rhizobium* EN LOS CULTIVOS DE VEZA DE INVIERNO.

Se observaron en el microscopio pequeños bastones gram negativo, con presencia de abundantes gránulos de beta-hidroxibutirato; con motilidad positiva luego del crecimiento por 24 horas en medio líquido.

Se aislaron e identificaron dos cepas, de las cuales se encontraron características coloniales diferentes en medio de cultivo base sólido, que se manejaron con nomenclatura diferente; las colonias que presentaban características rugosas se denominaron FESC-L1 que fueron estas las que se utilizaron en este trabajo experimental.

En medio líquido con azul de bromotimol se evaluó el cambio de pH al virar a amarillo a los tres días de incubación, lo cual indica que esta cepa es acidificadora y de crecimiento rápido. (35, 53).

Los resultados de la inoculación de las semillas de *Vicia villosa* a las 3 y 4 semanas se encontraron nódulos rosados en las raíces de la plántula un indicador de la eficiencia de la fijación de nitrógeno y nodulación.

CARACTERISTICAS DE Rhizobium leguminosarum FESC-L1.

Tabla 3.

Tinción de Gram	Negativa
Morfología	Bastones pequeños
Morfología colonial	Circulares, convexas, translúcidas, rugosas y con producción abundante de goma.
Presencia de gránulos de beta-hidroxibutirato	Positivo
Motilidad	Positiva
Azul de bromotimol	Reacción ácida en tres días
Leche tornasolada	Reacción ácida con fermen- tación de la lactosa en formación de coágulo con desprendimiento de suero.
Nodulación de Vicia Villosa	Positiva
Reacción Inmunológica con antisuero de <u>R. leguminosarum</u>	Positivo
Reacción de identidad con antisuero de <u>R. leguminosarum</u> FESC-L3	Negativo

Las cepas FESC-L3 y FESC-L1 muestran diferencias no sólo en su morfología colonial, sino también en la rapidez para producir ácido, no muestran reacciones de identidad entre ellas en pruebas de precipitación en caja, pero reaccionan frente a antisueros de Rhizobium leguminosarum.

5.2 OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

5.2.1. EVALUACION DEL CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE FOSFATO DIBASICO DE POTASIO.

En la tabla 4 y en la figura 1, se muestran los resultados de velocidad de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación para Rhizobium leguminosarum FESC-L1 en el medio de cultivo con variaciones en los niveles de K_2HPO_4 .

En la tabla 4 se presenta el resumen de la información de las medias y diferencias estadísticas para los diferentes niveles de aporte de K_2HPO_4 . Las comparaciones de las medias para los niveles de aporte de Fosfato dibásico de Potasio indicaron que las concentraciones de 0.6 y 1.16 presentaron las mejores velocidades de crecimiento y tiempo de duplicación a diferencia de las concentraciones superiores, difiriendo significativamente con los medios con concentraciones de 1.66 y 2.16 g/l de K_2HPO_4 . En la figura 1 se observa el comportamiento de la bacteria con respecto a las variaciones de ésta sal.

TABLA 4. EFECTOS DEL FOSFATO DIBASICO DE POTASIO A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN.

K_2HPO_4 g/l	u	tD
0.6	0.116 ^a	5.98 ^a
1.16	0.122 ^a	5.66 ^a
1.66	0.077 ^b	9.03 ^b
2.16	0.083 ^b	8.37 ^b
ee	0.0035	0.337

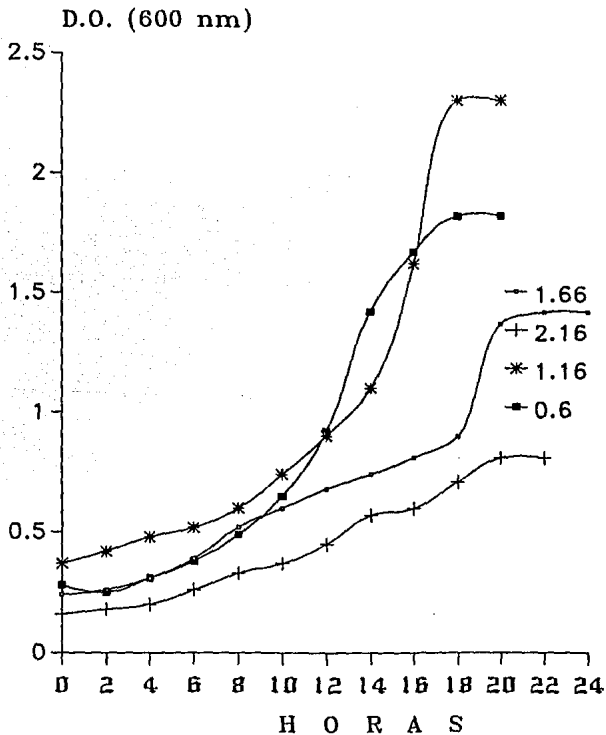
u = velocidad de crecimiento h

tD= tiempo de duplicación h

ee= error estándar

Los indices a, b diferentes dentro de las columnas, indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

FIGURA 1 CRECIMIENTO DE *R. Leguminosarum* FESC-L1
CON DIFERENTES NIVELES DE H₂PO₄



5.2.2 EVALUACION DEL CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Los resultados obtenidos para las variaciones en los niveles de sulfato de magnesio se detallan en la tabla 5 y figura 2.

El resumen mostrado en la tabla nos presenta la información de las medias y diferencias significativas para los diferentes niveles de aporte de sulfato de magnesio (0.26, 0.76, 1.01, 1.26 g/l). La comparación de las medias para los diferentes niveles de aporte de sulfato de magnesio, presentó el mejor tiempo de duplicación a una concentración de 1.01 g/l de sulfato de magnesio, aunque se podría usar 0.76 y 1.26 g/l, obteniéndose también buenos resultados; por lo tanto, se seleccionó 1.01 g/l por ser la concentración que permitió el mejor tiempo de duplicación.

TABLA 5. RESUMEN DE LOS TIEMPOS DE DUPLICACION Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO CON DIFERENTES NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO.

