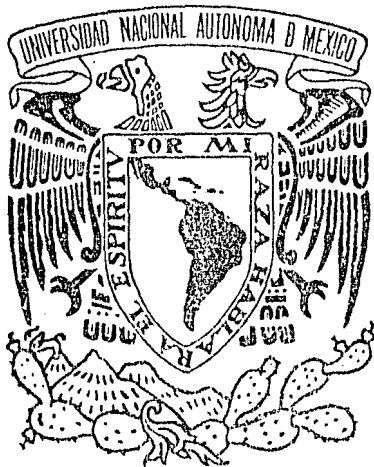


7
2/3/85

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO COMPARATIVO A NIVEL DE LABORATORIO DE 16 CEPAS DE
RHIZOBIUM JAPONICUM

T E S I S

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

1985



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.

Contenido:

Resumen	1
I Introduccion	3
II Generalidades	4
2.1 Características de <u>Rhizobium</u>	4
2.2 Características metabólicas	7
2.3 Interacciones de <u>Rhizobium</u> con otros microorganismos y factores ambientales	15
III Material y métodos	19
3.1 Cepas de <u>Rhizobium japonicum</u>	19
3.2 Pruebas bioquímicas	19
3.2.1 Desarrollo en glucosa-peptona-agar	19
3.2.2 Desarrollo en citrato de Koser	19
3.2.3 Desarrollo en agar sulfito de bismuto	19
3.2.4 Medio modificado de Bergensen (utilización del manganeso)	20
3.2.5 Prueba de cetolactasa	20
3.2.6 Desarrollo en ELMA-cristal-violeta (1:1000) y (1:150000)	20
3.2.7 Reacción de la leche tornasolada	20
3.2.8 Desarrollo en ELMA	20
3.2.9 Reacción ácida o alcalina en ELMA-AB	21
3.2.10 Utilización de Xilosa y Ramnosa	21
3.2.11 Reducción del tetrazolio (o actividad de hidrogenasa)	21
3.3 Resistencia a antibióticos	22
3.4 Prueba de la tolerancia a la acidez y alcalinidad	23

IV	Resultados	25
4.1.	Tabla 1	25
4.2	Tabla 2	30
4.2.1	Tabla 3.- Desarrollo máximo de las cepas en un interválo de pH 4-9	33
4.3	Gráficas de tolerancia a la acidez y alcalini- dad	33'
V	Análisis de los resultados	42
5.1	Pruebas bioquímicas	42
5.1.1	Desarrollo en glucosa-peptona-agar	42
5.1.2	Reacción de la leche tornasolada	42
5.1.3	Desarrollo en citrato de Koser	42
5.1.4	Producción de H ₂ S	42
5.1.5	Utilización del manganeso	42
5.1.6	Prueba de cetolactasa	42
5.1.7	Desarrollo en ELMA	42
5.1.8	Desarrollo en ELMABT	42
5.1.9	Desarrollo en ELMA-cristal violeta (1:1000) y (1:150000)	42
5.1.10	Fermentación de xilosa y Rannosa	43
5.1.11	Actividad de hidrogenasa	43
5.2	Resistencia a antibioticos	43
5.3	Resistencia a la acidez y alcalinidad	43
VI.	Conclusiones	44
VII.	Apéndice	45
VIII.	Bibliografía	51

R E S U M E N

Este estudio se realizó a nivel de laboratorio a fin de caracterizar y tipificar 16 cepas de Rhizobium japonicum las que en experimentos, anteriores se ha comprobado que -- son altamente efectivas en la fijación de nitrógeno.

En primer lugar se realizó una serie de 13 pruebas bioquímicas que fueron las siguientes: desarrollo en glucosa - peptona-agar, reacción en la leche tornasolada, desarrollo en citrato de Koser, producción de H_2S en agar sulfito de bismuto, desarrollo en el medio modificado de Bergensen producción de cetolactasa, reacción en el medio de ELMA-azul de bromotimol, desarrollo en el medio de ELMA-rojo-congo, desarrollo en medio de ELMA con cristal violeta (1:1000) y (1:150000), fermentación de xilosa en el medio de ELMA, fermentación de Ramnosa en el medio de ELMA y por último la -- prueba de la actividad de hidrogenasa.

También se realizaron otro tipo de pruebas con las mismas cepas como son: la resistencia o sensibilidad a los siguientes antibióticos: Amikacina, ac. nalidixico, ampicilina, cefalosporina, cloranficol, furandantina, gentamicina, colimicina, penicilina, sulfametozasol-trimetropin, tetraciclina, cloxacilina, eritromicina, lincomicina, novobiocina, estreptocimina.

Y por último se realizó la prueba de tolerancia a la acidez y alcalinidad, ésta prueba se llevo a cabo con 14 de las cepas ya que la 1 y 3 se comportaron atípicamente y las eliminamos al igual que en la prueba de resistencia a antibióticos.

Para ésta prueba se eligió un rango de pH de 4-9, se realizó con la finalidad de determinar el pH óptimo de desarrollo y así conocer su comportamiento a cambios bruscos de éste parámetro. Condición que es muy frecuente al introducir inoculantes al suelo de tal manera que ésta información nos ayuda a elegir las cepas que más convengan para trabajar en un suelo determinado.

Los resultados de las pruebas bioquímicas corresponden así en su totalidad al género Rhizobium japonicum observándose que coinciden con lo reportado en la literatura, sola--

mente las cepas 1 y 3 perdieron sus características típicas - y ésto se atribuye a que probablemente las cepas sufrieron un cambio genético. En la prueba de resistencia a antibióticos - se observó que cada una de las cepas presenta un patrón de -- comportamiento diferente con respecto a las otras.

Por lo que se refiere a la prueba de tolerancia a la acidez y alcalinidad se logró ver el rango de pH óptimo para el-máximo desarrollo de cada cepa.

I I N T R O D U C C I O N

1.- En los últimos años los estudios referentes a la práctica de inoculación y los beneficios que de ésta derivan han aumentado considerablemente; determinándose que las cepas de Rhizobium deben reunir ciertas características para que sean empleadas con fines agronómicos.

Actualmente no existen resultados que permitan correlacionar la efectividad en la fijación de nitrógeno con las características fisiológicas y serológicas; pero es de gran importancia la formación de un cepario con un criterio estricto del comportamiento de las cepas seleccionadas como altamente eficientes en experimentos de invernadero, especialmente cuando ésta información es complementada con pruebas de tolerancia a la acidez, o bien a concentraciones elevadas de sales, las que son de gran utilidad para saber si las cepas tienen capacidad para adaptarse en suelos con éstas condiciones, de tal modo que el conocimiento de las características anteriores y el control estricto de las cepas auténticas de Rhizobium aumenta las probabilidades de que la inoculación recomendada proporcione los beneficios que se esperan de ella.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se procedió a efectuar el estudio del comportamiento metabólico y actividad de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno del género Rhizobium especie japonicum, para lo que se aplicaron once pruebas bioquímicas, diez de las cuales permiten caracterizar a éstas cepas de manera general y otra referente a la actividad de la hidrogenasa, que de acuerdo con numerosos reportes parece existir una relación directamente proporcional con la efectividad de la cepa.

Otras pruebas realizadas corresponden a la determinación de la tolerancia a la acidez y alcalinidad y sensibilidad o resistencia a antibióticos, ésta última con objeto de utilizar algunos antibióticos en estudios posteriores.

II GENERALIDADES

2.- I Características de Rhizobium.

Además de su capacidad para formar nódulos con las leguminosas, que sigue siendo la base más aceptable para la ubicación taxonómica de su género, Rhizobium presenta los siguientes caracteres distintivos: bacilos Gram negativos de tamaño mediano, móviles y con gránulos de polihidroxibutirato, que se desarrollan escasamente en glucosa-peptona-agar, en cambio en un medio de agar con extracto de levadura su desarrollo es lento al principio y finalmente abundante dando origen a colonias características, de apariencia acosa o blancas (con cierto grado de variación reconocible después de cierta experiencia con éste grupo); la formación de ácidos es escasa o nula.

Respecto a la velocidad de crecimiento del género Rhizobium; existen especies que se consideran de crecimiento rápido ya que alcanzan su máximo desarrollo en horas, y se clasifican como pertenecientes al grupo I, en tanto que el grupo 2 incluye a las especies que se consideran de crecimiento lento y éstas alcanzan su máximo desarrollo en un período de 5 a 7 días, y ésto parece reflejar verdaderas diferencias metabólicas entre especies de éste género.

En el medio de agar levadura manitol su desarrollo es abundante en 3 - 5 días, formándose colonias incolóras o blancas y gomosas cuando pertenecen a las especies trifolii, leguminosarum, phaseoli, meliloti y algunas del grupo del caupi, en tanto que las especies lupini, japonicum, rizobia del Lotus y la mayor parte del grupo caupi en éste mismo medio se desarrollan lentamente observándose crecimiento escaso en un período de 5 a 7 días, las colonias son más pequeñas y blancas y con formación de goma escasa.

En éste mismo medio adicionado de rojo congo las colonias de rizobia absorben muy poco colorante o nada, desarrollando colonias incolóras o levemente rosadas.

Keyser, relacionó estas características de desarrollo rápido y lento como la presencia o ausencia de ciertas enzimas, lo que fué ratificado por Park.

Graham, reportó que el grupo de desarrollo rápido utilizó un mayor número de fuentes de carbono que las de crecimiento lento.

Otras características útiles para el reconocimiento de esos grupos de "especies" son: la naturaleza de sus antígenos somáticos, estimulación mediante azúcares pentósidos o vitaminas, límites de tolerancia a pH y de temperatura, y producción de H_2S . (28).

Sin embargo hasta la fecha el criterio más aceptado para la ubicación taxonómica de las especies se basa en su infectividad a determinado tipo de leguminosas en las que dan origen a la formación de nódulos. Esto se debe a que tanto las especies de rizobia, como las plantas de leguminosas presentan un grado de especificidad y esto lo podemos observar claramente en la tabla A.

Hasta hace poco se creía que las leguminosas eran los únicos huéspedes para Rhizobium, pero en 1973, se descubrió un caso en el que Rhizobium de Vigna sinensis ("Cowpea") -- forma nódulos en Trema aspera una planta tropical no leguminosa. Trema es en la actualidad el único género de no leguminosas conocido que se ha localizado por rizobia.

Tabla A

Grupos de inoculación cruzada de Rhizobium (39)

	Organismo	Plantas huéspedes
<hr/>		
Tipos de crecimiento rápido.		
Grupo de la alfalfa	<u>R. meliloti</u>	Meliloto, alfalfa
Grupo del trébol	<u>R. trifoli</u>	Trébol
Grupo del chícharo	<u>R. legumi- nosarum</u>	Chícharo, lentejas algunas habas.
Grupo Phaseolus	<u>R. Phaseoli</u>	Frijol
<hr/>		
Tipo de crecimiento lento.		
Grupo del lupino	<u>R. Lupini</u>	Lupino
Grupo de la soja	<u>R. japonicum</u>	Soja
Grupo del "Cowpea"	"Rhizobia del cowpea"	Vigna sinensis ("cow- pea") cacahuates aca- cias etc.

2.2. Características metabólicas.

Rhizobium, puede usar una gran variedad de carbohidratos, produciendo ácido pero nunca gas, utiliza nitrógeno inorgánico (amonio o nitrato) para su crecimiento, algunas cepas requieren factores de crecimiento y aminoácidos para su desarrollo óptimo o bien pueden usar formas de nitrógeno excepto nitritos.

Rhizobium es débilmente proteolítico.

Los medios sintéticos adecuados para el crecimiento de algunas cepas han sido descritos por Ferry, Etal, Schminghames y Bergensen. (6) (23) (43)

El gluconato de calcio (5% p/v) y fuentes de carbohidratos específicos son útiles como suplementos del medio para cepas de crecimiento lento. El intervalo de temperatura óptima de crecimiento es de 25° C - 30° c. (12) Una temperatura de 70° C. durante 10 minutos es letal, otra característica de éstas bacterias es, la intolerancia a la acidez, -- más adelante se hablará de ésta propiedad.

Los rizobia no crecen bien en medios de cultivo con -- peptona como se mencionó, aunque ésta se utiliza corrientemente para muchas bacterias, pero sí crecen en diversos extractos complejos de origen vegetal como el extracto de levadura, que por lo general, es la fuente de nitrógeno más -- conveniente ya sea en forma de extracto fresco o de preparados comerciales; como fuente de carbono se usa a menudo el manitol pero puede ser sustituido por otros, como la glucosa o la sacarosa, ciertos rizobia se desarrollan mejor en o--- tras hexosas o pentosas, así ocurre con muchos rizobia de -- crecimiento lento los cuales usan preferentemente galactosa o arabinosa.

Algunas pruebas bioquímicas ayudan a distinguir el gé-- nero Rhizobium de otros géneros, a continuación se citan, -- algunos medios de cultivo que son útiles en la realización de las diferenciación.

El agar extracto de levadura manitol conocido también como medio de ELMA, es ampliamente utilizado en el aislamiento de Rhizobium. (48) Su composición se cita en el apéndice. El carbonato de calcio es generalmente omitido del medio, sobre todo en los casos en los que se pretende realizar determinaciones del crecimiento bacteriano por turbidimetría. Las cepas de crecimiento rápido se desarrollan en un tiempo de 3-5 días, formando colonias de color pálido y aspecto gomoso. (48)

El medio de ELMA, con indicador rojo congo (10 cc de una solución acuosa 1:400 esterilizado por separado y agregado en forma aséptica a cada litro de medio fundido antes de su uso), es de gran utilidad para diferenciar Rhizobium de otras bacterias, en general Rhizobium se tinte debilmente con éste colorante, en tanto que otras bacterias toman el color con intensidad.

El comportamiento de cada cepa de Rhizobium en particular debe establecerse mediante cultivos puros auténticos, tomando en cuenta otras características coloniales para forzar su distinción. Lo anterior se logra más fácilmente analizando el crecimiento superficial en el medio de cultivo (ELMA).

En el medio de glucosa-peptona-agar (su composición se cita en el apéndice), el crecimiento de Rhizobium es pobre o bien no se detecta crecimiento a las 24 hrs. eso mismo ocurre con otros medios que contengan peptona, existen excepciones en muchas cepas de Rhizobium meliloti referente al crecimiento de éste medio. Esta prueba se realiza en laboratorio como prueba de rutina.

