



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**AISLAMIENTO, CULTIVO E INOCULACION DE ALGAS  
AZUL - VERDES Y AZOLLA FILICULOIDES LAM. EN  
SUELOS DE ARROZAL DEL EDO. DE MORELOS.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de :

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**SERGIO ARTURO ESPINOSA ABARCA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## C O N T E N I D O

	Pág.
I) INTRODUCCION. . . . .	i
II) REVISION DE LITERATURA . . . . .	4
A) Algas Azul-Verdes. . . . .	4
1) Características generales y taxonomía. . . . .	4
2) Fisiología . . . . .	5
a) Nutrición . . . . .	6
b) pH . . . . .	8
c) Temperatura . . . . .	9
d) Luz . . . . .	10
e) Desecación. . . . .	11
3) Ecología . . . . .	12
4) Aislamiento. . . . .	14
5) Fijación de N <sub>2</sub> . . . . .	16
6) Importancia agronómica . . . . .	17
B) <u>Azolla</u> . . . . .	21
1) Taxonomía . . . . .	21
2) Morfología. . . . .	22
3) Reproducción . . . . .	23
4) Simbiosis . . . . .	25
5) Fisiología. . . . .	29
a) Requerimientos nutricionales . . . . .	29
b) Temperatura. . . . .	31
c) pH. . . . .	32
d) Intensidad luminosa . . . . .	32
e) Salinidad . . . . .	33

	Pág.
f) Fotosíntesis . . . . .	33
g) Fijación de N <sub>2</sub> . . . . .	34
6) <u>Azolla</u> en la agricultura. . . . .	37
a) Rendimiento . . . . .	38
b) Fijación de nitrógeno anual . . . . .	39
c) Efecto en el rendimiento del arroz . . . . .	40
d) Capacidad de crecimiento . . . . .	43
e) Composición química . . . . .	43
f) Descomposición . . . . .	44
7) Manejo práctico en el campo. . . . .	45
a) Densidad de inoculación. . . . .	46
b) Fertilización de <u>Azolla</u> . . . . .	46
8) Enemigos de <u>Azolla</u> . . . . .	48
9) Otros usos . . . . .	49
III) MATERIALES Y METODOS . . . . .	52
A) Suelos. . . . .	52
1) Colecta de suelos . . . . .	52
2) Tratamiento de los suelos: Suelo normal, empobrecido, y estéril. . . . .	52
3) Determinaciones físicas y químicas del suelo. . . . .	52
B) Estudios microbiológicos del suelo . . . . .	53
1) Amonificantes. . . . .	53
2) <u>Nitrosomonas</u> . . . . .	53
3) <u>Nitrobacter</u> . . . . .	53
4) Desnitrificantes. . . . .	53
5) Fijadores de N <sub>2</sub> de vida libre . . . . .	53
6) Algas azul-verdes (cianobacterias). . . . .	54

	Pág.
C) Algas azul-verdes (cianobacterias) . . . . .	54
1) Aislamiento. . . . .	54
2) Cepas. . . . .	55
3) Curvas de crecimiento. . . . .	56
4) Deseccación. . . . .	56
5) Congelamiento . . . . .	56
6) Ensayos en invernadero . . . . .	57
7) Actividad nitrogenásica. . . . .	57
D) <u>Azolla</u> . . . . .	58
1) Cepa . . . . .	58
2) Ensayos en invernadero . . . . .	58
3) Actividad nitrogenásica. . . . .	59
E) Análisis estadístico . . . . .	59
IV) RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	60
A) Suelos. . . . .	60
B) Microflora del ciclo del nitrógeno. . . . .	60
C) Aislamiento y experimentación con cianofitas. . . . .	62
D) Experimentación con <u>Azolla</u> . . . . .	66
V) CONCLUSIONES. . . . .	93
VI) RESUMEN. . . . .	98
VII) BIBLIOGRAFIA. . . . .	100

## I) INTRODUCCION

En los últimos años se han acentuado tres de los más importantes problemas a los que se enfrenta la humanidad:

- a) La crisis energética
- b) La alimentación básica
- c) La contaminación ambiental

El primero es un problema que afortunadamente en México no tiene las dimensiones que alcanza en otros países. Sin embargo, es bien sabido que el petróleo es un recurso no renovable y por lo tanto es imperativo disminuir su consumo y encontrar fuentes energéticas que lo substituyan.

Entre los múltiples productos que se obtienen de los hidrocarburos, están los fertilizantes químicos nitrogenados que son usados ampliamente en la agricultura. Estos fertilizantes juegan un papel fundamental en la producción mundial de alimentos y constituyen un problema primordial en los países pobres o en vías de desarrollo.

La producción de granos básicos en estos países, incluyendo a México, debe satisfacer totalmente la demanda interna. Watanabe (1978), cita que en los países en vías de desarrollo, el promedio de cereales producidos por unidad de área es de 1.5 ton./ha. y que en 1985 tendrá que ser de 2.4 ton./ha., para satisfacer las necesidades alimentarias de estos países. Esto representaría una fertilización de 75 kg. N/ha., mientras que hasta ahora los niveles de fertilización en los campos de

cultivo, son de sólo 25 kg./ha.

Por otra parte, en los países desarrollados se emplean altas dosis de fertilizantes químicos nitrogenados para obtener rendimientos aceptables. Todo esto sin considerar que el costo de la fertilización química resulta elevada debido a que la fabricación de estos fertilizantes depende directamente de los hidrocarburos. Por otra parte, el empleo de altas dosis de fertilización puede producir un desequilibrio ecológico en los campos de cultivo al ser arrastrados los fertilizantes a lugares donde no se requieren. Es por esto que se ha despertado interés científico a nivel mundial por abocarse con más énfasis a tratar de resolver o al menos disminuir la magnitud de estos problemas.

Una alternativa que se ha ido gestando desde principios de siglo es aprovechar el proceso biológico de la fijación del nitrógeno atmosférico que, en la Naturaleza, está reducido solamente a ciertas bacterias y algunas algas azul-verdes (cianobacterias). Estas últimas son de especial interés debido a que, además de tener la capacidad de transformar el nitrógeno atmosférico en nitrógeno protéico, ya sea como organismo de vida libre o en forma simbiótica con algunas plantas y hongos, son organismos fotosintetizadores por lo que tienen resuelto su abastecimiento de energía, punto vital en el proceso de la fijación del  $N_2$ .

De entre las asociaciones simbióticas, la que ha despertado gran interés desde el punto de vista agronómico es la

que constituyen Azolla-Anabaena azollae. Este helecho y su microsimbionte se han empleado en China como fertilizante biológico en los cultivos de arroz, desde hace más de 2 siglos; sin embargo, su aplicación agronómica y con fundamentos científicos es reciente.

Entre otros países asiáticos, en China actualmente se fertilizan biológicamente con Azolla 1,300,000 has. y en Vietnam 800,000. Singh (1979) y Watanabe (1978) estimaron una incorporación de 840 y 460 kg. de N/ha./año, respectivamente, al fertilizar con Azolla. Con respecto a su importancia en la producción agrícola, Liu et al (1981) informan haber obtenido rendimientos de 12-15 ton./ha./año, de arroz, con la incorporación de Azolla a los cultivos de dicho cereal.

Por otra parte, las algas azul-verdes de vida libre, representan también otra alternativa en la fertilización biológica de los cultivos de arroz, ya que la inoculación de los arrozales con estos microorganismos, puede contribuir con 72-144 kg. de N/ha./cosecha (Li, 1981), además de que pueden constituirse en una excelente fuente de proteína (40-50%), que puede ser usada como forraje y aún para consumo humano cuando son cultivadas en condiciones higiénicas.

Son estas razones las que nos motivaron a iniciar este trabajo, considerando que en nuestro país el cultivo del arroz es uno de los más importantes y representa uno de los principales cereales en la dieta de nuestro pueblo, además de que se cuenta en el país con los climas y condiciones favorables para la propagación y empleo agronómico de Azolla y de las algas azul-verdes.

## II) REVISION DE LITERATURA

### A) Algas azul-verdes (cianobacterias)

#### 1) Características generales y Taxonomía

La población microbiana de un suelo normalmente está constituida por bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios, en orden decreciente (Alexander, 1977).

Las algas del suelo se clasifican en clorofitas o algas verdes, cianofitas o algas azul-verdes, bacilarofitas o diatomeas y xantofitas o algas amarillas (Alexander, 1977).

Las cianofitas o algas azul-verdes es el único grupo de algas en donde se conocen especies fijadoras de nitrógeno. Estos microorganismos procariotes y fotosintéticos contienen clorofila a, carotenos, xantofilas y las ficobilinas llamadas ficocianina y ficoeritrina (Stewart, 1970). La combinación de los pigmentos produce el color azul verdoso característico del grupo.

La morfología de las azul-verdes es unicelular, colonial o filamentosa. Esta última puede poseer 3 clases de células: heterocistos, esporas o acinetos y células vegetativas.

Los heterocistos es el sitio donde ocurre la fijación de  $N_2$ , es decir, es la sede de la nitrogenasa (Day y Witty, 1977). Son células con pared gruesa, normalmente de mayor tamaño que las células vegetativas y de color amarillo verdoso.

Las esporas o acinetos son células más grandes, a lo

largo y a lo ancho, que las células vegetativas y son formas de resistencia a condiciones adversas del medio ambiente.

Aunque las células vegetativas son fundamentalmente de función fotosintética, investigaciones recientes han demostrado su capacidad para la fijación de  $N_2$ , únicamente bajo condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis (Stewart, 1980 b).

Las algas azul-verdes están rodeadas por una envoltura o vaina mucilaginoso cuya composición química no es bien conocida. Se tiene conocimiento de que es un polisacárido muy complejo (Fogg et al., 1973).

Fritsch (1945; citado por Fogg et al., 1973) hizo una clasificación de las algas azul-verdes o cianofitas y las agrupó en 5 ordenes: Chroococcales, Chamaesiphonales, Pleurocapsales, Nostocales y Stigonematales.

Por otro lado, Stanier (1978' citado por Stewart, 1980a) propuso que las algas azul-verdes deberían incluirse dentro de las bacterias y ser denominadas cianobacterias.

Una clasificación más reciente en los subgrupos de las cianofitas fue hecha por Rippka et al (1979; citado por Stewart, 1980a y Rippka et al., 1981a) en la cual reconoce 22 géneros contenidos en 5 secciones, sin ninguna nomenclatura en particular, únicamente numeradas de la I a la V.

## 2) Fisiología

Las algas azul-verdes (cianobacterias) constituyen junto con las proclorofitas, los 2 únicos grupos de procariotes fotoautótrofos (fotolítotrofos) capaces de realizar la fotosín-

tesis utilizando el agua como agente donador de electrones, liberando  $O_2$  (Stanier et al., 1981).

Dentro de las cianofitas existe un grupo en el cual se desarrollan heterocistos, que son células altamente especializadas que tienen la capacidad de fijar el  $N_2$  aeróbicamente, las cuales obtienen su energía para la fijación del  $N_2$  por medio de la energía que captan las células vegetativas en la fotosíntesis (Rippka et al., 1981b; Wolk, 1981).

a) Nutrición.

Los elementos mayores requeridos para el desarrollo de las cianofitas no son diferentes a los que necesitan las plantas: N, P, K, Ca, Mg, Na y, por supuesto, C, H y O (Fogg, et al., 1973). De éstos, el nitrógeno y el carbono son obtenidos de la atmósfera por medio de los heterocistos y células vegetativas, respectivamente (Stewart, 1980b). Experimentos realizados con Anabaena cylindrica por Allen y Arnon (1955) demostraron que el crecimiento de esta alga con nitrógeno combinado ( $NO_3^-$ ) y nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), es prácticamente el mismo con ambas fuentes de nitrógeno. Kratz y Myers (1955) señalan que el amonio, el nitrato y la urea sirven como fuente de nitrógeno para Anabaena y Nostoc.

Según Fogg et al (1973), la forma más recomendable en el suministro de fósforo es en forma de fosfato dibásico a una concentración de más de 0.05%. Este compuesto es preferido dado que actúa como amortiguador alrededor de pH 7.5.

El requerimiento de sodio y potasio fue establecido

por Kratz y Myers (1955) informando que los niveles óptimos son de 5 y 2.5 p.p.m., respectivamente.

Allen y Arnon (1955) señalan que el calcio es necesario para el desarrollo de las cianofitas y recomiendan una dosis de 20 p.p.m. El magnesio es un componente de la clorofila y por lo tanto es un elemento esencial para estos microorganismos, recomendándose una dosis de 20 p.p.m. (Fogg et al, 1973).

El hierro es un constituyente de compuestos tales como citocromos, ferredoxinas y nitrogenasa, y generalmente es adicionado a los medios de cultivo como complejo quelatado, ya sea como citrato, EDTA, etc., para mantenerlo soluble en condiciones de alcalinidad.

El molibdeno es un elemento esencial para cualquier microorganismo fijador de  $N_2$ , ya que es un componente de la nitrogenasa, por lo que es necesario adicionarlo a los medios de cultivo. Kratz y Myers (1955), Allen y Arnon (1955), Fogg et al (1973) y Stewart (1977) citan la necesidad de este elemento y recomiendan una dosis de 0.1 y 0.2 p.p.m. ya sea que el cultivo haya sido adicionado de nitratos o bien esté creciendo con  $N_2$ , respectivamente.

Para un buen crecimiento de las cianofitas, es necesario agregar al medio de cultivo trazas de los siguientes elementos: boro, manganeso, cobre, zinc y cobalto. Fogg et al (1973) recomienda una concentración de 0.1 p.p.m. de Boro. El cobalto es necesario en cantidades de 0.4 microgramos/l.

Existen informes de que el burbujeo con aire y aire con CO<sub>2</sub> al 5% estimulan el crecimiento de las algas azul-verdes (Venkataraman, 1969; Fogg et al., 1973; Stewart, 1980a).

Se han desarrollado varias fórmulas para el cultivo de las cianofitas, entre otros, los más utilizados son el medio de Chu No. 10 (Gerloff et al., 1950) medio de Kratz y Myers (1955), medio de Allen y Arnon (1955), medio BG-11 de Hughes, Gorham y Zehnder, con ligeras modificaciones hechas por Allen y Stanier (1968), siendo este último medio de cultivo de los más empleados para el aislamiento y cuantificación de algas azul-verdes y diatomeas (Roger y Reynaud, 1976, 1977; Reynaud y Roger, 1977; Halperin et al., 1977; Rippka et al., 1981b).

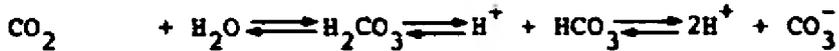
b) pH.

La concentración de iones hidrógeno es un factor muy importante, el cual afecta directamente la fisiología de las cianofitas.

Los autores coinciden en que el rango de pH en el cual las algas azul-verdes pueden crecer es muy grande, pero el óptimo se encuentra en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, esto es entre 7.0-8.5 (Mishustin y Shil'nikova, 1971; Fogg et al., 1973; Stewart 1977).

Hay informes de que aún en rangos de pH ácidos (6.0) y alcalinos (9.0) existe desarrollo de algas azul-verdes (Kratz y Myers, 1955). Sin embargo, el efecto de pH en el crecimiento no es sólo debido a la interacción entre la concentración de iones hidrógeno y el metabolismo celular, sino también a la in-

teracción entre iones hidrógeno y el medio de cultivo. El equilibrio:



es afectado, así como también la solubilidad de muchos compuestos de metales pesados, que en los medios de cultivo tienden a precipitar en forma de hidróxidos bajo condiciones alcalinas (Fogg et al., 1973).

c) Temperatura.

Las algas azul-verdes tienen rangos de temperatura muy amplios, pero en general, la mayoría de ellas crece mejor a temperaturas cercanas a los 35°C (Fogg et al., 1973; Stewart, 1977).

Allen y Stanier (1968) sugieren que la temperatura es un factor selectivo para el aislamiento y cultivo de las cianofitas, y determinan que a una temperatura de 35°C se evita el desarrollo de algas eucariotes. Sin embargo, recientemente Rippka et al (1981b) mencionan que un gran número de cianofitas no toleran temperaturas arriba de 30°C y algunas veces ni siquiera arriba de 20°C, por lo que estos autores no están de acuerdo que el cultivo a una temperatura de 35°C sea un procedimiento selectivo o de enriquecimiento para las cianofitas.

Por otro lado, Alexander (1975) informa que ciertas especies de cianofitas fijan N<sub>2</sub> a temperaturas tan bajas como -5°C, así como también ciertas especies de Nostoc que lo hacen

a temperaturas de 0°C.

Castenholz (1981) informa que una cepa de alga azul-verde puede crecer a temperaturas tan altas como 73-74°C (termofílicas).

Kratz y Myers (1955) encontraron que las mayores tasas de crecimiento para Anabaena cylindrica, Nostoc muscorum y Anacystis nidulans son a 35, 32.5 y 41°C respectivamente.

Witty (1979) experimentando con temperaturas de congelación, encontró que después de someter a Nostoc ellipsosporum durante 30 minutos a -18°C, observó destrucción de células vegetativas, permaneciendo únicamente heterocistos y esporas; aunque después de 4-6 días, observó que éstos desarrollaron pequeños filamentos.

d) Luz.

Varios autores coinciden en que la intensidad luminosa óptima para el cultivo de las algas azul-verdes, depende de varios factores tales como densidad de cultivo, concentración de CO<sub>2</sub>, el diseño del recipiente donde se realice el cultivo etc. (Fogg et al., 1973; Stewart, 1980a).

Fogg et al (1973) menciona que, en condiciones de campo, las algas azul-verdes soportan mayores intensidades luminosas que cuando crecen en el laboratorio, señalando también que, a bajas intensidades luminosas o iluminación intermitente (16 horas luz y 8 de oscuridad), es como se mantienen mejor los cultivos. Sin embargo, Allen y Arnon (1955), demostraron que con adecuadas dosis de CO<sub>2</sub>, nutrimentos minerales y aún con

nitrógeno atmosférico (como única fuente de este elemento), bajo una intensidad luminosa de 16,000 lux, obtuvieron un crecimiento de A. cylindrica ligeramente mayor que cuando la fuente de nitrógeno fué el nitrato. También encontraron que la luz intermitente comparada con luz continua, no produjo diferencias en el crecimiento.

e) Desecación.

Las algas azul-verdes tienen una gran capacidad para soportar la desecación. La humedad que poseen es, probablemente, uno de los factores más importantes que determinan su actividad nitrogenásica.

Fogg et al (1973) y Stewart (1977) señalan que en regiones áridas, existe poca población de cianofitas, pero cuando llueve en tales regiones se desarrolla un vigoroso crecimiento de estos microorganismos. Prueba de ésto es lo que sucede en los desiertos de Arizona. También en regiones tropicales y subtropicales Singh (1950; citado por Fogg et al., 1973) llevó a cabo experimentos en suelos alcalinos e infértiles, cercando superficies del suelo con amontonamiento del mismo a manera de bordo y dejó que se inundaran en la época de lluvias, esto condujo a la acumulación del agua que permitió el desarrollo de algas azul-verdes fijadoras de  $N_2$ , con el consecuente mejoramiento de estos suelos transformándose en suelos fértiles.

Según Stewart (1977), uno de los factores más importantes para soportar la desecación consiste en que la mayoría de las algas fijadoras de  $N_2$ , producen un abundante y grueso

mucflago que impide la pérdida drástica de agua.

Fogg et al (1973) señalan que la abundancia de algas azul-verdes es mayor en suelos cultivados que en suelos no cultivados y lo explican por el hecho de que en los primeros existe irrigación.

Witty (1979) menciona que en un experimento realizado en un suelo inoculado con cianofitas, la actividad nitrogenásica se pierde después de 2 días de desecación al 4%, sin recuperarse esta actividad después de volver a humedecerse. Sin embargo, en experimentos llevados a cabo en medios de cultivo, Rodgers (1977) demostró que aún después de 7 días de desecación a menos de 10% de humedad, todavía encontró actividad nitrogenásica después de haber humedecido los cultivos de Mostoc muscorum.

### 3) Ecología

Las algas azul-verdes tienen una distribución cosmopolita. Se les puede encontrar en regiones polares (Alexander, 1975), en regiones templadas (Granhall, 1975), en regiones tropicales (Venkataraman, 1975) e inclusive en desiertos (Shields y Durrel, 1964).

Se le ha dado mayor atención a la ecología de las cianofitas en los cultivos de arroz por la importancia que éstas representan en los sembradíos de ese cereal. Venkataraman (1975) menciona que en la India la distribución de cianofitas varía de 4 al 80%, dependiendo de las características de los suelos y de las condiciones climáticas. De 2213 muestras de suelo el 33%

presentaron cianofitas fijadoras de nitrógeno, siendo Aulosira fertilissima y especies de Nostoc, algunas de las más abundantes.

En Egipto, El-Nawawy y Hamdi (1975) informan que los géneros más comunes en los cultivos de arroz son Calothrix y Anabaena y concluyen que una amplia variedad de algas azul-verdes, incluyendo aquellas fijadoras de  $N_2$ , se desarrollan en suelos de Egipto.

Existen informes de su amplia distribución en países como Japón, Filipinas, Italia, Unión Soviética y Estados Unidos (Fogg et al., 1973), pero han sido desde el punto de vista cualitativo.

