

2e/
67



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA INOCULACION DE
AZOSPIRILLUM SP. EN DOS VARIETADES DE
TRIGO, REALIZADA A NIVEL INVERNADERO

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

1. Introducción
2. Objetivos
3. Generalidades
4. Material y Métodos
5. Resultados
6. Discusión de Resultados
7. Conclusiones y recomendaciones
8. Anexo
9. Bibliografía.

La producción mundial de cereales como el trigo ha au-
mentado enormemente durante las últimas décadas y es neces-
ario incrementarla todavía más si se quiere dar alimento a
una población creciente. Hasta ahora esto se ha logrado me-
diante la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados
que se están haciendo prohibitivos por su encarecimiento, -
dado que su fabricación y distribución requiere del consumo
de energéticos.

Una alternativa para elevar la producción agrícola y -
econmizar fertilizantes nitrogenados, es el desarrollo de
estudios en el área de la fijación biológica del nitrógeno,
la cual actualmente es tema de estudio en diferentes insti-
tuciones de investigación, particularmente en lo referente
a la fertilización nitrogenada de las gramíneas con bacte-
rias del género Azospirillum.

Aunque los procesos naturales bacterianos y los proce-
sos químicos industriales, de formación de amoníaco, preci-
san la misma energía por unidad de nitrógeno fijado - - - -
(\pm 15 000 Kcal./Kg) se debe tomar en cuenta que en la fijación
industrial se obtiene del gas natural y derivados del petró-
leo (citado por Alvarez y Lemos-Pastrana) el cual es un re-
curso no renovable y esto explica que los costos aumentarán
considerablemente en el transcurso del tiempo.

Uno de los pasos más importantes en la investigación -
tendiente a lograr una fijación biológica de nitrógeno en-
plantas no leguminosa fué dado por Döbereiner al descubrir-

la relación que existe entre una bacteria fijadora libre, - Azospirillum sp. con las raíces de algunos pastos forrajeros y algunas gramíneas.

Azospirillum sp. se ha encontrado en más de 50 % de los suelos de los países tropicales estudiados y se ha reportado una ganancia de 30-40 Kg., de N/Ha., debido a la fijación biológica en los suelos inoculados. (citado por Alvarez y Lemos-Pastrana, 1980).

Se considera por lo tanto necesario evaluar el efecto de la inoculación de cepas nativas de Azospirillum en el desarrollo de trigo, para la posible utilización de este recurso en la fertilización de los suelos agrícolas destinados a estos cultivos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la infección de Azospirillum en el desarrollo de trigo, para la posible preparación de un inoculante que sea utilizado en la fertilización de los suelos agrícolas destinados a estos cultivos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Aislamiento de Azospirillum sp. a partir de raíces de 6 tipos de gramíneas cultivados en el estado de México.

2.2.2. Identificación de las cepas aisladas y de otras aisladas en trabajos previos.

2.2.3. Determinar la infectividad de Azospirillum en la rizósfera de dos variedades de trigo, adaptadas a los suelos en estudio.

2.2.4. Determinar el efecto de la asociación entre las diferentes cepas y las variedades de trigo empleadas.

2.2.5. Seleccionar a las cepas infectivas y efectivas en la fijación del nitrógeno.

3. GENERALIDADES

3.1. Aislamiento de Azospirillum

Spirillum lipoferum (Azospirillum sp.) fué primeramente aislado y descrito por Beijerinck -- (1925) en Holanda, pero durante casi 50 años permaneció ignorado, hasta que fué redescubierto en Brasil (Bulow y Döbereiner, 1975, Day y Döbereiner 1976). La distribución ecológica de este microorganismo, considerada por Döbereiner et al., (1976) como característica de los suelos tropicales, ha demostrado ser más amplia, pues en Argentina se ha aislado hasta de los suelos de la Patagonia (citado por Alvarez, 1983). El aislamiento de Azospirillum se ha realizado de diversas plantas como puede verse en el cuadro 3.1.

El Aislamiento de Azospirillum sp. es muy simple, basta sembrar un pequeño trozo de raíz de aproximadamente 0.5 a 1 cm., de longitud en medio NFB semisólido, para obtener al cabo de unos pocos días el desarrollo del microorganismo buscado. Sin embargo la purificación suele ser bastante difícil porque los contaminantes supuestamente oligotróficos, desarrollan muy bien en este medio y al estriar el material en caja predomina sobre Azospirillum sp., muchos de estos contaminantes son bastones Gram negativos, móviles o no que aislados en cultivos puros muestran una actividad nitrogenásica reducida. (Alvarez, 1983). Es por lo --

CUADRO 3.1 AISLAMIENTO DE AZOSPIRILLUM

Plantas	Autor	País	Año
<u>Pastos tropicales y maíz</u>	Döbereiner y Day (15)	Brasil	1975
Arroz	Döbereiner et al. (13)	Brasil	1976
<u>Cynodon dactylon</u>	Eskew et al. (18)	California	1977
Arroz, Maíz y Sorgo	Subba Rao (42)	India	1979
<u>Panicum, Musa</u>	Tyler et al. (45)	Ecuador y Venezuela	1979
<u>Cyperaceae</u>	Kielo et al. (22)	Finlandia	1981
<u>Opuntia</u>	Rao et al. (33)	India	1982
<u>Euphorbia</u>			

tanto necesario, antes de estriar la mezcla bacteriana en cajas de Petri, obtener el mayor enriquecimiento de Azospirillum, que se logra fácilmente por resiembra sucesiva de tubo a tubo.

La adición de rojo congo a los medios de cultivo (Rodríguez Caceres, 1982) facilitan el reconocimiento de las colonias de Azospirillum sp., pero en muchos casos otros microorganismos cuyas colonias se parecen a las de Azospirillum sp., también concentran el colorante, por lo que es necesaria la observación cuidadosa al microscopio. (Alvarez 1983).

3.2 Identificación de Azospirillum

Las cepas aisladas, desarrolladas en el medio semisólido de malato dan origen a una película superficial blanca y densa, compuesta de espirilos semejantes a una rosca de corcho, los que se mueven rápidamente hacia atrás y hacia adelante en línea recta, son Gram negativos, con 5 a 15 micrones de largo por aproximadamente 1 micrón de ancho, presentan gránulos de polibetahidróxibutirato (PHB) y poseen actividad nitrogenásica. Se reconocen dos especies, ambas son pleomórficas. (Lamm et al., 1981).

A. lipoferum forma grandes células vegetativas en forma de S después de 72 horas de crecimiento. Después de incubaciones prolongadas en medio sólido y semisólido, los cultivos presentan estructuras ovoides con pared difusa y son aproximadamente de 2.5 micras de diámetro por 3.15 micras de largo. Los cultivos ricos en cistos son más resis-

tentes a la desecación que los cultivos normales vegetati--vos, por lo que se piensa que los cistos representan un mecanismo para que Azospirillum pueda persistir en la rizófera bajo condiciones de un medio ambiente desfavorable. Sin embargo los datos no han sido probados para demostrar su potencial de resistencia. En 1980 Berg et al., reportó la formación de estructuras capsuladas, las cuales fueron capaces de reducir C_2H_2 en medio sólido libre de nitrógeno. (Lamm et al., 1981).

Esta propiedad sumada a la habilidad de utilizar al NO_3^- como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia y de acidificar al medio a partir de fructosa permite ubicar a los microorganismos aislados en el género Azospirillum (Tarrand et al., 1978) y diferenciarlos así de otros espirilos fijadores de nitrógeno.

3.2.2. Identificación de las especies de Azospirillum

Para ello se realizan pruebas bioquímicas y fisiológicas que incluyen morfología celular en medio NFb semi-sólido más extracto de levadura (a las 72 horas de desarrollo) requerimientos de biotina, utilización de glucosa a partir de glucosa-peptona en 96 horas de desarrollo, habilidad de producir ácido a partir de glucosa en medios anaerobios y algunas pruebas enzimáticas como son hidrólisis de gelatina, indol, catalasa, oxidasa, ureasa etc. Todas estas pruebas fueron realizadas por Tarrand-Krieg-Döbereiner, 1978.

3.2.3. Identificación de Azospirillum por técnicas inmunológicas.

Las especies y grupos de Azospirillum han sido - caracterizadas serológicamente por Schank et al., 1979; - - De-polli et al., 1980. Por aplicación de técnicas de anticuerpos fluorescentes, De-polli reporta una diferenciación-reducida entre las especies de A. lipoferum y A. brasilense provenientes de diferentes plantas huéspedes específicas de grupo. (citado por Ladha et al., 1982).

De la asociación Azospirillum con arroz fué aislado y caracterizado este microorganismo por Ladha et al., - 1982, quienes emplearon para su identificación técnicas - de inmunodifusión e inmunofluorescencia; en este experimento el antisuero de dos cepas de Azospirillum lipoferum produjeron una pequeña banda de precipitación tanto con A. lipoferum como con A. brasilense. Los Antisueros de dos cepas de A. lipoferum y una cepa de A. brasilense produjeron una sola banda de precipitación con la especie de su respectiva especie. Las reacciones de anticuerpos fluorescentes con - Azospirillum fueron especies específicas; la especificidad de estos anticuerpos fluorescentes y antisueros fueron además probados con otros Azospirillum.