Otra prueba que se utiliza en la rutina es la prueba de la leche tornasolada.

El empleo de la leche como medio de cultivo data de los comienzos de la bacteriología. Se utiliza como medio diferencial para demostrar si un microorganismo efectúa la fermentación, peptonización o ambos efectos a la vez.

La caseína es una proteína capaz de reaccionar como ácido débil o como base poco energética (anfótero). En la leche se encuentra enteramente en suspensión coloidal. Algunas bacterias segregan una enzima parecido a la renina capaz de hidrolizar caseína y transformarla en paracaseína soluble y en cuerpo similar a la peptona. La paracaseína soluble reacciona entonces con las sales cálcicas disueltas y se forman un precipitado de paracaseinato de calcio, el líquido claro que rodea el coágulo de paracaseína se conoce por suero, esto se representa en el esquema siguiente:



Cuerpo peptoide

p-caseína soluble

+

sales cálcicas
paracaseína

(paracaseinato de Ca)

Las bacterias que fermentan con rapidez la lactosa produce suficiente acidez para precipitar o coagular la caseína. El líquido claro que se separa del coágulo es el suero, la acidez obtenida basta para impedir que prosiga el desarrollo bacteriano. Las bacterias que no fermentan la lactosa pueden producir coágulo con renina, siguiendo una peptonización de la caseína con formación de diversas fracciones solubles. La leche se vuelve alcalina en la reacción.

Las bacterias que fermentan muy lentamente la lactosa no tienen la propiedad de preservar las proteínas.

La concentración límite de hidrogeniones no se alcanza nunca y la proteína se descompone a medida que se utilizan los carbohidratos ya que si hay carbohidratos no ocurren alteraciones putrefacticas pues éstos preservan las proteínas. En tales condiciones la leche puede volver

se ácida o alcalina según predomine el efecto de fermentación o el de putrefacción.

A la leche se le añade con frecuencia el indicador -- tornasol para detectar cambios de pH en el medio.

Existen otros colorantes como la sulfonftaleína de -- brillo no intenso como el púrpura de bromocresol y el azul de bromotimol que muestran una sensibilidad mayor y son superiores al tornasol para apreciar cambios en la reacción de la leche. Sin embargo, el tornasol indica también el potencial de oxidación-reducción del medio lo que no pueden hacer los indicadores sintéticos de sulfonftaleína y ésta propiedad suele ser de importancia para el diagnóstico. Algunas bacterias tienen la propiedad de reducir el tornasol a su forma incolora. Por ello el tornasol continúa siendo muy utilizado para añadirlo a un medio lácteo.

Rhizobium produce cambios lentos y variados en leche-tornasolada, por ejemplo Rhizobium meliloti da una reacción ácida, y muchas cepas producen lentamente una zona de suero en la parte superior del tubo, en tanto que Rhizobium japonicum tiene la propiedad de producir alcalinización -- del medio y no producir zona de suero. (29)

Otra prueba usada es la que se realiza con medio de -- ELMA agregando como indicador el azul de bromotimol en la proporción de 5 ml. de una solución alcohólica al 0.5% lt. y el que permite detectar las variaciones del pH por cambios en el color del indicador (48), y se utiliza para diferenciar las especies de Rhizobium de crecimiento rápido que producen ácido, de las de crecimiento lento que presentan reacción alcalina.

Existen otras pruebas que permiten la diferenciación entre especies de Rhizobium, de crecimiento lento (21), -- nos habla de una prueba para ver la fermentación de azúcares como son la xilosa y la ramnosa, en ésta prueba se utiliza el medio de ELMA y en el, se sustituye el manitol -- por algunos de los azúcares antes mencionados y se usa co-

mo indicador rojo de fenol a una concentración de 0.8 g/l, - se someten las cepas a incubación durante 3 a 7 días a una - temperatura de 30°C.

Como resultado de ésta fermentación se produce acidez - ésta prueba se interpreta observando el vire del indicador - si hay producción de ácido, el cambio de color es de rojo na ranja hasta llegar a amarillo según sea la cantidad de ácido presente.

R. lupini produce ácido a partir de xilosa y ramosa, - en tanto que R. japonicum nó.

Las pruebas bioquímicas son utilizadas en la diferencia ción de cepas de Rhizobium, estas incluyen propiedades como: requerimientos vitamínicos, tolerancia a NaCl, tolerancia a la acidez y alcalinidad, utilización de carbohidratos e in-- termediarios, y también respuesta a agentes antimicrobianos. (19) (25) (27)

Otra prueba útil para diferenciar a Rhizobium de otros- géneros es la que emplea el medio de ELMA con cristal viole- ta a una concentración de 1:1000 y 1:150000. Algunas especies de Rhizobium presentan un crecimiento similar al de Rhizo- bium japonicum, sin embargo otras desarrollan colonias pe- queñas que toman ligeramente el color del medio, en cambio - Agrobacterium radiobacter desarrolla colonias lisas en la - superficie con centros de color violeta. (22) Esta determi- nación y otras que se mencionan a continuación son de espe- cial interés cuando se efectúan asilamientos, así por ejem- plo otras especies de Agrobacterium, son muy abundantes en - el suelo, frecuentes se confunden con Rhizobium en los proce- dimientos de aislamiento ya que en el medio de ELMA producen colonias indistinguibles. Sin embargo existen otros medios - que son útiles para distinguir a esos géneros.

Graham y Parker, examinaron muchas cepas y al aplicar - varias pruebas bioquímicas, observaron que Agrobacterium - presenta un crecimiento característico en glucosa-peptona-- agar utiliza citrato, produce sulfuro de hidrógeno en el me-

dio de cultivo agar sulfito de bismuto y forma un precipitado en agar glicerofosfato de calcio. (28)

En contraste con Rhizobium el crecimiento típico es escaso en glucosa-peptona-agar, no utiliza el citrato, forma poco o nada H_2S en agar sulfito de bismuto y no da precipitado en agar glicerofosfato.

Bryant reportó que en el medio modificado de Bergen son las especies de Agrobacterium tienen buen crecimiento mientras que algunas cepas de Rhizobium no crecen en éste medio. La composición de éste medio se cita en el apéndice.

Es interesante la nota que nos dice que cultivos aislados de rizobia, los cuales fueron responsables de la formación de nódulos, no crecieron en el medio de lactosa manganeso, mientras que cepas de Agrobacterium mostraron abundante crecimiento, por lo tanto ésta prueba es muy útil para establecer la diferencia entre Rhizobium y Agrobacterium.

Existe otra prueba que ayuda a diferenciar a éstos dos géneros y se basa en que el género Agrobacterium tiene la capacidad de, (oxidar el carbón 3 del núcleo glicosídico de disacáridos), y de acuerdo al azúcar utilizado se obtiene 3-cetalactosa, 3 cetomaltosa ó 3 cetosacarosa, compuestos que son fácilmente detectados mediante reactivos utilizados para azúcares reductores (Fhling, Benedict, Luff, etc.), la composición del medio se cita en el apéndice.

Bernaests y De Ley trabajaron con 33 especies de los siguientes géneros observando que ninguno es capaz de oxidar al carbono 3 del núcleo glicosídico de disacáridos: Acetobacter, Aerobacter, Alcaligenes, Bacillus, Chromobacterium, Escherichia, Gluconobacter, Nocardia, Mycobacterium, Paracolobactrum, Pseudomonas, Rhizobium, Streptomyces y Xanthomonas.
(7) (8) (9) (10)

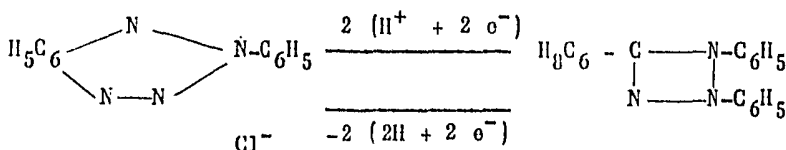
Dos determinaciones muy importantes desde el punto de vista de la aplicación práctica de Rhizobium son aquellas --

que permiten evaluar la fijación de nitrógeno, son pruebas-enzimáticas y corresponden a la determinación de la actividad de hidrogenasa y la determinación de la actividad de la nitrogenasa.

Durante la reducción del nitrógeno a amoníaco se produce simultáneamente hidrógeno gaseoso lo que constituye una pérdida de energía. En relación a esto se ha observado que algunas cepas de Rhizobium disponen de un gen denominado hup⁺ el que permite a las bacterias sintetizar una hidrogenasa, enzima que cataliza la disociación del gas en protones y electrones los que son reutilizados en el proceso de fijación o reducción de nitrógeno reportándose que las cepas que poseen esta información genética son más eficientes en la fijación de nitrógeno. (37)

La prueba de la actividad de hidrogenasa es una prueba muy importante para ver la actividad enzimática en el suelo. (35) (43) (46) También es importante porque ayuda a evaluar la fijación de nitrógeno por Rhizobium indirectamente, ya que la actividad de hidrogenasa es directamente proporcional a la cantidad de nitrógeno fijado, esta prueba se realiza con el reactivo clorhidrato de 2, 3,5, trifenil tetrazolium, esta sal es reducida cuando existe actividad de hidrogenasa y la interpretación de la prueba es la siguiente, el reactivo inicialmente es de color amarillo pálido y si se lleva a cabo la reacción hay un vire a color rojo encendido. Las colonias se aprecian de color rojo encendido si la prueba se positiva.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Amarillo pálido

Rojo

Con lo que respecta a la prueba de la nitrogenasa se tiene que ésta evalúa directamente la actividad de la nitrogenasa mediante la técnica de la reducción de acetileno a etileno, es sumamente sensible y puede llevarse a cabo en preparaciones y cultivos bacterianos en el laboratorio y en nódulos de legumbre y en bacterias de vida libre in situ.

Esta prueba esta basada en la reducción de C_2H_2 a C_2H_4 catalizado por la nitrogenasa. La técnica es muy simple-rápida y efectiva, el procedimiento se efectúa mediante una jeringa que tiene acetileno que ya está medido, el cuál es inyectado al cultivo in vitro o bién al sistema radicular con nódulos, esto se realiza en matraces adecuados para el experimento, después de varias horas de incubación se toman lecturas estrayendo nuevamente con una jeringa el gas de los matraces, éste gas será etileno si en que hubo actividad de nitrogenasa y se realizan mediciones del gas después de la incubación mediante cromatografía de gases.

Las ventajas de esta técnica es que se obtendrán valores de nitrógeno fijado rápidamente, y además se considera efectiva ya que podemos saber el valor real de nitrógeno fijado, así poder elegir la cepa más efectiva.

Como desventajas de la técnica se tiene, que si no se maneja adecuadamente se puede caer en errores como la pérdida de gas etileno y así obtener falsos resultados. (32)

2.3. Interacciones de Rhizobium con otros microorganismos y factores ambientales

Las raíces de las leguminosas, en contacto con bacterias del género Rhizobium establecen una simbiosis que se manifiesta con la formación de nódulos, y es precisamente en éste lugar donde se realiza la fijación de nitrógeno atmosférico. (4)

Sin embargo los rizobia, antes de la infección y formación del nódulo, se comportan como bacterias de vida libre, por lo cuál tienen que sobrevivir y proferar en el suelo -- junto con millones de microorganismos habitantes del mismo, -- compartiendo tanto espacio, sustratos energéticos y otro tipo de nutrientes. (17)

Dado que los microorganismos se encuentran viviendo en el suelo y formando comunidades complejas, existen interacciones variadas e intensas entre sus diferentes componentes. Existen muchos factores biológicos que afectan la sobrevivencia de los rizobia cuando se encuentra en vida libre.

Entre los factores no biológicos se citan el pH, temperatura, humedad relativa y tipo de suelo. (47)

Entre los factores biológicos se ha señalado la interacción de rizobia con microorganismos nativos del suelo, constituyendo un obstáculo para el desarrollo de los rizobia. Reportes de India, Australia y Nueva Zelanda, indican que los factores biológicos son importantes en el establecimiento de la simbiosis y la falta de nodulación. (20)

Se ha reportado que diversos actinomicetos, hongos, protozoarios y virus del suelo y de la rizosfera de las leguminosas tienen un efecto antagónico hacia los rizobia. Aunque no todos los antagonismos son debidos a sustancias inhibitoras, la mayor parte de los estudios son causados por la presencia de éstas, por lo que no hay duda de que uno de los factores limitantes más importantes de estas relaciones en condiciones ópticas es la presencia de sustancias antagónicas. (40)

No hay bases determinantes para demostrar que los suelos naturales contengan concentraciones eficaces de sustancias -- inhibidoras, aunque gran parte de las pruebas indican que sí existen y son efectivas comprobándose por el bajo nivel de actividad microbiana en el suelo, lo que sí se sabe, es que localmente pueden existir sustancias inhibidoras en concentraciones efectivas en situaciones especiales, y en el suelo éstas se acumulan con rapidez en condiciones de estimulación adecuadas, debido a que los efectos inhibitorios y producción de antibióticos son a menudo dependientes del estado nutricional del suelo. (40)

La significación ecológica de los antibióticos en el cambio de la composición de la microflora del suelo en la naturaleza ha sido motivo de controversia, y los rizobia al igual -- que otras bacterias Gram (negativas) son muy susceptibles a -- efectos antagónicos. (14)

Las principales bacterias con acción antibiótica hacia -- los rizobia son aquellas que pertenecen a los géneros Pseudomonas y Bacillus.

El efecto antibiótico de actinomicetos sobre los rizobia ha sido demostrado por muchos investigadores. Esos antagonistas son miembros del género Streptomyces. (2)

Del mismo modo varias especies fúngicas también han sido reportadas como inhibitorias de Rhizobium y entre ellas se -- mencionan a Penicillium y Aspergillus como las más activas.

Especies de Alternaria, Cophaeosporium, Fusarium y otras también son inhibitorias de los rizobia.

Se han realizado estudios del efecto de antibióticos sobre el crecimiento o actividad de Rhizobium encontrándose una gran variación en lo que a sensibilidad se refiere.

En condiciones in vitro se ha determinado que algunos rizobia de desarrollo lento producen bactericidas.