Los escasos trabajos publicados con respecto a la población de estos microorganismos indican variaciones. Roger y Reynaud (1977) y Fong y Shen (1981) mencionan que la población total de algas en un cultivo de arroz varía notablemente durante el ciclo del cereal; citan que al principio del anegamiento se implantan las diatomeas y clorofitas, al inicio del florecimiento de la panícula se implantan las Oscillatoriaceae y en el último estadio de la panícula, las algas azul-verdes son las dominantes. Los primeros autores señalan que variando las condiciones del cultivo tales como humedad, fertilización y la densidad de cultivo, la flora de algas del suelo de arrozal varía.

Bisuiya et al (1981) citan que en suelos con pH neutro y con alta humedad, detectaron el mayor número de cianofitas (31,000/g. de suelo); por otra parte, en suelos con pH ligera-

mente ácido y con poca humedad, observaron el menor valor (2,120/g. de suelo). Roger y Reynaud (1976) estimaron 15,600 esporas/cm<sup>2</sup>. de suelo seco. Catling et al (1981) encontraron 9,800 unidades/ml. en el tirante de agua de un cultivo de arroz.

En general, los factores que gobiernan el desarrollo y la ecología de las cianofitas en suelos son muy variados; entre otros, los más importantes son: humedad, nutrimentos, temperatura, pH e intensidad luminosa (Fogg et al., 1973).

Otro factor importante, pero poco investigado, son las interacciones que existen entre bacterias y algas, dado que las bacterias pueden utilizar y modificar muchos de los compuestos orgánicos que son excretados o liberados por las algas, así como también pueden alterar las tasas de fijación de N<sub>2</sub> y la fisiología de las mismas (Witty, 1974). Bunt (1960; citado por Witty, 1974) notó que la bacteria, no fijadora de N<sub>2</sub>, Caulobacter viviendo dentro del mucílago de Anabaena sp. casi duplicó la tasa de fijación de N<sub>2</sub>.

También se cree que las bacterias pueden proveer de CO<sub>2</sub> a las algas, estimulando su desarrollo (Witty, 1974).

#### 4) Aislamiento

Los métodos para el aislamiento de las algas azul-verdes están basados en los métodos clásicos usados en Bacteriología. El método de aislamiento directo en medio sólido, no tuvo los resultados esperados, dado que, según Venkataraman (1969), se requiere de un mayor tiempo de incubación lo cual significa

un riesgo de contaminación para los cultivos. Gerloff et al (1950) usando la misma técnica, encontraron que no era adecuada para el aislamiento de las algas azul-verdes.

Posteriormente se desarrollaron los cultivos selectivos o de enriquecimiento, que son una aplicación a microescala de los principios de Darwin de la selección natural (Venkataraman, 1969). El mismo autor señala que los 2 factores más importantes en la preparación de un medio de enriquecimiento son: i) Las condiciones de cultivo deben ser adecuadas para los microorganismos que van a ser aislados y ii) las condiciones deben ser lo más inadecuadas posibles para el crecimiento de otros microorganismos.

Para estimular selectivamente el crecimiento de las algas azul-verdes, se pueden utilizar muchos cultivos selectos (ver sección 2a). Estos incluyen ajuste del pH a ligeramente alcalino, incubación de los cultivos a 35°C (Allen y Stanier, 1968) y, en el caso de las fijadoras de N<sub>2</sub>, usar medios libres de nitrógeno (Fogg et al., 1973; Reynaud y Roger, 1976; Allen y Stanier, 1968). Otros autores mencionan el empleo de antibióticos para el aislamiento de las algas azul-verdes, tales como la ciclohexanida (Reynaud y Roger, 1976). También es muy común el empleo de micromanipuladores, conjuntamente con resiembras sucesivas en medios líquidos y sólidos (Allen, 1973), así como el método de las diluciones en placa o tubo (Venkataraman, 1969; Allen y Stanier, 1968).

### 5) Fijación de Nitrógeno

La fijación de nitrógeno molecular por las algas azul-verdes fué primeramente notada por Frank (1889), quien observó un incremento de nitrógeno en el suelo donde habían crecido algas azul-verdes. Esta observación fué considerada también por Beijerinck (1901), pero los resultados experimentales fueron cuestionados por no tratarse de cultivos libres de bacterias. No fué hasta 1914 cuando Pringsheim obtuvo los primeros cultivos axénicos, pero no pudo demostrar la acumulación de nitrógeno. En 1928, Drewes demostró que las algas azul-verdes asimilaban el nitrógeno atmosférico. Posteriormente De y Sulaiman (1950) y De y Mandal (1956), confirmaron lo establecido anteriormente.

La técnica del Kjeldahl fué la primera utilizada para demostrar la acumulación de nitrógeno (De, 1939; De y Sulaiman, 1950). La utilización de nitrógeno marcado ( $^{15}\text{N}_2$ ) confirmó la teoría (Stewart et al., 1975; Renaut et al., 1975; Stewart 1980a) y recientemente la técnica de la reducción del acetileno (Rodgers, 1977; Witty, 1979; Jones, 1981) facilitó y mejoró la sensibilidad en las determinaciones de fijación de  $\text{N}_2$ . Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la producción de etileno y la reducción de nitrógeno atmosférico no es proporcional (Knowles, 1981; Stewart, 1980a; Silvester, 1981; Buresh et al., 1980). Es por esto que los autores anteriores recomiendan el empleo de nitrógeno marcado  $^{15}\text{N}_2$  como estándar cuando se usa la técnica de la reducción del acetileno. Se han

encontrado factores de conversión muy variables, dependiendo de las condiciones a las que se realice la determinación aunque, en general, se acepta el factor teórico de 3 moles de etileno producido por 1 mol de nitrógeno reducido (Fong y Shen, 1981).

Los valores obtenidos con la técnica de la reducción del acetileno varían según el autor. Granhall (1975) obtuvo rangos de producción de etileno que varían de 0.22-3.87 nmoles/mg. de proteína/min. Li Shan-hao (1981) informa que, en general, los rangos de producción de etileno oscilan entre 1.3 y 3.8 nmoles/mg. de peso seco/min., sin embargo el mismo autor ha encontrado cepas excepcionales que han llegado a producir hasta 5.8 nmoles de etileno/mg. de peso seco/min.

#### 6) Importancia Agronómica

La fijación de nitrógeno atmosférico por los microorganismos del suelo constituye una manera natural de abastecer al suelo con nitrógeno combinado, y ésta ha probado ser de gran utilidad para las plantas de cultivo. La principal importancia agrícola y ecológica de las algas azul-verdes depende de la habilidad de ciertas especies de llevar a cabo simultáneamente, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. De esta manera, estas algas sirven como excelente fuente de nitrógeno y carbono al utilizar la energía solar y poder producir materia orgánica en el suelo, contribuyendo además con considerables cantidades de nitrógeno para el suelo (Venkataraman, 1969).

Las primeras observaciones sobre los efectos benéficos

de las cianofitas en el rendimiento del arroz fueron las de De (1939), quien demostró que el nitrógeno requerido para las cosechas de arroz, las cuales fueron obtenidas año con año sin la adición de ningún fertilizante, fué derivado de las algas que crecieron durante el cultivo del cereal.

El beneficio exacto de la utilización de las algas parece ser dependiente del tipo del suelo, la composición química del mismo, el agua y fertilizante usado, así como de las especies de algas y el clima (Mishutin y Shil'nikova, 1971).

De y Mandal (1956) estimaron que la incorporación de nitrógeno por el uso de cianofitas, en un suelo no fertilizado, varía de 16.7 a 53.7 kg. N/ha. Sin embargo, estos mismos autores encontraron que con la adición de fósforo, la cantidad de nitrógeno aumentó a 48.8-69.0 kg. N/ha. y observaron además que la fijación puede ser estimulada aún más con la adición de pequeñas cantidades de molibdeno, con lo cual estimaron 77 kg. N/ha.

De y Sulaiman (1950) demostraron que los valores de fijación de nitrógeno son mayores en presencia del arroz que en su ausencia. Consideran que esto es debido a la utilización del  $\text{CO}_2$  producido por las raíces de las plantas de arroz.

Mac Rae y Castro (1967) usando nitrógeno marcado  $^{15}\text{N}_2$  encontraron una fijación de 10-55 kg. de N/ha./año, aunque también cuantificaron el nitrógeno fijado por bacterias que también reducen el nitrógeno molecular.

Fong y Shen (1981) empleando la reducción del acetileno y utilizando el factor de conversión de 3:1 estimaron una

incorporación de 0.15-0.22 kg. de N/ha./día en suelos no fertilizados con nitrógeno y de 0.104 kg. de N/ha./día en suelos fertilizados con nitrógeno.

El consenso general es que de 7 a 75 kg. de N/ha./año pueden ser fijados por las cianobacterias de vida libre (Stewart, 1980a).

Venkataraman y Goyal (1968) informan que con la aplicación de algas azul-verdes al suelo, se han logrado incrementos de 15% en el rendimiento del grano. Gupta y Shukla (1967) mencionan incrementos en el nitrógeno total y contenido de proteínas como resultado de la fertilización con cianofitas.

Investigaciones recientes (Li, 1981) estiman que con estos microorganismos se logra una incorporación de nitrógeno equivalente a la adición de 72-144 kg./ha. de sulfato de amonio, indicando también que, en promedio, hubo un 10-20% de incremento en el rendimiento del grano, además de que se mejoraron las condiciones del suelo y se suprimieron, a cierto grado, el crecimiento de malezas.

Se ha observado que los beneficios por la inoculación con estos microorganismos es mayor cuando el nitrógeno es el único nutriente limitante (Venkataraman, 1975). Sin embargo, Goyal y Venkataraman (1970) encontraron respuesta a la fertilización con cianofitas aún con altos niveles de sulfato de amonio (100 kg./ha.), en el rendimiento del grano de arroz, así como también en diferentes tipos de suelos (Goyal y Venkataraman, 1971).

Por otra parte, Singh (1981) menciona que el uso de 20-40 kg. N por ha. como fertilizante químico, no afecta el crecimiento de las algas, pero menciona que una cantidad mayor de nitrógeno si retarda su crecimiento.

Según Gupta y Shukla (1967) la fijación del nitrógeno no es la única razón para el empleo de las cianofitas en los cultivos de arroz, sino también por la producción de otros factores de crecimiento por estos microorganismos, como son las auxinas y giberelinas, dado que se han encontrado incrementos en la producción de arroz aún en presencia de altos niveles de fertilizante nitrogenado, suficientes como para suprimir la fijación biológica del nitrógeno.

Entre otros autores, Watanabe (1973) menciona que el pH del suelo juega un papel fundamental en el desarrollo de las cianofitas y recomienda que en suelos con pH ácido, se agregue carbonato del calcio para levantar el pH a ligeramente alcalino.

#### 7) Otros aspectos de importancia

Otra aplicación de la cianofitas es la que señala Stewart (1980a) en el sentido de que pueden servir como alimento para peces herbívoros, y si éstos son desarrollados conjuntamente con el arroz, su excremento puede servir como fuente de nitrógeno para el cultivo.

Por otra parte, Wang et al (1981) mencionan que Mostoc flagelliforme es conocida por su delicioso sabor en los platillos chinos. A este respecto Ortega (1972) menciona que ya los antiguos mexicanos ingerían el "cocolín" y que se consumía en mercados

de la ciudad de México. La misma autora revela que el "cocolin" actualmente está compuesto principalmente por Phormidium tenue y Chroococcus turgidus, y no descarta la posibilidad de que Spirulina maxima también haya sido utilizada como alimento humano. Por último, cita que el "anomoxtle" también era consumido, el cual está constituido por Nostoc commune Vaucher.

## B) Azolla

Azolla es un helecho acuático pequeño que se encuentra distribuido en todo el mundo, flotando en la superficie de estanques, charcos, canales, acequias, lagos y cultivos de arroz, dando la apariencia de una alfombra verde o rojiza (Moore, 1969).

### 1) Taxonomía

El nombre del género Azolla proviene de los vocablos griegos Azo (seco) y ollyo (muerto), sugiriendo que el helecho muere en la época de la sequía. En 1783 Lamarck estableció el género Azolla, perteneciente a la familia Azollaceae C. Chr. (Moore, 1969; Lumpkin y Plucknett, 1980).

El género Azolla está dividido en 2 subgéneros: Euazolla con cuatro especies y Rhizosperma con dos especies.

#### Euazolla

- A. filiculoides (Lamarck)
- A. caroliniana (Willd.)
- A. mexicana (Presl.)
- A. microphylla (Kaulfuss)

Rhizosperma

A. pinnata (R. Brown)

A. nilotica (De Caisne)

Azolla tiene dos formas de reproducción: asexual o vegetativa y sexual. Para la identificación de las especies es necesario que el helecho se encuentre en su etapa de reproducción sexual.

Una característica útil para la distinción entre los subgéneros es la localización y presencia de los glochidios (Fig. 10) en los massulae (Konar y Kapoor, 1972; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980).

Las especies de Euazolla tienen los glochidios en toda la capa externa de la superficie de los massulae, a diferencia del subgénero Rhizosperma, que los contiene en la capa interior, como es el caso de A. pinnata, o bien carece de ellos (A. nilotica).

2) Morfología

El cuerpo vegetativo de Azolla es de forma triangular o poligonal (Fig. 8). Las especies miden de 1-2.5 cm. de diámetro y la especie más grande (A. nilotica), que según Peters et al (1981) es atípica, llega a medir hasta 15 cm. o más. Está constituido por frondas que se van alternando lateralmente en la reproducción vegetativa y en el punto de unión de las frondas existe una incisión que es importante para el buen funcionamiento de aquella.

Las frondas consisten de hojas y cada hoja está for-

mada por un lóbulo dorsal aéreo grueso, que contiene clorofila y un lóbulo ventral flotante transparente que es un poco más grande y sin clorofila. En el lóbulo dorsal existe una microcavidad ovoide que está en contacto con la atmósfera y en donde se encuentra el microsimbionte (Anabaena azollae), además de unas estructuras denominadas pelos de transferencia (Fig. 11), de los cuales posteriormente se explicará su función en la asociación (Duckett et al., 1975).

Se observan raíces colgando en el agua y miden de 1.5-15 cm. de largo según la especie. Estas están cubiertas por pelos radiculares (Lumpkin y Plucknett, 1980).

### 3) Reproducción

Azolla posee dos formas de reproducción: vegetativa o asexual y sexual. La primera es la más frecuente en la naturaleza y la segunda es más rara, compleja e implica el desarrollo de los órganos reproductores (esporocarpos). Estos son de dos tipos y se agrupan en pares en el lóbulo ventral de las frondas iniciales; los microsporocarpos de forma globular y los megasporocarpos más pequeños y ovoides. Los primeros son los órganos sexuales masculinos y los segundos los femeninos.

Dentro de los microesporocarpos se aprecian unas estructuras denominadas microesporangios, que al madurar producen las microesporas y se dividen en corpúsculos alveolares llamados massulae (fig. 9) que según Godfrey et al (1961) y Correll y Correll (1972), en A. filiculoides el número de éstos oscila entre 4-6. Unidos a los massulae se aprecian los

glochidia que pueden ser septados, como en el caso de A. mexicana, carecer de los septos como lo es en A. caroliniana, o raramente septados, y en tal caso, únicamente cerca de la punta como en A. filiculoides (Godfrey et al., 1961; Correl y Correll, 1972).

Por otro lado, en el megasporocarpo existe sólo un megasporangio y una sola megaspora se desarrolla para posteriormente dividirse y formar un protalo.

Una vez que han caído al fondo del agua los microesporocarpos y la megaspora, se convierten en protalo masculino y femenino respectivamente, después de un período de latencia. Posteriormente, los anterozoides son liberados para fertilizar la oosfera y producir el embrión, el cual flota sobre la superficie del agua (esporofito).

En regiones templadas y bajo condiciones artificiales A. filiculoides desarrolla esporocarpos en el verano (Talley et al., 1977; Watanabe, 1978; Lumpkin y Plucknett, 1980), y A. pinnata los desarrolla en invierno (Lumpkin y Plucknett, 1980).

Watanabe (1978) menciona que en el Instituto Internacional de Investigaciones del arroz (IRRI) han logrado producir esporocarpos de A. pinnata, bajo condiciones artificiales, aunque no han podido reproducir una recombinación sexual artificial.

Sin embargo, investigaciones recientes (Liu, 1981) señalan que en la República Popular de China han logrado la germinación de las esporas en 10 días a una temperatura de

21°C o en 7 días a 25°C, tomando alrededor de 30 días para formar el helecho.

Singh (1979) cita que en la India los esporocarpos se desarrollan abundantemente durante condiciones adversas tales como altas temperaturas en verano y bajas temperaturas en invierno, además señala también que la formación de los esporocarpos retarda el crecimiento vegetativo de las frondas.

#### 4) Simbiosis

En 1873 Strasburger describió la presencia de una alga azul-verde en la cavidad del lóbulo dorsal de las frondas de Azolla, a la cual la llamó Anabaena azollae (Moore, 1969). Los taxónomos la colocaron en la división Cyanophyta, orden Nostocales, familia Nostocaceae (Lumpkin y Plucknett, 1980).

Desde 1913 Oes sugirió que el microsimbionte es capaz de fijar nitrógeno atmosférico.

Anabaena azollae consta de 3 tipos de células: células vegetativas (sitio primario de la fotosíntesis; Lumpkin y Plucknett, 1980; Stewart, 1980b); heterocistos (sitio de fijación del nitrógeno; Fogg et al., 1973; Wolk, 1981) y esporas o acinetos (células vegetativas de mayor tamaño y pared más gruesa); aunque ciertos autores no han encontrado esporas en Azolla (Hill, 1977).

Hill (1977) midió el tamaño de las células vegetativas en A. filiculoides y encontró dimensiones que van de 4-6 micras de diámetro por 6-12.5 de largo. Lumpkin y Plucknett

(1980) encontraron un diámetro de 5 micras de largo por 9 de largo en células vegetativas y de 7 micras de diámetro por 11 de largo en los heterocistos.

La asociación comienza desde que se inicia el ciclo reproductivo de Azolla. Los acinetos o esporas de A. azollae están presentes desde que se inicia el desarrollo del indusio.

Cuando una espora del alga germina, ésta se divide y forma los hormogonios, que son filamentos jóvenes y cortos. Posteriormente, cuando el helecho va desarrollándose vegetativamente, las células del microsimbionte van colonizando las cavidades de las siguientes frondas. Durante las primeras etapas del desarrollo algal no se observan heterocistos. Hill (1977) considera que la función de estos filamentos y células es generativa y posteriormente algunas de ellas se convierten en heterocistos, los cuales empiezan a fijar  $N_2$ .

Hill (1975) menciona que el número de heterocistos varía de cerca de cero en los filamentos del ápice de las frondas a 29-33 por ciento en la décima quinta fronda; pero después de la vigésima, los heterocistos empiezan a envejecer.

Singh (1979) cita que esta frecuencia de heterocistos varía linealmente del ápice de la fronda (9.5%), a la décima fronda (25%).

Hill (1977) midió la tasa de fijación de  $N_2$  en cada fronda, alcanzando la máxima cerca de la décima segunda fronda y declinando entre la vigésima y vigésima cuarta.

Peters (1975; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) evaluó cualitativa y cuantitativamente el promedio de células

de A. azollae como sigue: 23.1% de heterocistos; 60.9% de células vegetativas y 16% de esporas o acinetos. Becking (1976) y Singh (1977) mencionan una frecuencia de heterocistos de 15-20% y 22-30% respectivamente. Sin embargo, comparativamente, la frecuencia de heterocistos en una alga de vida libre como Anabaena cylindrica, es de sólo 6% (Hill, 1975).

En la cavidad donde se establece el microsimbionte y recubierto éste por una envoltura de composición química desconocida, también encontramos unas estructuras llamadas "pelos de transferencia", que pueden ser simples o ramificados (Peters, 1981; Peters et al., 1981). Estudios fisiológicos hacen pensar que los pelos de transferencia (Fig. 11) son los órganos de intercambio entre el macro y microsimbionte (Watanabe, 1978; Peters et al., 1981). Duckett et al. (1975) sugieren que la principal función de los pelos de transferencia es la absorción de nitrógeno fijado por A. azollae.

En A. filiculoides, T. Lumpkin ha contado de 8 a 21 pelos de transferencia por fronda. Sin embargo, otros autores (Peters y Mayne, 1974a) han observado cavidades y pelos de transferencia sin estar habitados por el microsimbionte.

Bottomley, 1920 (citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) informó haber aislado Pseudomonas y Azotobacter de la cavidad; sin embargo, Peters y Mayne (1974b) ensayaron la reducción del acetileno en cultivos de bacterias aisladas de la cavidad y no encontraron conversión a etileno. Aunque no en condiciones anéxicas, los mismos autores al someter las frondas del helecho libres del microsimbionte al mismo procedimiento,

tampoco obtuvieron reducción del acetileno.

Se han hecho experimentos con el fin de separar a la planta del microsimbionte por diversos métodos basados en variación de las condiciones ambientales como bajas temperaturas y deficiencias nutricionales. En 1958 Nickell (citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) inició el uso de antibióticos; posteriormente Peters y Mayne (1974a) emplearon la misma técnica con la cual obtuvieron buenos resultados. Hill (1975) logró separarlos primero con un tratamiento a baja intensidad luminosa (1250 lux) y posteriormente con alta intensidad luminosa (10,000 lux).

El helecho libre del alga luce más compacto, tiende a tener más raíces y requiere de nitrógeno combinado para su crecimiento (Hill, 1975).

Numerosos autores han publicado haber obtenido el desarrollo del microsimbionte en cultivos aislados; Becking, 1976 (Vouk y Wellisch, 1931; Huneke, 1933; Tuzimura et al., 1957; Shen, 1960; Venkataraman, 1962; Wieringa, 1968; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980), sin embargo, esto ha sido cuestionado por otros autores que no han podido lograrlo, argumentando que se pudo haber tratado de algún contaminante epifítico, además se basan en que el aislamiento debe seguir los postulados de Koch (Hill, 1975; Singh, 1977; Stewart, 1980a).