Los antígenos de cultivos viejos mostraron mejor-reacción de inmunofluorescencia, pero solamente con sus respectivos grupos, la reacción fué menos intensa cuando se emplearon cultivos de menos de 24 horas de desarrollo. Esto sugiere que los antígenos viejos pueden ser usados para la

sustituyendo las ecuaciones (4.12a), (4.12b) y (4.13) en la ecuación 4.11 se obtiene:

$$\begin{aligned} -\rho_{\alpha} g h &= 2 \gamma^{\alpha\beta} / R - \rho_{\beta} g h \\ \rho_{\beta} g h - \rho_{\alpha} g h &= 2 \gamma^{\alpha\beta} / R \end{aligned}$$

o bien

$$\gamma^{\alpha\beta} = R g h (\rho_{\beta} - \rho_{\alpha}) / 2 \quad \dots \dots \quad (4.14)$$

Cuando las fases β y α son un líquido y un gas respectivamente, el ángulo de contacto (θ) entre la interfase y el vidrio es próximo a cero. Con un valor de $\theta = 0^{\circ}$ y con una interfase de forma esférica, la interfase es un hemisferio y el radio R se hace igual al radio r del tubo capilar. Si además la densidad de la fase α es despreciable frente a β , como ocurre con el aire frente a los líquidos, entonces la ecuación anterior se simplifica a

$$\gamma^{\alpha\beta} = 1/2 \rho_{\beta} g h r \quad \dots \quad (4.15)$$

$$\text{para } \theta = 0^{\circ} \text{ y } \rho_{\beta} \gg \rho_{\alpha}$$

donde

$\gamma^{\alpha\beta}$ = tensión superficial del líquido

r = radio interno del capilar

h = altura alcanzada por el líquido en el interior del capilar

ρ_{β} = densidad del líquido que asciende en el capilar

g = constante de gravedad

Esta ecuación permite calcular la $\gamma^{\alpha\beta}$ de un líquido de densidad conocida, midiendo la altura que este alcanza en el interior de un capilar de radio determinado.

identificación de Azospirillum de la misma especie. (Ladha et al., 1982).

3.3. Taxonomía de Azospirillum sp.

Azospirillum sp. en un principio fué clasificado como Spirillum lipoferum (bacteria descrita por Beijerinck 1925), debido a la falta de estudio sobre esta bacteria no fué incluida en la Edición del Manual de Bergey (1975). Estudios minuciosos de 60 estirpes aisladas de suelos y raíces de los diferentes continentes (Europa, Africa, Asia y América) revelaron la necesidad de una reclasificación --- (Tarrand et al., 1978). Con bases en estudios de DNA homólogos y numerosas características fisiológicas se estableció un nuevo género con dos especies, Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense. Azospirillum brasilense ha sido dividido en 2 grupos: Nir⁺ (con habilidad para denitrificar) y Nir⁻ (sin habilidad para denitrificar).

3.4. Efecto de la inoculación con Azospirillum en diferentes cultivos.

3.4.1 Inoculación en gramíneas

Los primeros investigadores sobre la fijación de nitrógeno por asociación bacteria-rizosfera en pastos fueron Döbereiner y colaboradores en Brasil. De particular importancia fué el hallazgo de la asociación en la rizosfera de Paspallum notatum con Azotobacter paspali (Döbereiner et al., 1972) que se reportó como específica al genotipo del pas

to; sin embargo, en estos experimentos, la actividad nitrogenásica fué muy baja. Otras asociaciones estudiadas corresponden a la bacteria Beijerinckia indica con caña de azúcar (Döbereiner et al., 1972).

En 1974 Döbereiner y Day aislaron Azospirillum brasilense (formalmente conocido en ese entonces como Spirillum lipoferum de "Transvala" digit (Digitaria decumbens) - y la bacteria fué recuperada nuevamente de este pasto en la estación experimental de Florida. Las raíces que presentaban alta fijación de nitrógeno fueron seleccionadas. Mediante cortes citológicos observaron que la célula cortical de las raíces se encontraban llenas de bacterias que parecían Azospirillum brasilense en medida y morfología; este trabajo citológico sugirió una asociación entre Azospirillum brasilense y Digitaria decumbens.

Schank et al., 1975; trabajando con Azospirillum brasilense y Digitaria decumbens al hacer un balance de nitrógeno reportan una ganancia de 200 Kg/Ha. (Citado por Taylor en 1979).

En 1979 R. W. Taylor estudió la respuesta de dos pastos inoculados con Azospirillum Sp., en suelos desarrollados en piedra caliza procedentes de las Bahamas; para ello empleó los pastos: Pennisetum americanum y Panicum maximum, sembrándolos en estos suelos fertilizados con una pequeña cantidad de nitrógeno y los inoculó con un cultivo mezclado con dos especies de Azospirillum. Obtuvo un rendi-

miento significativamente elevado de materia seca al compararlo con el control no inoculado. Los resultados en Panicum maximum fueron elevados pero no hubo diferencia significativa al compararlos con el testigo. En tanto encontraron una asociación benéfica para la fijación de nitrógeno entre Pennisetum americanum y el organismo Azospirillum.

Cohen et al., 1980, estudiaron el efecto de la inoculación de diferentes especies de Azospirillum en maíz y S. italica bajo diferentes medios ambientes controlados y diferentes tipos de suelos en jarras de Leonard. Las diferentes bacterias examinadas fueron Azospirillum brasilense (Sp-7, Sp-80, Cd, y Cd-1). Los suelos utilizados fueron: un suelo arenoso, uno franco arcilloso y un suelo tipo Loess. Mediante este experimento ellos demostraron que la inoculación con Azospirillum incrementa significativamente el % de reducción de C_2H_2 , peso seco, contenido de nitrógeno total en raíces y brotes tanto en las plantas de maíz como en las plantas de S. italica comparado con los controles no inoculados. También observaron que las plantas asociadas con Azospirillum se desarrollan mejor con niveles pequeños de nitrógeno combinado inicialmente en el suelo. Otros experimentos previos hechos por Smith, 1976 se reportan incrementos significativos de peso seco de Pennisetum y Panicum con niveles medios de fertilización de nitrógeno. Por lo anterior se puede concluir que la asociación Azospirillum con raíces de pasto beneficia a la planta tanto por producción hormonal como por fijación de nitrógeno, particularmente en

períodos posteriores al crecimiento de las plantas donde estas necesitan incrementar el nitrógeno durante la floración y formación de semillas.

Kapulnik et al., en 1981 realizaron estudios sobre los efectos de la fijación de nitrógeno por Azospirillum a diferentes períodos de desarrollo de las plantas de S. italica. Para ello hicieron pruebas de reducción de acetileno en los diferentes períodos de desarrollo de las plantas; encontraron que los valores de reducción de acetileno en S. italica fueron más elevados en el período de reproducción mientras que en el período de semillero no se detectó actividad.

De la misma forma en maíz y sorgo desarrollados en campo la reducción de acetileno fué más elevada durante el período reproductivo de las plantas. Ellos explican que esto se debe a un incremento en el número de raíces maduras asociadas con Azospirillum al empezar el crecimiento reproductivo de las plantas. En este período hay además un incremento en la absorción de nitrógeno aprovechable por la planta, que asociada con la lixiviación y la de desnitrificación, podrían agotar el nitrógeno del suelo; de esta forma se activa la nitrogenasa de Azospirillum.

El decremento en la producción de etileno después del período de reproducción en S. italica podría estar relacionado al crecimiento rápido del tallo y a la inflorescencia durante el período máximo de desarrollo.

3.4.2. Inoculación en trigo.

En 1982, S. N. Rai y A.C. Gaur, probaron una cepa de Azospirillum lipoferum (con alta capacidad para fijar nitrógeno) como inoculante para suplementar la necesidad de nitrógeno de una cosecha de trigo en condiciones de campo. Los tratamientos correspondieron a 0, 40 y 80 Kg. N/ha. con y sin inoculante; 60 Kg. P_2O_5 y 4 Kg K_2O /ha. los que fueron aplicados como dosis basal. El experimento se realizó en bloques diseñados al azar; los controles sin nitrógeno produjeron 1 260 Kg. de grano/ha y la producción en tratamientos inoculados fué de 2 070 Kg de grano/ha., resultando un incremento significativo. En el tratamiento de 40 Kg de N/ha la producción de grano fué de 2 370 Kg./ha. en contraste con la producción de 3 110 Kg/ha en tratamientos similares de nitrógeno más inoculante, así el incremento en la producción fué alrededor de 30%. En los tratamientos que recibieron 80 Kg de N/ha rindieron 2 970 Kg de grano/ha, mientras que éste mismo tratamiento de nitrógeno fertilizado más la inoculación rindieron 4 170 Kg de grano/ha; así el incremento en la producción debido a la aplicación de inoculante fué alrededor de 36%.

El incremento en materia seca y captación de nitrógeno en Zea mays inoculado con Azospirillum en campo, también fué reportado por Cohen et al., 1980.

Los estudios realizados por Kapulnik et al., 1981- describen el efecto de Azospirillum brasilense sobre los parámetros de crecimiento y contenido de nitrógeno de gramí-

neas con vías fotosintéticas C - 4 (*Panicum*, sorgo) y C - 3 (trigo). Los resultados que obtuvieron junto con reportes - previos, indican claramente que la altura y el florecimiento ocurrió primero en las plantas inoculadas comparadas con las no inoculadas. El peso seco total de raíces, contenido de nitrógeno, altura total de las plantas y longitud de las hojas fueron significativamente incrementadas por la inoculación.

El incremento en las ramificaciones y formación - de pelos de raíz aumenta su capacidad de absorción; este - efecto en el sistema de raíces se debe probablemente a la - secreción de hormonas por las bacterias, pero estos datos - no son todavía confiables para establecer cual de los dos - efectos de Azospirillum es más importante en el aumento del crecimiento de las plantas.