Gross D. y Col. reportan que Rhizobium aislado de caupí -- inhibió 58 de 66 cepas de Rhizobium japonicum en tanto que entre las cepas de Rh. japonicum no se observó antagonismo y

concluye que la producción de estos antibióticos puede ser uno de los factores responsables para que dominen ciertas poblaciones de Rhizobium en un suelo. (30)

Las cepas de Rhizobium spp. tienen diferentes sensibilidades hacia los antibióticos puros; rizobia de crecimiento lento son menos sensibles que las de crecimiento rápido a bajas concentraciones de ciertos antibióticos. (17) El efecto de tales antibióticos sobre la cepas muestra una gana considerable de sensibilidad y resistencia como ha sido demostrado con pruebas hechas con una colección de cepas de Rhizobium japonicum y con especies de rápido crecimiento como son las de Rhizobium trifoli, R. Leguminosarum y R. meliloti donde los antibióticos del grupo del las tetracilinas fueron los más activos. (48)

Elkan, realizó estudios con cepas de Rhizobium japonicum, utilizando diferentes agentes químicos como: sulfadiazol 250 mg. estreptomycin 10 mg., eritromicina, polimixina B, cloranfenicol y novobiocina. El investigador encontró que las cepas fueron resistentes a la eritromicina, polimixina B, y cloranfenicol y sensibles a los demás. (21)

Skotniki y colaboradores, reportaron una correlación entre la actividad de la nitrogenasa de Rhizobium in vitro y la resistencia a la espectomicina y concluye que ésta relación facilitará el aislamiento de cepas que sean útiles por su capacidad fijadora de nitrógeno. (45)

Entre otras pruebas, se encuentra también la de tolerancia a la acidez y alcalinidad que son muy importantes por el significado que tienen en la adaptación de Rhizobium a suelos con estas características y la productividad de los mismos indica que un aumento en la producción de ganado de carne en las 350,000,000 hectáreas en las sabanas, ácidas e infértiles de sudamérica representa un enorme trabajo para los ganaderos. (18)

Sin embargo para obtener un beneficio completo de la fijación biológica de nitrógeno, es necesario que las cepas --

que se introduzcan formen una simbiosis efectiva. El pH bajo limita la disponibilidad de fósforo y favorece niveles altos de Al, por lo que en estos suelos la nodulación y la fijación de nitrógeno es afectada negativamente, por lo tanto es esencial emplear cepas de Rhizobium adaptadas a condiciones ácidas. Por otro lado la producción de alcalinidad por Rhizobium aislado de leguminosas tropicales se considera una característica distintiva con significación ecológica.

Se ha observado que la acidez tiene efecto inhibitor sobre el crecimiento de Rhizobium. Se han desarrollado algunas pruebas para observar la producción de alcalí así como la resistencia de Rhizobium a pH ácido.

Hagerdon y colab. aislaron 50 cepas de nódulos de Stilosanthes capitata, S. guianensis y S. hamanta, y observaron marcadas diferencias entre ellas, 19 de las cepas crecieron en el medio ELMA a un pH=6.8-7.0, 2 crecieron a un pH ácido y los demás crecieron a un pH de 7-8.

En un estudio Hagerdon determina el efecto del pH sobre 40 cepas de Rhizobium japonicum con efectividad comprobada en la fijación de nitrógeno, también trató de establecer una relación entre su efectividad y su resistencia a pH ácidos. Los resultados demostraron que las cepas eran ácido tolerantes e incapaces de alcalinizar el medio. (31)

Keyser y Munns consideran que aún cuando el uso de un medio de cultivo acidificado no reproduce en ninguna forma las características complejas del suelo, pero si proporciona información y constituye un método rápido para determinar la tolerancia a la acidez. (34)

III MATERIAL Y METODOS

3.1. Cepas de Rhizobium japonicum

Las cepas empleadas pertenecen a la colección de Microbiología Experimental de la Facultad de Química. Estas cepas han sido calificadas en trabajos previos como alta y medianamente eficientes en la fijación de nitrógeno y específicas para las siguientes variedades de Glycine max:

38'

variedad Jupiter

variedad Bragg

variedad Cajeme

variedad DM-2

variedad Davis

variedad Alamo

3.2. Pruebas bioquímicas:

Pruebas bioquímicas que nos diferencian el género Rhizobium del género Agrobacterium.

3.2.1. Desarrollo en glucosa-peptona-agar.

Rhizobium japonicum se caracteriza por producir escaso o ningún desarrollo en éste medio después de un período de incubación de 24 a 96 horas a una temperatura de 28°C.
(48)

3.2.2. Desarrollo en citrato de Koser.

Las cepas de Rhizobium japonicum se inoculan y se incuban a una temperatura de 28°C durante 7 días. El medio presenta turbidez cuando el citrato es utilizado.

Rhizobium japonicum es incapaz de utilizar a los citratos, por lo tanto el medio no presenta alteración. (28)

3.2.3. Desarrollo en agar sulfito de bismuto.

Se inocularon e incubaron las cepas a una temperatura de 28°C durante 7 días.

Rhizobium japonicum se caracteriza por no producir o producir muy poco ácido sulfhídrico en éste medio.

Si está prueba resulta (+) el medio de cultivo se torna negro y si da (-) el medio no sufre cambio, solo se presenta crecimiento en la superficie de éste. (28)

3.2.4. Medio modificado de Bergensen (Utilización del manganeso). En la superficie del medio, se forma una película cuando el Mn es utilizado, no hay formación de película en el caso cuando el Mn no es utilizado.

3.2.5. Prueba de la cetolactasa.

En ésta prueba las cepas se incuban durante 7 días a una temperatura de 28°C. Esta prueba se interpreta de la siguiente manera: si es (+) se observa color rosa al agregar el reactivo de Benedict, y si es (-), no hay desarrollo de color. (7)

3.2.6. Desarrollo en ELMA-cristal-violeta (1:1000) y (1:15000).

Las cepas se inoculan y se incuban a una temperatura de 28°C durante 7 días. Rhizobium japonicum no se desarrolla en éste medio de cultivo.

Sin embargo géneros como Agrobacterium si se desarrolla dando colonias características de color blanquecino -- con centro de color violeta. (22)

Pruebas para diferenciar cepas de Rhizobium de crecimiento rápido y crecimiento lento.

3.2.7. Reacción de la leche tornasolada.

Las cepas se inoculan e incuban a 28°C durante 7 días un vire a color rojo nos indica producción de acidez y al color tornasol nos indica alcalinización del medio. (29)

3.2.8. Desarrollo en ELMA.

Las cepas inoculadas en éste medio se incuban a una temperatura de 28°C durante 7 días. Rhizobium forma colonias de tipo cremoso, convexas, de color blanquecino, mucosas, brillantes, de 0.2 - 2 mm. de diámetro y si se trata-

de cepas de crecimiento rápido su crecimiento se presenta -- de 24-48 horas y en el caso de cepas de crecimiento lento, -- el crecimiento ocurre al cuarto o quinto día de incubación. (48)

3.2.9. Reacción ácida o alcalina en EIMA-AB

Las cepas se inoculan e incuban a una temperatura de -- 28°C durante 7 días. Una cepa de crecimiento rápido produc- -- tora de acidez causa un vire a color amarillo, en cambio -- las cepas de crecimiento lento como Rhizobium japonicum -- producen alcalinidad y el medio vira a color azul. (48)

3.2.10. Utilización de Xilosa y Rannosa.

Las cepas se inoculan e incuban a una temperatura de -- 28°C durante 7 días. El medio presenta un cambio a color -- amarillo cuando los azúcares son utilizados. En el caso de -- que no hay utilización de azúcares el medio vira a color -- rojo debido al aumento del pH a alcalino. (21)

3.2.11. Reducción del tetrazolio (o actividad de hidrogena- -- sa).

En ésta prueba se utiliza el medio básico de Ranga -- Rao modificado por Maior y Campbell. (37) Se realizan los -- siguientes pasos:

- a) Se esteriliza el medio de cultivo.
- b) Se prepara una solución de clorhidrato de 2,3,5 trife- -- niltetrazolio (TTC) a una concentración de 3% y se esterili- -- za.
- c) Se coloca el medio de cultivo en cajas petri y se le aña -- de 1 ml. de la solución de TTC en la caja y se mezcla.
- d) Se deja solidificar y se inocula 0.1 ml de la suspensión -- bacteriana.
- e) Se incuba durante 1 a 2 semanas a una temperatura de -- 28°C observándose la reducción del tetrazolio, por la apa- -- rición de colonias rosadas o rojas en el medio de cultivo, -- en caso de dar resultados negativos no se observará colora- -- ción en las colonias. (21)

3.3. Resistencia a antibióticos.

En éste ensayo se usan sensidiscos con antibióticos a diferentes concentraciones específicas para bacterias Gram negativas y Gram positivas, empleando el medio de cultivo-EIAMA como base y el método de difusión en placa, realizándose los siguientes pasos:

- a) El medio de cultivo estéril se vacía en cajas petri, se deja solidificar, se inocula extendiéndose con un triángulo de vidrio estéril.
- b) Se procede a colocar un multidisco impregnando con los siguientes antibióticos:

Anikacina

Ampicilina

Cefalosporina

Eritromicina

Gentamicina

Lincomicina

Novobiocina

Penicilina

Estreptomina

Sulfametozasol trimetropin

Tetraciclina

Estos antibióticos tienen efecto sobre bacterias Gram --
positivas.

Anikaina

Ac nalidixico

Ampicilina

Cefalosporina

Cloranfenicol

Furadantina

Gentamicina

Penicilina

Colimicina

Sulfametozasol trimetropin

Tetraciclina

Eritromicina

Estos tienen efecto sobre bacterias Gram positiva y Gram negativas.

3.4. Prueba de la tolerancia a la acidez y alcalinidad.

En la prueba de la tolerancia a la acidez y alcalinidad, se realizan curvas de crecimiento a diferentes pH, en el intervalo de 4-9 realizando los siguientes pasos:

- a) Se realiza el medio de CELM (descrito en el apéndice)- se colocará en matraces con un tubo unido en un costado con el fin de utilizarlo como celda para determinar el crecimiento midiendo la turbiedad en un fotocolorímetro Klett Summerson, a diferentes períodos de incubación.
- b) Se ajustá el pH en el valor de 4-9 con HCL 0.1 N o -- NaOH 0.1 N.
- c) Se esteriliza el medio con el pH ajustado.
- d) Se inocula el matraz utilizando una asa de 4 mm. de diámetro.
- e) Se incuba con agitación a 120 r.p.m., en una incubadora modelo 624 New Brunswick Scientific CO. INC, a 27°C durante una semana o más tiempo de acuerdo a la cepa.
- f) Las lecturas de la turbiedad se realizan cada 24 hrs.
- g) La incubación se suspende al observar que las lecturas se estabilizan o decrecen. (18)

Para el cálculo de la turbiedad producida por el crecimiento bacteriano se utiliza la curva estandar de Mc. -- Farland, obtenida en el nefelómetro de Mc. Farland.

La turbiedad de la suspensión problema es comparada con las respectivas lecturas de turbiedad de una serie de 10 tubos calibrados conteniendo soluciones de Sulfato de bario, preparados por la mezcla de diversas cantidades de solución de cloruro de bario al 1% y H_2SO_4 al 1% (ver tabla B)

La turbiedad de éstos tubos calibrados corresponde a las diferentes concentraciones de bacterias, tomando como referencia las turbiedades producidas por cultivos de esta filococos, estreptococos, gonococos y bacilos coliformes.

Tabla B

Tabla de calibración de suspensiones bacterianas por nefelometría.

	(ml)	(ml)	No. bacterias $\times 10^6$
Tubo	1% BaCl ₂	1% H ₂ SO ₄	
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1 200
5	0.5	9.5	1 500
6	0.6	9.4	1 800
7	0.7	9.3	2 100
8	0.8	9.2	2 400
9	0.9	9.1	2 700
10	1.0	9.0	3 000

Se trazaron 2 curvas, la curva de Mc Farland y otra curva igual realizada con una dilución 1:10 con el fin de poder interpolar valores más pequeños. (15)

IV R E S U L T A D O S

J: Levadura-manitol-cristal-violeta (1: 150000).

+ = escaso desarrollo

- = sin desarrollo

K: Levadura-xilosa.

+ = producción de ácido.

- = no producción de ácido.

L: Levadura-ramnosa.

+ = producción de ácido.

- = no producción de ácido

LL: Actividad de hidrogenasa

+ = actividad de la enzima hidrogenasa.

- = inactividad de la enzima hidrogenasa.

4.1 Tabla 2

Resultados de la resistencia a antibióticos

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19
Amikacina	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Ac.Nalidixico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilina	NR	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	NR
Cefaloxorina	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	R	R	R	R	R	R	R
Furandantina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	R	R	R	NR	R	R	R
Colistina	R	R	R	R	R	R	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR
Penicilina	R	NR	R	NR	NR	R	R	R	R	NR	R	R	R	R
Sulfametoxazol trimetopim	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	R	R	R
Tetraciclina	R	NR	NR	NR	R	NR	R	R	R	R	R	R	R	R
Eritromicina	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	R	R	NR	R	NR	NR	NR
Cloxacilina	R	R	R	R	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	R
Lincamicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Novobiocina	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	R	R	NR
Estreptomisina	R	NR	NR	NR	R	R	NR	NR	R	NR	R	NR	NR	R

R= resistente

NR= no resistente

Prueba de la tolerancia a la acidez y alcalinidad.

Las siguientes gráficas representan el resultado de la ---
prueba de la tolerancia a la acidez y alcalinidad.

Cada línea representa un pH, tomando el intervalo de 4-9.

Las gráficas se ajustan por el método de mínimos cuadrados.

4.2.1. Tabla 3.

Desarrollo máximo de las cepas en un valor de pH de 4-9.