Por otra parte, se ha tratado de recombinar el alga aislada con el helecho libre del alga, pero no se ha logrado (Bortels, 1940; Huneke, 1933; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980). Sin embargo, investigaciones recientes en China (Li,

1981b) consideran que tal recombinación o "reinfeción" ha sido obtenida.

En la naturaleza se ha encontrado el helecho libre del alga pero esto ha sido muy raro (Hill, 1977).

Sintetizando, la característica más sobresaliente de Azolla, es su relación simbiótica con el alga fijadora de  $N_2$ , A. azollae en la cual el helecho provee nutrientes y una cavidad protectora en cada fronda y a cambio el simbiote le proporciona nitrógeno atmosférico fijado y posiblemente otras sustancias promotoras del crecimiento (Lumpkin y Plucknett, 1980).

#### 5) Fisiología

##### a) Requerimientos Nutricionales

Azolla puede ser cultivada en medios artificiales libres de nitrógeno, por lo que algunos autores han desarrollado fórmulas para su crecimiento. Muchos usan diluciones de los medios de Knop, Hoagland y Crone. Otros (Watanabe y Espinas, 1976; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) emplean soluciones con concentraciones de nutrimentos similares a las existentes en los cultivos de arroz, sólo que adicionan doble concentración de fósforo (20 p.p.m.) y triple concentración de molibdeno. También se ha demostrado que, entre otros elementos, requiere de sodio, manganeso (Olsen, 1972); cobalto (Johnson et al., 1966) y molibdeno, este último indispensable para la fijación del  $N_2$  (Bortels, 1940; Johnson, 1966 y Olsen, 1972 son citados por Lumpkin y Plucknett, 1980).

El principal limitante nutricional en el crecimiento de Azolla es el fósforo, ya que en medios deficientes en este elemento, se inhibe o retarda su desarrollo (Prayoon et al., 1979; Tung y Shen, 1980; Talley et al., 1981). La deficiencia en fósforo se manifiesta principalmente por cambios en el color de la planta de verde a rojizo y desarrollando raíces rizadas (Moore, 1969; Lumpkin y Plucknett, 1980).

La concentración mínima óptima de fósforo para un buen desarrollo de Azolla parece ser que depende de la especie y cepa. Olsen (1972; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) informa que A. caroliniana creció bien en un lago con una concentración de 1.1 mg./l. de fósforo. Talley et al (1981) mencionan que la dosis de fósforo en donde observaron mayor fijación de  $N_2$  y desarrollo de A. filiculoides fué de 0.8 mg/l., encontrando también diferencias entre cepas de A. filiculoides. Watanabe (1978) recomienda que, a una concentración mayor de 0.1 mg/l. de  $P_2O_5$ , A. pinnata puede tener un buen desarrollo. Este investigador cita, además, que la roca fosfórica no es efectiva como fuente de fósforo para el cultivo de Azolla, recomendando el uso del superfosfato ( $P_2O_5$ ).

El calcio es otro nutrimento necesario para su crecimiento. Watanabe (1978) y Singh (1979) coinciden en que su deficiencia da lugar a frondas más pequeñas y a una coloración más rojiza que la que se presenta por deficiencia de fósforo. El segundo autor recomienda una dosis de 2.0 mM/l. de calcio para un óptimo crecimiento.

El hierro es otro elemento necesario para su desa-

rollo. El helecho se torna clorótico (amarillo) cuando carece del hierro suficiente. En este caso, el pH del medio ambiente juega un papel crucial dado que en condiciones alcalinas o neutras, el hierro precipita y no es asimilable para la planta. Por el contrario, en rangos de pH ácidos (4-6) el ión es soluble, siendo en este caso necesario balancearlo con calcio para evitar un exceso de absorción de este elemento y por tanto producir toxicidad (Lumpkin y Plucknett, 1980). Watanabe y Espinas (1976; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) señalan que 1.0 mg/l. de Fe es suficiente para un buen desarrollo de Azolla.

b) Temperatura

Existen diferentes informes de las temperaturas bajo las cuales Azolla puede sobrevivir o bien crecer adecuadamente.

Algunos investigadores consideran que Azolla puede sobrevivir en temperaturas tan bajas como 5°C (Talley et al., 1977) y tan altas como 45°C (Ashton y Walmsley, 1976) siendo la óptima a 27.5°C.

Singh (1979) indica que A. pinnata crece bien a una temperatura de agua de 14-35°C, siendo su desarrollo óptimo a 20-30°C. Ashton y Walmsley (1976) señalan una temperatura óptima de 27°C para un buen desarrollo de A. filiculoides. Watanabe (1977, 1978) menciona que A. pinnata muere cuando el promedio de temperatura excede los 31°C y, por último, Moore (1969) cita que Karamyshev (1957) encontró en Vietnam que a temperaturas promedio arriba de 22°C Azolla tiende a morir.

c) pH

El rango de pH en que Azolla puede sobrevivir es muy amplio (3.5-10.0); siendo su óptimo entre 4.5-7.0 (Moore, 1969; Watanabe, 1978; Lumpkin y Plucknett, 1980). Ashton y Walmsley (1976) encontraron que bajo altas intensidades luminosas (60,000 lux) y altos valores de pH (9-10), o bien, bajas intensidades luminosas (15,000 lux) y bajos valores de pH (5-6) se observa el máximo desarrollo de Azolla; apreciando también una relación inversa entre el pH y la temperatura para la reducción de nitratos y la fijación de  $N_2$ . La reducción de nitratos fué óptima a pH 4.5 y a 30°C, mientras que la fijación de  $N_2$  lo fué a pH 6 y a 20°C.

d) Intensidad Luminosa

Los trabajos realizados sobre la intensidad luminosa óptima para Azolla también difieren según el autor. Ahmad (1941; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) encontró un máximo desarrollo en un rango de 500-2,000 lux. Ashton (1974; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) informa un máximo crecimiento relativo y actividad nitrogenásica al 50% de luz solar (40-57.5 klux) en A. filiculoides. Peters et al (1976) citan que la fijación de  $CO_2$  se satura a 8,000 lux y la fijación de  $N_2$  a 5,000 lux en A. caroliniana. Watanabe (1978) señala un máximo desarrollo de A. pinnata a 40,000 lux y Tung y Shen (1980) indican que a 50% de luz solar hay una mayor fijación de  $N_2$ .

Estudios realizados en China concluyen que a 25,000 lux se presenta el máximo contenido en nitrógeno total (4.8%),

mientras que a 47,000 lux, el crecimiento y la fijación de  $N_2$  alcanzan su máximo. También mencionan que A. pinnata puede soportar intensidades de 3,500-120,000 lux, recomendándose un rango de 20,000-40,000 lux, puesto que a estos niveles el contenido en nitrógeno es mayor (Lumpkin y Plucknett, 1980).

e) Salinidad

Considerando que el crecimiento de Azolla declina conforme la concentración de sales aumenta, ésta debe ser tomada en cuenta en cualquier lugar donde se intente introducir el cultivo de Azolla (Lumpkin y Plucknett, 1980).

Tran y Dao (1973) sugieren que la concentración mineral óptima es de 90-150 mg/l. Le Van y Sobochkin, 1963 (citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) informan que Azolla crece bien en un lago con una concentración de 160-380 mg/l.

f) Fotosíntesis

En relación con los pigmentos fotosintéticos, el macrosimbionte contiene clorofila a y b, mientras que el microsimbionte contiene clorocila y a ficocianina, que es una ficobilina hidrosoluble encontrada en todas las algas azul-verdes (cianobacterias), Lumpkin y Plucknett, 1980.

El microsimbionte contiene un 7.5-13% de la clorofila total, o bien, un 10-20% de clorofila a en la asociación (Peters y Mayne, 1974a).

La fijación de  $CO_2$  se lleva únicamente en las células vegetativas del microsimbionte y cloroplastos del macrosimbionte.

Peters (1977) considera que el microsimbionte aún cuando contiene una gran cantidad de clorofila, no puede obtener la energía suficiente requerida para la fijación del  $N_2$ , por lo que sugiere que el déficit de energía lo obtiene del fenómeno conocido como mixotropismo (nutrición autotrófica y saprofitica), o bien de un intercambio energético con el helecho por medio de compuestos carboxilados.

Otro pigmento importante producido por el helecho es la antocianina, de color rojo, el cual se presenta en condiciones adversas para el helecho. Ejemplo de esto sucede cuando hay deficiencias de fósforo (Talley et al., 1977; Watanabe, 1978; Singh, 1979), o bien cuando este organismo está sometido a fuertes intensidades luminosas (Moore, 1969; Singh, 1979).

#### g) Fijación de Nitrógeno

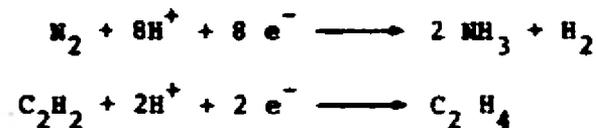
La fijación de  $N_2$  por la asociación, ha sido demostrada indirectamente por cultivo en medios artificiales libres de nitrógeno y utilizando el método de Kjeldahl, así como también por la técnica de reducción del acetileno, o bien, directamente, por el uso de nitrógeno marcado ( $N^{15}$ ).

A pesar de que el helecho puede extraer el nitrógeno del medio acuático, el microsimbionte es capaz de obtener todo el nitrógeno necesario para ambos, por la fijación del  $N_2$ .

Se ha demostrado que el nitrógeno puede ser asimilado por ambas rutas simultáneamente, es decir, por fijación y por absorción sin perderse la actividad nitrogenásica (Peters

et al., 1976, 1981). Peters y Mayne (1974b) demostraron que aún después de 6 o 7 meses de crecimiento en un medio con nitrógeno, las frondas de Azolla aún mostraron actividad nitrogenásica. Contrariamente, experimentos con frondas libres del simbionte no fueron capaces de reducir el acetileno, confirmando que A. azollae es el responsable de la fijación del  $N_2$ . Por otra parte, estos mismos investigadores observaron que con el microsimbionte aislado sí hubo una reducción del acetileno.

Peters et al (1977) encontraron que el factor de conversión de etileno producido a partir de acetileno, a nitrógeno fijado es de 1.6-2.0 para la asociación, y de 2.5-3.0 para el microsimbionte, sin embargo trabajos más recientes (Peters et al., 1981) revelan que el factor de conversión encontrado es de 4. Watanabe et al (1978; citado por Buresh et al., 1980) asumieron un factor teórico de 4, basados en las siguientes ecuaciones:



Becking (1976; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) considera que la actividad nitrogenásica de la asociación, es de 12 a 20 veces mayor que la actividad de las algas azul verdes, fijadoras de  $N_2$  de vida libre.

Watanabe (1978) menciona que el máximo valor de la actividad nitrogenásica en la asociación, es de 90 micromoles de etileno por gramo de peso seco por hora y asume que si del

10 al 17% del nitrógeno total de la asociación lo representa A. azollae, la actividad del microsimbionte, en cantidad de nitrógeno contenido, es de 19 micromoles por gramo de peso seco por hora, lo cual es mucho mayor que la actividad, hasta ahora conocida, de Rhizobium en nódulos de soya (3.9 micromoles/hora). Este mismo autor menciona además que, bajo las mejores condiciones, el rendimiento debe ser de 10 mg. de N/día/g. de peso seco; con lo que, finalmente concluye que la asociación simbiótica Azolla-Anabaena azollae es la más eficaz en cuanto a fijación de nitrógeno.

Algunos autores (Bortels, 1940; Tuzimura et al., 1957; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) han encontrado que la adición de bajas concentraciones de nitrógeno (7 p.p.m.) aumenta el desarrollo de Azolla. Sin embargo, Peters y Mayne (1974b) notaron que la actividad nitrogenásica decreció en un 30% después de 35 días, y un 90% después de 6 a 7 meses en cultivos a los que se les adicionó de nitratos y urea.

Peters et al (1981) señalan que después de 5 semanas de cultivar A. caroliniana en un medio adicionado de amonio (2.5 mM), se encontró actividad nitrogenásica en un 70%.

Tung y Shen, (1980) revelaron que el fósforo es el principal macroelemento limitante en la actividad nitrogenásica de A. pinnata, además, encontraron que esta actividad es mayor en un medio de cultivo libre de nitrógeno (medio Watanabe), comparado con un suelo de jardín inundado con agua destilada, pero al adicionarle fósforo al suelo la actividad se duplicó

después de 2 días.

El microsimbionte no sólo fija nitrógeno, sino que también lo excreta; Peters et al (1977) usando nitrógeno marcado observaron que la distribución del nitrógeno fijado fué: 49.9% amonio extracelular, 6.4% amonio intracelular, 5.6% nitrógeno orgánico extracelular y 38.1% nitrógeno orgánico intracelular.

Se han realizado estudios para observar la actividad de la glutamino sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) en la asociación y se encontró que el 90 y 80% corresponde al macrosimbionte respectivamente, indicando con esto que la mayor cantidad del amonio producido es aprovechado por el helecho. Dado que el microsimbionte excreta amonio, es de esperarse que la actividad de la GS sea mayor en el helecho, especialmente en los pelos de transferencia.

Algunos autores mencionan que ciertas especies de Azolla liberan compuestos nitrogenados al medio acuático. Shen et al (1963; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) cita que una variedad China de Azolla liberó 14-21% del  $N_2$  fijado. Brill (1977; citado por Peters, 1977) menciona que un investigador de su laboratorio encontró una cepa de A. mexicana que excreta el 20% del  $N_2$  fijado. Sin embargo, Peters (1977) no encontró ningún compuesto nitrogenado en solución donde A. caroliniana fué cultivada.

#### 6) Azolla en la Agricultura

Existen informes muy antiguos del uso de Azolla en

la fertilización de arrozales tanto en Vietnam como en la República Popular de China. En nuestro país existe información sobre el uso de Azolla como abono verde en las chinampas, por los antiguos pobladores del valle de México, los cuales le llamaban "chilacastle", nombre que aún prevalece hasta nuestros días (Peña, 1978).

En Vietnam actualmente se fertilizan más de 800,000 has. de suelos de arrozal y en China 1,300,000 has. (Singh, 1979).

Lumpkin y Plucknett (1980) citan un estudio hecho por Shen et al, en el cual se comparó la incorporación de nitrógeno en el suelo con Azolla, alfalfa y soya. Se descubrió que 1.5 meses de cultivo de Azolla incrementó el contenido de nitrógeno del suelo en una medida igual a la producida por la soya, pero esto sólo representó un 40% comparada con la cosecha de alfalfa.

#### a) Rendimiento

Gopal (1967; citado por Moore, 1969) menciona un rendimiento máximo de 37.8 ton./ha. de peso húmedo, conteniendo 2.2 ton. de peso seco en un lapso de 3 meses. Tomando en cuenta que Azolla contiene de 4 a 5% de nitrógeno en peso seco, esto representa 90 Kg. N/ha. Karamyshev (1957; citado por Moore, 1969) cita un rendimiento, en Vietnam, de 50 ton./ha. en peso húmedo conteniendo 120-140 kg. N/ha. entre el tiempo de sembrado y el espigamiento del arroz.

En California, Talley et al (1977) encontraron rendimientos máximos de 0.98 ton./ha. en peso seco (24-45 Kg. N/ha.) con A. mexicana y 1.8-2.7 ton./ha. de peso seco (58-105

Kg. N/ha.) con A. filiculoides en 35 días.

En Dinamarca, 3 ton./ha. en peso seco (90 Kg. N/ha.) de A. filiculoides fueron señalados por Olsen (1972; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980). En 1973, Tran y Dao (citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) obtuvieron de 8-10 ton/ha. (25-50 kg N/ha.) de A. pinnata en peso húmedo.

Singh (1977) también indica un rendimiento de 8-10 ton./ha. en peso húmedo (30 Kg. N/ha.) para A. pinnata en la India. Singh, 1979, con un inóculo de 0.1-0.4 Kg/m<sup>2</sup> en peso húmedo, obtuvo un rendimiento de 8-15 ton./ha. en 8-20 días, en ensayos realizados en el campo, lo cual le dio un promedio de 347 ton./ha./año, estimando una captación de 868.5 Kg. N/ha./año. El mismo autor, usando tanques de cemento a los cuales adicionó suelo y agua encontró que fueron muy adecuados para la multiplicación de Azolla, estimando una cosecha anual de 321 ton./ha.

#### b) Fijación de N<sub>2</sub>.

Becking (1976) en base a un experimento llevado a cabo en Indonesia por la técnica de reducción del acetileno, estima una fijación de N<sub>2</sub> que oscila entre 62-125 Kg N/ha. Por otra parte, Moore (1969) considera un potencial de fijación de 100-160 kg N en 3-4 meses. Talley et al (1977) mencionan que A. filiculoides y A. mexicana producen 52 y 41 Kg N/ha, respectivamente, en 35 días bajo condiciones de campo, dando un promedio de 1.2 Kg N/ha/día.

Watanabe (1978) en un experimento en Filipinas que

duró 330 días consiguió un incremento de 460 Kg. N/ha. siendo el promedio de 1.4 Kg N/día y menciona que Azolla no necesita de la fase lag para la activación de la nitrogenasa después de su inoculación en el campo.

Los valores más altos de fijación potencial anual provienen de los dos países con mayor experiencia en el cultivo de Azolla. El instituto de Agricultura de Vietnam considera un potencial aproximado de 1000 Kg N/ha; y en China de 92-151 Kg N/ha, en 45 días y de 52.2 Kg N/ha en 30 días (Lumpkin y Plucknett, 1980).

Singh (1979) menciona que Dao y Tran en Vietnam estiman una fijación de 864 Kg. N/ha./año y en la India la estiman de 840 Kg. N/ha./año.

#### c) Efecto en el rendimiento del arroz

El principal enfoque que se le ha dado a la asociación ha sido su aprovechamiento en el cultivo del arroz. Experimentos realizados han demostrado que el uso de Azolla, incrementa el crecimiento del arroz; el número de espigas, el contenido proteínico y el rendimiento en grano y paja significativamente (Singh, 1979; Talley et al 1977, 1981).

Moore (1969) cita incrementos en los rendimientos arroceros de 14, 17, 22 y 40% con el uso de Azolla.

Talley et al (1977) observaron incrementos de 112% sobre el control, incorporando una capa de A. filiculoides (50 Kg/ha) en el suelo, y de 216% por la incorporación de una capa de Azolla y con una reinoculación simultánea al trasplante

del arroz (cultivo dual).

Experimentos practicados en Instituto Internacional de Investigaciones sobre el Arroz (IRRI), llevados a cabo por Watanabe (1978) indican que Azolla, creciendo conjuntamente con el arroz y su incorporación posterior a los 40 días después del trasplante, produjo un incremento del 12-25% (0.3-0.7 ton/ha) sobre el control no inoculado. En otro experimento publicado por el mismo autor, Azolla fué adicionada antes y después del trasplante del arroz. La combinación de inocular 4 veces antes del trasplante del arroz y la incorporación después del mismo, produjo un máximo de 36% (1.9 ton/ha) de incremento sobre el control.

Singh (1979), logró incrementar en un 54% (0.5-1.5 ton/ha) sobre el control, por la incorporación de una capa (10 ton/ha) de Azolla en el suelo, o bien permitiendo únicamente su descomposición sin incorporarla. Este mismo autor con una densidad de Azolla de 20 ton/ha, encontró un incremento de 69% (1.8 ton/ha) sobre el control. Estos mismos experimentos permitieron apreciar que el porcentaje de nitrógeno en el grano se incrementa en un 21% como máximo y en la paja en un 27%. No obstante, este investigador recomienda el uso de fertilizante nitrogenado inorgánico junto con Azolla para obtener más altos rendimientos en las cosechas. Por ejemplo, la adición de 10 ton/ha de Azolla más 40 Kg/ha de sulfato de amonio dio un incremento de 91% (2.4 ton/ha) sobre el control, lo cual es muy cercano a la adición de 80 Kg N/ha. de sulfato de amonio, el cual dio un incremento de 106% (2.79 ton/ha) sobre el control.

Talley et al (1981) obtuvo resultados similares, pues al adicionar pequeñas cantidades de nitrógeno en forma de Azolla (30 kg/ha) complementadas con la misma cantidad de sulfato de amonio observó incrementos similares a los que obtuvo adicionando 60 Kg de nitrógeno por hectárea en forma de sulfato de amonio. Sin embargo al aumentar la dosis de nitrógeno en forma de Azolla (60 Kg N/ha) más la misma dosis de sulfato de amonio, no se sumó el efecto de ambas fertilizaciones, logrando sólo un 71% en relación a la fertilización con 120 Kg N/ha de sulfato de amonio.

Científicos de la República Popular de China señalan incrementos en los rendimientos de arroz que varían de 0.4-158% con un promedio de 18.6% como resultado de 422 experimentos de campo (Lumpkin y Plucknett, 1980).

Recientes investigaciones (Liu et al., 1981) señalan que en China se han logrado rendimientos de arroz de 12-15 toneladas/ha. con el empleo únicamente de Azolla. Esto se ha logrado utilizando una técnica de sembrado del arroz en dobles hileras anchas y angostas.

Kulasooriya y de Silva (1977) registraron 132% de incremento en número de granos por panoja al fertilizar con Azolla, contra 95% observado al fertilizar con urea, con respecto al control no fertilizado.