Parece que el efecto benéfico de Azospirillum bra silense no está limitado a gramíneas con vías fotosintéti- cas C-4 (sorgo, Pennisetum americanum, Zea mays, Panicum, - etc.) pues la inoculación en trigo plantas con vía fotosin- tética C-3, también aumentó el peso seco, la altura y el nú- mero de espigas; estos incrementos han sido también reporta- dos por Rennie y Larson, 1979.

3.4.3. Estudios sobre la infección de raíces de trigo.

En experimentos realizados por Monzon 1982 sobre la localización de Azospirillum sp., en tejido radicular de trigo (Triticum aestivum) y su relación con las posibles -

vías de infección; se observaron raíces de trigo las que -- fueron cortadas de plántulas de 5, 10 y 15 días de edad -- (inicialmente inoculadas con Azospirillum sp.) e incubadas en un medio con cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC) -- durante 2,4 y 12 horas a 30°C. Las bacterias reductoras de esta sustancia se diferenciaron mejor de las partículas reductoras del tejido vegetal a las 4 horas de incubación. Al mismo tiempo se hicieron determinaciones de la actividad ni trogenásica de las plantas en estudio por el método de reducción de acetileno, comprobándose que la iniciación de la fijación de nitrógeno se realiza en condiciones de invernadero después de 2 semanas de desarrollo de las plántulas.

De acuerdo a los sitios de reducción del colorante observados, los posibles puntos de entrada de Azospirillum sp. en raíces de trigo, sería a nivel de puntas de -- raíces y sitios de formación de raíces secundarias. La infección se extiende luego por el tejido cortical y en los -- comienzos de la actividad nitrogenásica, las bacterias están ubicadas en el xilema.

La preferencia de esas zonas por las bacterias se atribuye a la intensa actividad metabólica y elevada secreción de exudados que caracteriza a esos sitios radicales.

La detección de actividad pectinolítica (del tipo pectinatranseliminasa) en Azospirillum (citado por Monzon-1982) hace suponer que actúa facilitando el proceso de invasión.

Patriquin et al., 1978 trabajando con maíz y em--

pleando la prueba del TTC no detectaron bacterias en la región apical de la raíz principal, lo mismo que Magalhaes et al., 1979, en plantas de maíz desarrolladas en campo. Pero estos investigadores observaron bacterias a 2 cm., del ápice radicular, sin embargo no les fue posible observarlas en la zona terminal de la raíz. No obstante suponen que una posible invasión del estela de la raíz, se produce por vía — apical ya que en las preparaciones microscópicas encontraron infección en el cilindro central sin disrupción de la endodermis. Además la alta actividad nitrogenásica en plantas de maíz con muchas raíces laterales (Pereira, et al., - 1978) apoya la idea de invasión del cilindro central por — las puntas de raíces, al aumentar el número de éstas. (citado por Monzon, 1982).

3.4 Aspectos botánicos y ecológicos del trigo.

El trigo pertenece a la familia de las Gramíneas, — que comprenden alrededor de 600 géneros y más de 500 especies.

El trigo (silvestre o cultivado) se halla clasificado en el género Triticum, del cual se conocen 14 especies. Las especies se subdividen en tres grupos: diploides, tetraploides y hexaploides, según el número de cromosomas contenidos en sus células reproductoras. Los grupos difieren también por sus características anatómicas, morfológicas y de otro tipo. Parece ser que los tipos tetraploides y hexaploides han sido originados de los antiguos trigos diploides, — generalmente mediante hibridación con gramíneas silvestres —

afines. (Aykroydy and Doughty 1970).

El trigo es una planta herbácea anual de 0.50 a 0.80 metros de altura, sus tallos centrales más o menos huecos con entrenudos (caña) que se ramifican al ras del suelo con un número variable de tallos (macollo) las cuales emiten sus propias raíces adventicias y alcanzan la misma altura que el central.

En el extremo de cada tallo se localizan las inflorescencias que forman espigas en dos series opuestas y - alternas de espiguillas a lo largo del raquis. Las espiguillas contienen flores que originan los frutos (cariopses) - protegidos por glumas y glumolas.

3.5.1. Importancia del trigo.

El trigo es un cereal que prospera en una gran diversidad de medio ambiente y que se presta a la implantación de adelantos científicos y a la mecanización. Como alimento - el trigo es una fuente importante de proteínas y materia prima excepcional por el número de los productos que pueden - - elaborarse con ella tanto por métodos tradicionales como por los de la moderna tecnología de los alimentos. Sus productos resultan agradables al ser humano en general y pueden incluirse en diferentes tipos de dietas, ya sea como ingrediente principal o como complemento deseable. El pan es la forma principal en que se consume el trigo en gran parte del mundo, es muy adecuado a la manera de vivir impuesto por la industrialización y la urbanización cada vez mayores. El trigo contribuye eficazmente a la prevención de la deficiencia pro

tefnico-cal6rica y al mejoramiento de la nutrici6n de los ni6os. Estos hechos hacen que el trigo adquiriera cada vez mayor importancia como alimento humano. (Aykroydy and Doughty 1970).

El cuadro 3.2 muestra la producci6n y consumo de trigo en M6xico, realizado por el sector Agropecuario y Fo—restal, 1985.

CUADRO 3.2 PRODUCCION Y CONSUMO DE TRIGO (MEXICO 1978-1985)

CONCEPTO	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984 P	1985 E
Producción T(mil)	2,785	2,287	2,785	3,193	4,462	3,460	4,509	4,541
Importación T(mil)	506	1,169	923	1,130	315	401	344	360
Consumo aparente T(mil)	3,264	3,434	3,684	4,317	4,775	3,864	3,861	4,901
Consumo per- capita. Kg. Personas	50	51	53	61	67	51	63	62
Exportación T(mil)	27	22	24	6	2	—	1	—
Superficie sembrada Ha (mil)	-	643	777	940	1,011	907	1,081	1,168
Superficie cosechada Ha (mil)	760	584	724	860	1,011	857	1,032	1,100

P = Preliminar

E = estimado

4. MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se desarrollo según el esquema 4.1

Los análisis físico y químico de los suelos fueron realizados en el laboratorio de suelos de CODAGFM, Metepec, Estado de México.

4.1 Aislamiento y purificación de Azospirillum

4.1.1. Aislamiento a partir de raíces y suelos.

En el estado de México se muestrearon raíces y -- suelos de la rizosfera de los siguientes cereales:

Triticale Yoreme Tc 179

Trigo de las variedades Yavaros C-79 y Toluca F-73

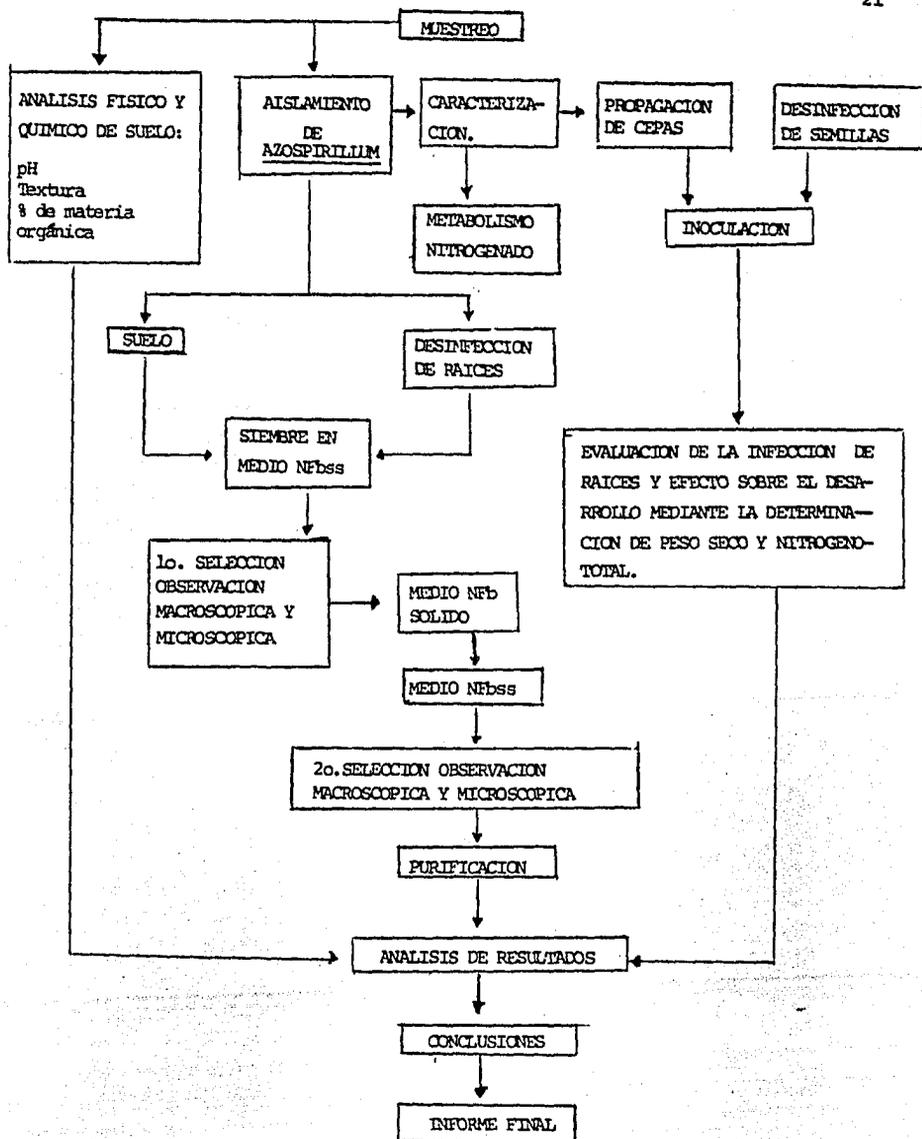
Cebada Apizaco

Avena Putman

Centeno Elbon

Las muestras de raíces y suelos se colocaron en - bolsas de polietileno y fueron transportadas al laboratorio de Microbiología Experimental Fac., de Química, UNAM., donde se conservaron en refrigeración hasta el momento de ser procesadas.