MgSO ₄ , g/L	u	tD
0.26	0.069 ^a	10.24 ^a
0.76	0.127 ^b	5.44 ^b
1.01	0.131 ^b	5.28 ^b
1.26	0.120 ^b	5.80 ^b
ee	0.0059	0.60

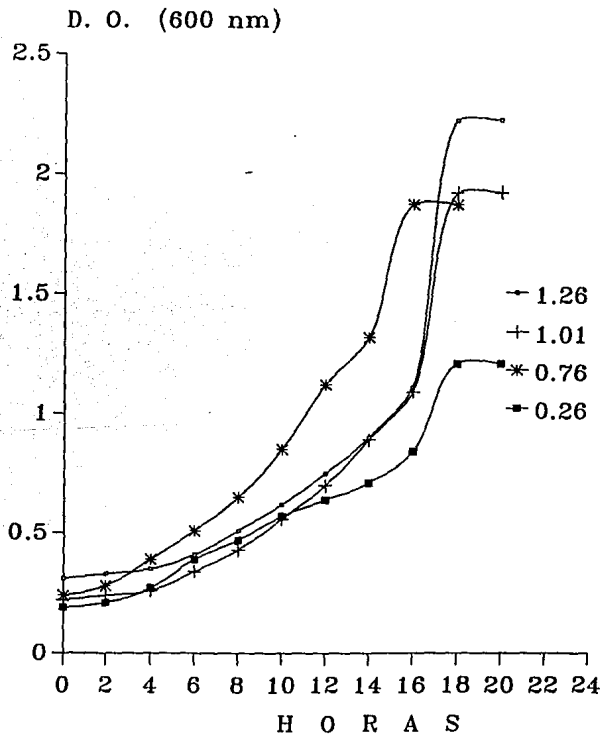
u = velocidad de crecimiento h

tD= tiempo de duplicación h

ee= error estándar

Los índices a, b diferentes dentro de las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

FIGURA 2, CRECIMIENTO DE *R. Leguminosarum* FESC-L1⁴¹
CON DIFERENTES NIVELES DE Mg₂SO₄



5.2.3 EVALUACION DEL CRECIMIENTO DEL Rhizobium leguminosarum FESC-L1 VARIANDO LOS NIVELES DE CLORURO DE SODIO EN EL MEDIO DE CULTIVO.

En la tabla 6, se presentan los resultados obtenidos para la velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (tD) para Rhizobium leguminosarum FESC-L1 en el medio de cultivo, variando los niveles de aporte de cloruro de sodio.

En la figura 3 observamos que la comparación de las medias nos indican que los mayores tiempos de duplicación correspondieron a las concentraciones más altas de cloruro de sodio; la concentración de 0.1 g/l de cloruro de sodio, mostró los mejores tiempos de duplicación y que es significativamente diferente a otros niveles utilizados, lo anterior se aprecia en un aumento de la concentración de los iones cloruros que puede ser tóxico para éste microorganismo (38).

TABLA 6. CINETICA DE CRECIMIENTO DE Rhizobium leguminosarum FESC-L1 CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO.

NaCl g/l	u	tD
0.1	0.103 ^a	6.7 ^a
0.2	0.078 ^c	8.90 ^c
0.3	0.089 ^b	7.79 ^b
0.4	0.080 ^c	8.67 ^c
ee	0.0023	0.245

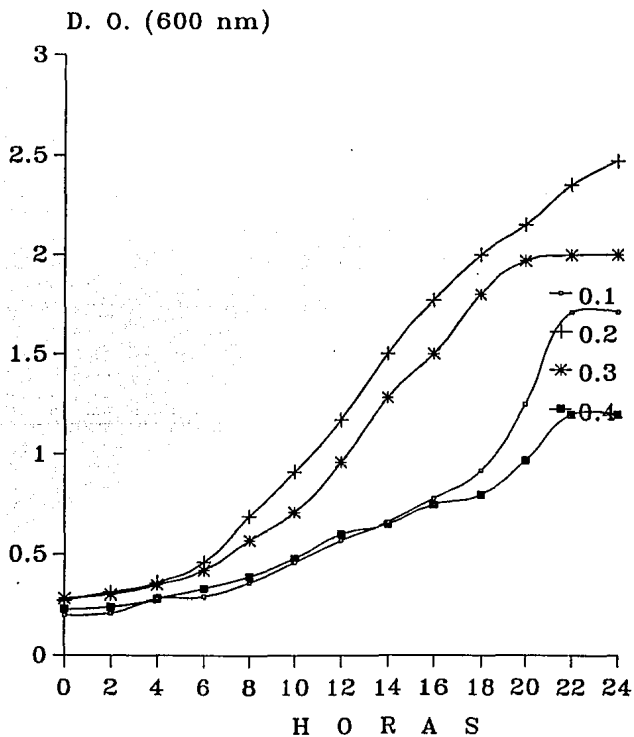
u = velocidad de crecimiento h

tD= tiempo de duplicación h

ee= error estándar

Los índices a, b, c diferentes dentro de las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

FIGURA 3, CRECIMIENTO DE R. Leguminosarum FESC-L1⁴⁴
CON DIFERENTES NIVELES DE NaCl



5.2.4. EVALUACION DEL CRECIMIENTO CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO

En la tabla 7 y figura 4, se presentan los resultados de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_D) obtenidos en los medios de cultivo en los cuales variaron los niveles de $FeCl_3$; las medias y las diferencias estadísticas para los medios utilizados también se detallan.

El análisis de la información, nos indicó la existencia de una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las concentraciones de cloruro férrico. Las comparaciones de las medias para velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_D) indicaron que la concentración de 0.05 g/l de cloruro férrico, difirió significativamente de los niveles superiores, mientras que altas concentraciones no muestran diferencia que podamos considerar significativa; por ésta razón, se eligió el nivel de cloruro férrico de 0.1 g/l como nivel óptimo para ser utilizado en el medio para el crecimiento bacteriano.

TABLA 7. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO FERRICO SOBRE u Y tD EN EL CRECIMIENTO DE Rhizobium leguminosarum FESC-L1.