Por otra parte, el Instituto de Suelos y Fertilizantes de la República Popular de China, publicó que Azolla empleada como abono verde disminuye la gravedad específica del suelo,

incrementa la porosidad (3.7-4.2%) y el contenido de materia orgánica. También se menciona que reduce la evaporación en un 11%, el contenido de sales en agua (0.012-0.049%) y suelo (0.014-0.048%) (Lumpkin y Plucknett, 1980).

d) Capacidad de Crecimiento

Azolla tiene un crecimiento exponencial que está sujeto a numerosas variables ambientales.

A. pinnata duplica su biomasa en 3-5 días, aunque en el campo esto ocurre en un período de 5-10 días (Watanabe, 1978). En el IRRI, Lumpkin y Plucknett (1980) observaron que A. pinnata duplica su peso en un tiempo de 2.8 días. Talley et al (1977) obtuvieron los mismos resultados con A. mexicana y de 7 días con A. filiculoides.

Tung y Shen (1980) observaron la duplicación de la biomasa de A. pinnata en un tiempo de 2.8 días en un medio artificial, y 5 días en un suelo inundado con agua destilada.

e) Composición Química

Según Lumpkin y Plucknett (1980) Azolla, en base seca tiene un contenido proteínico que varía de 13,16,22 y 23.4%.

Buckingham et al (1977; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) realizaron un análisis de aminoácidos en A. filiculoides, el cual indicó deficiencias de lisina; metionina e histamina. Además encontraron una relación en base seca de 9.3% de lignina y 15.2% de celulosa.

Fujiwara et al (1947; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) detectaron 23.8% de cenizas, 4.42% de grasa, 9.5% de

fibra y 6.38% de almidón en A. pinnata.

Por último, Varghese et al (1976; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) mencionan 9.7% de cenizas, 61% de carbohidratos, 6.3% de grasa cruda y 23% de proteína.

Peters (1977) encontró que A. caroliniana tiene diferentes relaciones C:N dependiendo de la fuente de nitrógeno en la cual fue cultivada, es decir 18.1 con N<sub>2</sub> únicamente, 15.4 con urea y 10.4-10.6 con nitratos y aire o argón.

Singh (1979) menciona que Azolla contiene un 4-5% de nitrógeno en base seca y 0.2-0.3% en base húmeda. Indica además, que recién cosechada contiene alrededor de 94% de humedad.

#### f) Descomposición

Muchos investigadores han observado mayores incrementos en la asimilación de nitrógeno por las plantas de arroz, cuando Azolla es incorporada en el suelo, que cuando se le deja descomponer en el agua (Talley et al, 1977; Watanabe, 1978; Singh, 1979). Sin embargo, hay inconsistencia en los informes sobre la velocidad de descomposición del helecho una vez que éste se ha incorporado al suelo, y el grado de mineralización y disponibilidad del nitrógeno hacia la planta.

Watanabe (1977) denota que el nitrógeno de Azolla es liberado lentamente, habiendo estimado que su disponibilidad para una cosecha de arroz fue de 70% comparada a la del nitrógeno del sulfato de amonio. Singh (1979) menciona que Azolla se descompone rápidamente y que su mineralización ocurre en

3 semanas. Este mismo autor cita que a temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  la mineralización es aún más rápida con lo cual se libera el 80% del nitrógeno contenido, de donde el 56% está en forma de amonio. Otros autores mencionan que 2/3 del nitrógeno total de Azolla son liberados después de 6 semanas, o en 5-8 semanas en suelos de arrozal (Watanabe et al., 1977) Tuzimura et al., 1957, citados por Lumpkin y Plucknett, 1980).

#### 7) Manejo Práctico en el Campo

En Asia, el cultivo de Azolla como abono verde se realiza básicamente en dos formas:

La primera es dejar un espacio de un 5-10% del total del suelo dispuesto para la siembra del arroz, para el cultivo de Azolla, y el doble de espacio si se proyectan dos cosechas de este cereal.

La segunda forma, consiste en que Azolla sea cultivada en los arrozales e incorporada al suelo durante intervalos antes y/o después de la cosecha y entre cosechas. Preferentemente, Azolla es desarrollada e incorporada varias veces antes del transplante de las plantas de arroz.

Cuando Azolla alcanza su máxima densidad y su desarrollo empieza a declinar, 1/2-1/3 de Azolla es retenido como "semilla" para la siguiente cosecha y el remanente es incorporado al suelo. En ambos métodos Azolla es generalmente desarrollada como cultivo dual, es decir, junto con el arroz (Lumpkin y Plucknett, 1980).

a) Densidad de Inoculación

La importancia en la densidad de inoculación es básica para obtener una producción de Azolla eficaz. Dado que se multiplica principalmente en forma vegetativa, su densidad debe ser tal que pueda multiplicarse varias veces hasta cubrir el área deseada captando la mayor cantidad de luz.

Los vietnamitas Tran y Dao (1973; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) recomiendan una densidad de inoculación de 0.5 Kg por metro cuadrado, con lo cual dependiendo de la época del año, obtienen 1-1.6 y 1- 1.4 Kg/m<sup>2</sup> en verano e invierno respectivamente. y en caso de que haya un desarrollo de algas en los cultivos de arroz, recomiendan emplear una densidad de siembra mayor del helecho (0.7-0.8 Kg/m<sup>2</sup>).

Singh (1979) usó densidades de 0.1-0.4 Kg/m<sup>2</sup> en peso fresco obteniendo, en un período de 8-20 días, de 8-15 tons. de material verde.

Talley et al (1977) mencionan haber inoculado con una densidad de 0.5 Kg/m<sup>2</sup> con A. mexicana y A. filiculoides en California.

b) Fertilización de Azolla

Azolla es notablemente susceptible a la carencia de fósforo, por lo que la aplicación continua de este elemento es necesaria para su rápida propagación.

Trabajos como los de Talley et al (1977) indican que la fertilización con KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (7.2 Kg P/ha) en 4 dosis iguales cada 7 días aumentó su desarrollo y concluyen que cada

Kg. de fósforo, resultó en más de 5 Kg. de nitrógeno fijado después de 35 días. Tran y Dao (1973; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) encontraron que 1 Kg. de  $P_2O_5$  (440 g. de P) fué equitativo a 2.2 Kg. de  $N_2$  fijado. Watanabe (1978) señala que 1 Kg. de  $P_2O_5$  produce más de 2 Kg. de  $N_2$  fijado con el empleo de Azolla.

Los vietnamitas recomiendan 5-10 kg. de superfosfato (1-2 kg. de  $P_2O_5$ /ha.) cada 5 días.

Shen et al (1963; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) ensayaron experimentos con 1.5, 3.0 y 6.0 Kg. de superfosfato (0.3, 0.6 y 1.2 Kg. de  $P_2O_5$ ) en parcelas de  $8.5 m^2$  y observaron un incremento en nitrógeno de 35, 76 y 190% respectivamente, después de 8 días.

Tuzimura et al (1956; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) en experimentos de lozas con lodo de  $0.5 m^2$  con 0.4 g. de inóculo observaron incrementos en peso, sobre el control sin fósforo, a diferentes dosis de fósforo: 69% con 20 kg. de  $P_2O_5$ /ha., 349% con 40 kg.  $P_2O_5$ /ha., 948% con 80 kg.  $P_2O_5$ /ha. y 879% con 160 kg.  $P_2O_5$ /ha. Singh (1979) recomienda una dosis de superfosfato de 4-8 kg. de  $P_2O_5$ /ha. por cosecha por semana.

Prayoon et al (1979) recomienda que en suelos donde existe fuerte fijación de fósforo, es aconsejable aplicar el fósforo en dosis fraccionadas, de tal manera que con 25 Kg. de  $P_2O_5$ /ha, aplicados en 5 dosis, obtuvieron el mejor rendimiento

de Azolla.

En suelos ligeros con poca cantidad de materia orgánica y nutrimentos minerales, Tran y Dado (1973; citados por Lumpkin y Plucknett, 1980) recomiendan la aplicación de 5 Kg de  $K_2O$  (4.1 Kg. de K) cada 5 días, y microelementos, aplicados como ceniza a razón de 100 Kg./ha. cada 5 días.

Singh (1977; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) usó 5-8 Kg de  $K_2O$  (4.1-6.56 Kg. de K/ha/semana) y 50 Kg/ha. de ceniza, además adicionó 0.125 Kg/ha. de molibdeno para estimular la fijación de nitrógeno.

#### 8) Enemigos de Azolla

Otro factor importante en el desarrollo de Azolla es el control de los insectos y las enfermedades del helecho.

Afortunadamente, los insectos que atacan al helecho son diferentes de los que atacan al arroz, además, muchos de los pesticidas usados para el arroz, inhiben el desarrollo de los parásitos de Azolla.

Los insectos atacan al helecho principalmente en épocas calurosas, cuando la temperatura sobrepasa los 28°C y cuando es época de lluvias.

Si no se toman medidas para el control de plagas, una cosecha de Azolla puede ser destruida en 3-5 días. Entre los principales insectos que la atacan se encuentran las larvas de mariposas del género Pyralis y Nymphula, las cuales infestan los lóbulos ventrales de las frondas, formando manchas café o blancas y usando como alimento a las mismas (Watanabe, 1978;

Wingh, 1979; Lumpkin y Plucknett, 1980).

Otro grupo de insectos muy destructivo de Azolla, lo constituyen los escarabajos y algunas especies de caracoles. También se han observado infecciones por hongos, pero no han logrado su identificación, sin embargo, en el IRRI se cree, tentativamente, que se trate de Penicillium spp.

Entre otras plagas del helecho se mencionan: ácaros (*Arrenurus*), gorgojos (*Stenopelmus*) y pulgones (sin mencionar el género del pulgón).

Para la prevención o tratamiento de estas plagas, los autores (Watanabe, 1978; Singh, 1977, 1979; Lumpkin y Plucknett, 1980) recomiendan el uso de pesticidas fosfatados orgánicos o clorados tales como "223" (DDT), "666" (BHC), Vofatoc y Furadan (Carbofuran).

Singh (1979) recomienda la aplicación de carbofuran en una concentración de 65 g./ha. y aconseja el uso de éste, únicamente en donde se observan las manchas características del parásito y no en el área total, con el objeto de minimizar su aplicación. Sugiere además, para la prevención de plagas, el uso de una cantidad pequeña de carbofuran (3-30 mg./kg. de Azolla) junto con el inóculo, con lo cual, tanto se protege por una semana a la cosecha del ataque de los insectos, como también se estimula el desarrollo del helecho.

#### 9) Otros Usos

Frecuentemente, Azolla se encuentra flotando en lagos, estanques, canales, acequias, charcos, etc., formando

gruesas capas conjuntamente con otras plantas acuáticas tales como Lemna, Eichhornia, Spirodella, Wolfia, Pistia, Salvinia, etc. (Singh, 1979; Watanabe, 1978).

En muchas regiones del mundo, estas densas capas interfieren en la pesca, impiden que el ganado beba agua, impiden el flujo de agua en acequias y bombas de agua y, en otros casos como en Hawai y Maryland, interfieren en el cultivo del berro (Lumpkin y Plucknett, 1980).

En algunos países como Japón, algunas veces, se le ha considerado como una maleza, dado que su crecimiento es tan vertiginoso después del trasplante, que dificulta el desarrollo de las plántulas de arroz. También los chinos y vietnamitas reconocen que ciertas cepas de Azolla son consideradas como maleza. Sin embargo, otros autores indican el uso de cepas que desarrollen a lo largo de todo el año (Watanabe, 1978; Peters, 1977).

Contrario a lo citado anteriormente, hay informes en los que se cataloga Azolla como un supresor de malezas. Nguyen (1930; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) encontró que una densa capa de Azolla causó la muerte de Utricularia flexuosa, Echinochloa crusgalli y especies de Sagitaria. En un lago en Dinamarca, se observó que Azolla desplazó a Lemna (Olsen, 1972; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980).

Talley et al (1977) observaron el beneficio de Azolla cuando se desarrolló en cultivo dual, al suprimir el desarrollo de malezas en el arroz.

Por otro lado, el empleo de Azolla ha sido muy versátil ya que ha servido como alimento para ciertos peces (carpas) en Asia y Africa.

También hay informes sobre el uso de Azolla como forraje para cerdos, ganado, patos, pollos (Lumpkin y Plucknett, 1980) pues dado su alto contenido proteínico, su valor nutritivo es muy considerable.

Tran y Dao (1973, citado por Lumpkin y Plucknett, 1980) menciona que Azolla puede producir de 540-720 Kg. de proteína por hectárea por mes.

Abundando en el uso de Azolla, algunas tribus de Africa la utilizan como ingrediente en su dieta (Chevalier, 1926; citado por Lumpkin y Plucknett, 1980). En apoyo a lo anterior, el Dr. Singh (1979) menciona que Azolla cultivada en condiciones higiénicas, puede servir para el consumo humano, ya que el mismo la ingirió en diferentes formas, concluyendo que su sabor es agradable y no causa dificultades digestivas, por lo que está tomando medidas para popularizar su consumo a nivel humano en la India.

### III) MATERIALES Y METODOS

#### A) Suelos

##### 1) Colecta de Suelos

Se colectaron suelos utilizados para el cultivo rotatorio arroz-caña de azúcar del Campo Agrícola Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, en el Municipio de Zacatepec del Edo. de Morelos. Las muestras pertenecen al área de experimentación conocida como "tabla 2". Las 4 muestras colectadas se tomaron de la capa arable (0-30 cms.). Posteriormente fueron secadas al aire y tamizadas (malla # 16).

##### 2) Tratamiento de los suelos: Suelo normal, empobrecido y estéril

Las 4 muestras colectadas se mezclaron y homogeneizaron perfectamente y se dividieron en 3 partes iguales; una se empobreció con una siembra masiva de 15 g. de semilla de cebada por cada 2 kg. de suelo. Otra de las porciones se esterilizó con radiaciones gama (Cawse, 1975) a una dosis total de 4 megarad, y la última se dejó intacta, clasificándola como suelo normal.

##### 3) Determinaciones físicas y químicas del suelo

Textura: según el método de Bouyoucos (1963)

Reacción del suelo pH: se determinó con suspensión del suelo-agua destilada, en relación 1:2.5, utilizando un potenciómetro marca Corning.

Calcio, magnesio y potasio intercambiables: extrayendo éstos del suelo, con una solución de acetato de amonio 1 N pH 7, por centrifugación y titulando con EDTA.

Fósforo asimilable: colorimétricamente, según el método Bray I (Jackson, 1964).

Materia orgánica (M.O): por combustión húmeda, según el método de Walkley y Black modificado (Jackson, 1964).

Nitrógeno Total (N.T.): por digestión de Kjeldahl, sin incluir nitratos (Brenner, 1965).

Nitratos: por el método de la brucina (Moreno, inédito).

#### B) Estudios Microbiológicos del Suelo

La estimación cuantitativa de las bacterias que intervienen en el ciclo del nitrógeno, se hizo en suelo húmedo por el método de las diluciones en tubo por triplicado, y en placa para los fijadores de nitrógeno de vida libre, utilizando, en el primer caso, las tablas de Mc Crady (1946) para obtener el número más probable (NMP).

- 1) Amonificantes: Se incubaron durante 12 días en el medio de Katzneison (1946).
- 2) Nitrosomonas y Nitrobacter: Se incubaron durante 20 días en el medio propuesto por Barkworth y Bateson (1965).
- 3) Desnitrificantes: Se incubaron durante 8 días en el medio propuesto por Timonin (1946).
- 4) Fijadores de vida libre: Se incubaron durante 14 días en el medio de Lipman, citado por Rubenchik (1963).

- 5) Algas azul-verdes heterocísticas: Se incubaron durante 30 días en el medio de Hughes, Corham y Zehnder, modificado por Allen y Stanier (1968).

La temperatura de incubación fué de 28°C, a excepción de las algas que se incubaron a 35°C, bajo lámparas de "luz de día" de 40 watts, con una intensidad luminosa de 3,500 lux, sin períodos de oscuridad.

### C) Algas Azul-Verdes

#### 1) Aislamiento.

El aislamiento de las algas azul-verdes heterocísticas se logró en las diluciones más altas ( $10^{-5}$ ), y por resiembras sucesivas en medios sólidos y líquidos (Allen y Stanier, 1968), hasta la obtención de cultivos unialgales, bajo una temperatura de 35°C que, según estos autores, es selectiva para las cianofitas. Las condiciones de iluminación se describieron anteriormente.

#### 2) Cepas

Se seleccionaron dos cepas nativas y dos de colección, estas últimas fueron obtenidas de la Culture Collection of Algae de la Universidad de Texas y fueron Anabaena cilíndrica B 385 y Anabaena variabilis B 373. En todos los ensayos se utilizaron cultivos no axénicos. La selección de las cepas nativas se hizo en base al tamaño y abundancia de los heterocistos.

El inóculo fué, en todos los casos, de 0.5 ml. equivalente a 1.8 mg. en peso seco, de cultivos en la fase de crecimiento logarítmico. La medición del inóculo se hizo por cen-



Fig. 1.- Cámara de crecimiento para las algas azul-verdes.

trifugación y desplazamiento de volúmen en agua destilada (Palacios, 1980).

### 3) Curvas de Crecimiento

Las curvas de crecimiento se determinaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml. con un volúmen de medio de cultivo de 100 ml., bajo las mismas condiciones de luz y temperatura, además con burbujeo de aire generado a razón de 300 burbujas por minuto.

La biomasa en peso seco fué medida depositándose en papel filtro y dejando secar el material a 40-45°C hasta peso constante.

Las determinaciones de proteína en cada punto de la curva se hicieron por la técnica de semimicro-Kjeldhal (Brenner, 1965), siendo de 5 días el período entre cada punto de la curva.

### 4) Desecación

Para la prueba de resistencia a la desecación, se dejaron secar al aire, durante 3 meses, las 4 muestras colectadas para posteriormente cuantificar la población de cianofitas heterocísticas por los mismos métodos mencionados anteriormente y bajo las mismas condiciones.

### 5) Congelación

Se congelaron las 2 cepas de colección y las 2 nativas a una temperatura que varió de -4 a -18°C durante 30 días en frasquitos de 7 ml. de capacidad. Posteriormente se descon-

gelaron y se incubaron bajo condiciones óptimas. La prueba se hizo por cuadruplicado para cada cepa.

#### 6) Ensayos en Invernadero

Se utilizaron 50 g. de cada suelo, inundados con 60 ml. de agua destilada, en recipientes de 100 ml. Los tratamientos fueron con la inoculación de las 4 cepas en cada suelo.

Al final del tiempo de incubación (15 días), el material verde se mezcló y dejó secar durante 3 semanas para, posteriormente, determinar la incorporación de materia orgánica.

El nitrógeno total y el % del incremento de materia orgánica y nitrógeno total se calculó en base a la cantidad de nitrógeno contenido en la materia orgánica (Jackson, 1964).

#### 7) Actividad nitrogenásica.

Fue evaluada por la técnica de la reducción del acetileno (Dart *et al.*, 1972; Turner y Gibson, 1980) en frascos de 60 ml., sellados con tapones de goma, conteniendo 5 ml. de medio de cultivo libre de nitrógeno en un caso, y 5 g. de suelo con 6 ml. de agua destilada en el otro.

La proporción de acetileno fue, aproximadamente, al 10%; el acetileno se obtuvo a partir de carburo de calcio. Se incubaron las muestras durante 1 hr. con una intensidad luminosa de 5,800 lux, producida por lámparas de luz de día. La temperatura fue de 28-30°C.

Se usó un cromatógrafo de gas marca Varian Aerograph 1400, equipado con una columna de 3 m. de longitud empacada

con Porapak T y con un detector de ionización de flama. La temperatura de la columna fué de 90°C y de 120°C para el inyector y detector. Se utilizó una mezcla estándar de 100 p.p.m. de etileno-nitrógeno y, en todos los casos, alícuotas de 1 ml.

D) Azolla.

1) Ceba

Las muestras de Azolla fueron colectadas en diciembre de 1980 de una acequia del poblado de Mixquic, D.F. en México. El estudio microscópico de los esporocarpos, obtenidos de plantas cultivadas en medio de cultivo libre de nitrógeno (Allen y Stanier, 1968) permitió, 2 semanas más tarde, la identificación de la especie.

2) Ensayos de Invernadero

a) En medio de cultivo.- Los ensayos se realizaron en recipientes de 100 ml., conteniendo 30 ml. del medio del cultivo libre de nitrógeno a pH 8.

Se ensayó el efecto de diferentes dosis de roca fosfórica (con un promedio de 17 p.p.m. de fósforo soluble) y fósforo soluble, variando el pH y la fuente de nitrógeno.

b) En suelo.- Se utilizaron 50 g. de cada suelo (pH 8) inundados con 60 ml. de agua destilada. Los tratamientos fueron con superfosfato triple, roca fosfórica y molibdeno.

Al final del tiempo de incubación (15 días), el material verde de cada tratamiento, se mezcló e incorporó, dejándose secar durante 3 semanas, para posteriormente, determinar la materia orgánica en los suelos (Jackson, 1964).

### 3) Actividad Nitrogenásica

Se estimó bajo las mismas condiciones y con el mismo equipo utilizado con las algas azul-verdes, a excepción de que en Azolla, se estimó el efecto del pH en la capacidad de fijación del nitrógeno entre ejemplares recién colectados (un día antes de la determinación) y ejemplares mantenidos bajo cultivo (pH 8) durante más de 30 días.

### E) Análisis Estadístico

El análisis estadístico de las bacterias del ciclo del nitrógeno se llevó a cabo por medio de las pruebas de Análisis de Varianza no paramétricas de Kruskal-Wallis, dado que las varianzas de cada grupo no pudieron suponerse que eran iguales, además de que los datos no presentaron una distribución que se haya aproximado a la normal.