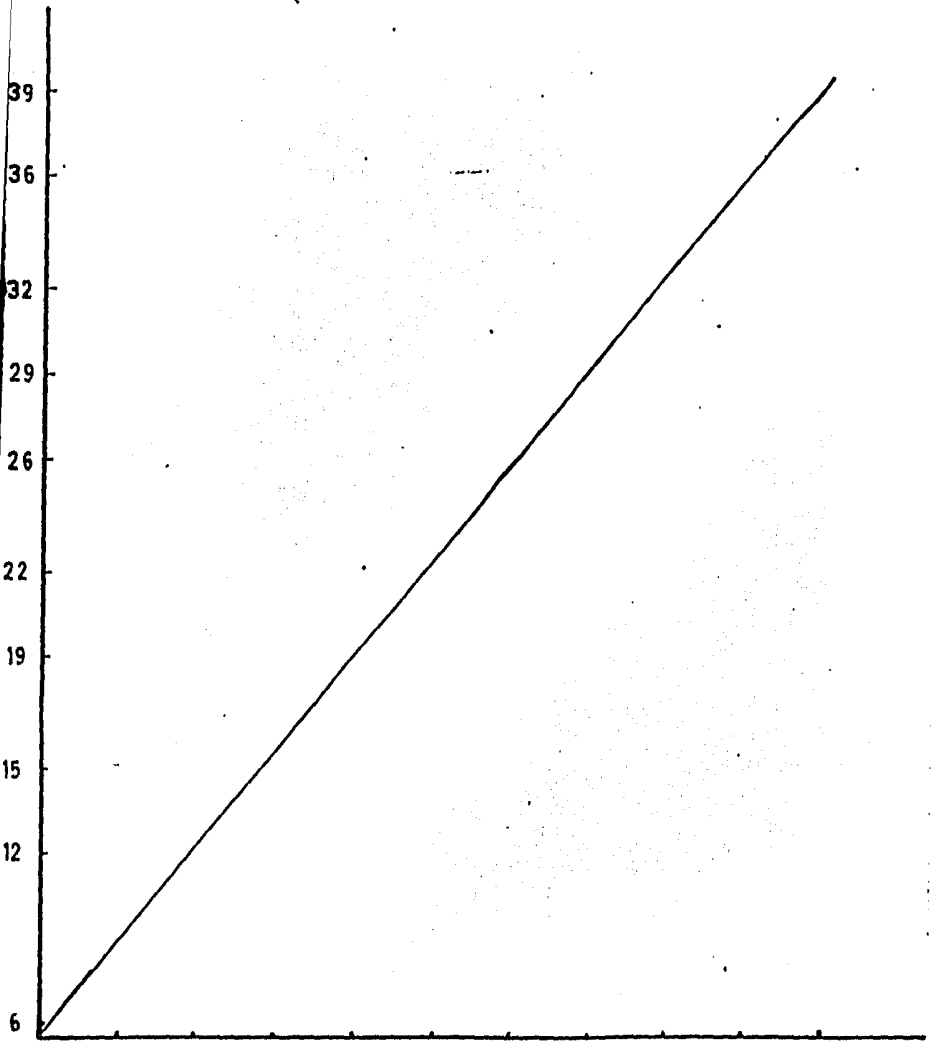
Cepas	pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH=8	pH = 9
4			+			
5		+				
6				+		
7		+				
8		+				
9						+
10		+				
11			+			
12		+	+			
13						+
16					+	
17		+				
18			+			
19		+				

Datos de la curva patrón

X	Y
30 X 10^6	6.11
60 X 10^6	12.461
90 X 10^6	15.856
120 X 10^6	19.251
150 X 10^6	22.645
180 X 10^6	26.040
210 X 10^6	29.435
240 X 10^6	32.830
270 X 10^6	36.225
300 X 10^6	39.619

X = // de células / ml.

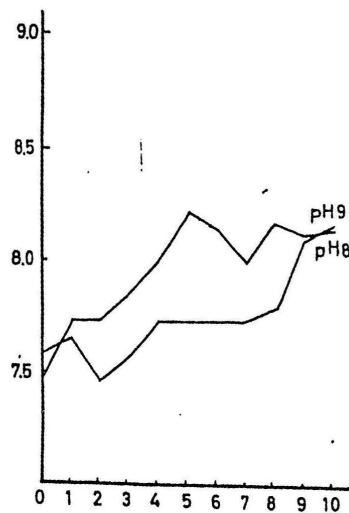
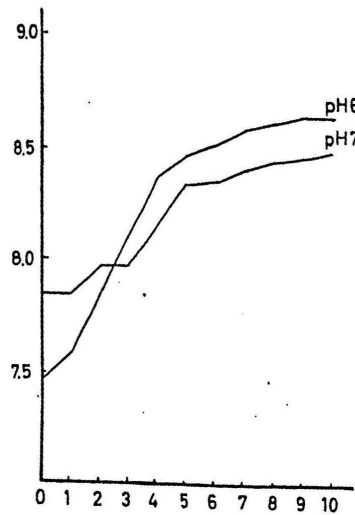
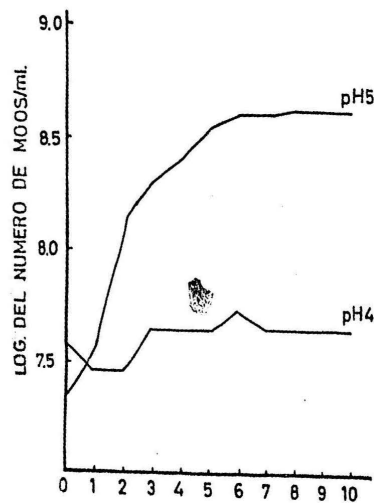
Y = (Unidades Klett)



NUMERO DE MICROORGANISMOS

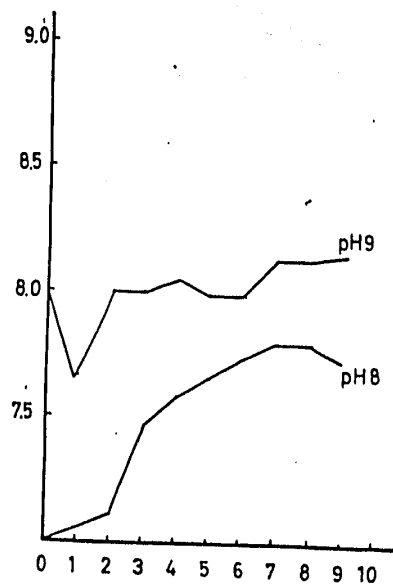
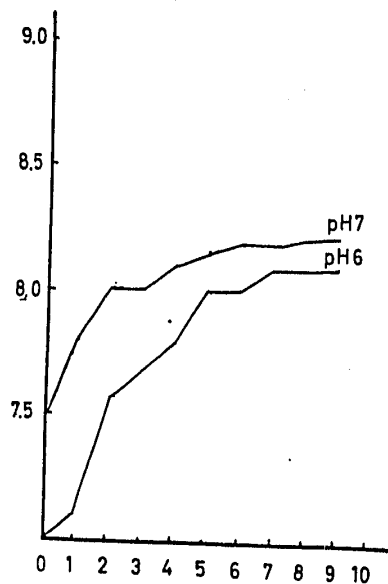
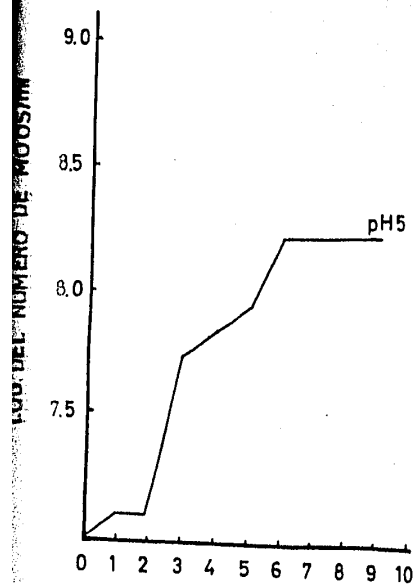
CURVA PATRON

DESARROLLO DE LA CEPA F04 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



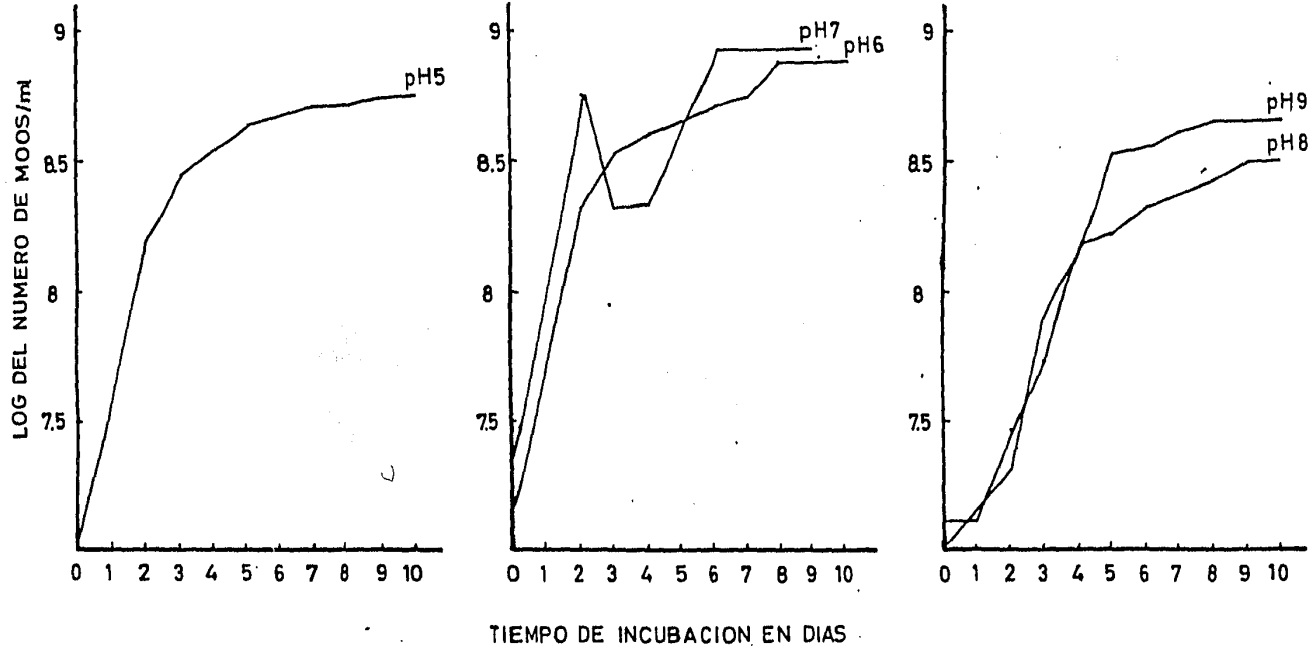
TIEMPO DE INCUBACION EN DIAS

DESARROLLO DE LA CEPA F05 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH

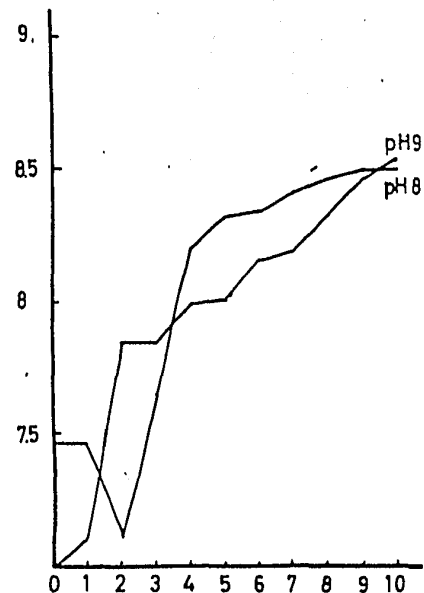
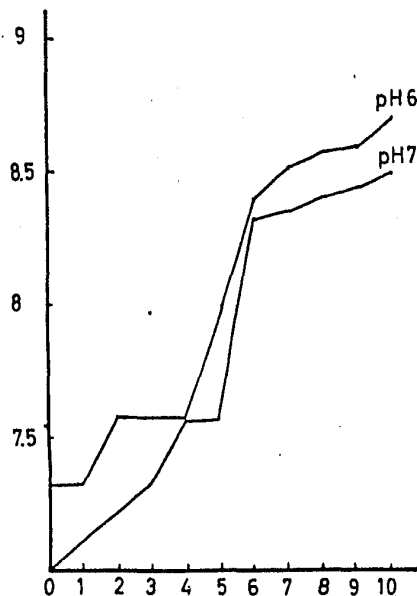
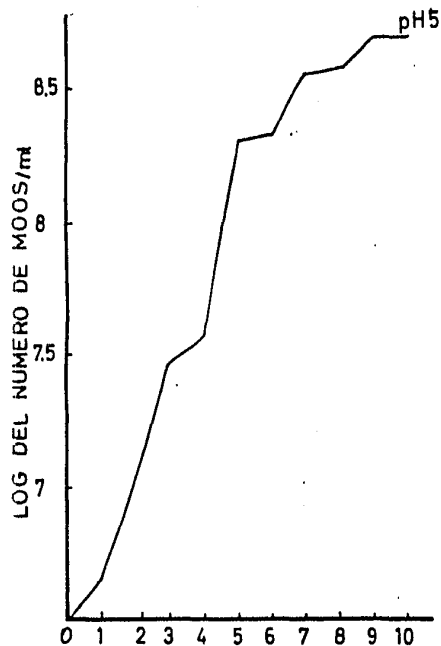


TIEMPO DE INCUBACION EN DIAS

DESARROLLO DE LA CEPA FQ6 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH

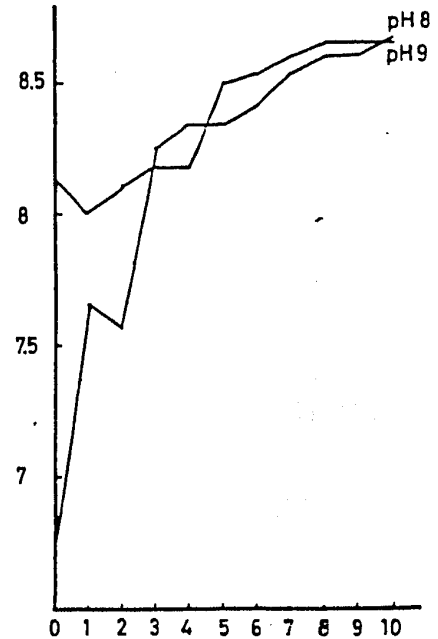
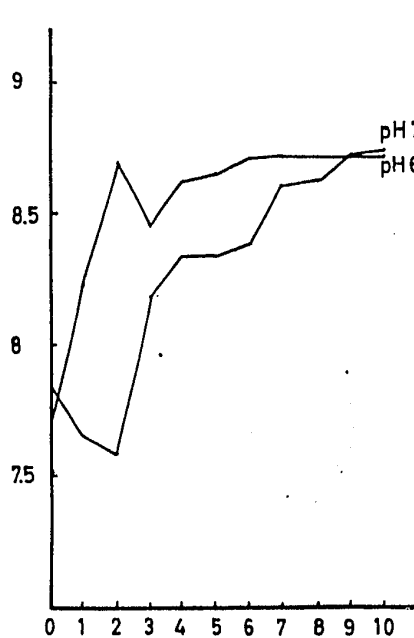
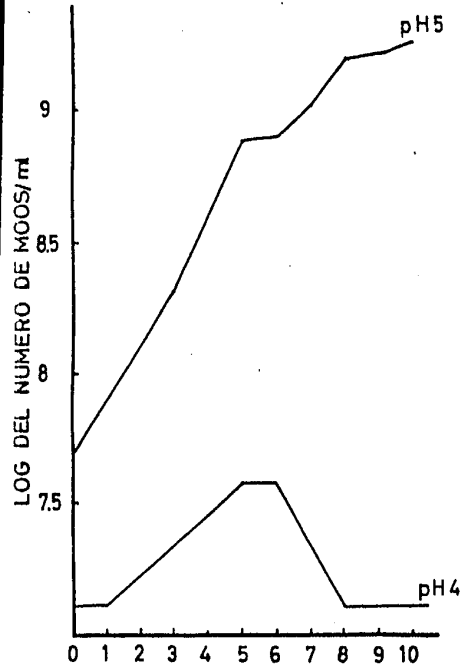