FeCl ₃ g/l	u	tD
0.5	0.44 ^a	16.0 ^a
0.1	0.77 ^b	9.0 ^b
0.15	0.79 ^b	8.8 ^b
ee	0.025	0.90

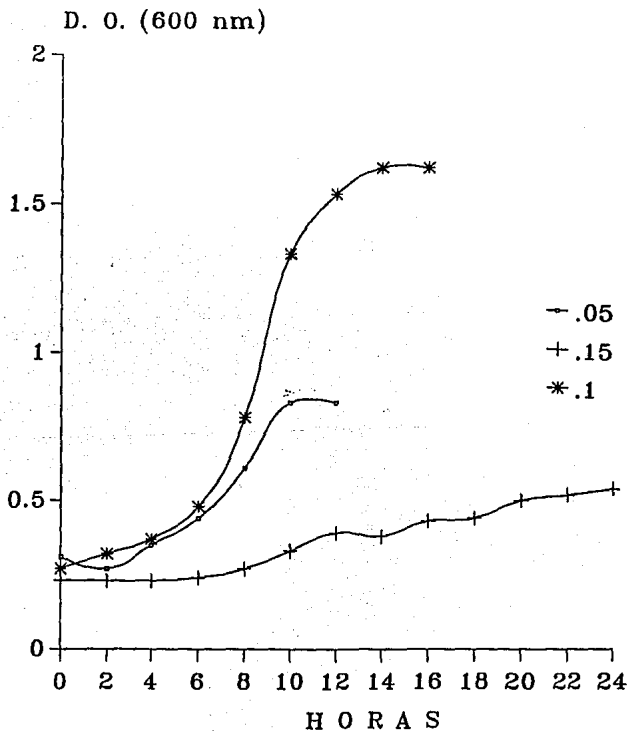
u = velocidad de crecimiento h

tD = tiempo de duplicación h

ee = error estandar

Los indices a, b diferentes dentro de las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

FIGURA 4, CRECIMIENTO DE *R. Leguminosarum* FESC-L1⁴⁷
CON DIFERENTES NIVELES DE FeCl3



5.2.5. EVALUACION DEL CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL MEDIO DE CULTIVO.

En la tabla 8 y figura 5, los resultados obtenidos de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (tD) para Rhizobium leguminosarum FESC-L1 con variaciones en los niveles de extracto de levadura en el medio de cultivo.

El análisis estadístico de las interacciones nos indicó que el comportamiento de Rhizobium leguminosarum FESC-L1, a alta concentración de extracto de levadura el mejor tiempo de duplicación de 4.79 horas.

Es recomendable el estudio de concentraciones mayores a 1.25 g/l de extracto de levadura para observar si continúa el mismo comportamiento, o si existe una inhibición a altas concentraciones de esta fuente de nitrógeno, ya que las altas concentraciones de aminoácidos en el medio de cultivo inhiben el crecimiento de cepas del género Rhizobium (38, 53).

TABLA 8. PROMEDIOS DE μ Y tD EN HORAS CON DIFERENTES NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL CRECIMIENTO DE Rhizobium leguminosarum.

Extracto de levadura g/l	μ	tD
0.5	0.066 ^a	10.5 ^a
0.75	0.76 ^a	9.9 ^a
1.0	0.119 ^b	5.8 ^b
1.25	0.145 ^b	4.79 ^b
ee	0.012	1.40

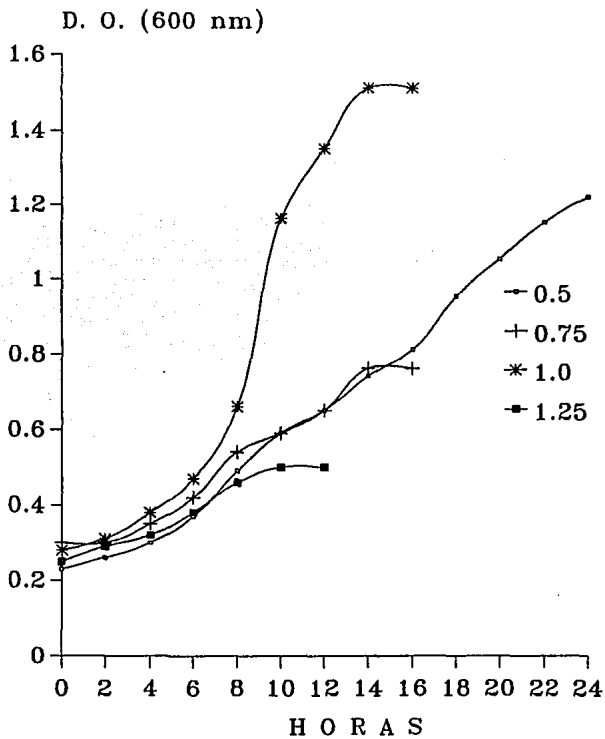
μ = velocidad de crecimiento h

tD = tiempo de duplicación h

ee = error estandar

Los indices a, b diferentes dentro de las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

FIGURA 5, CRECIMIENTO DE R. Leguminosarum FESC-L1⁵⁰
CON DIFERENTES NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA



**5.2.6. EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE
Rhizobium leguminosarum FESC-L1
VARIANDO LOS NIVELES DE MANITOL
COMO FUENTE DE CARBONO.**

En la tabla 9 y figura 6, se indican las velocidades de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_D) para Rhizobium leguminosarum FESC-L1 con diferentes niveles de manitol.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de concentración de 5, 10, 15, y 20 g/l de manitol, aunque el mejor tiempo de duplicación fué de 4.7 Horas con 15 g/l de manitol.

El mayor tiempo de duplicación fué con 10 g/l de manitol siendo éste dato significativamente diferente ($P < 0.05$) respecto a los otros niveles estudiados.

Lo anterior puede deberse a que la fase exponencial fué muy prolongada y con poca variación en la densidad óptica registrada, lo que nos ocasionó que al realizarse los cálculos se aumente el error inherente al método experimental, siendo éste un error sistemático del modelo matemático empleado.