El análisis estadístico en la inoculación de los suelos con las cianofitas heterocísticas y Azolla filiculoides se realizó por el análisis de varianza con programas desarrollados en el Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas de la UNAM (IIMAS).

#### IV) RESULTADOS Y DISCUSION

##### Suelos

En la tabla 1 se muestran los resultados de algunos de los análisis físicos y químicos de las 4 muestras colectadas, encontrándose una mayor retención de humedad en las muestras 3, 2 y 4. Los valores de conductividad eléctrica resultaron bajos. El Ca, Mg y K intercambiables se encontraron con valores altos y los nitratos fueron altos (29 p.p.m.) y medios (18.7 p.p.m.).

La tabla 2 reúne los resultados de los análisis de los suelos normal y empobrecido, los cuales se pueden interpretar de la manera siguiente:

El suelo posee una textura fina, un pH moderadamente alcalino, valores altos de capacidad de intercambio catiónico total (C.I.C.T.), Ca, Mg y K intercambiables con valores altos, valores muy bajos en fósforo, moderadamente rico en materia orgánica (M.O.), pobres en nitrógeno total y los nitratos, en suelo normal y empobrecido, con valores medios y ligeramente bajos, respectivamente.

##### Microflora del ciclo del nitrógeno de los suelos

La estimación cuantitativa de la microflora del ciclo del nitrógeno fué estadísticamente significativa únicamente con el género Nitrobacter en las 4 muestras del suelo de experimentación (tabla 3). Esto indica que su población en estos suelos resultó relativamente homogénea. En términos generales, los valores de población microbiana resultaron comparables a

los estimados por Morales (1977) en suelos cañeros de Veracruz.

En algunos casos se pudo apreciar una correspondencia entre la proporción de algunos nutrimentos y algunos grupos microbianos (tablas 1 y 3). La tabla 3 muestra los resultados de los análisis microbiológicos, encontrándose que los valores más altos de Nitrosomonas y algas azul-verdes heterocísticas (5,500 y 316/g. de suelo seco, respectivamente), corresponden a la muestra de suelo con mayor contenido de calcio (74 meq/100 g.; muestra 1), sugiriendo que este elemento, como ha sido considerado por Barkworth y Bateson (1965) y Allen y Arnon (1955), juegan un papel importante en el desarrollo de estos microorganismos.

Por otro lado, el valor más alto de nitratos, detectado en la muestra 3 (29 p.p.m.), corresponde a la mayor población de desnitrificantes con 24,833/g. de suelo seco. Contrariamente, los fijadores de nitrógeno de vida libre se vieron disminuidos en esta misma muestra (1,986/g. de suelo), así como también las algas azul-verdes heterocísticas (113/g. de suelo seco).

El número de algas azul-verdes heterocísticas resultó muy bajo comparado con lo que se menciona en la literatura, sin embargo, es necesario hacer notar que, los datos citados por otros autores (Roger y Reynaud, 1976; Bhuiya et al., 1981 y Catling et al., 1981), no corresponden únicamente a cianofitas heterocísticas.

## Aislamiento y experimentación con cianofitas

Las cepas aisladas se seleccionaron en base a la abundancia y tamaño de los heterocistos. Las diferencias dimensionales y morfológicas se reúnen en la tabla 4, y figuras 2 y 3, respectivamente.

Anabaena cylindrica: Fase lag de 7 días. Fase log de 7 días. Fase estacionaria de 14 días y apreciación de la fase de muerte. Producción de proteína de 18 mg. (fig. 4).

Anabaena variabilis: Fase lag de 14 días. Fase log de 14 días. Fase estacionaria de 2 días y apreciación de la fase de muerte. Producción de proteína de 37 mg. (fig. 5).

Nostoc commune (1): Fase lag 14 días. Fase log 21 días. No se apreció la fase estacionaria durante el tiempo de incubación. Producción de proteína de 37 mg. (fig. 6).

Nostoc commune (2): Fase lag no observada. Fase log de 28 días. Fase estacionaria de 2 días y apreciación de la fase de muerte. Producción de proteína de 54 mg. (fig. 7).

La velocidad de crecimiento de Nostoc commune 2 fue mayor en todos los puntos de la curva, a excepción del último, ya que Nostoc commune 1 obtuvo un valor mayor en peso seco en este punto. Esto se debe, probablemente, a que la cepa de Nostoc commune 2 no presentó la fase lag.

El máximo rendimiento de Nostoc commune 1 se obtuvo a los 35 días (168 mg. de peso seco y 52 mg. de proteína). El de Nostoc commune 2 se obtuvo a los 28 días (183 mg. de peso seco y 54 mg. de proteína). El de Anabaena cylindrica se obtuvo

a los 21 días (63 mg. de peso seco) y la proteína a los 14 días (19 mg.). El de Anabaena variabilis a los 28 días (91 mg. de peso seco y 37 mg. de proteína). Por lo anterior, se apreciaba claramente que el mayor rendimiento, en los parámetros estudiados, se verificó con las cepas aisladas.

En ambas cepas de Anabaena y en Nostoc commune 2, se observó la fase de muerte, sin embargo, esto no ocurrió con Nostoc commune 1, lo cual quizá indica una mayor potencialidad de crecimiento y producción de proteína en esta última cepa. Sin embargo, la proporción de nitrógeno con respecto al peso seco fue más alto en la cepa de A. variabilis.

Allen y Arnon (1955) informan que A. cylindrica, con un inóculo de aproximadamente 50 mg./100 ml., multiplicó 10 veces su biomasa en 6 días (500 mg./100 ml.); en el presente trabajo, el inóculo de cada cepa fue de 1.8 mg./100 ml., habiéndose obtenido en 7 días una biomasa de 8.7 y 49 mg. con N. commune (1) y (2) respectivamente, y 25 y 9.6 con A. cylindrica y A. variabilis respectivamente, por 100 ml. de medio de cultivo; esto corresponde a un incremento de 4.8, 27, 13.8 y 5 veces su biomasa, respectivamente.

En el suelo desecado al aire durante 3 meses se detectó una disminución en la población de cianofitas heterocísticas, tabla 5. Estos valores representan 1/3 y 1/6 de los propágulos estimados en las muestras de suelo 1 y 3, respectivamente, antes de ser desecadas.

El valor más alto de propágulos de cianofitas hete-

rocísticas (muestra 1), y el más bajo (muestra 3) en la prueba de desecación del suelo corresponden, proporcionalmente, con aquéllos detectados en los suelos recién colectados (tabla 5).

La temperatura de congelación afectó, en diferente medida, a todas las cepas ensayadas. En la tabla 6 se aprecia que únicamente las cepas aisladas conservaron su viabilidad después de la congelación. Dos cultivos de Nostoc commune (1) y uno de Nostoc commune (2) conservaron el color azul verdoso característico y desarrollando biomasa una semana después del período de congelación; desapareciendo el color en la cepas que no se reactivaron nuevamente. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Witty (1979), respecto a la viabilidad de cianofitas heterocísticas bajo temperaturas de congelación (0 a -18°C) durante 6 horas.

El efecto de la inoculación de los suelos con las algas se aprecia en la tabla 7. En los tres suelos y con todas las cepas, el incremento de materia orgánica y nitrógeno total resultó estadísticamente significativo con respecto al suelo no inoculado.

La más alta respuesta se verificó con N commune (1) en el suelo empobrecido, con un 23.6% de incremento de materia orgánica y nitrógeno total, siendo estadísticamente significativo a un valor de  $p = 0.01$  con respecto al suelo empobrecido que no fué inoculado (B0). Los valores obtenidos con esta misma cepa en suelo normal y estéril fueron 15.3 y 21.9, respectivamente.

Los resultados nos permiten considerar que las cepas nativas, particularmente Nostoc commune 1, resultaron superiores a las cepas de colección, quizás por su mayor capacidad de adaptación al suelo del cual precisamente fueron aisladas. Sin embargo, Anabaena variabilis, obtuvo la mayor tasa de fijación de  $N_2$  en suelo, lo cual se refleja en una mayor mineralización del nitrógeno incorporado al suelo (28.7 p.p.m. de  $NO_3^-$ , tabla 8).

Los datos sobre la capacidad de fijación de  $N_2$ , a través de la técnica de la reducción del acetileno, se reúnen en la tabla 9. En medio de cultivo libre de nitrógeno, Nostoc commune 1, redujo la mayor cantidad de acetileno (1.95 nmoles/mg. de proteína/min.); sin embargo, el cultivo en suelo de Anabaena variabilis fue con el que se obtuvo la tasa más alta de acetileno reducido (2.13 nmoles/mg. de proteína/min.). Comparando con los datos que citan otros autores, se puede considerar que nuestros valores de etileno producido caen en los rangos aceptables de actividad nitrogenásica en estos microorganismos. Granhall (1975) señala rangos de 0.22-3.87 nmoles de etileno/mg. de proteína/min., y Li Shang (1981) informa que, en general, los rangos de producción de etileno varían entre 1.3-3.8 nmoles/mg. de peso seco/min.; el mismo autor menciona que, excepcionalmente, algunas cepas han llegado a producir hasta 5.8 nmoles/mg. de peso seco/min., esto desde luego varía según la cepa.

### Experimentación con Azolla

Con el análisis microscópico de los esporocarpos se logró la identificación de la especie Azolla filiculoides.

Las figuras 9 y 10 muestran los massulae y los glochidia que según Godfrey et al (1961) y Correl y Correl (1972) deben carecer de septos o bien raramente se observan en la punta de los glochidia en la especie A. filiculoides.

Se logró además identificar un pelo de transferencia (fig. 11) según lo describen Duckett et al (1975) y Lumpkin y Plucknett (1980) y que, de acuerdo entre otros autores, a Duckett et al (1975), Watanabe (1978), Lumpkin y Plucknett (1980) y Peters et al (1981), es el sitio donde ocurre el intercambio de nutrimentos entre ambos simbioses.

En las tablas 10, 10a, 11 y 12 se resumen los resultados del crecimiento de Azolla en medio de cultivo y suelo inundado. Los máximos valores de biomasa obtenidos fueron de 27.2 mg. en medio de cultivo en 30 días y de 40.8 mg. en suelo inundado durante 15 días. Esto indica una diferencia en biomasa de 13.6 mg., haciéndose notar que, en el suelo inundado, la biomasa se obtuvo en la mitad del tiempo de la obtenida en el medio de cultivo.

En la tabla 10a se manifiesta claramente que el pH juega un papel fundamental en la solubilidad y asimilación de la roca fosfórica y fósforo soluble. Se puede apreciar que a pH 6 existe el mayor valor de solubilización y la mayor asimilación. Esto se refleja en el crecimiento de Azolla (tabla 10), donde encontramos una respuesta significativa a pH 6 con

respecto a pH 8, con ambas fuentes de fósforo.

No obstante que en la literatura existen datos acerca de que la roca fosfórica no es muy efectiva como fuente de P para Azolla (Watanabe, 1978) en la tabla 11 se puede apreciar que Azolla respondió significativamente a la roca fosfórica, habiéndose obtenido un 120% de incremento en peso seco en comparación con un 36% de incremento obtenido con  $K_2HPO_4$ . En esta misma tabla se puede apreciar que en ningún caso, la adición de una fuente de nitrógeno combinado ( $KNO_3$ ) resultó estadísticamente significativa para el desarrollo de Azolla filiculoides.

Considerando los resultados sobre el efecto de la adición de pequeñas cantidades de nitratos para el cultivo de Azolla (tabla 11) se decidió experimentar en un suelo empobrecido en nutrimentos, particularmente en nitratos, y en un suelo estéril, donde se pensó que se eliminaría la competencia de la microflora, principalmente por el fósforo. Los resultados se reúnen en la tabla 12, apreciándose que Azolla siempre dio una respuesta altamente significativa en el suelo empobrecido y con cualquier dosis de P, en comparación con el suelo normal y estéril. Esto nos conduce a pensar que el suelo, al tener una alta capacidad para mineralizar el nitrógeno, contiene cantidades suficientes de este elemento como para inhibir el desarrollo del helecho.

La estimación de nitratos en el suelo empobrecido e incorporado con Azolla nos permite apreciar la cantidad de nitrógeno orgánico mineralizado después de la incubación del

suelo. Los resultados concuerdan con los datos de la tabla 12 sobre el efecto del P en el crecimiento de Azolla. Los más altos valores de nitratos corresponden al máximo % de incremento en nitrógeno y peso seco (tabla 14). Se puede inferir que la flora mineralizadora del suelo se vio considerablemente estimulada por el nitrógeno incorporado por Azolla en el suelo.

No se detectó una diferencia significativa en la incorporación de nitratos por Azolla entre los tratamientos con P, pero sí se apreció una diferencia considerable entre el suelo empobrecido sin Azolla no incubado y los suelos tratados con Azolla e incubados.

Cabe resaltar que los resultados estadísticos en la incorporación de materia orgánica se hicieron tomando por separado los tratamientos de fósforo, fósforo más molibdeno y fósforo sin molibdeno.

Los resultados de la tabla 13 demuestran que, en promedio, el mayor rendimiento se obtuvo en el suelo empobrecido, principalmente en el tratamiento con roca fosfórica, en donde se aprecian las diferencias significativas más fuertes ( $p=0.01$ ) con respecto a los mismos tratamientos en los otros suelos.

En el suelo normal, todos los tratamientos con fósforo fueron fuertemente significativos, al compararse con el tratamiento de Azolla sin fósforo (A0).

En el suelo estéril se detectó un efecto altamente significativo en el tratamiento con la dosis menor de super-

fosfato triple (50 Kg/ha) comparada con el tratamiento (Ao) Azolla sin fósforo. Por último, en los experimentos con cada suelo, existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar los tratamientos (Ao) Azolla sin fósforo, con respecto a los testigos ( $T_A$ ,  $T_B$ ,  $T_C$ ) sin Azolla. Esto indica que la adición de Azolla a los suelos, incrementa significativamente el contenido de materia orgánica y nitrógeno, lo cual coincide con los hallazgos de Singh (1979) y los informes del Instituto de Suelos y Fertilizantes de la República Popular de China (Lumpkin y Plucknett, 1980).

Las pruebas de fijación de  $N_2$  (tabla 15), resultan congruentes con los resultados obtenidos en los ensayos de invernadero (tablas 10, 11 y 12). Los valores más altos de producción de etileno (0.08 nmoles/mg. peso seco/min.) corresponden a los cultivos en suelo, y los valores más bajos (0.05 nmoles/mg. peso seco/min.) a los cultivos en medio libre de nitrógeno y al helecho recién colectado en ese mismo medio de cultivo. Es interesante hacer notar que la mayor tasa de reducción de acetileno, corresponde al cultivo en suelo empobrecido. Por otra parte, la evaluación de este mismo parámetro en la muestra del helecho recién colectado y en aquella que había sido mantenida en medio libre de nitrógeno (pH 8) durante más de 30 días, hace pensar que no es necesario que haya una fase lag antes de la activación de la fijación de  $N_2$ , confirmando lo establecido por Watanabe, 1978.

Tung y Shen (1980) obtuvieron con A. pinnata una mayor actividad nitrogenásica en cultivos libres de nitrógeno,

al comparar con lo que obtuvieron en suelos de jardín inundados con agua destilada. Lo anterior nos permite considerar que, muy probablemente, los suelos de jardín utilizados por estos autores fueron ricos en nitrógeno, causa por la cual obtuvieron con ellos una menor actividad nitrogenásica. En el presente trabajo se pudo apreciar que, en todos los ensayos, los rendimientos más altos en el crecimiento de Azolla y en su actividad nitrogenásica, precisamente corresponden a los cultivos con suelo empobrecido.

Los valores de reducción de acetileno encontrados en la cepa objeto de este ensayo (0.05-0.08 nmoles de etileno/mg. de peso seco/min.) quedan dentro de los valores más bajos mencionados en la Literatura, los cuales oscilan entre 0.55-3.8 nmoles de etileno/mg. de peso seco/min. (Lumpkin y Plucknett, 1980). El análisis de nitrógeno total fué bajo (2.71%), y coincide con su baja tasa de fijación de  $N_2$ , comparados con los porcentajes de 4-5% de nitrógeno total citados por Talley et al., 1981; Singh, 1979 y Peters et al., 1981.

TABLA 1.- DETERMINACIONES FISICAS Y QUIMICAS EN SUELOS DE LA CAPA ARABLE

Muestras	Humedad %	pH H <sub>2</sub> O 1:2.5	C.E. mhos/cm <sup>3</sup>	CATIONES INTERCAMBIABLES mg/100 g			M.O. %	N.T. %	N-NO <sub>3</sub> ppm	P Asimilable ppm
				Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	N <sup>+</sup>				
1	20.4	7.9	0.75	74.0	10.5	0.95	2.10	0.133	18.7	2.30
2	28.7	7.9	0.60	62.0	22.0	0.85	1.69	0.092	18.7	1.75
3	26.7	8.0	0.56	46.5	14.5	0.97	1.90	0.089	20.8	1.65
4	32.5	8.0	0.72	48.0	12.5	0.85	1.72	0.086	18.7	1.30

Nota:

C.I.C.T. = Capacidad de Intercambio catiónico total

N.T. = Nitrogeno total

M.O. = Materia orgánica

Rel. C/N = Relación carbono/nitrogeno

C.E. = Conductividad Eléctrica

D.A. = Densidad Aparente

Tabla 2.- ALGUNAS PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LOS SUELOS DE EXPERIMENTACION

Suelo	Profundidad cm	Textura			D.A.	pH		C.I.C.T. Meq/100 g.	K Soluble p.p.m.	Fósforo		M.O. %	N-NO <sub>3</sub> p.p.m.	N.T. %	Rel. C/N
		Arena	Limo	Arcilla		1:2.5	C.E.			Asimilable	p.p.m.				
Normal	0-30	32	23	45	1.14	8.0	0.63	86.7	9.4	1.0	2.77	20.8	0.100	15.9	
		Limo Arcilloso													
Blanqueado	0.30	32	23	45	1.14	8.0	0.36	85.2	9.4	0.85	2.62	12.5	0.098	15.6	

Tabla 3.- Estimación de la microflora del ciclo de nitrógeno en la capa arable de los suelos.

Microorganismos (repeticiones)	NMP (Número Más Probable) de microorganismos/gr de suelo seco			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
<b>AMONIFICANTES</b>				
1	45,000	15,000	45,000	150,000
2	95,000	20,000	20,000	45,000
3	250,000	95,000	45,000	450,000
$\bar{x}$	130,000	43,333	36,666	215,000
<b>Nitrosomas sp.</b>				
1	2,500	450	2,500	2,500
2	9,500	4,500	2,500	2,500
3	4,500	950	2,500	2,500
$\bar{x}$	5,500	1,966	2,500	2,500
<b>Nitrobacter sp.</b>				
1	950	4.5	0.7	0.0
2	950	4.5	0.9	0.0
3	950	9.5	3.0	0.4
$\bar{x}$	950	6.16	1.53	0.13
<b>DESNITRIFICANTES</b>				
1	2,500	2,500	45,000	2,000
2	11,500	4,500	4,500	2,000
3	2,000	1,600	25,000	1,150
$\bar{x}$	5,333	2,866	24,833	1,716
<b>ALGAS CIZMOFITAS CON HETEROCISTOS</b>				
1	250	75	95	150
2	450	150	150	150
3	250	150	95	250
$\bar{x}$	316	125	113	183
<b>BACTERIAS FIJADORAS LIBRES DE NITROGENO</b>				
1	3,300	4,130	1,400	2,600
2	2,360	3,430	2,100	1,260
3	2,460	3,430	2,460	2,630
$\bar{x}$	2,706	3,663	1,986	2,163

Tabla 4.- DIFERENCIAS DIMENSIONALES ENTRE LAS CEPAS AISLADAS (MICRAS)

	<u>N. commune (1)</u>			<u>N. commune (2)</u>			Promedio	
	Largo	Promedio	Ancho	Promedio Largo	Promedio	Ancho		
Oóbulas Vegetativas	3.5-7.5	5.0	4.5-6.0	5.0	3.5-7.5	5.0	4.5-6.0	5.0
Heterocistos	5.5-11.0	7.2	5.0-7.5	6.1	4.0-9.0	7.0	4.5-8.0	6.4
Esporas	8.0-22.0	12.6	5.0-7.5	5.9	7.0-11.0	8.5	5.0-9.0	6.5

Promedio de 100 mediciones.

Tabla 5.- EFECTO DE LA DESECACION DEL SUELO EN LA ESTIMACION DE PROPAGULOS VIABLES DE CIANOFTAS HETEROCISTICAS.

Tipo de suelo	Número de propágulos/gr de suelo seco			
	S U E L O S			
	1	2	3	4
Desecado	95	45	15	25
Fresco	316	125	113	183

Tabla 6.- EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONGELACION EN LA VIABILIDAD DE LOS CULTIVOS DE CIANOFITAS.

Cepas	Número de cultivos viables de una serie de 4
<u>A. cylindrica</u>	0
<u>A. variabilis</u>	0
<u>Nostoc commune</u> (1)	2
<u>Nostoc commune</u> (2)	1

Temperatura promedio = - 11°C  
(30 días de congelamiento)

Tabla 7.- EFECTO DE LA FERTILIZACION DE SUELOS DE ARROZAL UTILIZANDO ALGAS AZUL VERDES EN LA INCORPORACION DE MATERIA ORGANICA Y NITROGENO TOTAL.