DESARROLLO DE LA CEPA FQ7 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



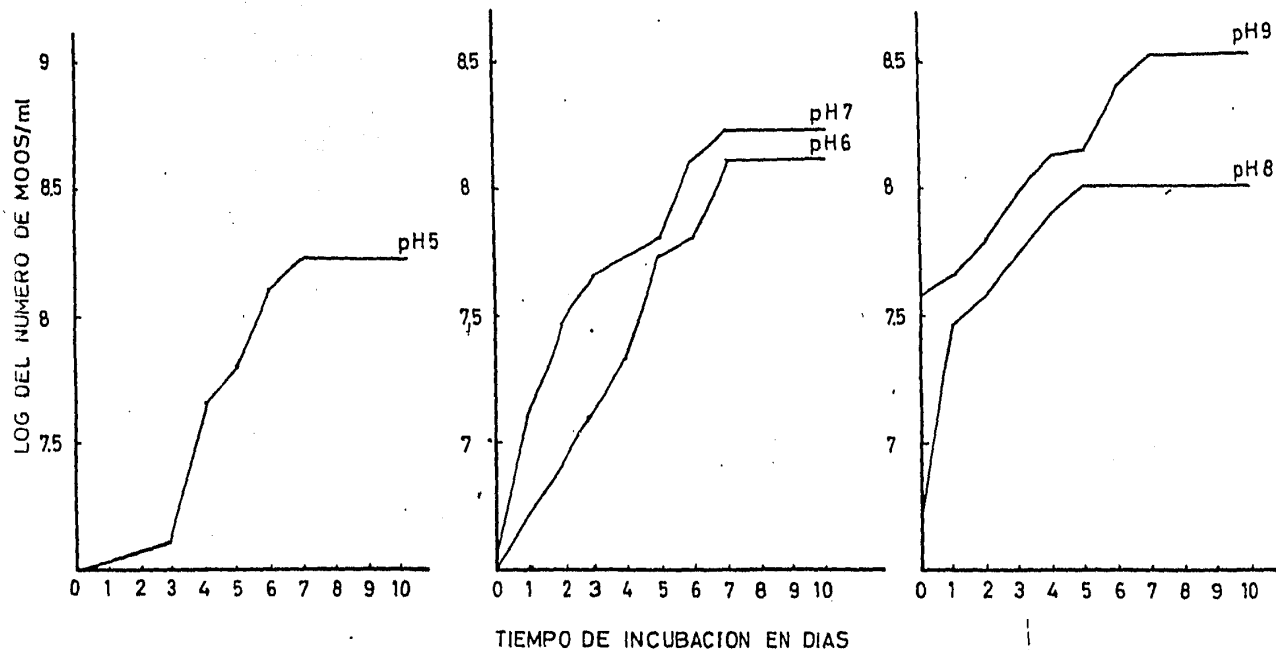
TIEMPO DE INCUBACION EN DIAS

DESARROLLO DE LA CEPA F08 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH

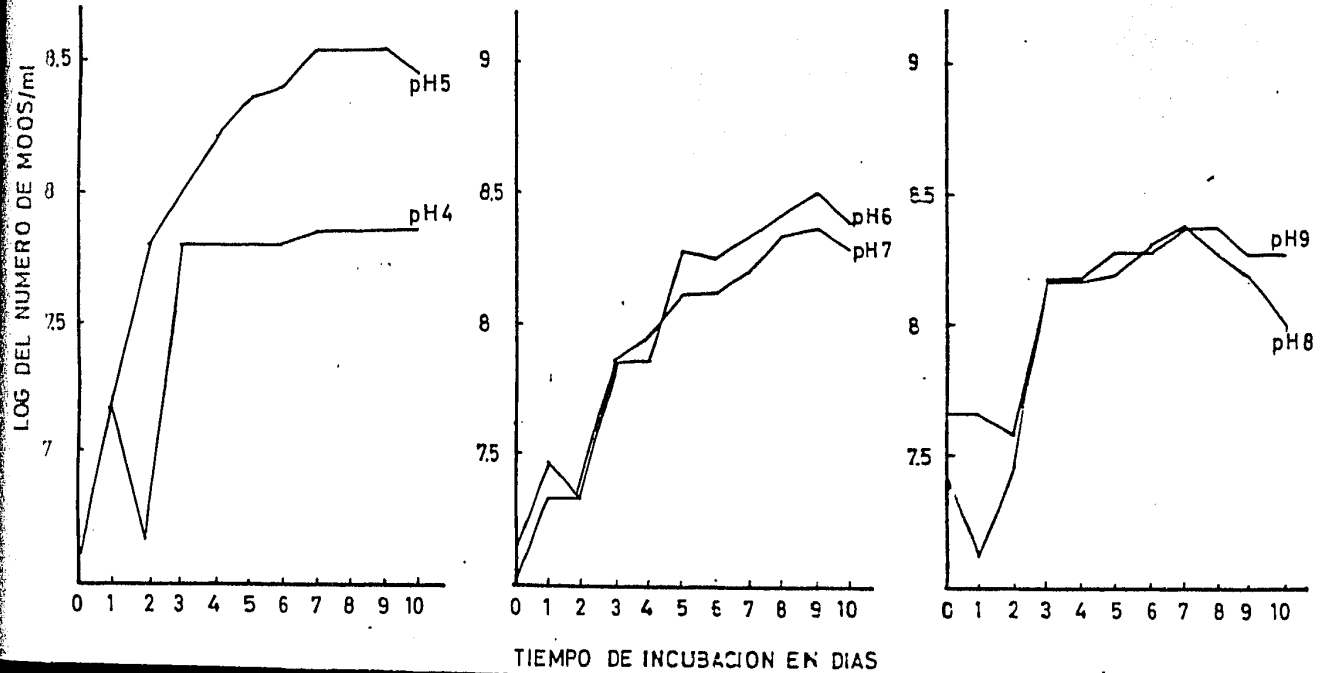


TIEMPO DE INCUBACION EN DIAS

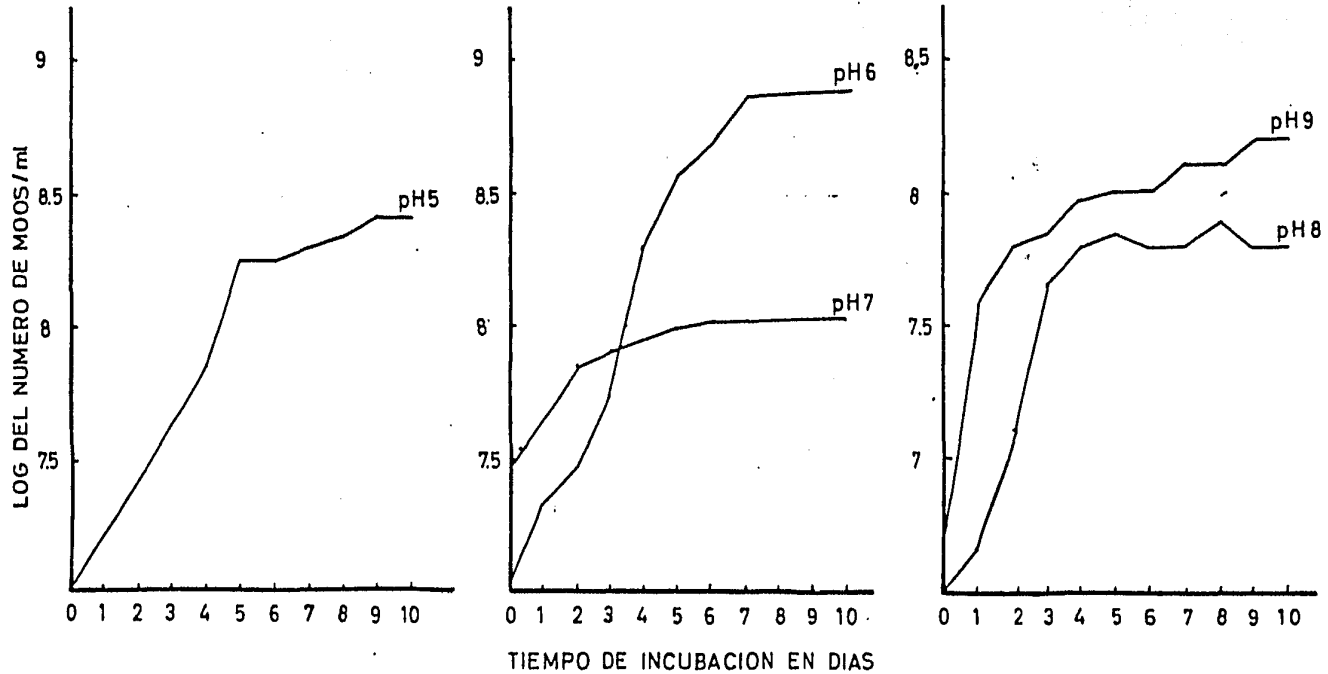
DESARROLLO DE LA CEPA F09 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



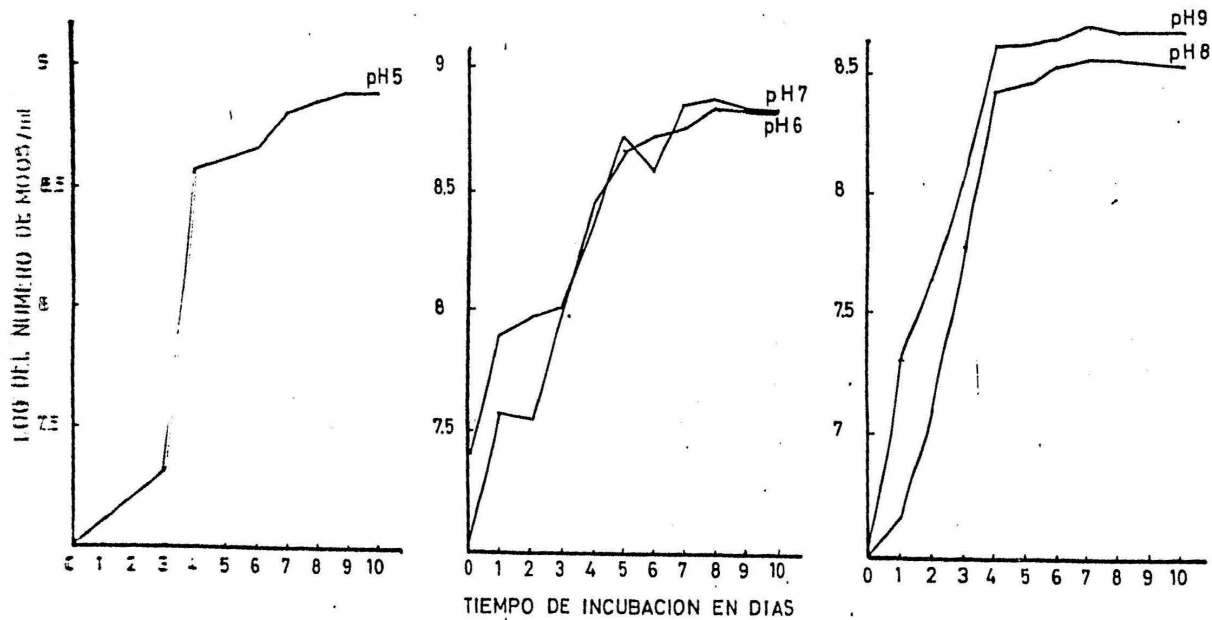
DESARROLLO DE LA CEPA F010 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



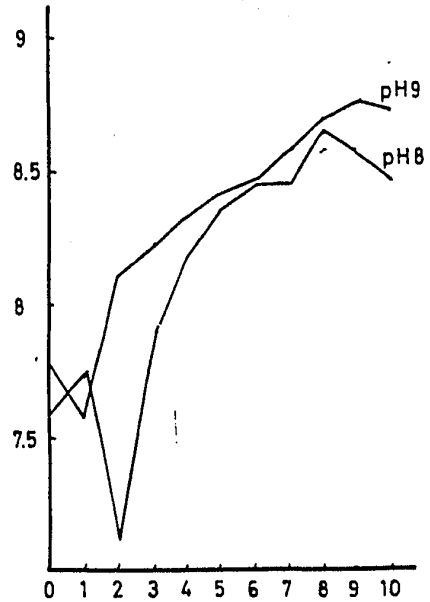
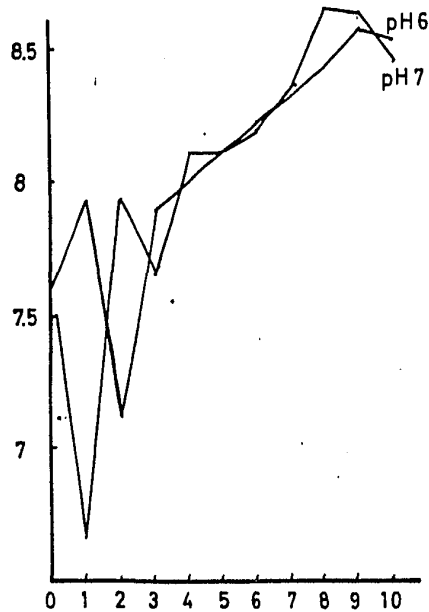
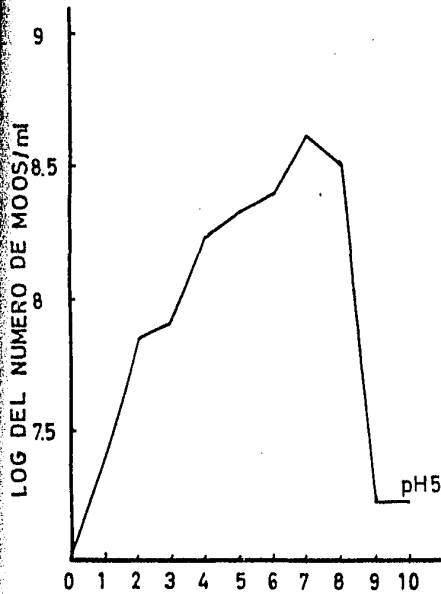
DESARROLLO DE LA CEPA FO11 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