TABLA 9. EFECTOS DEL MANITOL A DIFERENTES NIVELES DE CONCENTRACION SOBRE μ Y tD EN HORAS, EN Rhizobium leguminosarum FESC-L1

Manitol g/l	μ	tD
5.0	0.135 ^a	5.2 ^a
10.0	0.091 ^b	7.7 ^b
15.0	0.148 ^a	4.7 ^a
20.0	0.132 ^a	5.2 ^a
ee	0.067	0.38

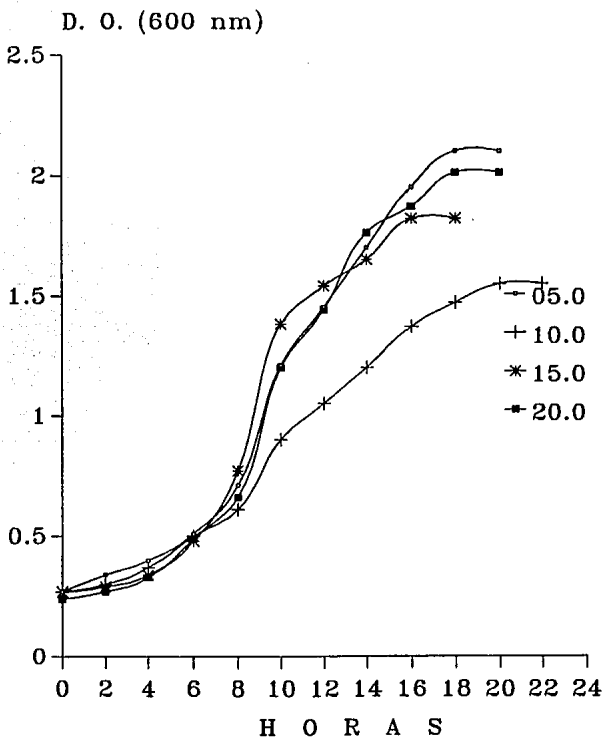
μ = velocidad de crecimiento h

tD = tiempo de duplicación h

ee = error estándar

Los índices a, b diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

FIGURA 6. CRECIMIENTO DE *R. Leguminosarum* FESC-L1⁵³
CON DIFERENTES NIVELES DE MANITOL



5.3. MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO.

En la tabla No. 12 se detalla el medio óptimo de crecimiento para el Rhizobium leguminosarum FESC-L1, mostrándose las concentraciones de cada uno de los nutrientes:

TABLA No. 12

MEDIO DE CULTIVO

NUTRIENTE	CONCENTRACION g/l
Fosfato de Potasio	1.16
Sulfato de Magnesio	1.01
Cloruro de Sodio	0.10
Cloruro Férrico	0.10
Extracto de Levadura	0.75
Manitol	15.00

Resumen de las concentraciones óptimas de los nutrientes de acuerdo a las mejores tiempos de duplicación obtenidos para cada componente del medio.

5.4 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE Rhizobium leguminosarum FESC-L1.

5.4.1. EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DEL Rhizobium leguminosarum EN EL MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO.

En las figuras 7, 8, 11 y tabla 10, se muestra el resumen del cálculo de la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación al modificarse la temperatura en el medio de cultivo optimizado. La información obtenida fué utilizada para ajustar ecuaciones polinomiales, lineales o cuadráticas explicativas del comportamiento general de la velocidad de crecimiento al modificarse la temperatura de incubación del medio. La ecuación que logró el mejor ajuste para Rhizobium leguminosarum FESC-L1, fué la siguiente:

$$U = -2.05 + 0.153 * \text{temp} - 0.0027 * \text{temp}^2$$

En la figura 8, se muestra que la temperatura óptima para el crecimiento de Rhizobium leguminosarum FESC-L1 se encuentra entre 28° y 30°C.

TABLA 10. SE MUESTRA LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN VARIANDO LA TEMPERATURA DEL MEDIO OPTIMIZADO.

Temperatura °C	μ	t_D
26	0.105	7.4
28	0.121	4.4
30	0.115	5.3
32	0.089	10.2
34	0.40	19.0