Para efectuar el aislamiento de raíces, estas se cortaron en pedazos de 0.5 a 1 cm., de longitud y se lavaron 3 veces con agua destilada corriente y 3 veces con -- agua destilada estéril. Posteriormente se desinfectó la superficie de las raíces con solución de cloramina T al 1% durante 5 minutos. Inmediatamente fueron lavadas varias veces



Esquema 4.1 Programa de Trabajo

con agua destilada estéril y solución amortiguadora de fosfatos 1 milimolar (pH 6.8) y se procedió a sembrarlas en tubos de cultivo de 20 ml., de capacidad con 7-8 ml de medio-NFb semisólido (medio 1) por triplicado. Procediéndose a —elegir los tubos que presentaron: 1) formación de una película fina debajo de la superficie del medio en forma de velo o sombrilla que es apreciable a partir de las 14-18 horas de incubación, 2) vire del indicador del medio a color azul, 3) al hacer las observaciones microscópicas en fresco predominan los espirilos con movimiento típico.

A los tubos elegidos se le hicieron de 3-5 resiembbras consecutivas con el fin de enriquecer los cultivos, de la última resiembra se estirió al microorganismo en cajas de petri con medio NFb sólido (medio2) con el objeto de separar las colonias y poder aislar al microorganismo. Las cajas se incubaron a 28-30°C durante 7 días. Las colonias formadas se observaron al microscopio y se escogieron aquellas que tenían la morfología característica del Azospirillum.

4.1.2. Verificación de la pureza.

Los cultivos seleccionados fueron sembrados por —estria cruzada en los siguientes medios de cultivo: NFb sólido (medio2), medio de papa (medio 3) y medio de agar nutritivo (medio 4). Estos medios se incubaron a 28-30°C durante 7 días. Se escogieron las colonias secas, opacas de color amarillo o azuladas. Posteriormente se realizaron observaciones

microscópicas de las colonias escogidas para verificar la morfología celular. Estas colonias fueron transferidas de nuevo a medio NFb (medio 1) incubándose a 28-30°C durante 48 horas. La aparición de los tres puntos mencionados citados en párrafos anteriores nos indican que el aislamiento de las bacterias es positivo.

Para efectuar el aislamiento a partir de suelos se proceso de la misma forma que el aislamiento a partir de raíces, sustituyendo los pedazos de raíces por pequeños - - agregados de suelo con un peso aproximado de 5-10 mg., que se sembraron directamente por picadura a los tubos con medio semisólido NFb (medio 1).

4.1.3. Mantenimiento de los cultivos.

Las cepas purificadas fueron conservadas en medio NFb (medio 1) en refrigeración a 4°C y resembradas cada 6 meses. Antes de utilizar las cepas para las diferentes pruebas se verificó su pureza mediante la tinción de Gram.

4.2. Caracterización de Azospirillum

4.2.1. Cepas

- De referencia

Sp-7 Azospirillum brasiliense. Catálogo de colección ATCC 29145.

VI-2 Azospirillum lipoferum. Aislada de raíces de maíz colectado en Metepec estado de México. Clasificada en el laboratorio de Microbiología Experimental.

- Para identificación de especies.

Se emplearon tres cepas, dos aisladas en un experimento previo, realizado por el Q.F.B. Angel Flores en el laboratorio de Microbiología Experimental y una aislada en la presente investigación. Estas cepas fueron anotadas como:

Pox Azospirillum sp. Aislada de pasto Pangola procedente de Matías Romero, Oaxaca.

C₄ Azospirillum sp. Aislada de trigo, procedente de Celaya, Guanajuato.

5sc Azospirillum sp. Aislada de avena, procedente de Metepec, estado de México.

4.2.2. Medios de cultivo (ver anexo)

NFb semisólido (1)

NFb-glucosa semisólido (5)

NFB- sin biotina (6)

NFb-extracto de levadura (7)

NFb sólido (2), Medio LIC (3), Gelosa nutritiva (4)

NFb con diferentes azúcares y ácidos orgánicos como fuente de carbono (8).

Medios para pruebas enzimáticas: Hidrólisis de gelatina (9), Almidón (10), Indol (11), Catalasa - - (12), Esculina (13), oxidasa (14) y Ureasa (15).

NFb líquido libre de nitrógeno con 0.08 % de agar (16).

NFb líquido más nitrato de potasio (17).

Solución de NFb (18)

NFb semisólido para NMP (19).

4.2.3. Criterios de clasificación (Tarrand-krieg, 1978).

Se determinó el comportamiento de las 5 cepas empleadas al sembrarlas en los medios de cultivos antes mencionados procediéndose a la observación de las siguientes características.

En el medio 1, alcalinización del medio y formación de una película en forma de campana 2 mm abajo de la superficie a las 24 horas de desarrollo, la que emigra hacia la superficie al aumentar el período de incubación.

Característica de las colonias formadas en los medios 2, 3 y 4.

En el medio 5 desarrollo superficial a las 72 ho -

ras de incubación.

Presencia o ausencia de desarrollo en el medio - de cultivo carente de biotina.

Y en el medio 7 morfología celular.

Todos los cultivos se inocularon en tubos y se incubaron a 28-30°C durante 48-72 horas. (Döbereiner, 1980).

De acuerdo con el criterio de clasificación expuesto por Tarrand, 1978; se procedió a determinar algunas propiedades bioquímicas referentes a la capacidad de desarrollarse en presencia de diferentes fuentes de carbono, — substituyendo en el medio NFb al ácido succínico. Acidificación de la glucosa en presencia de peptona y pruebas enzimáticas tales como: hidrólisis de gelatina (medio 9) interpretada después de un período de incubación de 10 a 15 días; — hidrólisis del almidón (medio 10) interpretada después de — un período de incubación de 10 a 15 días; producción de indol (medio 11) esta prueba se llevó a cabo después de haber incubado el cultivo 48-72 horas a 30°C y haber adicionado — el reactivo de Ehrlich o Kovac; prueba de catalasa esta se realizó colocando una gota de H_2O_2 en cultivos desarrollados en medio NFb semisólido; degradación de la esculina — (medio 13) se interpretó a los 8 a 10 días; oxidasa (medio-14) se realizó mezclando una gota al 1% de clorhidrato de — dimetil parafenilendiamina con una gota de cultivo desarrollado en medio NFb líquido durante 72 hora a 30°C; ureasa — (medio 15) se interpretó de acuerdo con el viraje del indicador y el crecimiento en el medio de cultivo después de — 48, a 72 horas.

4.3 Metabolismo del nitrógeno en diferentes capas de Azospirillum.

Con objeto de determinar las transformaciones de nitrógeno que efectúa Azospirillum se procedió a inocular las cepas previamente caracterizadas en medios de cultivos carentes de nitrógeno o adicionados de nitrato de potasio (medio 17), los que se incubaron a 28-30°C en condiciones estáticas y de agitación y se procedió a determinar el nitrógeno proteico y nitrógeno inorgánico residual en sus diferentes estados de oxidación.

4.3.1. Capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico por Azospirillum

Esta evaluación se realizó mediante la técnica de Micro-Kjeldhal modificado por Mitchell.

Matraces de 125 ml de capacidad con 50 ml de medio NFb líquido libre de nitrógeno más 0.08 % de agar (medio 16) fueron inoculados por triplicado con 5 ml de cultivo de 24 horas de desarrollo, cuya densidad de población se ajustó a 60 unidades Klett. Estos se incubaron a 28-30°C durante 5 días; después de los cuales se transfirió 1 ml del cultivo al matraz de micro-Kjeldhal, para realizar la determinación de nitrógeno por el método de Mitchell, 1972.

Los testigos que se corrieron fueron:

- 1) testigos sin inocular y sin incubar
- 2) testigos inoculados y sin incubar.

La incubación se efectuó en condiciones estáticas para favorecer el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico.

4.3.2. Transformaciones de nitrógeno inorgánico (asimilación y desnitrificación).

Se determinó en cultivos estáticos y agitados. El nitrógeno molecular desprendido debido a la desnitrificación se determinó por balance entre el contenido de nitrógeno inicial en el medio 17 (en forma de nitratos) menos el contenido de nitrógeno final. (productos del metabolismo nitrogenado liberado en el medio de cultivo en forma de nitrato, amonio, nitrógeno orgánico y nitratos residuales).

Los testigos incluidos en ambos experimentos (agitados y estáticos) fueron:

- 1) Testigos inoculados y sin incubar
- 2) Testigos sin inocular e incubados
- 3) Testigos sin inocular y sin incubar.

Ambos experimentos se hicieron por triplicado.

Los métodos empleados para estas determinaciones fueron:

Nitritos (se determinó en el sobrenadante) por el método del ácido sulfanílico. (Chapman y Parker, 1973).

Nitrógeno amoniacal (se determinó en el sobrenadante) por el método de Mitchell. (Mitchell, 1972).

Nitrato residual por el método de Harper. (Chapman y Parker, 1973).

En la biomasa se determinó nitrógeno orgánico - por el método de Mitchell. (Mitchell, 1972).

Los pasos seguidos para hacer estas determinaciones están descritos en el esquema 4.2.

4.4. Evacuación de la Infectividad y Efectividad en la fijación de nitrógeno por Azospirillum en plantas de trigo (Invernadero).