DESARROLLO DE LA CEPA FQ 12 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH

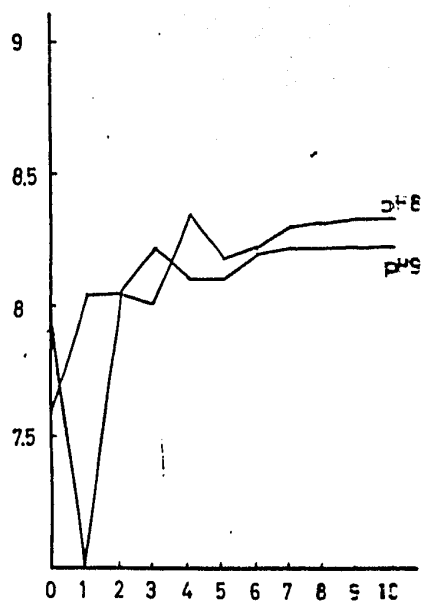
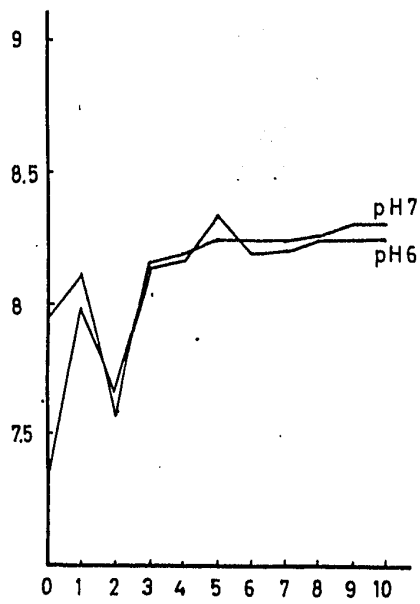
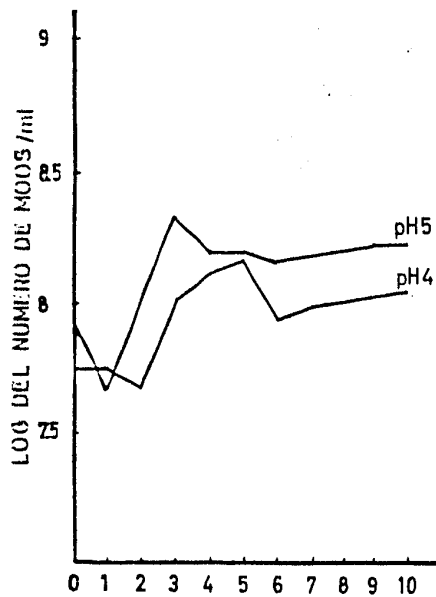


DESARROLLO DE LA CEPA FQ 13 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



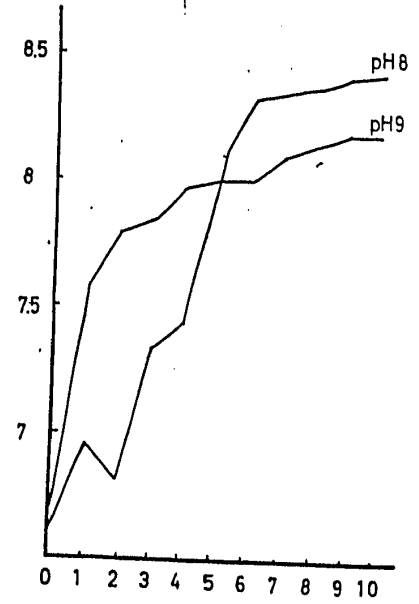
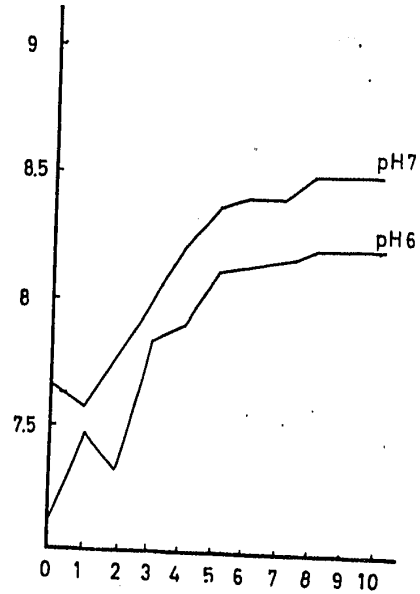
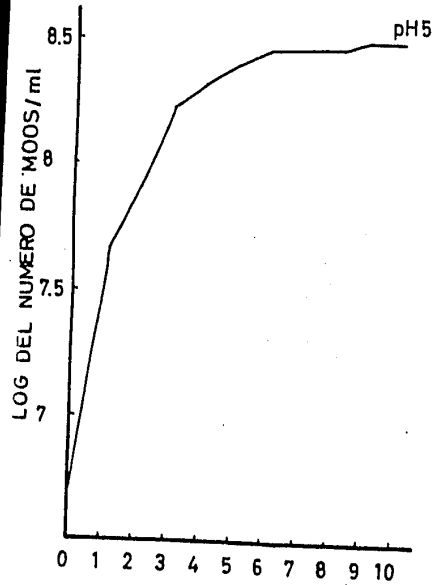
TIEMPO DE INCUBACION EN DIAS

DESARROLLO DE LA CEPA FQ16 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



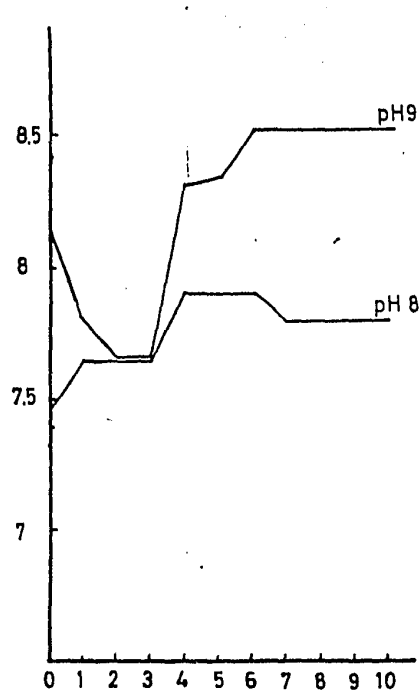
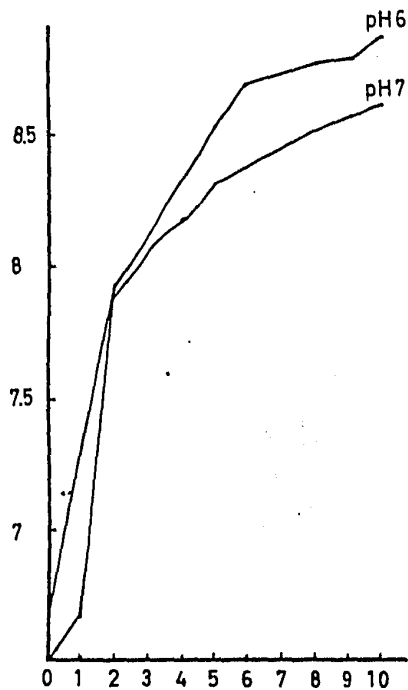
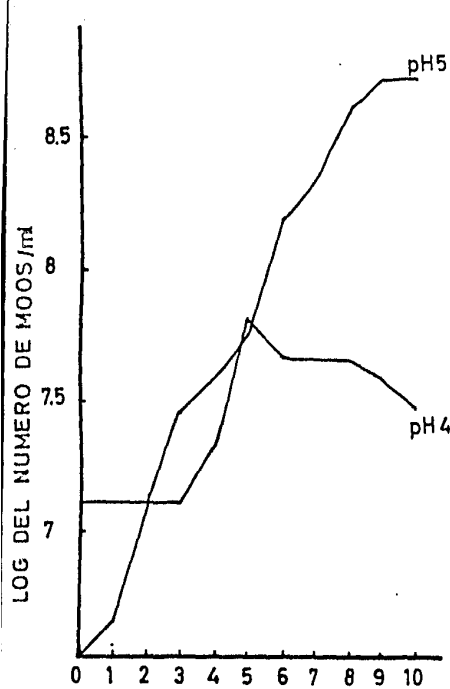
TIEMPO DE INCUBACION EN DIAS

DESARROLLO DE LA CEPA FQ17 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



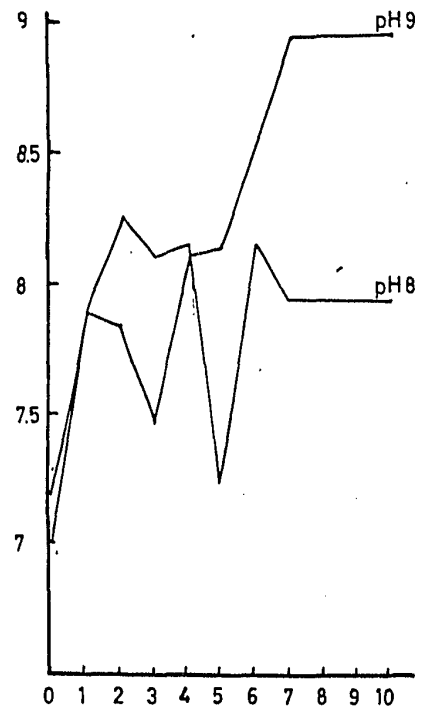
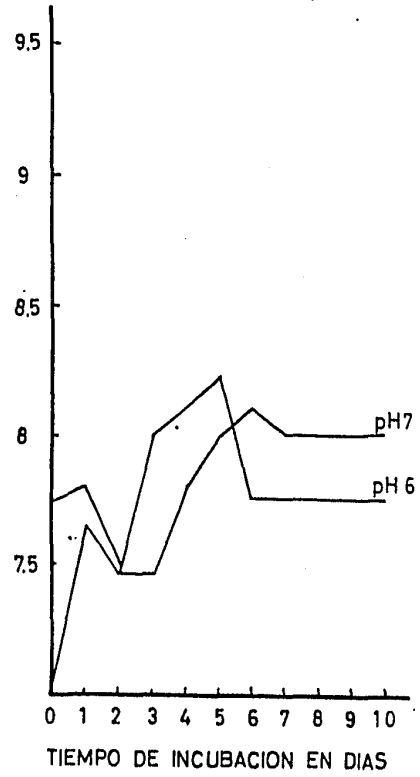
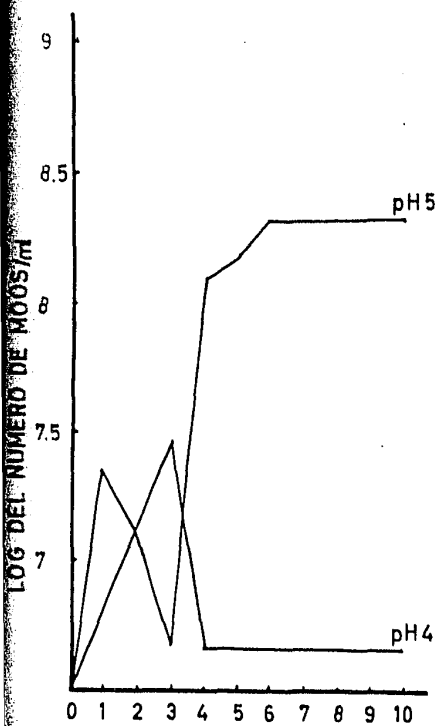
TIEMPO DE INCUBACION EN DIAS

DESARROLLO DE LA CEPA FQ18 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



TIEMPO DE INCIUBACION EN DIAS

DESARROLLO DE LA CEPA FG 19 DE RHIZOBIUM JAPONICUM
EN DIFERENTES pH



Datos utilizados en la realización de las gráficas.

Copa Q F 4.

<u>Tiempo en días.</u>	pH	Log. del número de células/ml.					
		4	5	6	7	8	9
0		7.58	7.33	7.47	7.85	7.47	7.58
1		7.47	7.43	7.58	7.85	7.74	7.66
2		7.47	8.14	7.85	7.98	7.74	7.47
3		7.66	8.31	8.11	7.98	7.85	7.58
4		7.66	8.41	8.39	8.16	8.08	7.74
5		7.66	8.56	8.48	8.33	8.23	7.74
6		7.74	8.62	8.53	8.36	8.16	7.74
7		7.66	8.62	8.60	8.42	8.08	7.74
8		7.66	8.64	8.63	8.46	8.19	7.80
9		7.66	8.64	8.66	8.47	8.14	8.11
10		7.66	8.64	8.66	8.50	8.16	8.27

Copa Q F 5.

0	-	-	-	7.47	-	7.98
1	-	7.11	7.11	7.80	-	7.66
2	-	7.11	7.58	8.05	7.11	7.80
3	-	7.74	7.69	8.08	7.47	7.80
4	-	7.85	7.80	8.11	7.58	7.85
5	-	7.94	8.05	8.16	7.66	7.94
6	-	8.23	8.08	8.19	7.74	7.98
7	-	8.23	8.11	8.19	7.80	8.14
8	-	8.27	8.11	8.21	7.80	8.14
9	-	8.27	8.11	8.23	7.74	8.16

Cepa Q F 6.