Ceapa	M.O. (%)	Incremento de M.O. (%)	Nitrógeno Total (%)	% del incremento de M.O. y N.T.
Suelo Normal (A)				
A <sub>1</sub>	2.65	0.35	0.13	15.2
A <sub>2</sub>	2.66	0.36	0.13	15.5
A <sub>3</sub>	2.65	0.35	0.13	15.3
A <sub>4</sub>	2.63	0.33	0.13	14.1
A <sub>0</sub>	2.30	—	0.11	—
Suelo Espobrecido (B)				
B <sub>1</sub>	2.63	0.40	0.13	17.6
B <sub>2</sub>	2.63	0.40	0.13	17.6
B <sub>3</sub>	2.76	0.53	0.14	23.6
B <sub>4</sub>	2.60	0.37	0.13	16.6
B <sub>0</sub>	2.23	—	0.11	—
Suelo Estéril (C)				
C <sub>1</sub>	2.56	0.36	0.13	15.6
C <sub>2</sub>	2.43	0.23	0.12	10.4
C <sub>3</sub>	2.68	0.48	0.13	21.9
C <sub>4</sub>	2.68	0.48	0.13	21.9
C <sub>0</sub>	2.20	—	0.11	—

Medida de la Temperatura 24.7°C

Los valores obtenidos son medias de 3 repeticiones.

Estadísticamente significativo p = 0.05 \* p = 0.01 \*\*

A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>4</sub> vs. A<sub>0</sub> \*

B<sub>3</sub> vs. B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>0</sub> \*

B<sub>3</sub> vs. B<sub>0</sub> \*\*

C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>1</sub> vs. C<sub>0</sub> \*

1 = Anabaena cylindrica

2 = Anabaena variabilis

3 = Nostoc commune (1)

4 = Nostoc commune (2)

0 = Sin ceapa.

Tabla 8.- DETERMINACION DE NITRATOS EN SUELO EMPOBRECIDO DESPUES DE 3 SEMANAS DE HABER INCORPORADO ALGUNAS ALGAS AZUL VERDES.

Cepa	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ppm
<u>Anabaena cylindrica</u>	26.6
<u>Anabaena variabilis</u>	28.7
<u>Nostoc commune</u> ( 1)	24.5
<u>Nostoc commune</u> (2)	14.6
Suelo sin Inocular Incubado.	27.0
Suelo sin Inocular no incubado	12.5

Los valores obtenidos son medias de 2 repeticiones.

Tabla 9.- PRODUCCION DE ETILENO Y FIJACION DE N<sub>2</sub> POR ALGUNAS CIANOFITAS.

Cepa	Etileno Producido	Fijación de N <sub>2</sub> *
	(nmoles/mg. de proteína/min.)	
		Medio de Cultivo
<u>Anabaena cylindrica</u>	1.83	0.61
<u>Anabaena variabilis</u>	1.37	0.45
<u>Nostoc commune</u> (1)	1.95	0.65
<u>Nostoc commune</u> (2)	0.65	0.21
		Suelo
<u>Anabaena cylindrica</u>	1.40	0.46
<u>Anabaena variabilis</u>	2.13	0.71
<u>Nostoc commune</u> (1)	1.11	0.37
<u>Nostoc commune</u> (2)	0.09	0.03

\* El factor teórico de conversión de etileno producido y fijación de N<sub>2</sub> fué de 3. (Turner y Gibson, 1980).

Tabla 10.- EFECTO DEL pH Y DOS FUENTES DE FOSFORO EN EL CRECIMIENTO DE A. filiculoides EN UN MEDIO DE CULTIVO LIBRE DE NITROGENO.

Tratamientos		Incremento en volumen (ml.)	Incremento en peso seco (mg.)	Incremento en peso seco %
Fósforo soluble	pH 5	0.36	14.4	72
	pH 6	0.68	27.2	136*
	pH 7	0.36	14.4	72
	pH 8	0.18	7.2	36
Roca fosfórica	pH 5	0.40	16.0	80
	pH 6	0.68	27.2	136*
	pH 7	0.44	25.0	88
	pH 8	0.40	16.0	80

\* Estadísticamente significativo con respecto a pH 8 con un valor de  $p = 0.05$

Fósforo soluble 39 mg/l de  $K_2HPO_4$

Roca fosfórica 50 mg/l

Tabla 10a.- Efecto del pH en la solubilización de la roca fosfórica en medio de cultivo, y en su asimilación por A. filiculoides.

Tratamiento	Control mg. de P/l	<u>Azolla</u> mg. de P/l
pH 5	2.23	0.00
pH 6	6.17	0.10
pH 7	0.92	0.77
pH 8	0.00	0.00

Medía de la Temperatura 24.5°C

Control sin Azolla

Los valores obtenidos son medias de 5 repeticiones.

Tabla 11.- RESPUESTA DE *A. filiculoides* A LA ADICION DE NITRATOS Y ROCA FOSFORICA AL MEDIO DE CULTIVO.

Tratamientos (mg/l)	KNO <sub>3</sub> mg/l	Incremento en volúmen (ml)	Incremento en peso seco (mg)	Incremento en peso seco %
Roca fosfórica 50	10	0.38	15.0	75
50	0	0.60	24.4	120*
100	10	0.34	14.4	72
100	0	0.46	19.6	98
150	10	0.44	17.6	88
150	0	0.36	14.8	75
Control	10	0.34	13.6	68
	0	0.18	7.2	36

Media de la Temperatura 21.8°C

Control = 39 mg/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Los valores obtenidos son medias de 5 repeticiones.

\* Estadísticamente significativo p = 0.05

Tabla 12.- EFECTO DEL SUPERFOSFATO TRIPLE, ROCA FOSFORICA Y MOLIBDENO EN EL CRECIMIENTO DE *A. ficuloides*.

Tratamientos		Incremento en volúmen (ml.)	Incremento en peso seco (mg.)	Incremento en (A) nitrógeno y peso seco
	A P Mo			
			Suelo normal (A)	
A <sub>1</sub>	+++	0.48	19.2	96
	++-	0.58	21.6	108
A <sub>2</sub>	+++	0.58	23.2	110
	++-	0.54	21.6	108
A <sub>3</sub>	+++	0.50	20.0	100
	++-	0.52	20.8	104
A <sub>0</sub>	+--	0.62	24.8	124
			Suelo Empobrecido (B)	
B <sub>1</sub>	+++	0.86	34.9	172
	++-	0.92	36.8	184
B <sub>2</sub>	+++	1.02	40.8	204
	++-	0.96	38.4	192
B <sub>3</sub>	+++	0.72	28.8	144
	++-	0.80	32.0	160
B <sub>0</sub>	+--	0.70	28.0	140
			Suelo Normal (C)	
C <sub>1</sub>	+++	0.54	21.6	108
	++-	0.44	17.6	88
C <sub>2</sub>	+++	0.54	21.6	108
	++-	0.50	20.0	100
C <sub>3</sub>	+++	0.36	14.4	72
	++-	0.52	20.8	104
C <sub>0</sub>	+--	0.46	18.4	92

Medio de la Temperatura 24.7°C

1 y 2 = a tratamiento con 2.7 y 5.4 mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por 50 g. de suelo (50 y 100 kg/ha respectivamente).

3 = Tratamiento con 25 mg. de roca fosfórica por 50 g. de suelo (1000 kg/ha)

0 = Tratamiento sin fósforo (P)

A = Anolla

Mo = 7.87 microgramos por 50 g. de suelo (0.125 kg/ha).

(A) El incremento del nitrógeno se calculó en base a la cantidad de nitrógeno total contenido en peso seco

Los valores contenidos son medias de 5 repeticiones.

Estadísticamente significativo p = 0.05 \* p = 0.01 \*\*

B<sub>2</sub> vs. B<sub>3</sub>, B<sub>0</sub> \*\*

B<sub>1</sub> vs. A<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> \*\*

B<sub>2</sub> vs. A<sub>2</sub>, C<sub>2</sub> \*\*

B<sub>3</sub> vs. A<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> \*\*

B<sub>1</sub> vs. B<sub>0</sub> \*

B<sub>0</sub> vs. C<sub>0</sub> \*

Tabla 13.- EFECTO DEL SUPERFOSFATO TRIPLE, ROCA FOSFORICA Y MOLIBDENO EN LA INCORPORACION DE MATERIA ORGANICA, POR A. filicoides.

Tratamientos	M.O. (g)	Incremento de M.O. (%)	% del incremento de M.O.	
Suelo normal (A)				
A <sub>1</sub>	+++	2.66	0.36	15.5
	++-	2.65	0.35	15.3
A <sub>2</sub>	+++	2.55	0.25	10.6
	++-	2.79	0.49	21.3
A <sub>3</sub>	+++	2.59	0.29	12.6
	++-	2.72	0.42	18.4
A <sub>0</sub>	+--	2.52	0.22	9.7
T <sub>A</sub>	---	2.30	—	—
Suelo Euporecido (B)				
B <sub>1</sub>	+++	2.61	0.38	17.0
	++-	2.57	0.33	14.9
B <sub>2</sub>	+++	2.66	0.42	18.9
	++-	2.75	0.51	23.0
B <sub>3</sub>	+++	2.73	0.49	21.9
	++-	2.99	0.76	33.9
B <sub>0</sub>	+--	2.77	0.54	24.0
T <sub>B</sub>	---	2.23	—	—
Suelo Estéril (C)				
C <sub>1</sub>	+++	2.49	0.30	13.4
	++-	2.75	0.55	24.9
C <sub>2</sub>	+++	2.65	0.45	20.3
	++-	2.59	0.39	17.8
C <sub>3</sub>	+++	2.65	0.45	20.3
	++-	2.61	0.41	18.8
C <sub>0</sub>	+--	2.70	0.50	22.9
T <sub>C</sub>	---	2.20	—	—

Medio de la Temperatura 24.7°C

1 y 2 = Tratamiento con 2.7 y 5.4 mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por 50 g. de suelo. ( 50 y 100 kg/ha respectivamente).

3 = Tratamiento con 25 mg. de roca fosforica por 50 g. de suelo (1000 kg/ha).

0 = Tratamiento sin fósforo (P).

Mo = 7.87 microgramos por 50 g. de suelo (0.125 kg/ha)

A = Amilla P = fósforo T = testigo

Los valores obtenidos son medias de 3 repeticiones.

Estadísticamente significativo p = 0.05\* p = 0.01 \*\*

Fósforo

Fósforo sin Molibdeno

Fósforo con Molibdeno

B<sub>3</sub> vs. A<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> \*\*

A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>1</sub> vs. A<sub>0</sub> \*\*

A<sub>1</sub> vs. C<sub>1</sub> \*

A<sub>2</sub> vs. A<sub>1</sub> \*

B<sub>3</sub> vs. A<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> \*\*

A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>1</sub> vs. A<sub>0</sub> \*\*

A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> vs. C<sub>2</sub> \*

C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> vs. C<sub>1</sub> \*

B<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> vs. B<sub>0</sub> \*\*

B<sub>3</sub> vs. B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>0</sub> \*\*

Con y sin Amilla

B<sub>3</sub> vs. B<sub>1</sub> \*\*

B<sub>2</sub> vs. B<sub>0</sub> \*\*

A<sub>0</sub> vs. T<sub>A</sub> \*

B<sub>3</sub> vs. C<sub>3</sub>, A<sub>3</sub> \*\*

B<sub>0</sub> vs. T<sub>B</sub> \*

B<sub>3</sub> vs. B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>0</sub> \*

C<sub>1</sub> vs. C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>0</sub> \*

C<sub>0</sub> vs. T<sub>C</sub> \*

B<sub>2</sub> vs. B<sub>0</sub> \*

C<sub>1</sub> vs. C<sub>0</sub> \*\*

C<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> vs. C<sub>0</sub> \*

C<sub>3</sub> vs. C<sub>0</sub> \*

C<sub>2</sub> vs. C<sub>0</sub> \*

C<sub>1</sub> vs. B<sub>1</sub> \*

Tabla 14.- DETERMINACION DE NITRATOS EN SUELO EMPOBRECIDO DESPUES DE 3 SEMANAS DE HABER INCORPORADO Azolla.

Tratamiento	NO <sub>3</sub> ppm
A P Mo	
B <sub>1</sub> + + +	29.2
+ + -	33.0
B <sub>2</sub> + + +	35.4
+ + -	29.2
B <sub>3</sub> + + +	29.2
+ + -	35.4
B <sub>0</sub> + - -	33.0
T <sub>B</sub> - - -	27.0
Suelo empobrecido sin <u>Azolla</u> y no incubado	12.5

1 y 2 = Tratamiento con 2.7 y 5.4 mg. de P<sub>2</sub> O<sub>5</sub> por 50 g. de suelo (50 y 100 kg./ha.) respectivamente.

3 = Tratamiento con 25 mg. de roca fosfórica por 50 g. de suelo (1000 kg./ha.)

0 = Tratamiento sin fósforo (P).

Mo = 7.87 microgramos por 50 g. de suelo (0.125 kg./ha.).

Los valores obtenidos son medias de 2 repeticiones.

Tabla 15.- REDUCCION DE ACETILENO Y FIJACION DE N<sub>2</sub> POR A. filiculoides.

Condiciones	Etileno Producido (nmoles/mg. de peso seco/min.)	Fijación de N <sub>2</sub>
En medio de cultivo:		
pH 5	0.060	0.020
pH 6	0.063	0.021
pH 7	0.056	0.018
pH 8	0.051	0.017
( <u>Azolla</u> recientemente colectada).	0.051	0.017
En Suelo Expobrecido inundado	0.080	0.026

Valores calculados en base al factor de conversión teórico de 3.

(Turner y Gibson, 1980),

Fig. 2.- Nostoc commune (1). Se aprecian células vegetativas (V) y heterocistos (H).

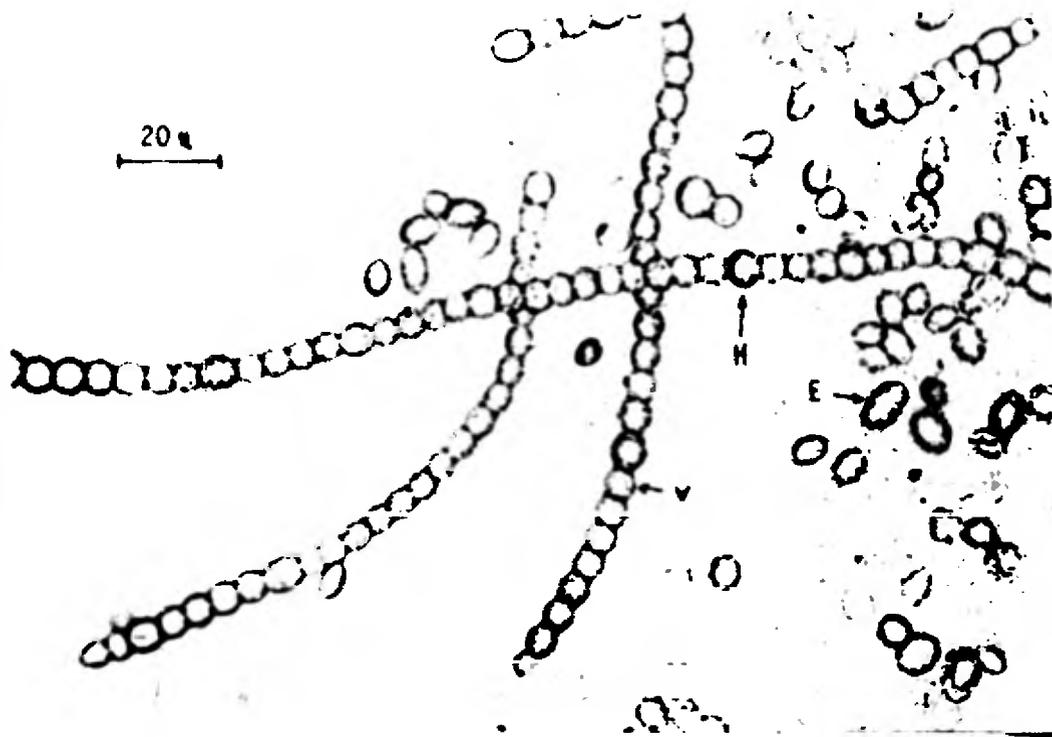


Fig. 3.- Nostoc commune (2). Se aprecian células vegetativas (V), heterocistos (H) y esporas (E).