FIGURA 7, CRECIMIENTO DE *R. Leguminosarum* FESC-L1
VARIACION EN LA VELOCIDAD AL MODIFICAR TEMPERATURA

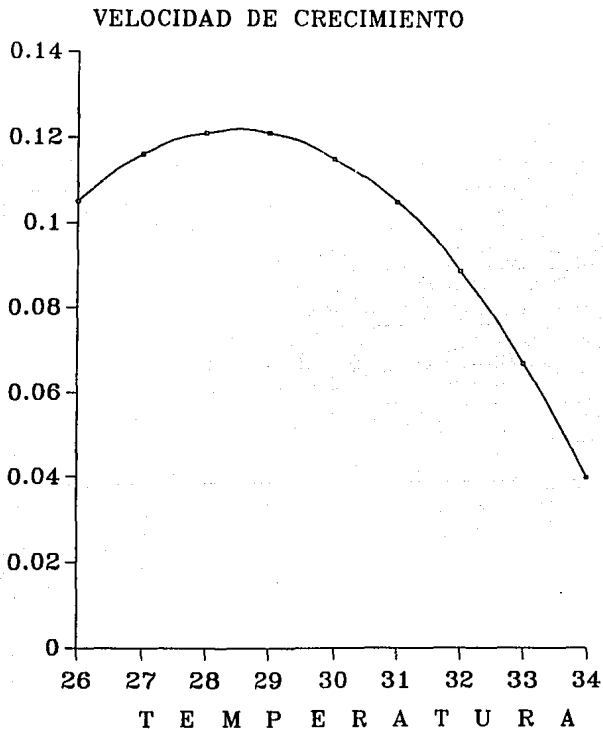


FIGURA 8, CRECIMIENTO DE R. Leguminosarum
FESC-L1 CON VARIACIONES EN EL TIEMPO DE DUPLICACION
AL VARIAR LA TEMPERATURA

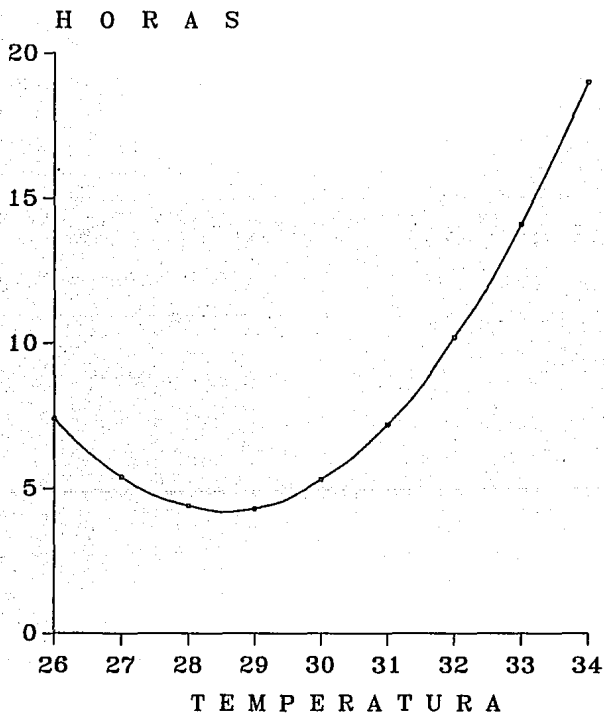
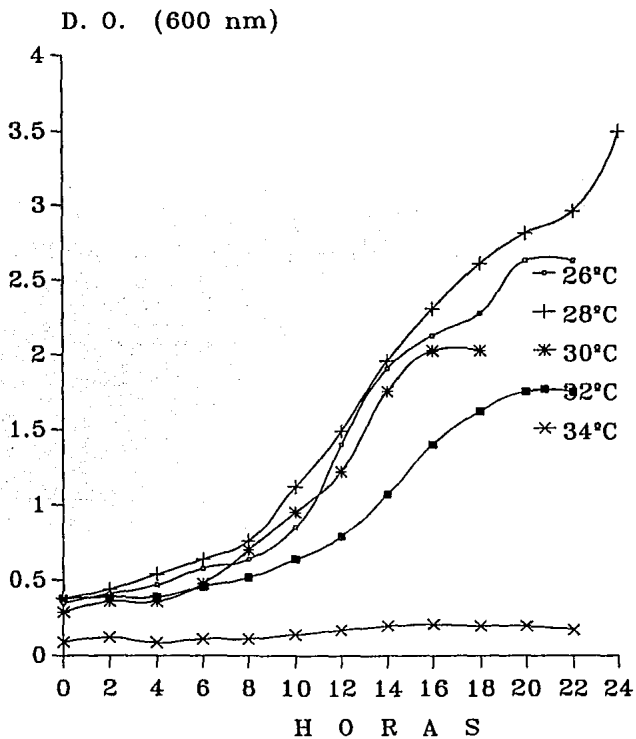


FIGURA 11, CRECIMIENTO DE *R. Leguminosarum* FESC-L1 VARIANDO LA TEMPERATURA DE INCUBACION ⁵⁹



5.4.2. EFECTOS DE LA MODIFICACION DEL pH EN EL CRECIMIENTO DE Rhizobium leguminosarum FESC-L1 EN EL MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO.

Como se muestra en las figuras 9, 10 y 12, La evaluación en el crecimiento de Rhizobium leguminosarum al modificarse el pH del medio de cultivo entre 6 y 8 unidades, y así mismo los resultados de la tabla 11, que nos describen la velocidad de crecimiento (u) y el tiempo de duplicación (tD).

Se utilizaron los datos obtenidos para ajustar las ecuaciones polinomiales, lineales o cuadráticas explicativas del comportamiento general de la velocidad y crecimiento al modificarse el pH del medio utilizado. La ecuación que logró el mejor ajuste para el crecimiento bacteriano al variarse el pH fué:

$$U = -0.21 + 0.094 \text{ pH} - 0.007 \text{ pH}^2$$

En la figura 9 se muestra claramente que el pH óptimo para el crecimiento de Rhizobium leguminosarum FESC-L1 está entre 6.5 y 7.5 unidades, eligiéndose 7.5 unidades, que es donde se encuentra el mejor crecimiento bacteriano, ya que es una bacteria acidificadora del medio de cultivo (39).

TABLA 11. MUESTRA LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION EN HORAS VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO.

pH	u	tD
5.5	0.095	7.31
6.0	0.102	6.76
6.5	0.105	6.52
7.0	0.105	6.59
7.5	0.101	6.96
8.0	0.93	7.63
8.5	0.082	8.62

FIGURA 9, CRECIMIENTO DE R. Leguminosarum FESC-L1
VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO

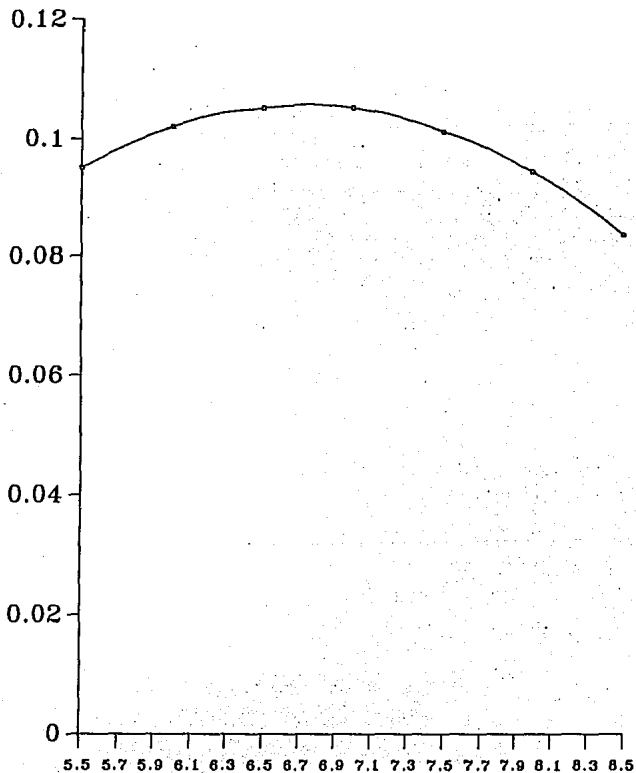


FIGURA 10, CRECIMIENTO DE R. Leguminosarum FESC-L1
VARIACIONES DEL TIEMPO DE DUPLICACION AL MODIFICAR pH

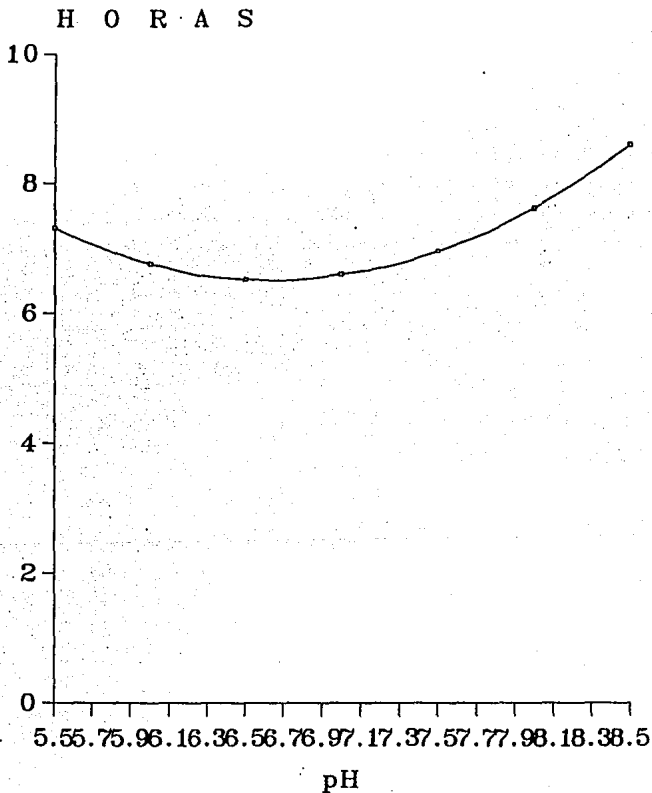
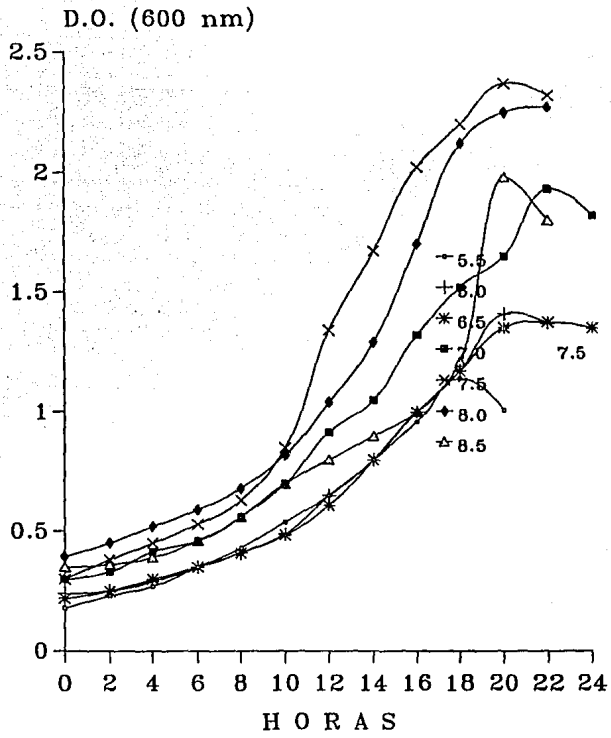


FIGURA 12, CRECIMIENTO DE R. Leguminosarum FESC-L1 CON VARIACIONES DE pH



5.5 PRODUCCION DE INOCULANTE PARA VEZA DE INVIERNO (VICIA VILLOSA)

La cinética de crecimiento realizada en las condiciones óptimas de producción en sistemas de lote a 30°C y un pH de 7.5 a 200 rpm. Llevó a la producción de un inoculante con una densidad óptica de 2.6 a 590 nm de absorbancia y una cuenta viable de 1×10^{10} UFC/ml. El peso seco bacteriano fué de 5 g/l, lo que nos indica una relación con la fuente de carbono un 33% de rendimiento de biomasa ya que una parte de la fuente aportada se utilizó para producción de metabolitos y mantenimiento bacteriano. De acuerdo a la bibliografía, la producción de células fué adecuada Aiba (2, 40).

6.0 CONCLUSIONES

La cepa con la que se trabajó en el laboratorio, mostró eficiencia en la nodulación de raíces de *Vicia villosa* identificándose como Rhizobium leguminosarum FESC-L1, la cual acidifica el medio de cultivo muy rápidamente. El medio óptimo de crecimiento obtenido en el presente trabajo experimental se muestra en la tabla No. 13; observándose diferencias en la concentración de los componentes.

TABLA No. 13. COMPARACION DEL MEDIO OPTIMIZADO CON EL MEDIO BASE.

NUTRIENTE	CONCENTRACION	
	g/l	
	MEDIO OPTIMIZADO	MEDIO BASE
Fosfato Dibásico de Potasio	1.16	1.66
Sulfato de Magnesio heptahidratado	1.01	0.76
Cloruro de Sodio	0.10	0.26
Extracto de Levadura	0.75	1.00
Manitol	15.00	20.00
Cloruro Férrico hexahidratado	0.10	0.00
	pH 7.5	pH 7.2-7.4
	Temp 30°C	Temp 30°C

Las necesidades de Nitrógeno y Vitaminas requeridas para el crecimiento de Rhizobium leguminosarum FESC-L1, fueron aportadas por extracto de levadura, a la concentración de 1.01 g/l con la cual se obtuvo el mejor crecimiento.

La concentración de Fosfato Dibásico de Potasio que presentó mejor tiempo de duplicación fué de 1.16 g/l ; también se puede utilizar la concentración de 0.6 g/l ya que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambas. Los niveles de aportación de Nitrógeno, vitaminas y minerales puede tener efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano.

El mejor tiempo de duplicación para las unidades estudiadas de Sulfato de Magnesio se obtuvo a 1.01 g/l, aunque se pueden elegir los niveles de 0.76 y 1.26 g/l ya que no existen diferencias significativas entre ambas.

El aporte de sales cloradas como Cloruro de Sodio (0.1 g/l) y Cloruro Férrico (0.1 g/l) se eligieron de acuerdo al menor tiempo de duplicación; para la primera se recomienda realizar estudios a futuro para subtetisar el efecto de concentraciones menores de Cloruro de Sodio.

La concentración de Fosfato de Calcio que permitió en mayores velocidades de crecimiento fué a 15 g/l. A nivel industrial se pueden considerar otros azúcares que tengan el mismo efecto que el manitol en la producción de inoculantes.