4.4.1 Cepas.

Se emplearon las dos cepas de referencia Sp-7 y VI-2, otras tres cepas, dos de las cuales fueron aisladas y clasificadas en el laboratorio de Microbiología Experimental y 1 cepa aislada y clasificada por Angel Flores en trabajos previos; en el que los resultados de fijación de nitrógeno por los métodos de reducción de acetileno y de micro-kjeldhal de pruebas realizadas in vitro indican que estas cepas son muy activas, mostrando una actividad similar o mejor que la cepa de referencia. Estas cepas corresponden a:

Sp-7 Azospirillum brasilense. Cepa de colección.

VI-1 Azospirillum brasilense. Aislada de maíz procedente de Metepec, estado de México.

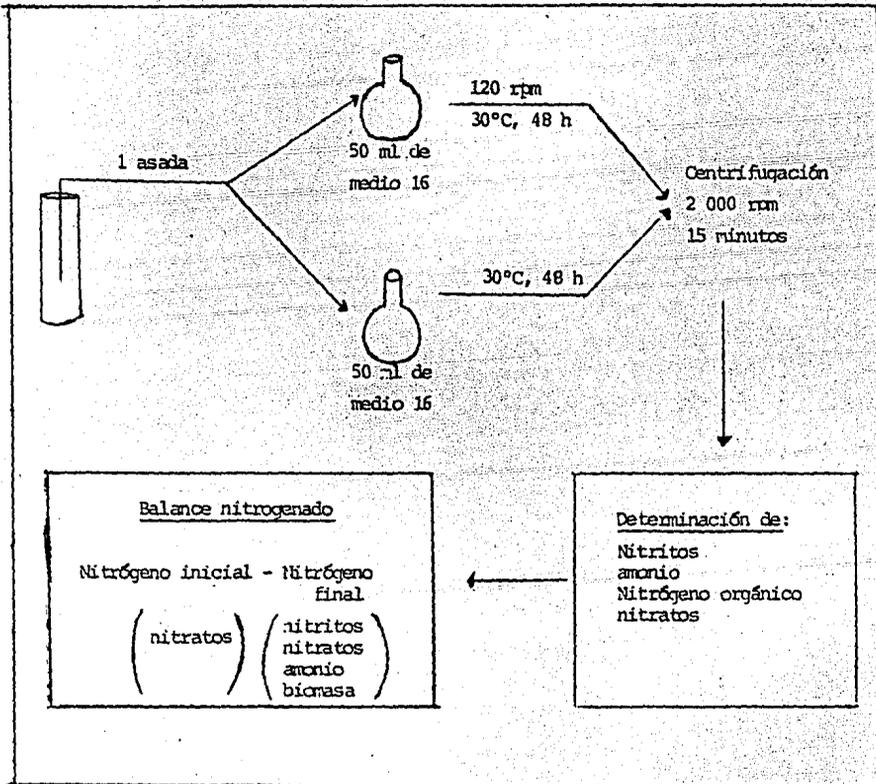
VI-2 Azospirillum lipoferum. Aislada de maíz procedente de Metepec, estado de México.

VS-1 Azospirillum brasilense. Aislada de sorgo procedente de Valle Santiago, Gto.

Y la cepa 5sc aislada y caracterizada en el presente estudio.

4.4.2. Semillas

En este experimento se emplearon semillas de las variedades de trigo México 82 y Zacatecas VI 74. A estas se les determinó el porcentaje de germinación colocando 100 semi



Esquema 4.2

TRANSFORMACIONES DE NITROGENO INORGANICO.

llas de cada variedad en cajas de Petri, se ajustó la humedad de 40 % con agua estéril y se incubaron a 25°C durante 72 horas después de los cuales se procedió a determinar el número de semillas germinadas. Esta prueba se realizó por triplicado en cada variedad de trigo.

4.4.3. Suelo.

Se colectó en Metepec, estado de México. La muestra de suelo se seco a temperatura ambiente, se homogenizó y distribuyó en 70 macetas de 4 Kg. de capacidad. En cada macetas se colocaron 2.5 Kg. de suelo.

A esta muestra se le determinó el número de Azospirillum por grano de suelo, por el método del NMP. Para ello se pesó un gramo de suelo y fué suspendido en un tubo de cultivo con 9.5 ml de solución Nfb (medio 18) a partir de la suspensión se hicieron diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} ; un volumen de 0.1 ml de la suspensión fué inoculada a tubos con medio Nfb (medio 19). Por triplicado, se incubaron a 28-30°C durante 4-5 días y se eligieron como tubos positivos los que presentaron la película característica en forma de velo, alcalinizaron el medio y tuvieron morfología microscópica del género Azospirillum. (Döbereiner, 1980).

4.4.4. Inóculo

Cada una de las cepas fué tratada de la siguiente manera:

- Inocular una asada de la cepa en un tubo que contiene medio NFB líquido adicionado de KNO_3 (1g/L), incubado durante 24 horas a 28°C.

- Propagación del inoculante, a un matraz nefelométrico de 300 cc. de capacidad que contenía 100 ml de medio de cultivo anterior, se transfirió 5 ml del cultivo desarrollado en el tubo y se incubó a 28-30°C durante 72 horas en agitación (120 rpm). Con objeto de inocular las plantas con el mismo número de células, se ajustó la densidad de población a 130 unidades Klett mediante la adición de cultivo estéril.

4.4.5. Siembra e inoculación

A cada maceta se le adicionó 2.5 g. de P_2O_5 y se mezcló lo mejor posible con el suelo, sembrándose 7 semillas de la variedad de trigo correspondiente; se ajustó la humedad a 60% de capacidad de campo y se colocaron las macetas en invernadero.

La inoculación se efectuó mediante la adición de 1 ml de los cultivos de azospirillum correspondientes a cada una de las plántulas de trigo de 72 horas de desarrollo.

La adición del fertilizante nitrogenado en forma de sulfato de amonio en el tratamiento testigo positivo se efectuó en dos ocasiones siendo éstas: cuando las plantas -

alcanzaron de 8 a 10 cm., de longitud y al inicio de la formación de macollo, las cantidades adicionadas fueron 1.54 - y 2.32 g por macetas respectivamente.

4.4.5. Diseño del experimento.

El diseño experimental fué de bloques al azar y estuvo constituido por 70 macetas que se dividieron en 2 lotes de 35 macetas (una para cada variedad de trigo). Cada lote a su vez fué subdividido en 7 lotes de 5 macetas que representaron las repeticiones de cada tratamiento.

Tratamientos

- 1 P_2O_5 + cepa Sp-7
- 2 P_2O_5 + cepa VI-1
- 3 P_2O_5 + cepa VI-2
- 4 P_2O_5 + cepa VS-1
- 5 P_2O_5 + cepa 5sc
- 6 testigo (+) + $(NH_4)_2SO_4$ + P_2O_5
- 7 testigo (-) + P_2O_5

4.4.7. Cuidados del cultivo

Este experimento se mantuvo en invernadero a temperatura de 10°C mínima y 30°C Máxima, durante 70 días, dando riegos periódicamente cuando fueron necesarios.

4.4.8. Evaluación de la infectividad de Azospirillum

Esta prueba consistió en hacer una serie de 6 - - aislamientos a diferentes tiempos, para determinar en que - tiempo las cepas de Azospirillum probadas, eran capaces de infectar las raíces de trigo.

El primer aislamiento fué hecho a las 72 horas de haber sembrado las semillas, previo a la inoculación. Este aislamiento se realizó con el fin de observar si las bacterias presentes en el suelo eran capaces de infectar a las - plántulas desarrolladas.

Los otros 5 aislamientos se realizaron después de haberse efectuado la inoculación a los períodos de 24, 72 - horas y después de 11, 19 y 27 días.

4.4.9. Evaluación de la efectividad en la fijación de nitrógeno atmosférico por Azospirillum asociado a raíces de trigo.

La cosecha se realizó a los 70 días. Cortándose -- las plantas al raz del suelo, estas se colocaron en la estufa a 65-70°C durante 72 horas y se procedió a determinar:

- Peso seco.
- Contenido de nitrógeno (parte aérea) por el método de micro-Kjeldhal modificado por Mitchell. Y a efectuar el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

5. RESULTADOS

LOS RESULTADOS DEL ANALISIS FISICO Y QUIMICO DE LOS SUELOS SE ANOTAN EN EL CUADRO 5.1

CUADRO 5.1 ANALISIS FISICO Y QUIMICO DE LOS SUELOS, REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE SUELOS DE LA COMISION COORDINADORA DE DESARROLLO AGRI-COLA Y GANADERO DEL ESTADO DE MEXICO.

DETERMINACIONES	SUELOS	
	Aislamiento	Pba. de Infectividad y Efectividad
pH	6.95	6.9
Nitrogeno total (Kg/Ha)	1 170.5 (B)	4 601.0 (R)
Fosforo asimilable (Kg/Ha)	41.25 (B)	56.4 (E)
Potasio asimilable (Kg/Ha)	277.22 (R)	820.0 (E)
Materia orgánica (Kg/Ha)	23.127 (B)	91.165 (R)
Nitrato (Kg/Ha)	36.775 (B)	142.6 (R)
Textura	Franco	Arenoso
% de Arena	75	66
% de Limo	41	22
% de Arcilla	12	12

B = bajo

R = Regular

E = Excelente

LOS RESULTADOS DEL AISLAMIENTO DE AZOSPIRILLUM SE ANOTAN EN CUADRO 5.2

CUADRO 5.2 AISLAMIENTO DE AZOSPIRILLUM A PARTIR DE LA RIZOSFERA DE -
CULTIVOS DE 6 CEREALES DIFERENTES.