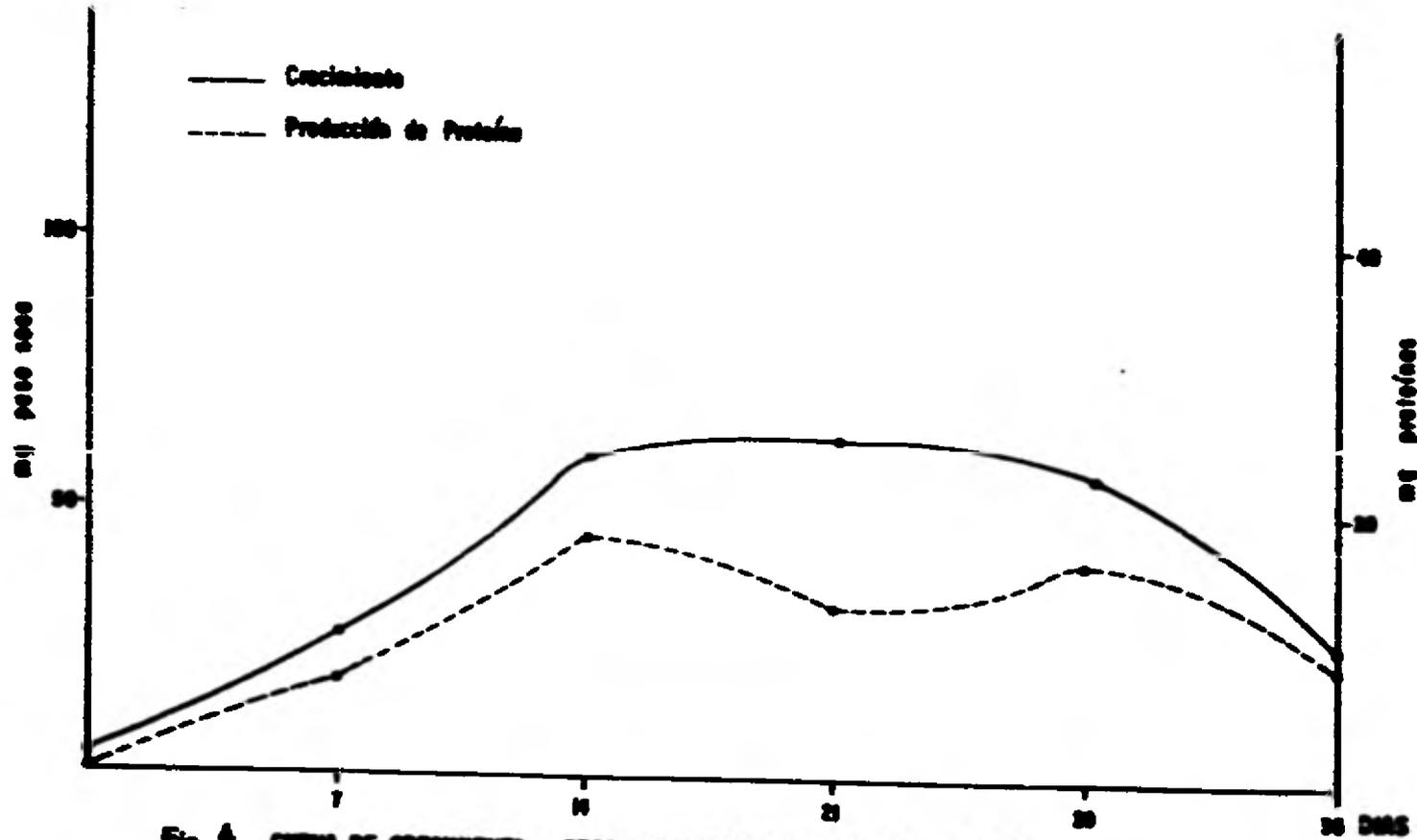
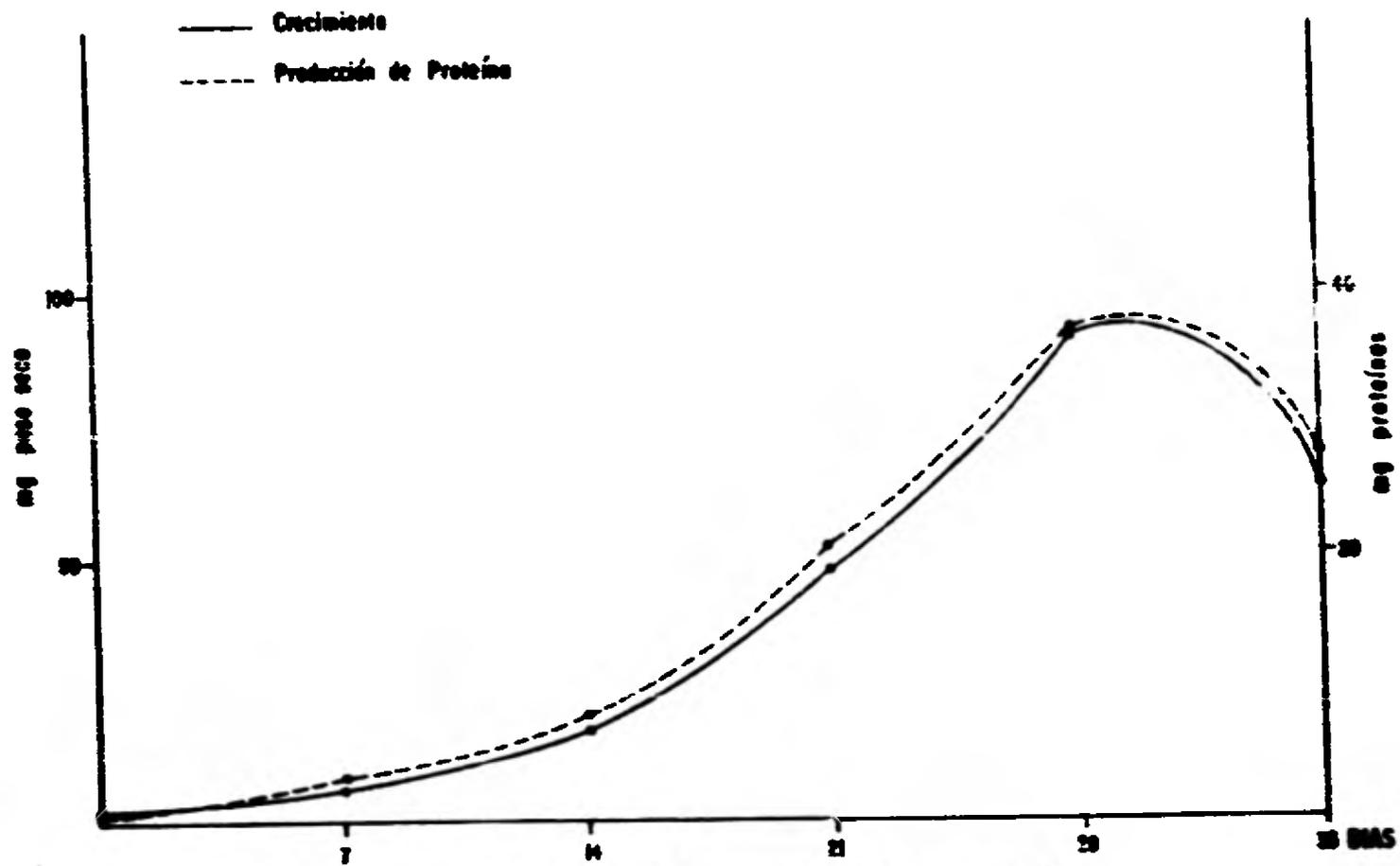
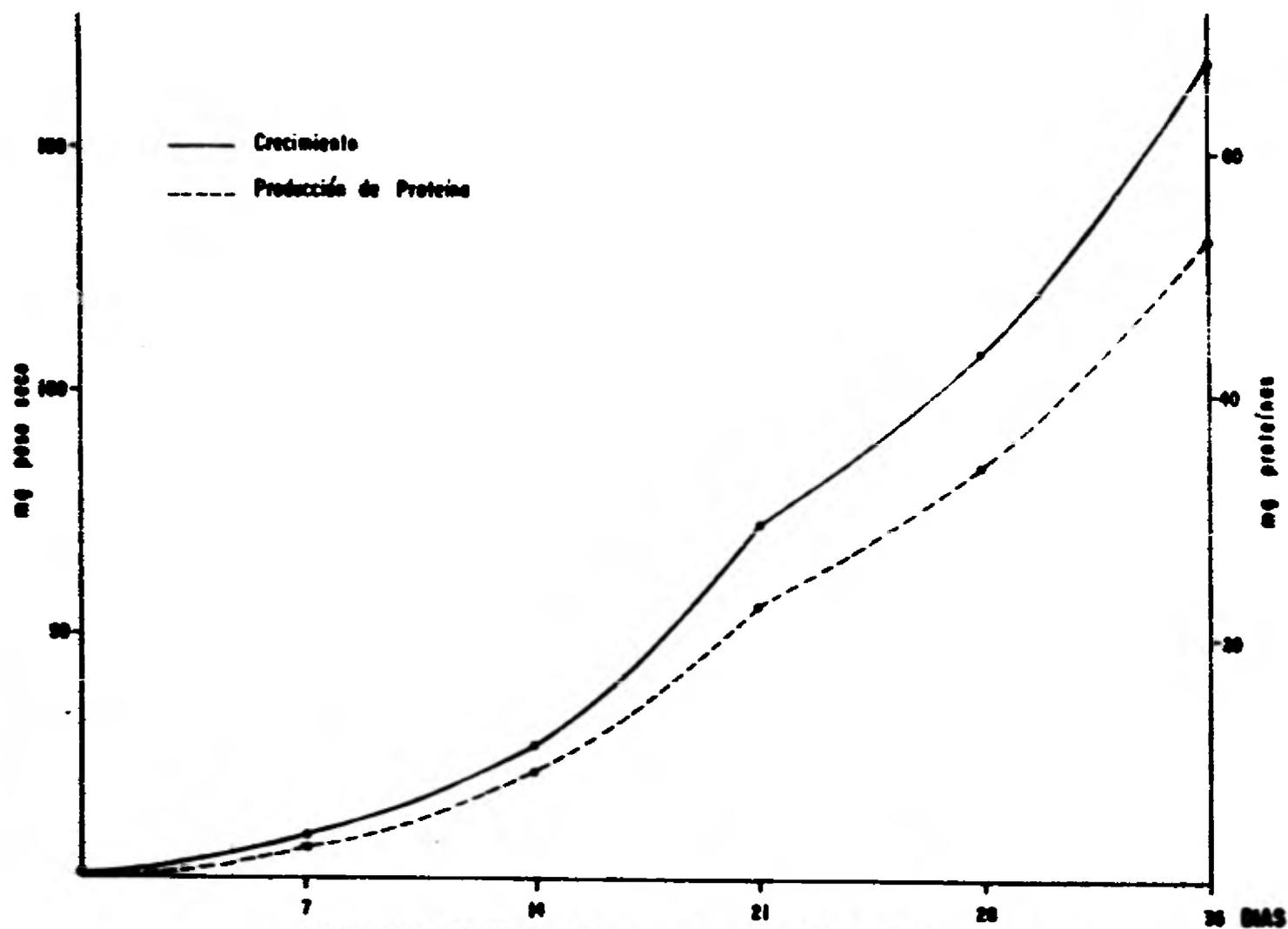


Fig 1 CURVA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE PROTEINA POR *A. salinarum* EN CULTIVO LIBRE DE NITROGENO CON BURBUJEO DE AIRE.



**Fig. 5** CURVA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE PROTEINA POR *A. variabilis* EN CULTIVO LIBRE DE NITROGENO CON BURBUJEO DE AIRE.



**Fig 6** CURVA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE PROTEINAS POR *Bacillus cereus* (1)  
EN CULTIVO LIBRE DE NITROGENO CON BURBUJEO DE AIRE.

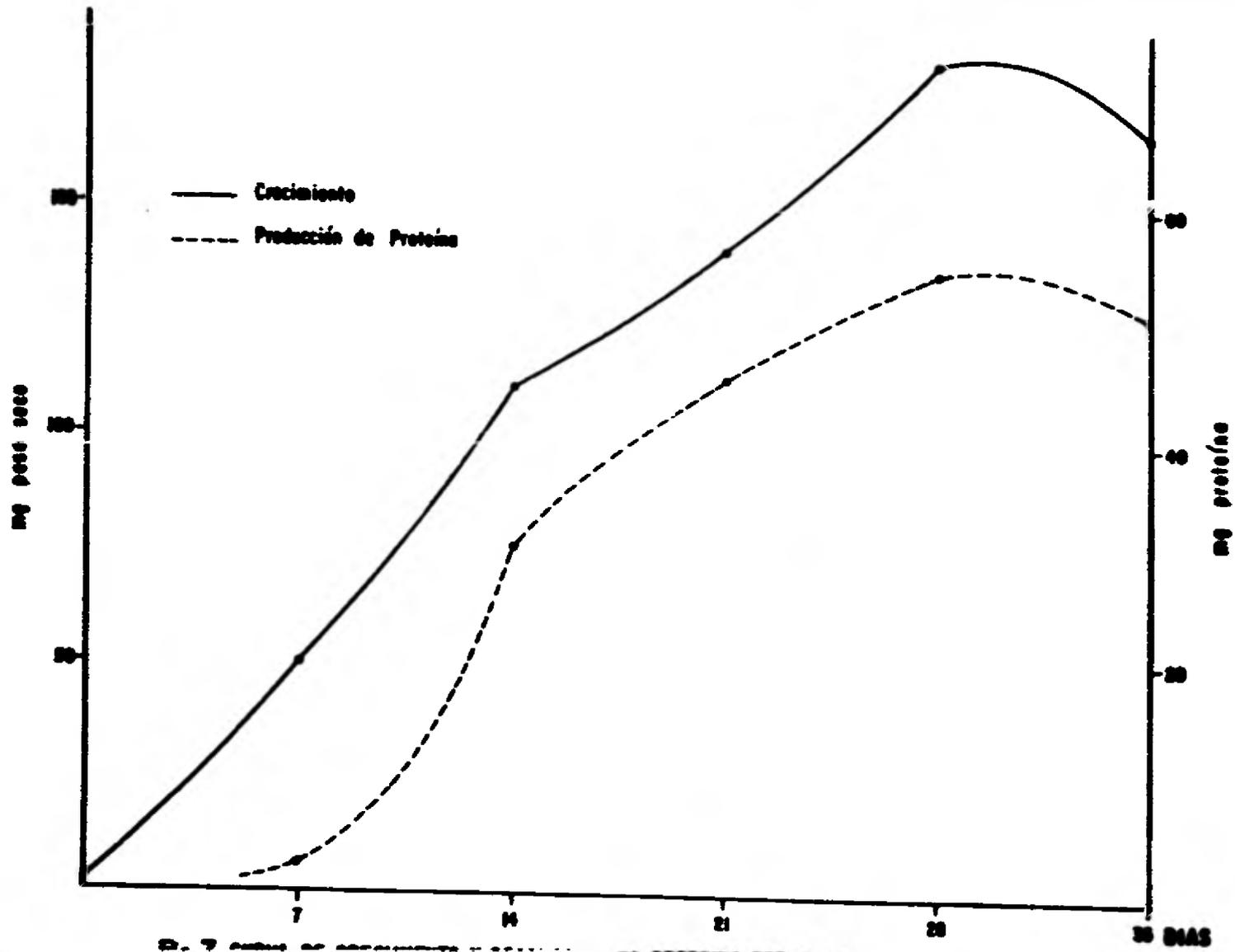


Fig. 7 CURVA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA POR *Streptococcus* (2)  
EN CULTIVO LIBRE DE NITRÓGENO CON BURBUJEO DE AIRE.

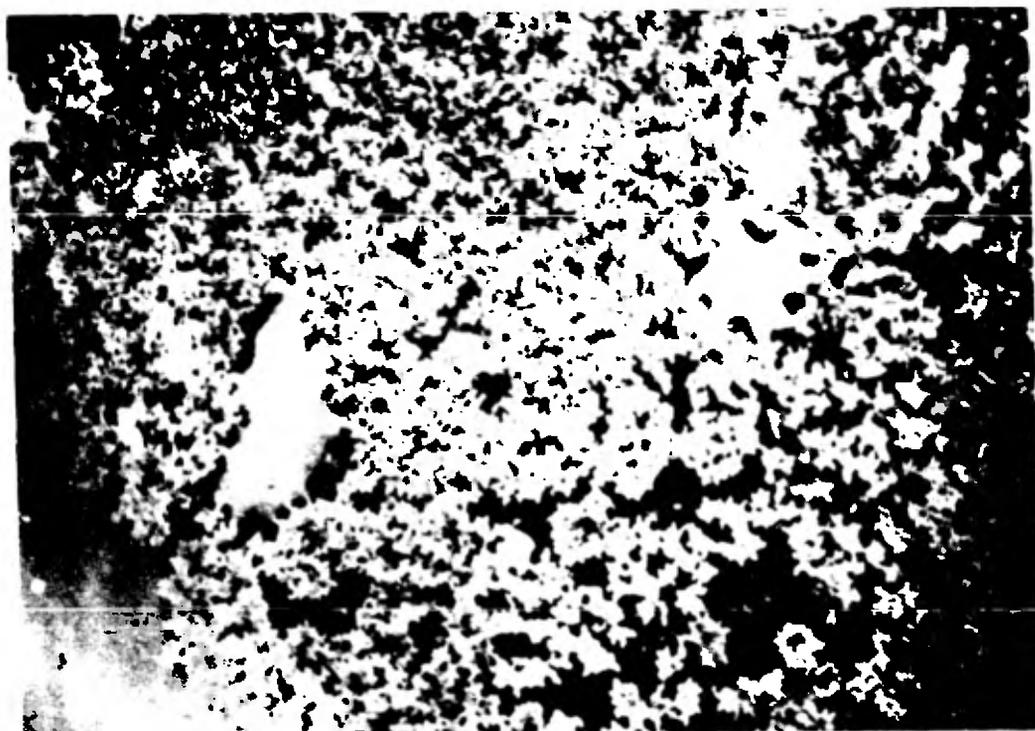


Fig. 8.- Plantas de Azolla filiculoides creciendo en suelo inundado.



Fig. 9.- Microfotografía mostrando dos microsporangia, los cuales constan de cuatro massulae cada uno (40 x).



Fig. 10.- Detalle de los glochidia donde se comprueba la ausencia de septos (100 x).

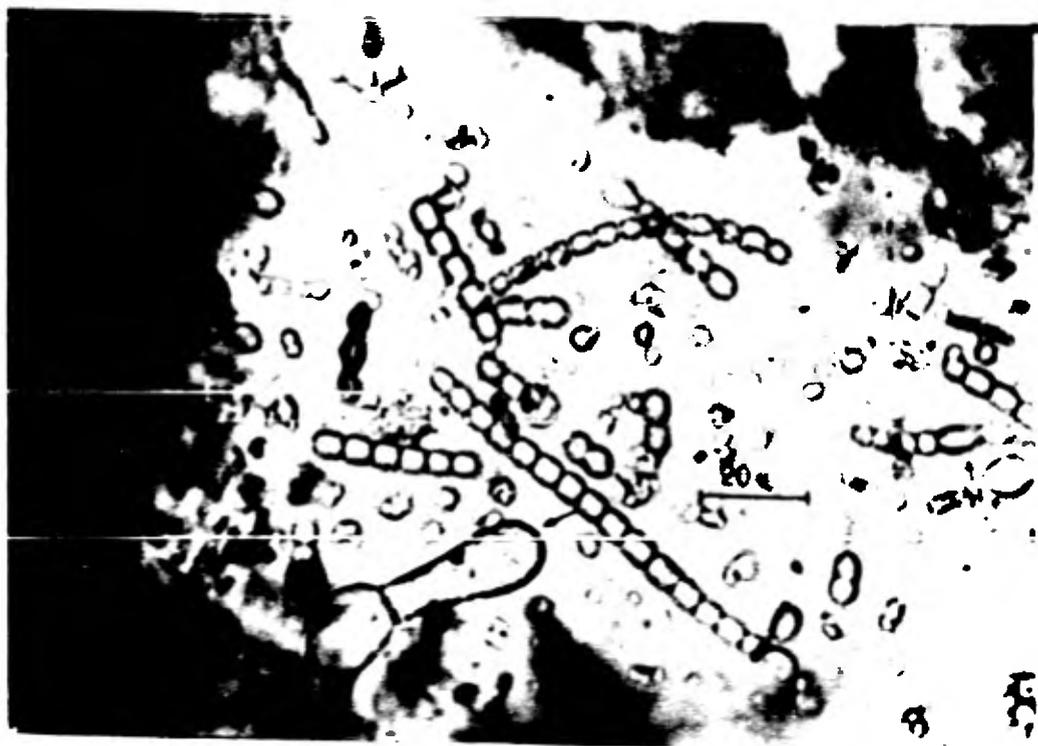


Fig. 11.- Microsimbionte (Anabaena azollae) con heterocistos (H) en la cavidad del helecho. Se observa un "pelo de transferencia", sitio donde ocurre el intercambio de nutrimentos entre ambos simbioses.

## VI CONCLUSIONES

### A) Estudio Microbiológico del Suelo.

1) La población de microorganismos amonificantes, Nitrosomonas, desnitrificantes, fijadores de nitrógeno de vida libre y algas azul-verdes heterocísticas, fué relativamente homogénea en la 4 muestras, a excepción de Nitrobacter spp., que presenta una diferencia significativa.

2) Se observó una correspondencia entre la proporción de nutrimentos en el suelo y la población de algunos grupos microbianos. Los valores más altos de Ca en el suelo corresponden a la mayor población de Nitrosomonas spp. y de algas azul-verdes heterocísticas. La mayor población de desnitrificantes corresponde al mayor contenido en nitratos y, contrariamente, fué donde se detectó la menor población de fijadores de  $N_2$  de vida libre y algas azul-verdes heterocísticas.

3) El número de propágulos de algas azul-verdes por gramo de suelo resultó muy bajo, aproximadamente 10 veces menor a lo encontrado por otros autores. Estos resultados nos permiten considerar que la abundancia de cianofitas fijadoras de  $N_2$  debe estar muy relacionada a factores edáficos tales como: humedad, materia orgánica, nitrógeno total, nitratos, tipo de cultivo y manejo del suelo, entre otros.

### B) Algas azul-verdes.

1) Las dos cepas nativas aisladas, identificadas como Mostoc commune (1) y (2), difieren entre sí tanto en su morfología

como en su fisiología. La cepa (1) mostró una mayor producción de biomasa, mayor incorporación de materia orgánica en el suelo y mayor capacidad para la reducción del acetileno, resultados que coinciden con los ensayos de invernadero en los cuales los suelos fertilizados con esta cepa, mostraron una mayor mineralización del nitrógeno.

2) La desecación del suelo disminuyó el número de propágulos de las algas azul-verdes heterocísticas. Sin embargo, la población que permaneció viable después de la desecación, ratifica el hecho de que estos microorganismos tienen una alta capacidad para soportar cambios drásticos en las condiciones ambientales.

3) Los ensayos con la temperatura de congelación pusieron de manifiesto la posibilidad de emplear el congelamiento como un recurso para el almacenamiento de cepas, conservando su viabilidad, velocidad de crecimiento sin afectar su actividad nitrogenásica.

4) En los experimentos sobre la fertilización de los suelos, hubo un efecto estadísticamente significativo en el incremento de materia orgánica y nitrógeno total en los 3 suelos estudiados.

La respuesta más significativa ( $p = 0.01$ ) se apreció en el suelo empobrecido e inoculado con la cepa Nostoc commune (1).

La superioridad de las cepas nativas frente a las cepas de colección, indica la necesidad de experimentar con organismos nativos, mejor adaptados a las condiciones edáficas,

siendo así más alta la probabilidad de obtener una respuesta a la fertilización de los cultivos de arroz.

5) Los rangos de fijación de nitrógeno de Nostoc commune (1) son aceptables, ya que caen en los valores medios citados por otros autores.

6) La baja cantidad de propágulos en los suelos estudiados, así como el efecto significativo obtenido durante la inoculación con cianofitas, nos permite considerar que sería justificable y altamente benéfico este tipo de fertilización biológica en los suelos destinados al cultivo del arroz en México.

7) La producción de proteína, ya sea para emplearse como forraje o para consumo humano, es otra alternativa que ofrecen las cianofitas heterocísticas.

### C) Azolla

#### 1) Condiciones de Cultivo.

De los ensayos en invernadero, tanto en medio de cultivo como en suelo inundado, se concluye que, en todos los casos, el crecimiento de Azolla resultó significativamente mayor en suelo, siendo comparativamente la biomasa 140% mayor que en el medio de cultivo.

#### 2) Cepa de Azolla.

El estudio microscópico de los esporocarpos permitió la identificación de la especie Azolla filiculoides. Durante el estudio microscópico se pudo observar un pelo de transferencia según lo describen Duckett et al., 1975 y Lumpkin y

Plucknett, 1980).

Las tasas de fijación de  $N_2$  de la cepa colectada, resultaron más bajas de las citadas en la Literatura, ésto nos permite confirmar que la actividad nitrogenásica varía según la cepa (Talley et al., 1981).

Resulta por lo tanto evidente la necesidad de intensificar la búsqueda y selección de cepas efectivas, con un buen grado de adaptación a las condiciones climáticas y edáficas de las zonas arroceras.

### 3) Respuesta a la aplicación de Fósforo.

a) Los resultados de los experimentos realizados en medio de cultivo con 2 fuentes de fósforo,  $K_2 HPO_4$  y roca fosfórica, nos indican que la respuesta de Azolla fué significativamente mayor con la roca fosfórica a una dosis de 50 mg./l.

Con ambas fuentes de fósforo, la respuesta de Azolla fué significativa a pH 6. Particularmente, por lo que a la roca fosfórica se refiere, a pH 6 se produjo la mayor liberación de P.

b) En los experimentos con suelo empobrecido se encontró una respuesta a la aplicación de P. ya sea que se adicione como superfosfato o como roca fosfórica.

c) Al llevarse a cabo el análisis de varianza, no se observaron interacciones entre el fósforo y el molibdeno en estos suelos. Ésto implica que la aplicación de molibdeno no tiene un efecto significativo en el crecimiento de Azolla.

d) Se apreció un incremento de  $N-NO_3$  en el suelo empobrecido incubado y fertilizado con Azolla, con respecto al suelo control empobrecido no incubado.

e) No se encontró una respuesta significativa en el crecimiento de Azolla a la adición de  $N-NO_3$  en medio de cultivo.

4) Incorporación de Materia Orgánica al suelo por Azolla.

a) Azolla tuvo un efecto significativo en la incorporación de materia orgánica al suelo.

b) En los 3 suelos la aplicación de P, en cualquiera de las dos fuentes y dosis, dio una respuesta significativa.

c) Con la aplicación combinada de roca fosfórica más molibdeno, se produjo un efecto significativo en los 3 suelos.