El crecimiento de las bacterias en el medio optimizado fué afectado por el pH y la temperatura de incubación y la temperatura de incubación fué de 30°C.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABAIDOO, Robert C.; George, Thomas; Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grown soybean and common bean; Can. J. Microbiology; 1989; p.92-96.
- 2.- AIBA, S., A. E. Humphrey y N.F. Millis. 1973. Survival and growth of bacterial introduced into soil. Biol. Biochem., 20: 509-515.
- 3.- AMENDOLA, R. 1984. Legume Persistence in Tropical Pastures. Departamenet of field crops and grasslands. Agricultural University Wageningen. Holanda. Mimeo. 98 p.
- 4.- AYANABA, A., and P.J. Dart. 1987. Biological Nitrogen Fixation in farming Systems of the Tropics. John Wiley and Sons (Ed), New York. 378 pps.
- 5.- BALATTI, Pedro A.; Calcium regulates growth of Rhizobium fredii and its ability to nodulate soybean cv, Peking.; Can. J. Microbiology, 1991; p. 542-548.
- 6.- BEDMAR, E., J. Olivares. Limitaciones de la fijación biológica del Nitrógeno. s.p.i.
- 7.- BERKUM, Peter van; and Maier Robert J. Lack of Carbon Substrate Repression of Uptake Hidrogenase Activity in Bradyrhizobium japonicum SR.; Journal of Bacteriology, April, 1988. p. 1962-1964.
- 8.- BOIARDI J.L.; Nodulation of Phaseolus vulgaris L., as affected by Rhizobium phaseoli growth phase. Can. J: Microbiology, 1987, p. 63-67.
- 9.- BROCK, T.D., D.W. Smith y M.T. Madigan. 1987. Clasificación de las Bacterias segun Bergey. In: Microbiología. Prentice Hall (Ed).

- 10.- BROCKMAN F.J. and Bezdicek D.F. Diversity within serogroups of Rhizobium leguminosarum biovar viceae in the Palouse Region of Eastern Washington as Indicated by Plasmid Profiles, Intrinsic Antibiotic Resistance, and Topography; *Applied and Environmental Microbiology*; 1989; p. 109-115.
- 11.- BUCHANAN R.E. Life phases in a Bacterial culture; *Infect. diseases*; 1918; p. 109-125.
- 12.- CAETANO-ANOLLES, G., P.M. Greehof. 1991. Alfalfa Control Nodulation during the onset of Rhizobium Nodulation-induced cortical cell division. *Plant Physiol.* 95: 366-373.
- 13.- CARLSON, R.W., R.E. Sanders 1968. Host-Symbiotic interactions. *Plant Physiol.* 62: 912-917.
- 14.- CONN, E.E. y P.K. Stumpf. *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise.* vol. 16. U.S.A. Academic Press (Ed.). 1990. pp. 66-101.
- 15.- CONN, E.E. y P.K. Stumpf. *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise.* vol. 5. U.S.A. Academic Press (Ed.). 1990. pp. 45-68.
- 16.- DIEBOLD, Ronald; Rhizobium leguminosarum Exopolysaccharide Mutants: Biochemical and Genetic Analyses and Symbiotic Behavior on Three Hosts; *Journal of bacteriology*, 1989, p.4821-4836.
- 17.- DILWORTH, M.J. and C.A. APPLEBY. 1979. Leghemoglobine and Rhizobium hemoproteins. *In: A Treatise of Fixation.* Wiley Interscience (Ed.). pp. 691-763.
- 18.- DUDMAN, W.F. 1964. Immune Diffusion Analysis of the Extracellular Soluble Antigen of two Strains of Rhizobium leguminosarum by phaseol. *J. Bacteriol.* Vol 173 pp 2411-2419.

- 19.- ELKAN, G.H. 1984. Taxonomy and Metabolism of Rhizobium. En M. Alexander (Ed.) Nitrogen Fixation. Plenum Press. N. York. pp 1-38.
- 20.-ELMAR L. Kannenberg and Nicholas J: Brewin; Expression of a Cell Surface Antigen from Rhizobium leguminosarum 3841 Is Regulated by Oxygen and pH; Journal Bacteriology, sept., 1989; p. 4543-4548.
- 21.-GIRARD, Marla de Lourdes, Flores, Margarita; Structural complexity of the symbiotic Plasmid of Rhizobium leguminosarum bv, phaseoli; Journal of Bacteriology.
- 22.-GRAHAM,P.H. 1963. Vitamin requirements of root nodule bacteria.J. Gen. Microbiol.,30:245-248
- 23.- HRABAK,Estelle M.; Growth-Phase-Dependent Immunodeterminants of Rhizobium trifolii Lipopolysaccharide Which Bind Trifoliin A, a White Clover Lectin.; Journal of Bacteriology; 1981, p.697-711.
- 24.- ISHIKAWA, Hideo and Evans, Michael L.; Gravity-Induced Changes in Intracellular Potentials in Elongating Cortical Cells of Mung Bean Roots. Plant Cell Physiol. 1990, p. 457-462.
- 25.-KATHRYNA. vanden Bosch; Developmental Regulation of a Rhizobium Cell Surface Antigen during Growth of Pea Root Nodules; Journal Bacteriology ; sep, 1989. p. 4537-4542.
- 26.-KUCEY, R.M.N. and Hynes M.F.; Populations of Rhizobium leguminosarum biovars phaseoli and viceae in fields after bean or pea in rotation with nonlegumes; Can. J. Microbiology; 1989; p. 661-667.
- 27.-LENHINGER, A.L.: 1967. Bioquímica, Omega (Ed).