Cereales	<u>Rafces</u>	
	Nb. de muestras	Muestras positivas la. selección 2a. selección
Triticale Yoreme Tcl 79	3	2 0
Trigo Yavaros C-79	3	2 0
Trigo Toluca F-23	3	0 0
Cebada Apizaco	3	0 0
Avena Putman	3	0 0
Centeno Elbon	3	1 0
<u>Suelo</u>		
	Muestras positivas	
	Nb. de Muestras	la. Selección 2a. Selección
Triticale Yoreme Tcl 79	3	2 0
Trigo Yavaros C-79	3	3 0
Trigo Toluca F-73	3	1 0
Cebada Apizaco	3	2 0
Avena Putman	3	4 0
Centeno Elbon	3	1 0

LOS RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS PARA LA IDENTIFICACION DE AZOSPIRILLUM SE ANOYAN EN EL CUADRO. 5.3

CUADRO 5.3 CARACTERÍSTICAS PARA LA IDENTIFICACION DE AZOSPIRILLUM (Döbereiner, 1980)

Cepas	Medio Nfb es con glucosa	Medio Nfb _{SS} sin biotina	Morfología celular en medio Nfb ss + extrac to de levadura (72 H)
<u>Azospirillum*</u> <u>lipoferum</u>	+	-	Cel. pleomórficas, en forma de "S" o hélice con gránulos de PBH, movimiento lento o ninguno. 1.5 x 5-30 μ
<u>Azospirillum*</u> <u>brasilense</u>	-	+	Cel. cortas, curvadas, con gránulo de PBH, muy móviles. 1.0 x 3.8 μ
<u>A. brasilense</u> Sp-7 (colección)	-	+	"
VT	+	-	Como <u>A. lipoferum</u> , con movimiento lento.
5sc	+	-	Como <u>A. lipoferum</u> , con movimiento lento. 1.47 x 5.88 μ
Pcx	-	+	Como <u>A. brasilense</u> 1.47 x 2.94 μ
C ₄	-	+	Como <u>A. brasilense</u> 0.35 x 2.94 μ

ss = semisólido

μ = micras

* = Reportado por Döbereiner, 1980.

Las lecturas se hicieron en la tercera resiembra. Incubación 28-30°C durante 72-96 horas.

LOS RESULTADOS DE MORFOLOGIA COLONIAL DE AZOSPIRILLUM SE ANOTAN EN EL CUADRO 5.4

CUADRO 5.4. MORFOLOGIA COLONIAL' DE AZOSPIRILLUM

Cepas	Medio agar nutri- tivo.	Medio NFB-extrac- to de levadura	Medio de papa
<u>A. Lipoferum*</u> y <u>A. brasilense*</u>	Diámetro 3-5 mm color rosa, planas secas, opacas y es- trelladas.	Diámetro 1-2mm, color Bco., ele- vadas, secas, o pacas, irregula- res o circulares	Diámetro de 3-5mm, color rosa, planas secas, opacas y es- trelladas.
<u>A. brasilense</u> Sp-7 (colect.)	Diámetro 3-4 mm, color rosa, pla- na seca, opaca, circulares e irregu- lares.	Diámetro de 1-2 mm. color crema planas secas, o pacas e irregula- res.	Diámetro de 2-3 mm color crema, planas secas, opacas circu- lares e irregulares.
<u>A. lipoferum</u> VI-2.	Diámetro 2-3 mm, color rosa, pla- nas, secas, opa- cas e irregulares.	Diámetro 1-2 mm, color Bco. ama- rillento, eleva- das, secas, opa- cas circulares.	Diámetro 2-3 mm, co- lor inicialmente Bca. y después azuladas, se- cas, planas, opacas, estrelladas.
Ssc	Diámetro 3-5 mm, amarillo, opacas planas e irregula- res.	Diámetro 1-2mm, color Bco-amari- llento, planas, secas, opacas e irregulares.	Diámetro 2-4mm color Bcas y después azu- ladas, secas, planas opacas estrelladas.
Pox	Diámetro 2-3mm, color amarillo pálido, planas, secas opacas y estrelladas.	Diámetro 1-2mm, color Bco-amari- llento, planas opacas, secas i- rregulares.	Diámetro 2-4mm, color azuladas-amarillentas, secas, planas, opacas, estrelladas.
C ₄	Diámetro 2-4mm, color rosa, plana opaca, circular e irregular.	Diámetro 1-2 mm, color Bco., pla- nas, secas, opa- cas, circulares.	Diámetro 2-3mm, co- lor azul-amarillento, seca plana, opaca, - estrellada.

' lectura realizada a los 8-10 días de incubación a 28±30°C.

* Reportado por Tarrand et al., 1978.

LOS RESULTADOS DE LA CARACTERÍSTICA PRINCIPAL PARA LA IDENTIFICACION DE -
AZOSPIRILLUM SE ANOTAN EN EL CUADRO 5.5

CUADRO 5.5 Características principales para la identificación de Azospirillum Sp. (Tarrand-Krieg)

Pruebas*	<u>A. lipoferum</u>	<u>A. brasilense</u>	5sc	Pox	C ₄
Requerimiento de biotina ¹	+	-	+	-	-
Glucosa y Cetoglutarato como única fuente de carbono	+	-	+	-	-
Nfb ss+ extracto de levadura, las células se hacen largas anchas e inmóviles. (48-72h)	+	-	+	-	-
Acidificación del medio glucosa-peptona en 96 horas.	+	-	+	-	-
Acidificación del medio glucosa y fructosa en anaerobiosis (2 semanas).	+	-	+	-	-
Crecimiento y acidificación producida a partir de manitol, ribosa y sorbitol (72 horas)	+	-	+	-	-

¹ Realizado en medio Nfb ss sin biotina.

* Reportado por Tarrand et al., 1978.

LOS RESULTADOS DE LAS CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE AZOSPIRILLUM SE ANOTA EN EL CUADRO 5.6

CUADRO 5.6 CARACTERISTICAS PARA LA IDENTIFICACION DE AZOSPIRILLUM (Tarrand-Krieg).

Pruebas ¹	% de cepas positivas *						
	<u>A</u> <u>Linoferum</u>	<u>A</u> <u>brasilense</u>	Sp-7 Colecc.	VI-2	Pox	C ₄	5sc
Oxoglutarato	100	0	-	+	-	-	+ d
Citrato	100	96 y 4 V	-	+	-	-	+
Gluconato	100	100	+	+	+	+	+
Malonato	0	0	+ d	+ d	-	-	-
Acetato	0	0	-	-	-	-	-
Oxalato	0	0	+ d	-	+ d	+ d	-
Glicerol	100	100	+	+	+	+	+
Succinato	100	100	+	+	+	+	+
Malato	100	100	+	+	+	+	+
Manitol	88 y 7 V	0	-	+	-	-	+
Sorbitol	67 y 13 V	0	-	-	-	-	+ d
Ribosa	40 y 27 V	0	-	+ d	-	-	+ d
Glucosa	100	9	+ d	+	+ d	+ d	+
Arabinosa	67 y 27 V	74 y 9 V	+ d	+ d	+ d	+ d	+ d
Xilosa	80 y 7 V	0 y 9 V	+ d	+	+ d	+ d	+
Fructosa	100	100	+	+	+	+	+
Sacarosa	0	0	-	-	-	-	+
Lactosa	0	0	-	-	-	-	-
Melobiosa	0	0	-	-	-	-	-
Bilis 1%	100	98 y 2 V	+	+	+	+	+
NaCl 3%	0	51 d	+	-	+	+	-

* Reportado por Tarrand et al., 1976.

¹ Lecturas hechas en la tercera reciebra. Incubación 28-30°C, durante 72- 96 horas.

V = Variable, d = débil.

LOS RESULTADOS DE LAS CARACTERISTICAS ENZIMATICAS PARA LA IDENTIFICACION DE AZOSPIRILLUM SE ANOTAN EN EL CUADRO 5.7

CUADRO 5.7 CARACTERISTICAS ENZIMATICAS PARA LA IDENTIFICACION DE AZOSPIRILLUM TARRAND-KRIEG, 1978.

PRUEBAS	<u>AZOSPIRILLUM</u> <u>lipoferum</u>	<u>AZOSPIRILLUM</u> <u>brasiliense</u>	5sc	Pox	C ₄	Sp-7	VI-2
Hidrolisis de gelatina	0	0	0	0	0	0	0
Almidon	0	0	0	0	0	0	0
Indol	0	0	0	0	0	0	0
Catalasa	27f y 40d	87f y 13d	+	-	+	+	+
Esculina	100	100	+	+	+	+	+
Oxidasa	100	100	+	+	+	+	+
Ureasa	100	100	+	+	+	+	+

f = fuerte

d = débil

LOS RESULTADOS DE FIJACION DE NITROGENO SE ANOTAN EN EL CUADRO 5.8

CUADRO 5.8 FIJACION DE NITROGENO * POR AZOSPIRILLUM

Cepas	Micro-Kjeldhal	
	Nitrogeno fijado ($\mu\text{g}/\text{cultivo}$)	% de nitrógeno fijado
Sp-7 de colección	750	100
C ₄	750	100
Pax	1 855.26	247.36
5sc	530	70.66

* Realizado en matraces con medio 16. Incubado durante 5 días a 28-30°C.

LOS RESULTADOS DEL METABOLISMO NITROGENADO DE LAS CEPAS DE AZOSPIRILLUM SE AJUSTAN EN LOS CUADROS 5.9 y 5.10 (cultivos agitados y cultivos estáticos — respectivamente).