## VI) RESUMEN

Se cuantificó la población de bacterias del ciclo del nitrógeno de un suelo de cultivo rotatorio arroz-caña de azúcar del Edo. de Morelos encontrándose que, a excepción del género Nitrobacter sp., la población es estadísticamente homogénea.

En las dos cepas aisladas, clasificadas como Nostoc commune Vaucher, se determinaron curvas de crecimiento y se cuantificó la producción de proteínas en un medio libre de nitrógeno, obteniéndose de 52 a 54 mg de proteína por 100 ml. en 35 días.

Se cuantificó la población de cianofitas en el suelo desecado al aire y se observó el efecto de la temperatura de congelación en la viabilidad de las cepas aisladas.

Los ensayos sobre la inoculación con cianofitas se llevaron a cabo en tres suelos: suelo normal, suelo empobrecido y suelo estéril. Los mejores resultados se obtuvieron con la cepa nativa Nostoc commune (1), en el suelo empobrecido en nutrientes al obtenerse un 23.6% de incremento de materia orgánica y nitrógeno total; resultando el efecto de la inoculación estadísticamente significativo a un valor de  $p = 0.01$ .

La técnica de la reducción del acetileno para evaluar la actividad nitrogenásica, indica que esta misma cepa tiene una actividad bastante aceptable: 1.95 y 1.11 nmoles de etileno producido por mg. de proteína por minuto en medio de cultivo y

suelo inundado, respectivamente. En todos los casos, se compararon los resultados con cepas de colección de Anabaena cylindrica y Anabaena variabilis.

Simultáneamente a lo anterior, se identificó una cepa de Azolla filiculoides Lamarck, colectada en Mixquic D.F., México, y se evaluó su crecimiento, bajo condiciones de invernadero, en medios de cultivo y en suelos inundados. La mayor biomasa se obtuvo en suelos inundados, habiéndose estimado una diferencia de 140% con respecto a la obtenida en medios de cultivo.

Se encontró que el pH 6 es el óptimo para el desarrollo de Azolla en medios de cultivo, ya sea que se utilice roca fosfórica o fósforo soluble ( $K_2HPO_4$ ). Bajo estas condiciones se detectó un 120% de incremento en peso seco con ambas fuentes de fósforo. El mayor crecimiento de Azolla se encontró en el suelo empobrecido. La fertilización del helecho con superfosfato triple (100 kg./ha.) permitió un incremento en su biomasa de 204%. La adición de nitrógeno, en forma de nitrato ( $KNO_3$ ) al medio de cultivo, inhibió el desarrollo de Azolla.

La fijación de  $N_2$  por este helecho arrojó valores bajos, comparados con lo citado por otros autores (Lumpkin y Plucknett, 1980).

Se observó que hay diferencias estadísticamente significativas en la incorporación de materia orgánica entre los suelos control y aquellos fertilizados con Azolla.

VII) BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M. (1977), Introduction to Soil Microbiology. 2nd. edition John Wiley & Sons. New York. 467 p.
- Alexander, V. (1975), Nitrogen Fixation by blue-green algae in polar and subpolar regions. En Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms. IBP vol. 6 p. 163-186.
- Allen, M.M. (1973), Isolation and Purification. Methods for Cyanophyceae. En Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Ed. J.R. Stein. Cambridge University Press. 127-138 p.
- Allen, M.B. y Arnon, D.I. (1955), Studies on Nitrogen-Fixing blue-green algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by Anabaena cylindrica Lemm. Pl. Physiol. 30: p. 366-372.
- Allen, M. M. y Stanier, R.Y. (1968). Selective Isolation of Blue-green algae from water and soil. J. Gen. Microb. 51: p. 203-208.
- Ashton, P.J. y Walmsley R.D. (1976). The aquatic fern Azolla and its Anabaena symbiont. Endeavor, 35, 39-43.
- Barkworth, M. y Bateson, M. (1965), The Population level of presumptive Nitrosomonas and Nitrobacter in some English soils. Plant and Soil, vol. 22, p. 220-228.
- Becking, J. H. (1976), Nitrogen Fixation in some natural ecosystems in Indonesia. En Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Ed. Nutman, P.S., IBP vol. 7, Cambridge University Press. p. 539-551.
- Beijerinck, M.W. (1901), Uber oligonitrophile Mikroben. Zentbl. Bakt. ParasitKde (Abt II) 7, p. 561-582.

- Bhuiya, Z.H.; Hashem, M.A. y Nurul Islam, A.K.M. (1981), Isolation and identification of dominant nitrogen-fixing blue-green algae from Bangladesh soils. En *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North-Holland Biomedical Press 498 p.
- Bouyoucos, G.J. (1963), Directions for Making Mechanical analysis of soil by hydrometer method. *Soil Sci.* vol. 42, p. 25-30.
- Bremer, J.M. (1965), Total Nitrogen. En *Methods in Soil Analysis*. Núm. 9 de la serie Agronomy. Ed. C.A. Black p. 1171-1174.
- Buresh, R.J., Casselman, M.E., Patrick Jr., W.H. (1980). Nitrogen Fixation in Flooded Soil Systems, A Review. En "*Advances in Agronomy*", vol. 33 Ed. N.C. Brady. Academic Press. p. 180-183.
- Castenholz, R.W. (1981), Isolation and Cultivation of Thermophilic Cyanobacteria. En *The Prokaryotes*. Eds. Mortimer P.S., Heinz S., Trüper, H.G., Balows, A. y Schlegel, H.G. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 236-246.
- Catling, H.D., Martínez, R.M. e Islam, Z. (1981), Survey of algae associated with deepwater rice in Bangladesh. *Cryptogamie algologie Tome 2, Fascicule 2*: p. 109-122.
- Cawse, P.A. (1975), Microbiology and Biochemistry of Irradiated soils. En "*Soil Biochemistry*" Eds. E.A. Paul y A. Douglas Mc Laren. vol. 3 Marcel Dekker Inc. New York, p. 214-261.
- Correl, D.S. y Correl, H.B. (1972). *Aquatic and Wetland Plants*

of South Western United States. Ed. Water Pollution Control Research Series.

- Dart, P. J., Day, J.M. y Harris, D. (1972). Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. En "Use of Isotopes for Study of Fertilizer Utilization by Legume Crops. International Atomic Energy Agency Technical Report 149: p. 85-100.
- Day, J.M. y Witty, J.F. (1977), Novel Aspects on Nitrogen Fixation. Reprinted from Outlook on Agriculture, vol. 9, (4): p. 180-185.
- De P.K. (1939), The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. Proc. R. Soc. B 127, p. 121-139.
- De P.K. y Mandal L.N. (1956), Fixation of Nitrogen by algae in rice rice soils. Soil Sci. 81, p. 453-458.
- De P.K. y Sulaiman, M. (1950), Fixation of nitrogen in rice soils by algae as influenced by crop, CO<sub>2</sub> and inorganic substances. Soil Sci. 70, p. 137-151.
- Drewes, K. (1928), Uber die Assimilation des Luftstickstoffs durch Blaualgen. Zentbl. Bakt. ParasitKde (Abt II) 76, p. 88-101.
- Duckett, J.G., Toth, R. y Soni, S.L. (1975), An Ultrastructural Study of the Azolla-Anabaena azollae Relationship. New Phytol. 75: p. 111-118.
- El-Mawawy, A.S. y Handi, Y.A. (1975), Research on blue-green algae in Egypt, 1958-1972. En Nitrogen fixation by free living microorganisms. Ed. W.D.P. Stewart. Cambridge University Press. p. 219-228.

- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay P. y Walsby, A.E. (1973), The Blue-Green Algae. Academic Press, London, New York. 459 p.
- Fong, H.M. y Shen, T.C. (1981), Nitrogen Fixation in some Malaysian Paddy fields. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 502 p.
- Frank, H. (1889), Uber den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffs durch erdbodenbewohnende Algen. Ber. dt. bot. Ges. 7, p. 34-42.
- Gerloff, G.C., Fitzgerald, G.P. y Skoog, F. (1950), The isolation, purification and culture of blue-green algae. Am. J. Bot., 37, p. 216-218.
- Godfrey, R.H., Reinert, G.W. y Houk, R.D. (1961), Observations on microsporocarpic material of Azolla caroliniana. Am. Fern J. 89-92.
- Goyal, S.K. y Venkataraman, G.S. (1970), Response of high yielding rice varieties to algalization I.- Effect on the yield of four rice varieties. Phytos, vol. 9, p. 137-138.
- Goyal, S.K. y Venkataraman, G.S. (1971), Response of high yielding rice varieties to algalization II. Interaction of soil types to algal inoculation. Phytos, vol. 10, p. 32-33.
- Granhall, U. (1975), Nitrogen Fixation by blue-green algae in temperate soils. En Nitrogen Fixation by free-living microorganisms. IBP vol. 6, p. 189-206.
- Gupta, A.G. y Shukla, A.C. (1967), Studies on the Nature of

- algal Growth Promoting substances and their influence on Growth, Yield and Protein contents of rice plants. Labdev, J. Sci. Tech., vol. 5 No. 2, p. 152-163.
- Halperin, D.R., de, Caire, G.Z. de, Mulé, M.C.Z. de y Cano, S.M. de. (1977), Fijación de nitrógeno por una cianofita unicelular Aphanothece stagnina (Sprengel) A. Braun. Physis, vol. 36 (92) p. 85-88.
- Hill, D.J. (1975), The pattern of development of Anabaena in the Azolla-Anabaena symbiosis. Planta, 122, p. 179-184.
- Hill, D.J. (1977), The role of Anabaena in the Azolla-Anabaena symbiosis. New Phytol. (78) p. 611-616.
- Jackson, M.L. (1964). Análisis Químico de Suelos. Ed. Omega, Barcelona. 602 p.
- Jones, K. (1981), Diurnal acetylene reductions by mats of blue-green algae in sub-tropical grassland: use of short-term and long term in situ assays. New Phytol. (88): p. 73-78.
- Katznelson, H. (1946), The rhizosphere effect of mangles in certain groups of soil microorganisms. Soil Sci., vol. 62, p. 343-354.
- Knowles, R. (1981), The Measurement of Nitrogen Fixation. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North Holland Biomedical Press, p. 327-333.
- Kratz, W.A. y Myers, J. (1955), Nutrition and growth of several blue-green algae. Am. J. Bot. 42, p. 282-287.
- Kulasooriya, S.A. y de Silva, R.S.Y. (1977), Effect of Azolla on yield rice. International Rice Research Newslett.

vol. (2) 10 p.

- Li Shan-hao. (1981a). Role of nitrogen fixing blue-green algae in rice Cultivation in China. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 500 p.
- Li Shan-hao (1981b). Discusión en Biological and developmental aspects of Azolla. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 258 p.
- Liu Chung-Chu (1981). Discusión en Nitrogen Fixation in Association with rice. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 325 p.
- Liu Chung-chu, Zheng De-ying, Chen Bing-huan, Chen Jia-ju, You Chung-biao y Li Jaing-wei (1981). The potential of Azolla as a nitrogen source for paddy soils. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 501 p.
- Lumpkin, T.A. y Plucknett, D.L. (1980). Azolla: Botany, Physiology, and Use as a green manure. Economic Botany 34 (2) p. 111-153.
- Mac Rae, I.C. y Castro, T.P. (1967). Nitrogen Fixation in some Tropical rice soils. Soil Sci. 103, p. 277-280.
- Mc Crady, P.W. (1946). Standard Methods of Water Analysis: Am. Pub. Health and Am. Water Assoc. eds. 9a. ed. p. 131-138.

- Mishustin, E.N. y Shil'nikova, V.K. (1971). Biological Fixation of Atmospheric Nitrogen. Mac Millan Press, London. 420 p.
- Moore, A.W. (1969). Azolla: Biology and Agronomic Significance. Bot. Rev. 35, p. 17-34.
- Morales, N.M. (1977), Estudio microbiológico de la rizosfera de la caña de azúcar, con énfasis en las bacterias aerobias libres, fijadoras de nitrógeno. Tesis. Fac. de Química, UNAM.
- Moreno, R.D. (Inédito). Manual de Métodos de Laboratorio de Suelos. INIA.
- Oes, A. (1913). Uber die assimilation des frein stickoffs durch Azolla. Z. Bot. 5: p. 145-163.
- Ortega, M.M. (1972) Estudio de las algas comestibles del valle de México. Rev. Lat-amer. de Microbiol. 14: p. 85-97.
- Palacios-Mayorga, S., (1980). Aislamiento y cultivo de algas edáficas (inédito).
- Peña, H.E.M. (1978). El trabajo agrícola en un pueblo chinampero: San Luis Tlaxiátemalco. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias, UNAM.
- Peters, G.A. (1977). The Azolla-Anabaena azollae symbiosis. En A. Hollaender ed. Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. Plenum Press, New York and London. p. 231-257.
- Peters, G.A. (1981). Biological and Developmental Aspects of Azolla. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North-Holland Biomedical Press p. 258.

- Peters, G.A., Evans, W.R., Toia, R.E. (1976). Azolla-Anabaena azollae relationship IV. Photosynthetically driven nitrogenase catalyzed  $H_2$  production. *Pl. Physiol.* 58: p. 119-126.
- Peters, G.A., Ito, O., Tyagi, V.V.S., y Kaplan, D. (1981). Physiological studies on  $N_2$ -fixing Azolla. En *Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen*. Eds. J. M. Lyons, R.C. Valentine, D.A. Phillips, D.W. Rains y R. C. Huffaker. Plenum Press, New York. p. 343-362.
- Peters, G.A., Ito, O., Tyagi, V.V.S., Mayne, B.C., Kaplan, D. y Calvert H.E. (1981). Photosynthesis and Nitrogen Fixation in the Azolla-Anabaena Symbiosis. En *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p. 121-124.
- Peters, G.A. y Mayne, B.C. (1974a). The Azolla-Anabaena azollae relationship I. Initial characterization of the association. *Plant Physiol.* 53: p. 813-819.
- Peters, G.A. y Mayne, B.C. (1974b). The Azolla-Anabaena azollae relationship II. Localization of nitrogenase activity as assayed by acetylene reduction. *Pl. Physiol.* 53: p. 820-824.
- Peters, G.A., Toia, R.E. y Lough, S.M. (1977). Azolla-Anabaena azollae relationship: V.  $^{15}N_2$  fixation, acetylene reduction, and  $H_2$  production. *Pl. Physiol.* 59: p. 1021-1025.

- Prayoon, S., Seetanun W., Chevmsiri, C., Kanareugsa C., y Takahashi, J. (1979). Azolla research studies in Thailand. Paper presented at the International Rice Research Conference, the International Rice Research Institute, Los Baños, Laguna, Philippines, 16-20 abril, 1979.
- Pringsheim, E.G. (1914). Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. III. Zur Physiologie der Schizophyceen. Beitr. Biol. Pfl. 12, 49-108.
- Ray, T.B., Peters, G.A., Mayne, B.C. y Toia, R.E. (1978). Azolla-Anabaena relationship VII. Distribution of ammonia-assimilating enzymes, protein and chlorophyll between host and symbiont. Plant Physiol. 62: p. 463-467.
- Renaut, J., Sasson, A., Pearson, H.W. y Stewart, W.D.P. (1975). Nitrogen fixing algae in Morocco. En Nitrogen fixation by free living microorganisms. Ed. W.D.P. Stewart. Cambridge University Press. p. 229-246.
- Reynaud, P. y Roger, P. (1977). Milieux sélectifs pour la numération des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote. Rev. Ecol. Biol. Sol, 14 (3): p. 421-428.
- Rippka, R., Waterbury, J.B. y Stanier, R.Y. (1981a). Provisional Generic Assignments for Cyanobacteria in pure culture. En The Prokaryotes. Eds. Starr P.M., Stolp H. Trüper H.G., Balows A. y Schlegel H.G. Editorial Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 247-256.
- Rippka, R., Waterbury, J.B., y Stanier, R.Y. (1981b). Isolation and Purification of Cyanobacteria: Some general principles. En The Prokaryotes. Eds. Starr P.M., Stolp H.,

Trüper H.G., Balows A. y Schlegel H.G. Editorial  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 212-220.

- Rodgers, G.A. (1977). Nitrogenase activity in Nostoc muscorum:  
recovery from dessication. Pl. and Soil 46, p. 671-674.
- Roger, P. y Renaud, P. (1976). Dynamique de la population  
algale au cours d'un cycle de culture dans une riziére  
sahelienne. Rev. Ecol. Biol. Sol, 13 (4): p. 545-560.
- Roger, P. y Reynaud, P. (1977). La biomasse algale dans les  
riziéres du Sénégal: importance relative des Cyanophycées  
fixatrice de N<sub>2</sub>. Rev. Ecol. Biol. Sol, 14 (4): p. 519-  
530.
- Rubenchik, L.I. (1963). Azotobacter and its use in agriculture:  
Washington, D.C., U.S. Dept. Commerce, Israel Prog.  
Sci. Transl., 278 p.
- Shields, L.M. y Durrel, L.W. (1964). Algae in relation to soil  
fertility. Bot. Rev. 30, p. 92-128.
- Silvester, W.B. (1981). Measurement of Nitrogen Fixation. En  
Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H.  
Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North-Holland Bio-  
medical Press. 334 p.
- Singh, P.K. (1977). Multiplication and Utilization of Fern  
Azolla containing nitrogen-fixing algal symbiont as  
green manure in rice cultivation. II Rizo 26: p. 125-137.
- Singh, P.K. (1979). Use of Azolla in India. Paper presented  
at the International Rice Research Conference, the  
International Rice Research Institute, Los Baños,  
Laguna, Philippines, 16-20 abril, 1979.

- Singh, P.K. (1981). Potentiality of blue-green algae and Azolla biofertilizers in rice cultivation in India. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 499 p.
- Stanier, R.Y., Pfennig N. y Trüper H.G., Balows A. y Schlegel, H.G. Editorial Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 197-211.
- Stewart, W.D.P. (1970). Algal Fixation of atmospheric nitrogen. Plant and Soil 32, p. 555-588.
- Stewart, W.D.P., Haystead A. y Dharmawardene W.N. (1975). Nitrogen assimilation and metabolism in blue green algae. En Nitrogen Fixation by free living microorganisms. IBP vol. 6, p. 129-158.
- Stewart, W.D.P. (1977). Blue-green algae. En A Treatise on Nitrogen Fixation. Section III Biology. Eds. R.W.F. Hardy y Silver W.S. Editorial John Wiley & Sons, New York. p. 63-123.
- Stewart, W.D.P. (1980a). Systems involving blue-green algae (Cyanobacteria). En Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Ed. F.J. Bergersen. Editorial John Wiley & Sons. p. 583-635.
- Stewart, W.D.P. (1980b). Some aspects of structure and function in  $N_2$ -fixing cyanobacteria. En Annual Review of Microbiology. Eds. Starr M.P., Ingraham J.L. y Balows A. Editorial Annual Reviews Inc. Palo Alto, California. Vol. 34, p. 497-536.

- Talley, S.N., Talley, B.J. y Rains, D.W. (1977). Nitrogen Fixation by Azolla in rice fields. En Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. Ed. por A. Hollaender. Plenum Publishing Corporation. p. 259-281.
- Talley, S.N., Lim E. y Rains, D.W. (1981). Application of Azolla in Crop Production. En Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen. Eds. J.M. Lyons, R.C. Valentine, D.A. Phillips, D.W. Rains y R.C. Huffaker. Plenum Press. New York. p. 363-384.
- Timonin M.I. (1946). Microflora of the rhizosphere in relation to manganese deficiency disease of oats. Soil Sci. Soc. America. Proc. vol. 11, p. 284-292.
- Tung, H.F. y Shen, T.C. (1981). Studies of the Azolla pinnata-Anabaena azollae Symbiosis: Growth and Nitrogen Fixation. New Phytol. 87: p. 743-749.
- Turner, G.L. y Gibson, A.H. (1980). Measurement of Nitrogen Fixation by Indirect Means. En Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Ed. por F.J. Bergersen. John Wiley and Sons. p. 111-138.
- Venkataraman, G.S. (1969). The Cultivation of Algae. Impreso por The Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 319 p.
- Venkataraman, G.S. (1975). The role of blue-green algae in tropical rice cultivation. En Nitrogen Fixation by free-living microorganisms. IBP vol. 6 p. 207-218.

- Wang Fa-chu; Zhung Zepu y Hu Zhangzhen (1981). Nitrogen Fixation by an Edible Terrestrial blue-green algae. En Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A.H. Gibson y W.E. Newton. Elsevier North Holland Biomedical Press. 455 p.
- Watanabe, A. (1973). On the inoculation of paddy fields in the Pacific area with nitrogen-fixing blue-green algae. Soil Biol. Biochem. vol. 5, p. 161-162.
- Watanabe, I. (1977). Azolla utilization in rice culture. International Rice Research Newsletter, vol. 2: 3.
- Watanabe, I. (1978). Azolla and its use in Lowland rice culture. Soil and Microbe, Japan. 20, p. 1-10.
- Witty, J.F. (1974). Algal nitrogen fixation on solid surfaces and temperate agricultural soils. Ph. D. Thesis, University of London.
- Witty, J.F. (1979). Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. Plant and Soil 52, p. 165-183.
- Wolk, C.P. (1981). Nitrogen fixation by Cyanobacterial heterocysts. En Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of fixed nitrogen. Eds. J.M. Lyons, R.C. Valentine, D.A. Phillips, D.W. Rains y R.C. Huffaker. Plenum Press, New York. p. 315-331.