<u>Tiempo en</u>		<u>Log. del número de células/ml.</u>					
<u>Mas</u>	<u>pll</u>	4	5	6	7	8	9
0	-	-	-	7.11	-	-	7.11
1	-	-	7.58	7.74	7.33	-	7.11
2	-	-	8.21	8.33	8.02	7.33	7.47
3	-	-	8.45	8.54	8.76	7.90	7.74
4	-	-	8.53	8.60	8.83	8.19	8.19
5	-	-	8.64	8.71	8.86	8.33	8.53
6	-	-	8.67	8.71	8.86	8.33	8.56
7	-	-	8.71	8.75	8.93	8.39	8.61
8	-	-	8.72	8.80	8.93	8.43	8.65
9	-	-	8.74	8.80	8.93	8.50	8.66
10	-	-	8.75	8.80	8.93	8.50	8.66

Cepa Q F 7.

0	-	-	-	7.33	-	7.47	-
1	-	-	6.66	7.33	-	7.47	7.11
2	-	-	7.11	7.58	-	7.11	7.85
3	-	-	7.47	7.58	7.33	7.66	7.85
4	-	-	7.58	7.58	7.66	8.21	7.98
5	-	-	8.31	7.21	7.66	8.33	8.05
6	-	-	8.33	8.41	8.33	8.34	8.16
7	-	-	8.56	8.53	8.36	8.42	8.19
8	-	-	8.58	8.58	8.41	8.47	8.33
9	-	-	8.70	8.60	8.45	8.50	8.47
10	-	-	8.70	8.61	8.50	8.50	8.52

Cepa Q F 8.

<u>Tiempo en</u> <u>días.</u>	pH	Log. del número de células/ml.					
		4	5	6	7	8	9
1		7.11	7.66	7.66	7.85	6.66	8.14
2		7.11	-	8.23	7.66	7.66	8.02
3		-	-	8.69	7.58	7.58	8.11
4		-	8.31	8.45	8.19	8.25	8.19
5		-	8.62	8.62	8.34	8.34	8.19
6		7.58	8.80	8.65	8.34	8.34	8.50
7		7.58	8.90	8.71	8.38	8.41	8.53
8		-	9.05	8.72	8.61	8.54	8.60
9		7.11	9.20	8.72	8.62	8.60	8.66
10		7.11	9.21	8.72	8.72	8.61	8.66
		7.11	9.25	8.72	8.74	8.67	8.66

Cepa Q F 9.

0	-	-	-	6.66	6.66	7.58
1	-	-	-	7.11	7.47	7.66
2	-	-	-	7.47	7.58	7.80
3	-	7.11	7.11	7.66	7.74	8.08
4	-	7.66	7.33	7.74	7.90	8.23
5	-	7.80	7.74	7.80	8.02	8.25
6	-	8.11	7.80	8.11	8.05	8.41
7	-	8.23	8.11	8.23	8.08	8.53
8	-	8.23	8.11	8.23	8.08	8.53
9	-	8.23	8.11	8.23	8.08	8.53
10	-	8.23	8.11	8.23	8.08	8.53

Cepa Q F 10.

<u>Tempo en</u> <u>días.</u>	pH	Log.del número de células/ml.					
		4	5	6	7	8	9
0		-	-	-	7.11	7.47	7.66
1		7.66	7.66	7.33	7.47	7.11	7.66
2		6.66	7.80	7.33	7.33	7.47	7.58
3		7.80	8.05	7.85	7.85	8.16	8.16
4		7.80	8.21	7.85	7.94	8.16	8.16
5		7.80	8.36	8.27	8.11	8.19	8.27
6		7.80	8.41	8.25	8.11	8.31	8.27
7		7.85	8.53	8.34	8.19	8.38	8.33
8		-	8.53	8.41	8.33	8.27	8.33
9		-	8.53	8.50	8.36	8.19	8.27
10		-	8.47	8.38	8.29	7.98	8.27

Cepa Q F 11.

0		-	-	-	7.47	-	6.66
1		-	-	7.33	7.66	6.66	7.58
2		-	-	7.47	7.85	7.11	7.80
3		-	7.85	7.74	7.90	7.66	7.85
4		-	8.25	8.29	7.94	7.80	7.98
5		-	8.25	8.57	7.98	7.85	8.02
6		-	8.29	8.69	8.02	7.80	8.08
7		-	8.33	8.76	8.05	7.80	8.11
8		-	8.41	8.77	8.08	7.90	8.11
9		-	8.41	8.78	8.08	7.80	8.21
10		-	8.41	8.78	8.08	7.80	8.21

Copa Q F 12.

<u>Tiempo en</u>		<u>Log. del número de células/ml.</u>						
<u>días</u>	<u>pH</u>	4	5	6	7	8	9	
0	-	-	-	-	7.33	-	-	
1	-	-	-	7.98	7.90	6.66	7.33	
2	-	-	-	7.66	7.98	7.11	7.66	
3	-	-	7.33	7.94	8.02	7.80	8.14	
4	-	-	8.58	8.45	8.38	8.43	8.61	
5	-	-	8.62	8.67	8.72	8.46	8.62	
6	-	-	8.66	8.73	8.60	8.53	8.65	
7	-	-	8.81	8.77	8.76	8.56	8.70	
8	-	-	8.05	8.85	8.88	8.56	8.68	
9	-	-	8.88	8.85	8.83	8.55	8.68	
10	-	-	8.88	8.85	8.83	8.55	8.68	

Copa Q F 13.

0	-	-	-	7.58	7.58	7.58	7.80
1	-	-	-	6.66	7.94	7.74	7.58
2	-	-	7.85	7.94	7.11	7.11	8.11
3	-	-	7.90	7.66	7.90	7.90	8.23
4	-	-	8.23	8.11	8.02	8.19	8.33
5	-	-	8.33	8.11	8.11	8.36	8.41
6	-	-	8.39	8.23	8.19	8.45	8.47
7	-	-	8.61	8.33	8.36	8.47	8.58
8	-	-	8.51	8.43	8.65	8.65	8.70
9	-	-	7.23	8.58	8.64	8.58	8.77
10	-	-	7.23	8.53	8.47	8.47	8.74

Cepa Q F 16.

<u>Tiempo en días.</u>	<u>Log. del número de células/ml.</u>						
	<u>pH</u>	4	5	6	7	8	9
0		7.74	7.94	7.33	7.94	7.58	8.05
1		7.74	7.66	7.98	8.11	7.85	7.02
2		7.66	7.02	7.66	7.58	7.85	8.16
3		8.02	8.33	8.14	8.16	8.02	8.23
4		8.11	8.19	8.16	8.19	8.36	8.23
5		8.16	8.19	8.33	8.23	8.19	8.11
6		7.94	8.16	8.19	8.21	8.23	8.11
7		7.98	8.18	8.20	8.21	8.30	8.20
8		8.00	8.20	8.24	8.24	8.32	8.22
9		8.20	8.22	8.24	8.30	8.31	8.22
10		8.40	8.20	8.24	8.30	8.34	8.22

Cepa Q F 17.

0	--	6.66	7.11	7.66	7.11	6.66
1	-	7.66	7.47	7.58	7.47	7.58
2	-	7.90	7.33	7.80	7.33	7.80
3	-	8.23	7.85	8.05	7.85	7.85
4	-	8.33	7.90	8.21	7.94	7.98
5	-	8.41	8.11	8.36	8.11	8.02
6	-	8.47	8.14	8.41	8.33	8.08
7	-	8.47	8.16	8.41	8.36	8.11
8	-	8.47	8.20	8.50	8.38	8.16
9	-	8.50	8.20	8.50	8.42	8.20
10	-	8.50	8.20	8.50	8.44	8.20

Cepa Q F 18.

<u>Tiempo en</u> <u>días</u>	pH	Log. del número de células/ml.					
		4	5	6	7	8	9
0		7.11	-	-	6.66	7.47	8.14
1		7.11	6.66	6.66	7.33	7.66	7.80
2		7.11	7.11	7.94	7.90	7.66	7.66
3		-	7.47	8.11	8.11	7.66	8.41
4		7.33	7.58	8.33	8.19	7.90	8.41
5		7.80	7.74	8.53	8.31	7.90	8.43
6		7.66	8.19	8.70	8.39	7.90	8.52
7		7.66	8.34	8.74	8.46	7.80	8.52
8		7.66	8.61	8.78	8.52	7.80	8.52
9		7.58	8.71	8.79	8.57	7.80	8.52
10		7.47	8.71	8.80	8.62	7.80	8.52

Cepa Q F 19.

0		-	-	7.74	7.11	7.66	6.66
1		-	7.33	7.80	7.66	7.90	7.90
2		7.11	7.11	7.47	7.47	8.27	7.85
3		7.47	6.66	8.05	7.47	8.11	7.47
4		6.66	8.11	8.11	7.80	8.16	8.11
5		6.66	8.19	8.23	8.02	7.23	8.14
6		6.66	8.33	7.74	8.11	8.16	8.05
7		6.66	8.36	7.74	8.08	7.94	8.94
8		6.66	8.36	7.74	8.08	7.94	8.94
9		6.66	8.36	7.74	8.08	7.94	8.94
10		6.66	8.36	7.74	8.08,	7.94	8.94

V ANALISIS DE LOS
RESULTADOS

5.1. Prueba bioquímica

- 5.1. Desarrollo en glucosa-peptona-agar. En ésta prueba se obtuvieron resultados negativos en casi todas las copas, - menos en la cepa 1 y 3. Hay que tomar en cuenta que con base en éstos resultados los rizobia no crecen bien en cultivo de peptona, al igual que en los medios que se utilizan corrientemente para muchas bacterias. (48)
- 5.1.2 En la leche tomasolada, se obtuvo una reacción alcalina sin producción de zona de suero, y esto es debido a que las copas de Rhizobium de crecimiento lento poseen la característica de producir alcalinidad. (48)
- 5.1.3 Desarrollo en citrato de Koser. La mitad de las copas de desarrollaron en citrato y fueron las siguientes:
Cepa 6, 7, 10, 12, 13, 16, 17, 18 y 19, en tanto que -- las resistentés no lo utilizaron.
- 5.1.4 Producción de H_2S . Únicamente la cepa 17 es sulfídrico- (+), lo que confirma lo esperado.
- 5.1.5 Utilización de manganeso. La utilización de éste fué negativo para cada una de las copas examinadas.
- 5.1.6 Producción de 3 cetalactosa. Esta prueba fué negativa para todas las copas.
- 5.1.7 Prueba en agar extracto levadura-manitol-rojo-congo. Las 16 copas estudiadas dieron resultados variables. Se observan 2 tipos de colonias: menores de 2 mm. y mayores a 2 mm. de diámetro; así como brillo, aspecto y forma.
- 5.1.8 Prueba en agar extracto de levadura-manitol-azul de bromotimol. Se observa uniformidad en los resultados, así como alcalinización del medio. Los resultados indican -- que las copas pertenecen al grupo de Rhizobium de crecimiento lento. (48)
- 5.1.9 Sensibilidad al colorante cristal violeta a una concentración de 1:1000 y 1:150000.

Solamente la cepa 1 crece a una concentración del colorante de 1:1000, y la cepa 3 a una concentración de-

1:150000, las colonias presentan las siguientes características: diámetro menor de 2 mm., ligeramente violetas, brillantes, lisas de aspecto mucoso.

5.1.10 Fermentación de xilosa y ramnosa.

Las 16 cepas son xilosa y ramnosa negativas.

5.1.11 Prueba de la actividad de hidrogenosa.

La prueba es positiva, para las 16 cepas estudiadas.

5.2. Resistencia a antibióticos.

Se observan los siguientes resultados: todas las cepas son resistentes al clorofenicol, sulfametoazol trimetropin, y cloxacilina; el 93% de las cepas son resistentes al ac. nalidixico, furandantina y colomicina, el 71% a la ampicilina y penicilina; el 64% resistentes a la cefalosporina, y el 50% a la eritromicina.

La mayoría de las cepas presenta sensibilidad a la gentamicina, novoblocina, estreptomina y tetraciclina.

Las cepas 4 y 12 presentan resistencia a 14 de los antibióticos probados.

5.3 Resistencia a la acidez y alcalinidad.

En ésta prueba se trabajo con 14 cepas de Rhizobium japonicum utilizando los siguientes valores de pH= 4, 5, 6, 7, 8, 9.

Las cepas: 5, 7, 8, 10, 12, 17 y 19. presentan su máximo crecimiento a pH = 5. Las cepas 4, 11, 12, 18, presentan máximo desarrollo a un pH = 6, la cepa 6 a un pH = 7 y las cepas 9, 13, y 19, a un pH = 9.0. Estos resultados muestran que la mayoría de las cepas presentan máximo crecimiento en un intervalo de pH de 5 - 7 y la minoría a pH de 7 - 9.

VI CONCLUSIONES

Como es de esperarse, los resultados obtenidos de las -- pruebas bioquímicas corresponden en su mayoría a los reportados para Rhizobium japonicum puesto que las cepas utilizadas, no fueron cepas recién aisladas sino cepas de colección. Es de hacerse notar que las cepas 7, 10, 12, 13, 16, 17 y 19 presentan resultados contradictorios en cuanto a su desarrollo -- en citrato y el diámetro de las colonias que tiene mayor similitud con las especies de Rhizobium del grupo 1. Sin embargo -- en un experimento simultáneo realizado en éste laboratorio se observó que éstas cepas son infectivas en diferentes variedades de soya y efectivas en la fijación de nitrógeno, cepas similares han sido aisladas por el Dr. Graham (comunicación personal).

Las cepas 1 y 3 no dieron los resultados esperados ya que éstas cepas perdieron sus características comportándose atípicamente, observándose un comportamiento constante con respecto a las otras pruebas bioquímicas efectuadas.

Las cepas 4 y 5 la 8 y 9 constituyen otro bloque en cuanto a comportamiento observado, en tanto que la 6, 11 y 17 difieren en una o varias de las pruebas realizadas. Sin embargo, todas nodulan a Glycine max y fijan nitrógeno.

Al realizar la prueba de resistencia a antibióticos se -- observó que todas las cepas son resistentes a 4 de los antibióticos probados y sensibles a los demás.

La mayoría de las cepas empleadas son marcadamente sensibles al valor de pH = 4, observándose cierta resistencia en -- las cepas 4, 10 y 13 y probablemente la 16.

Presentan resistencia a pH alcalinos probados ya que se -- observó un desarrollo adecuado.