CUADRO 5.9 METABOLISMO NITROGENADO DE AZOSPIRILLUM (cultivo* agitado)

Determinación	Cepas		
	5sc	Por	C ₄
Nitrógeno como biomasa (µg)	4 421.05	9 947.37	8 842.11
Nitrógeno como amonio (µg)	328.43	218.95	2 23.46
Nitrógeno como nitritos (µg)	935.56	315	0
Nitrógeno como nitratos (µg)	0	0	0
Nitrógeno total (µg)	5 685.04	10 481.66	8 865.57
Nitrogeno perdido al medio ambiente (µg)	1 244.95	0	0
% de nitrógeno en el medio	82.035	151.25	127.93
% de nitrógeno desnitrificado	17.965	0	0

* El medio contiene inicialmente 6 930 µg de nitrógeno en forma de nitrato.

CUADRO 5.10 METABOLISMO NITROGENADO DE AZOSPIRILLUM (Cultivo* estático)

DETERMINACION	5sc	Pox	C ₄
Nitrógeno como biomasa (µg)	0	2 500	1 100
Nitrógeno como amonio (µg)	0	0	0
Nitrógeno como nitrito (µg)	6 150	6 600	6 200
Nitrógeno como nitrato (µg)	207	407.44	7.44
Nitrógeno total (µg)	6 357	9 507.44	7 307.44
Nitrógeno perdido al medio-ambiente (µg)	573	0	0
% de nitrógeno en el medio	91.73	137.19	105.44
% de nitrógeno desnitrificado	8.27	0	0

* El medio contiene inicialmente 6 930 µg. de nitrógeno en forma de nitratos.

LOS RESULTADOS DEL AISLAMIENTO DE Azospirillum se anotan en el cuadro 5.11

CUADRO 5.11 AISLAMIENTO DE AZOSPIRILLUM A PARTIR DE LA RIZOSFERA DE CULTIVOS DE TRIGO INOCULADOS EN EL INVERNADERO.

Trigo variedad México 82 inoculado con	No. de muestras	Muestras positivas Aislamientos					
		*1o.	2o.	3o.	4o.	5o.	6o.
Sp-7 (colección)	5	0	4	3	4	5	5
VI-1	5	0	3	4	5	4	5
VI-2	5	0	4	5	5	5	5
SV-1	5	0	5	4	4	5	5
5sc	5	0	5	5	4	5	5
Testigo (+)	5	0	0	0	0	0	0
Testigo (-)	5	0	0	0	0	0	0
% de infección en Tratamientos inoculados			84	84	88	96	100
Trigo variedad Zacateca VI 74	No. de muestras	Muestras positivas Aislamientos					
		*1o.	2o.	3o.	4o.	5o.	6o.
Sp-7	5	0	4	4	5	5	5
VI-I	5	0	5	4	3	4	5
VI-2	5	0	4	4	5	4	5
VS-I	5	0	3	3	5	5	5
5sc	5	0	4	5	5	5	5
Testigo (+)	5	0	0	0	0	0	0
Testigo (-)	5	0	0	0	0	0	0
% de infección en tratamientos ino- culados.			80	84	92	92	100

* El primer aislamiento fué realizado cuando las plántulas tenían 72 horas de desarrollo, previas a la inoculación

LOS RESULTADOS DEL NUMERO DE AZOSPIRILLUM POR EL METODO

DEL NUMERO MAS PROBABLE SE ANOTA EN EL CUADRO 5.12

CUADRO 5.12 NUMERO DE AZOSPIRILLUM EN EL SUELO* EMPLEADO PARA EL EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO.

DETERMINACIONES EN:		METODO DEL No. MAS PROBABLE No. DE AZOSPIRILLUM POR GRAMO DE SUELOS
Suelo antes de inocularlo		1.7×10^2
Suelo después de la cosecha	Tratamientos, variedades ¹ México 82	
	Sp-7 (colección)	5.8×10^4
	VI-1	1.7×10^4
	VI-2	1.7×10^5
	SV-1	1.7×10^5
	5sc	5.8×10^5
	Testigo (+)	5.8×10^2
	Testigo (-)	1.7×10^2
	Tratamientos, variedad ¹ Zacateca VI 74	
	Sp-7	5.8×10^3
	VI-1	5.8×10^2
	VI-2	5.8×10^2
	SV-1	1.7×10^3
	5sc	1.7×10^3
	Testigo (+)	1.7×10^3
	Testigo (-)	1.7×10^3

* Suelo del Valle de Toluca
¹ de trigo.

LOS RESULTADOS DE PESO SECO DE LA PARTE AEREA DE LAS PLANTAS DE TRIGO
 VARIEDAD MEXICO 82 Y ZACATECA VI 74 RESPECTIVAMENTE SE ANOTAN EN LOS -
 CUADROS 5.13 Y 5.14

CUADRO 5.13 DETERMINACION DE PESO SECO (parte aérea) DE LAS PLANTAS
 DE TRIGO.

Variedad de trigo México 82.

Tratamientos	Tt	\bar{X}_t	Bloque	Tb	\bar{X}_b
Sp-7	9.77	1.954	1	13.14	1.877
VI-1	8.07	1.614	2	12.64	1.805
VI-2	9.7	1.94	3	12.2	1.742
SV-1	7.29	1.458	4	10.97	1.567
5sc	7.84	1.568	5	10.37	1.481
Testigo (+)	8.76	1.752			
Testigo (-)	7.89	1.578			

ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	gl	SC	CM	F observada	F requerida	
					5%	1%
Total	34	6.159				
Bloques	4	0.767	0.191	1.077	2.78	4.22
Tratamientos	6	1.114	0.185	1.042	2.51	3.67
Error	24	4.277	0.178			

Tt = Suma total de tratamientos

Tb = Suma total de bloques

\bar{X}_t = Media de tratamientos

\bar{X}_b = Media de bloques

CUADRO 5.14 DETERMINACION DE PESO SECO (parte aérea) DE LAS PLANTAS DE TRIGO ;

Variedad de trigo ZACATECAS VT 74

Tratamiento	Tt	\bar{x}_t	Bloques	Tb	\bar{x}_b
SP-7	7.08	1.46	1	11.07	1.58
VI-1	8.86	1.77	2	10.85	1.55
VI-2	8.74	1.74	3	11.34	1.62
SV-1	8.52	1.70	4	11.94	1.70
5sc	8.55	1.71	5	12.67	1.81
Testigo (+)	8.19	1.63			
Testigo (-)	7.93	1.58			

ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	gl	SC	CM	F observada	F requerida 5%	1%
Total	34	6.77				
Bloques	4	0.310	0.077	0.309	2.78	4.22
Tratamientos	6	0.447	0.074	0.298	2.51	3.67
Error	24	6.019	0.250			

LOS RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE NITROGENO (parte aérea) EN PLANTAS DE TRIGO VARIEDAD ZACATECA VT 74 Y MEXICO 82 SE ANOTAN EN LOS CUADROS -- 5.15 y 5.16 RESPECTIVAMENTE.

49

CUADRO 5.15 DETERMINACION DE NITROGENO (de la parte aérea) en plantas de trigo

VARIEDAD DE TRIGO ZACATECA VT 74.

TRATAMIENTOS	Tt	Rt	Bloques	Tb	Yb
Sp-7	140.12	28.02	1	195.47	27.92
VT-1	152.12	30.42	2	202.50	28.92
VI-2	126.00	25.20	3	208.25	29.75
VI-1	143.37	28.67	4	209.12	29.87
5sC	140.80	28.16	5	177.05	25.29
Testigo (+)	152.17	30.43			
Testigo (-)	137.80	27.56			

ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observada	F requerida 5%	1%
Total	34	1 046.75				
Bloques	4	99.02	24.75	0.78	2.78	4.22
Tratamiento	6	97.23	16.20	0.51	2.51	3.67
Error	24	850.49	35.43			

CUADRO 5.16 DETERMINACION DE NITROGENO (de la parte aérea) EN PLANTAS DE TRIGO

Variedad México 81

Tratamientos	Tt	\bar{x}_t	Bloques	Tb	\bar{x}_b
Sp-7	87.5	17.5	1	157.25	22.45
VT-1	82.67	16.51	2	157.25	22.46
VT-2	121.62	24.32	3	156.25	22.32
VS-1	135.37	27.07	4	180.30	25.75
5sc	146.75	29.35	5	164.07	23.43
Testigo (+)	134.62	26.92			
Testigo (-)	106.55	21.31			

ANALISIS DE VARIANZA.

FUENTE DE VARIACION	gl	SC	Cm	F observada	F requerida	
					5%	1%
Total	34	1 395.62				
Bloques	4	59.08	14.77	0.597	2.78	4.22
Tratamientos	6	743.39	123.89	5.013	2.51	3.67
Error	24	593.14	24.71			

LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DUNCAN PARA LA VARIEDAD
MEXICO 82 SE ANOTAN EN EL CUADRO 5.17.

CUADRO 5.17 PRUEBA DE DUNCAN

$n = 5$ repeticiones
 $S^2 = 24.714$
 $n_2 = 24$
 $P = 7$ tratamientos
 $\alpha = 0.05$

$$s\bar{x} = \sqrt{\frac{S^2}{n}}$$

$$L.S. = t_{05}(\text{prom.} - g1) s\bar{x}$$

No promedio	2	3	4	5	6	7
t multiple	2.92	3.07	3.15	3.22	3.28	3.31
L.S. entre dos promedios	6.491	6.825	7.003	7.158	7.292	7.358

T*	5sc	VSI	T(+)	VT-2	T(-)	SP-7	VT-1
	29.35	27.07	26.92	24.32	21.31	17.5	16.51

T* = TRATAMIENTO

6. DISCUSION DE RESULTADOS

6.1. Análisis físico y químico de los suelos.

Los resultados del cuadro 5.1 indican las características de los suelos empleados. En la primera columna se registran los datos del suelo a partir del cual se efectuó el aislamiento y en la segunda columna aquellos que se observaron en el suelo muestreado para realizar el experimento en invernadero. Se observa que presentan un pH neutro, - contenido de nitrógeno total, materia orgánica y nitratos de bajo a regulares correspondiendo estos últimos al suelo empleado para la experimentación en invernadero. En tanto - que los contenidos de fósforo y potasio asimilables son - altos, ya que de 22 a 48 kg/Ha de fósforo asimilable son - catalogados como de bueno a excelente, para potasio de 111 hasta 447.3 Kg/Ha son clasificados como de bajo a bueno observándose que en una de las muestras fué mayor. Respecto a la textura ambos son de tipo franco arenoso.