- 28.- LEYVA, A., J.M. Palacios, J. Murillo, T. Ruiz. Argüeso. 1990. Genetic Organization of the Hydrogen uptake (Hup) Cluster from Rhizobium leguminosarum. J. Bacteriol. 117: 1647-1655.
- 29.- LONG, Sharon R.; Rhizobium-Legume Nodulation: Life Together in the Underground; Cell, vol. 56; 1989; p. 203-214.
- 30.- LOPEZ, M. Fijación Biológica de Nitrógeno. En: Pastos tropicales. Curso de Postgrado. Edica.Cuba. pp.217-243.
- 31.- MAAGD, Ruud A. de; Spaank Herman P. Localization and Symbiotic Function of a Region on the Rhizobium leguminosarum Sym Plasmid pRL1J1 Responsible for a secreted, Flavonoid-Inducible 50-Kilodalton Protein; Journal of Bacteriology; 1989; p. 1151-1157.
- 32.- MAAGD, Ruud A. de; Mulders, Ine H.M.; Cloning, Nucleotide Sequencing, and Expression in Escherichia coli of a Rhizobium leguminosarum Gene Encoding a Symbiotically Repressed Outer Membrane Protein; Journal of Bacteriology; 1992; p. 214-221.
- 33.- MARTENSSON, Anna M.; Competitiveness of inoculant strains of Rhizobium leguminosarum by trifolli in red clover using repeated inoculation and increased inoculum levels; Can. J. Microbiology; 1989; p. 136-139.
- 34.- MARTINEZ, Esperanza; Palacios, Rafael; Nitrogen-Fixing Nodules Induced by Agrobacterium tumefaciens Harboring Rhizobium phaseoli Plasmids; Journal of Bacteriology; 1987; p. 2828-2834.
- 35.- MARTINEZ, Esperanza; Pardo, Marco A.; Reiteration of Nitrogen Fixation Gene Sequences and Specificity of Rhizobium in Nodulation and Nitrogen Fixation in Phaseolus vulgaris; Journal of General Microbiology; 1985; 1776-1786.

- 36.- MARTINEZ, V.R. 1986. Ciclo Biológico del Nitrógeno en el Suelo. In: Técnica Científica (Ed.).Cuba. 9-167 p.
- 37.- MONOD, Jacques; the Growth of Bacterial cultures; Ann. Rev. Microbiology; 1949; p. 371-394.
- 38.- NOEL, K. Dale, Vandenbosch, Kathryn A.; Mutations in Rhizobium phaseoli That Lead to Arrested Development of Infection Threads; Journal of bacteriology, Dec. 1989; p.1392-1401
- 39.- NORRIS, D.O. YR.A. Date. 1976. Legume bacteriology. In Tropical Pasture Research Principles and Methods. Shaw y Brya. Bulletin 51 commonweath Bureau of pasture and fields crops. C.A.B. (ed.), pp134-173.
- 40.- O'HARA, Graham W. Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in Rhizobium mellioli; Applied and Environmental Microbiology; 1989; p. 1870-1876.
- 41.- PAAU, Alan S. Improvement of Rhizobium inoculants; Applied and Environmental Microbiology; 1989; p. 862-865.
- 42.- PARKE, Donna; Regulation of Phenolic Catabolism in Rhizobium leguminosarum Biovar trifolii; Journal of Bacteriology , sept., 1991; p.5546-5550.
- 43.- RACHIE, K.O. et al; Tropical legumes Resources for the Future. National Academic of Sciences (Ed). Washington D.C. 1981. 258 pps.
- 44.- RALEIGH, Elisabeth A.; Positive Selection of Nodulation-Deficient Rhizobium phaseoli.; Journal of Bacteriology, 1982; p. 83-88.
- 45.- REGINENSI, R.S. Produccion de inoculantes para leguminosas usando como soporte bagacillo de caña de azucar. Tesis maestria UNAM

- 46.- ROMERO, David; Brom, Susana; Amplification and Deletion of a nod-nif Region in the Symbiotic Plasmid of Rhizobium phaseoli; Journal of Bacteriology; 1991; p. 2435-2441.
- 47.- ROSSI, Mauro; Defez, Roberto; regulation of Glutamine Synthetase Isoenzymes in Rhizobium leguminosarum biovar viceae.; Journal of General Microbiology; 1989, p. 629-637.
- 48.-RUUDA. de Maagd; Immunological Characterization of Rhizobium leguminosarum Outer membrane Antigens by Use of Polyclonal and Monoclonal Antibodies; Journal Bacteriology, feb., 1989; p.1136-1142.
- 49.- SCHUBERT. K. 1986. products of Biological Nitrogen Fixation in higher Plants, Synthesis, Transport and Metabolism. Ann. rev. Plant. Physiol. 37: 539-575.
- 50.- SMITH, Geoffrey B. and Wollum II, A. G. Nodulation of Glycine max by Six Bradyrhizobium japonicum Strains with Different Competitive Abilities; Applied and Environmental Microbiology; 1989; p. 1957-1962.
- 51.- TRINICK, Michael J. Localization of Bacteria and Hemoglobin in Root Nodules of Parasponia andersonii Containing Both Bradyrhizobium Strains and Rhizobium leguminosarum biovar trifolii; Applied and Environmental Microbiology; 1989; p. 2046-2055.
- 52.- TRUCHET, G. Simbiosis bacterias- leguminosas: un diálogo molecular: Mundo científico; 1993; N°113 vol 13; p. 267-269.
- 53.- TRUCHET, Georges; Debelle, Frederic; Identificación of a Rhizobium meliloti pSm2011 Region controlling the Host Specificity or root Hair Curling and Nodulation. J. Bacteriology; 1985. p.1200 1210.

- 54.- VINCENT, J.M. 1975. Manual práctico de Rhizobiología. In: Hemisferio sur (Ed.). B. Aires. pp.1-200.
- 55.- WENZEL, G. Biotechnology in Agriculture an overview. Biotechnology. A comprehensive treatise. vol. 6b. Verlagchemie. (Ed). Federal Republic of Germany. 1988. p. 788-789.
- 56.- WITTENBERG, J.B. 1980. Utilization of Leghemoglobin-bound oxygen by Rhizobium bacteroids. In: Nitrogen Fixation. W.E. Newton y h. Orme Johnson (Ed.). pp 53-58.
- 57.- YAHALOM, Eli; Okon, Jaacov; Dovrat, Amos; Posible mode of action of Azospirillum brasilense strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (Medicago polymorpha); Can. J. Microbiology; 1986; p. 10-14.
- 58.- YAHALOM, E. 1987. Azospirillum Effects on Susceptibility to Rhizobium Nodulation and on Nitrogen Fixation of several Forage Legume. Can. J. Microbiol. 33: 510-514.