Finalmente llama la atención el comportamiento de las cepas 10 y 13 que presentan un desarrollo similar con todos los valores, de pH empleados, lo que indica un rango amplio de adaptación a éste parámetro.

Por lo que respecta a la prueba de actividad de hidrogenasa, como ya mencionamos en uno de los capítulos anteriores,

ésta nos evalúa cualitativamente la fijación de nitrógeno y -- si relacionamos ésta prueba con otros estudios que se realizaron en el mismo laboratorio, en donde se trabajo con frijol de soja , 7 variedades diferentes y 16 cepas de Rhizobium japonicum las mismas que se utilizaron en éste estudio, estas cepas dieron la prueba de la actividad de hidrogenasa positiva, y -- éstas fijaron nitrógeno en las diferentes variedades de frijol de soja, por lo tanto ésta comprueba que existe relación entre la eficiencia en la fijación de nitrógeno y la presencia de la hidrogenasa.

VII A P E N D I C E

Medios de cultivo

1) Glucosa-peptona-agar

Glucosa 10 g.
Peptona 20 g.
NaCl 5 g.
Agar 15 g..
Agua dest. 1 lt.
pH 7.2.

Vincent J. M. 1975.

2) Leche tomasolada

(ya viene compuesta) se hidrata con agua destilada estéril).

3) Citrato de Koser

Fosfato monopotásico 1 g.
Sulfato de sodio y amonio .1.5 g.
Sulfato de magnesio0.2 g.
Citrato de sodio 3 g.
Agua destilada 1 lt.
pH 6.7.

Vincent J. M. 1975.

4) Agar sulfito de bismuto

(ya viene preparado) se hidrata con agua destilada estéril, no se esteriliza éste medio después, se debe -- preparar el mismo día de la siembra. Se deja reposar -- durante 2 horas después de la preparación.

5) Medio modificado de Bergensen

Lactosa 5 g.

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g.
KNO ₃	1 g.
Na ₂ HPO ₄	0.18 g.
FeEDTA (0.25%)	10 ml.
MnSO ₄ (33.5% p/v)	10 ml.
Agar	12 g.
pH	6.8.

Y.D. Gacer y A. N. Sen 1976.

6) Prueba de Cetolactasa

Lactosa	1 g.
Ext. de levadura	0.1 g.
Agua	100 g.

Bernaets, M. J. & De Ley, J. 1963.

7) ELIA + Rojo congo

K ₂ HPO ₄	0.5 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g.
NaCl	0.1 g.
Manitol	10 g.
Ext. de levadura	3 g.
Rojo congo	10 ml.
(solución acuosa 1:400)	
agar	15 g.
agua	1 lt.
pH	6.8.

Vincent J. M. 1975.

8) ELIA + Azul de bromotimol

K ₂ HPO ₄	0.5 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g.
NaCl	0.1 g.

Manitol	-----	10 g.
Ext. de levadura	-----	3 g.
Agar	-----	15 g.
Agua	-----	1lt.
pH	-----	6.8.
Azul de bromotimol	-----	5ml.

(Solución alcoholica 0.5%)

(Se esteriliza aparte el medio del colorante y después se combinan en condiciones estériles).

J. M. Vincent 1975.

9) ELMA + Cristal violeta (1:1000)

Medio de ELMA (con agar) + cantidad adecuada de solución de colorante cristal violeta para quedar en el medio a una concentración final de 1:1000.

10) ELMA + Cristal violeta (1:150000)

Al medio YEM (con agar) se agrega solución de cristal violeta esterilizado separadamente en cantidad adecuada para que en el medio quede una concentración final de 1:150000.

Ethel F. Allen and O.N Allen, 1950.

II) EL(m)A - Xilosa

Al medio de ELMA (sin agar) se lo sustituye el manitol por xilosa y en lugar de rojo congo se usa el colorante rojo de fenol en una concentración de 0.018 g/l.

12) EL(m)A - Ramosa

Al medio ELMA (sin Agar) se lo sustituye el manitol por Ramosa y en lugar de rojo congo se utiliza el colorante-rojo fenol (0.018 g/l).

13) Medio utilizado para la prueba de actividad de hidrogenasa.

Medio sintético para reducción de tetrazolio.

(mg/lt)

K_2HPO_4	400 mg.
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	100 mg.
KCl	65 mg.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50 mg.
$MnSO_4$	4.5 mg.
H_3BO_3	2.0 mg.
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 mg.
Na_2MoO_4	0.5 mg.
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.04 mg.
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025 mg.
Glicina	2.0 mg.
NaFeEDTA	40 mg.
Inositol	100 mg.
Sacarosa	3000 mg.
Na glutamato	500 mg.
Agar	12000 mg.

pH ----- 6.7-7.0

Distribuirlo en cantidades de 100 ml, y esterilizarlo luego - esperar que se enfríe hasta 60°C, antes de hacer cajas petri, - adicionar 1 ml. de una solución estéril de clorhidrato de trifnil tetrazolio (1g/100 ml.) mezclarlo bien y hacer cajas.

El medio básico es de Ranga Rao (1977) modificado según comentarios de Maier, (1978) Campbell, (1978)

14) Medio utilizado para la prueba de tolerancia a la acidez y - alcalinidad. (CELM)

a) Micronutrientes

MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.504 g.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.227 g.
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.034 g.
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.008 g.
Agua dest.	1000ml.

b) Vitaminas

Thiamina HCl	0.400 g.
Ca Pantotenato	0.400 g.
Biotina	0.0001 g.
Agua	100 ml.

c) Fosfato

KH ₂ PO ₄	1.36 g.
Agua	1000 ml.

Formulación del medio

Glycerol	5 g.
K ₂ SO ₄	0.131 g.
Na gluconato	0.220 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.074 g.
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.007 g.
FeEDTA	0.035 g.

a) Soln. micronutrientes	0.5 ml.
b) Soln. vitaminas	1.0 ml.
c) Soln. fosfato	1.0 ml.
Agar	20 g.
Agua	1000ml.

El pH se ajusta al pH deseado, el medio se esteriliza por autoclave se enfría hasta 55°C para entonces, probar con potenciómetro que el pH quede en el nivel deseado.

VIII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allen, O. N. and Ethel K. (1950). Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. Soil Sci. 14: 273.
- 2.- Antoun, H. Bordeleu, L. Gaynon, C. Lachance R. A. - - (1970). Actinomyces antagonistas de champignons et n'a afectan pas lo Rhizobium meliloti. Can J. Microbiol. 24: 558.
- 3.- Amith, R. S. and Miccer R. (1974). Interactions between Rhizobium japonicum and soybean rhizosphere bacteria. Agronomy Journal. 66: 564.
- 4.- Ayala Briceño, B. L. (1976). Proyección agronómica de algunos aspectos metodológicos de la rizobiología, - trabajo presentado en el IV congreso de la ciencia del suelo. Maturin (Venezuela) Agosto 22-27.
- 5.- Barrios, L. T. y Tsuzuki R. G. (1980). Selección de cepas efectivas de Rhizobium japonicum para frijol de soya variedad "Jupiter". Tesis profesional. Facultad de Química UNAM.
- 6.- Bergensen, F.J. (1961). The growth of Rhizobium in -- synthetic media. Aust. J. Biol. Sci. 14:349.
- 7.- Bernaets, M. A. and De Ley J. (1963). A biochemical - test for crown gall bacteria, Nature. 197: 406.
- 8.- Bernaets, M. and De Ley J. (1968). Biochim Biophys -- Acta. 30:661.
- 9.- Bernaets, M. and De Ley J. (1960). J. Gen Microbiol.- 22:129.
- 10.- Bernaets, M. and De Ley, Ant V. Leevwenh (1961). J. - Microbiol. 27:247.
- 11.- Brill, W. J. (1969). Fijación biológica de nitrógeno. American Scientific.

- 12.-Bowen, G.D. and Kennedy. M.M. (1959). Effect of High--soil temperature in Rhizobium spp. Ad. F. Agric. Sci. 16: 177.
- 13.- Bryant M. c. (1976). Antibióticos y su control me---diante el laboratorio. Ed. El manual moderno.
- 14.- Buges, A. (1960). Introducción a la microbiología del suelo Acirbia (Ed). Zaragoza. España.
- 15.- Campbell, D. and J. Garvey, N. Greener and. D. Suss---dorf. (1970) Methods in Immunology, 2nd. Edition W.A. Benjamin Inc. U. S. A. p: 435.
- 16.- Clark, A. G. (1969). The utility of manganese in lactose medium to differentiate Rhizobia from agrobacteria. Appl. Bact. 32: 248.
- 17.- Chowdhury, M. S. (1977). Effects of soil antagonists of symbiosis lagume-Rhizobium Interactions. Misc. -- Pbl. Hawaii Univ, Coop. Est. Ser. 145: 385.
- 18.- Dato, R. A. and. J. Halliday. (1979). Selecting Rhizobium for acid. infertile soils of the tropics. Nature: 277.
- 19.- Davis., (1962). Resistence of to Rhizobia to antimicrobiol, agents. J. Bact. 84: 187.
- 20.- Edmons, P. (1978). Microbiology. An Enviromental perspective, Mac Millan Publishing Co. New York.
- 21.- Elkan, G. H. (1971). Biochemical and gonical aspects--of the taxonomy of Rhizobium japonicum. Plant and soil, especial volume. 85-104.
- 22.- Ferry, P. Blachere, H. and Obaton. M. (1959). Un milieu de culture synthétique pour Rhizobium meliloti, - Anns agron 2: 219.
- 23.- Graham, H. (1969), Glucose catabolism in Rhizobium japonicum Journal of Bacteriology 97 (3). 1184-1191.

- 24.- Graham, P.H. (1963a). Vitamin requirement of root nodule bacteria. F gen Legumes. Antonie Van Leeuwenhoek. 29/: 281.
- 25.- Graham, P.H. (1963b). Antigenic affinities of the -- root nodule bacteria of legumes. Antonie Van Leeuwenhoek. 29: 281.
- 26.- Graham P.H. (1964). The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria.- q. legumes J. Gen Microbiol. 35:511.
- 27.- Graham, P.H. and Parker, C. A. (1964). Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. Plant and soil, 20: 383.
- 28.- Gibbs B. M. and Shapton D. A. Identification methods for microbiologists. Part B Academic press. (1968) pag. 51.
- 29.- Gross D. C. and A. K. Vidaver (1978). Bacterocin like substances produced by Rhizobium japonicum and other slow-growing Rhizobia. App. and Environmental Microbiology 30:936-943.
- 30.- Hagerdorn C. and A. Caldwell. (1981). Characterization of diverse Rhizobium Trifolii isolates. Soil - Soc. Am J. 45:513-516.
- 31.- Hardy, E. W. R. D. Hoston, R. K. Jakson and R. C. -- Burns. (1968). The actylene-otilene. Assay for fixation laboratory and field evaluation. Plant physiol. 43:1185.
- 32.- Katnelson, H. and A. C. Zacallo. (1957). Metabolism of Rhizobia in relation to affectiveness. Can J. Microbiol. 3:8 79-884.
- 33.- Koysor, H. H. and. D.N. Munns (1979]. Tolerance of - rhizobia to acidity, aluminum phosphate. Soil Sci. - Soc. Am. J. 43: 512-523.

- 34.- Lenhard, G. (1956). Die Dehydrogenaseaktivitat desbodes. als. mass fur die mikroorganismetatihkeit in boden. z -- pflanzenerahr. Dang Bodenk. 73:1
- 35.- Maier, R.J. Frank. J. and Harol J. (1979). Regularion of- hidrogenase in Rhizobium japonicum, Journal of Bacterio- logy. 137: 824.
- 36.- Maier, R.J. Norman E. R., Campbell, Frank J. Hanus Frank B Simpson, Sterling A. Rusell and Harol J. Evans. (1978). Expression of hidrogenase activity in freeliving Rhizo-- bium japonicum. Proc. Natl Acad Sci. USA 75: 3258 3262.
- 37.- Marganida, M. de Carvalho. H.V. Bushby and D.G. Edwards. (1981). Short communication, survival of Rhizobium in nu- trient solutions containing aluminium. Soil Biol. Bio--- chem. 13: 541-542.
- 38.- Martínez, De D. G. and Arias A. (1972). Enzymatic basis- for differentiation of Rhizobium into-fast-nad slow cro- wing groups. Journal of bacteriology 109 (1): 467-470.
- 38'.- Moza Fraga G., Hernández salgado G., Inoculación de Rhi- zobium japonicum en diferentes variedades de soya (ni-- vel invernadero). 2a. Reunión sobre fijación Biológica - del nitrógeno.
- 39.- Pard, D. (1971). La importancia de los antibióticos y de las sustancias inhibidoras. Burges, A. Y Raw, F. Ed bio- logía del suelo. Omega, S. A. Barcelona. España p. 505.
- 40.- Pattison, A.C. and F. A. Skinner. (1974) The affects of - antimic obial sustancias on Rhizobium spp. and their use- selectibe media J.Appl. Bact. 37:239-250.
- 41.- Postgate, J. (1981). fijación del nitrógeno. Ediciones O- mega Barcelona España.
- 42.- Shaefer, R. (1963). Dehydrogenase activity as a measure- of the global biological activity of soils. Ann inst Pas- teur. 105:326.

- 43.- Sewingchamer, E. A. (1960). Studies on induced variation in the Rhizobia I. defined media and nodulation test techniques, Appl. Microbiol. 8: 349.
- 44.- Skotnick, M. L. Rolfe B. G. and Minocher. (1979). Nitrogenase activity in pure cultures of spectinomycin resistant fast and slow growing Rhizobium. Biochemi and Biophysical Research communications 86 (4): 968-975.
- 45.- Stevenson. I. L. (1966). Some Observations on the microbial activity in re-moistened, air-dried soils. -- Plant and soil. 8: 170.
- 46.- Vincent, J. M. (1974). Root nodule symbiosis with Rhizobium p. 265. In: A quispel (Ed) The biology - of nitrogenfixation, North Holland. Publishing Co. - Holanda.
- 47.- Vincent, J. M. (1975). Manual práctico de rizobiología Buenos Aires, Ed. Hemisferio sur. Argentina.
- 48.- Vincent, J. M. (1977) Rhizobium. General microbiología In: Treatise on dinitrogen fixation sección III: Biology R.W. Hardy and G.S. Silver (Ed). John Wiley and U.S. A. p : 277.