6.2. Aislamiento de Azospirillum

Los resultados de la tabla 5.2. indican la presencia de Azospirillum en estos suelos que se encuentran ubicados en una zona de clima templado.

En cuanto al Azospirillum aislado de la raíz de diferentes cereales este resultó bajo lo que indica que las plantas muestreadas no son el hospedero adecuado o bien que la técnica de desinfección de raíces fué muy drástica eliminando a la mayor parte de la flora, ya que en los aislamientos procedentes de raíces se observó no solo un menor número de tubos positivos sino en general menor desarrollo de otros microorganismos.

La purificación de Azospirillum en muestras de suelo y raíces fué impedida por la presencia de contaminantes tales como bastones móviles o no, bacilos y cocos Gram-negativos, los que se observaron en gran abundancia en los tubos procedentes de la primera selección.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Alvarez, 1983; pues reporta dificultades para efectuar el aislamiento de Azospirillum de otros microorganismos diazotróficos que se desarrollan bien en este medio de cultivo.

6.3. Caracterización de Azospirillum

Los cuadros 5.3. y 5.4 muestran los resultados de morfología colonial de Azospirillum en medios de cultivos diferentes; se observa que hay gran similitud entre la

morfología colonial reportada por la literatura y las cepas aisladas, pues en general el color, el diámetro y la consistencia de las colonias permiten ubicar a las cepas aisladas dentro del género Azospirillum.

La observación de las características para la identificación de especies de Azospirillum según los criterios propuestos por Döbereiner, indican que la cepa 5sc cumple con las características para ser considerada como Azospirillum lipoferum pues:

- Crece bien en medio NFb con glucosa semisólido.
- Requiere de biotina para su crecimiento.
- En medio NFb semisólido más extracto de levadura presenta células pleomórficas en forma de "S" o hélice con movimiento lento.

Mientras que las cepas Pox y C₄ cumplen con las características para ser consideradas como Azospirillum brasilense y estas características son contrarias a las que presenta Azospirillum lipoferum.

En cuanto a sus dimensiones, Azospirillum lipoferum es más grande que Azospirillum brasilense. Así, la cepa 5sc mide 1.47 x 5.88 micras y las cepas: Pox mide 1.47 x 2.94 micras, C₄ 0.35 x 2.94 micras.

En la observación microscópica de los cultivos se observó a las 24 horas de desarrollo ambas especies son móviles con morfología celular similar. Azospirillum lipoferum

ferum presenta pleomorfismo después de las 72-96 horas de desarrollo y Azospirillum brasilense no presenta cambios en su morfología celular en cultivos de 6-7 días. En cultivos de más de una semana de desarrollo se observaron formas semejante a quistes en las cepas de ambas especies.

Lamm y Neyra en 1981 reportan que en incubaciones prolongadas de cultivos de Azospirillum sp. en medios semisólidos y sólidos se produce el engrosamiento de la pared y se forman estructuras ovoides llamados cistos y probaron que los cultivos con abundantes cistos son más resistentes a la desecación que los cultivos con células vegetativas. Ellos sugieren que la producción de cistos representa un mecanismo para que Azospirillum persista en la rizosfera durante condiciones desfavorables del medio ambiente.

En el cuadro 5.5 se muestran las características para la identificación de Azospirillum, según los criterios propuestos por Tarrand y Krieg con los que se confirmó la identificación obtenida con base a los criterios propuestos por Döbereiner.

El cuadro 5.6 muestra resultados de crecimiento de Azospirillum con diferentes fuentes de carbono, estas pruebas son muy variables tanto en las cepas de colección como en las cepas aisladas. Y se observa que la cepa 5sc considerada como A. lipoferum desarrolla bien usando como única fuente de carbono a la sacarosa. Según los reportes encontrados en la literatura el género Azospirillum es incapaz de

crecer en medio con sacarosa, malonato y oxalato. Sin embargo es necesario considerar que en este tipo de pruebas hay variabilidad aún en cepas que corresponden a la misma especie; y que de las pruebas realizadas la mayor parte coincidió con las reportadas para el microorganismo en estudio.

En las pruebas enzimáticas presentadas en el cuadro 5.7 se observó gran similitud entre las cepas aisladas y las reportadas por la literatura, las tres primeras pruebas son negativas y las tres últimas son positivas para el género Azospirillum y solamente la prueba de la catalasa da resultados de fuerte, débil y negativa. La única cepa que dió negativa esta prueba fué la Pox; la cepa C₄ y 5sc fueron catalasa positiva.

De acuerdo con los resultados obtenidos se piensa que las pruebas que ofrecen mayor ventaja para la identificación de la especie de Azospirillum son las presentadas en el cuadro 5.5. según los criterios descritos previamente por Döbereiner. Y que las otras pruebas son útiles para tener una mayor información sobre la fisiología de las diferentes cepas de Azospirillum, que su variabilidad no permite emplearlas como parámetros para la separación de especies.

Evaluación de Azospirillum

Fijación de nitrógeno atmosférico

De acuerdo con los resultados obtenidos por el método de microkjeldhal cuadro 5.8 se encontró que la cepa -

con mayor capacidad de fijación corresponde a Pox con --- 1 855.26 microgramos por 50 ml del cultivo, después las cepas Sp-7 de colección y la C₄ ambas con 750 microgramos por 50 ml del cultivo, la de menor capacidad fué la cepa 5sc con 530 microgramos por 50 ml de cultivo .

Los valores obtenidos con la cepa Sp-7 de colección se tomaron como referencia, debido a que estudios previos han demostrado que es una cepa con gran capacidad de fijación de nitrógeno. (Cohen et al., 1980).

6.4.2. Evaluación de la desnitrificación

El cuadro 5.9 muestra los resultados de los - - cultivos agitados, se observa que: la cantidad de nitrógeno en forma de biomasa es alta, hay poca cantidad de nitrógeno como amonio, la cantidad de nitrógeno como nitrito es está ligeramente elevada en dos de las cepas y no hay nitrógeno en forma de nitrato en el medio de cultivo. Esto indica que se llevó a cabo la reducción total de nitratos a amonio lo que ocasionó una elevada producción de biomasa. Esto corrobora los reportes de la literatura que indican que en condiciones de aerobiosis se lleva a cabo la asimilación de nitratos y la desnitrificación es nula.

En tanto que la cepa 5sc mostro un comportamiento atípico ya que si desnitrificó.

En el cuadro 5.10 se muestran los resultados de los cultivos estáticos (condiciones limitadas de oxígeno).-

Bajo estas condiciones se tiene que: la cantidad de biomasa es menor comparada con los cultivos agitados, no se detectó presencia de nitrógeno en forma de amonio; hay presencia de nitritos en el medio de cultivo de todas las cepas y esta - ligeramente elevado, la presencia de nitratos en todos los cultivos es baja. Esto sugiere que en condiciones limitadas de oxígeno se lleva a cabo la desasimilación de nitratos.

Por lo tanto conforme a los resultados obtenidos, se piensa que las cepas elegibles son: en primer término la cepa Pox por presentar una mayor capacidad de fijación de nitrógeno y no desnitrifica, en segundo término tenemos a la cepa C₄ por comportarse de forma similar a la cepa Sp-7 de colección en la fijación de nitrógeno y no presentar desnitrificación, por último tenemos a la cepa 5sc - aunque sus valores de fijación de nitrógeno fueron los más bajos comparados con las dos cepas anteriores, se encuentra todavía dentro de los rangos para ser considerada como una cepa recomendable para la inoculación ya que presenta baja capacidad de desnitrificación.

6.4.3. Los resultados del cuadro 5.12 indican la existencia de Azospirillum en los suelos en estudio, sin embargo este microorganismo nativo no fué capaz de infectar a las variedades de trigo en estudio, lo que se observa en los resultados del cuadro 5.11 en donde no se detectó infección en los tratamientos testigo.

En tanto que las 5 cepas probadas infectaron satisfactoriamente a las dos variedades y la infección aumentó a través del desarrollo del cultivo obteniéndose el 100% de infección en el último muestreo realizado en las dos variedades estudiadas.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en un trabajo previo en esta misma región realizado por Otake et al., 1985. En el que se empleó maíz como hospedero — y se realizó en condiciones de campo, se observa variabilidad. Se encontró que el Azospirillum nativo que no infectó al trigo si infecta al maíz. Se reporta que la inoculación favoreció el proceso de infección obteniéndose el 60% de raíces infectadas en tanto que en los testigos solo alcanzaron el 22%, la infección alcanzó su máxima expresión durante la floración para declinar posteriormente. Esto no coincide con nuestros resultados, sin embargo se debe considerar que las condiciones de invernadero favorecen la fisiología de la planta, en tanto que en condiciones de campo la fisiología de la bacteria, de la planta y consecuentemente de la asociación son afectadas por los cambios ambientales como estos autores lo mencionan y atribuyen la declinación de la infección a una helada que afectó al cultivo antes de efectuar el último muestreo que se realizó en la madurez fisiológica del cultivo.

De los resultados obtenidos cuadro 5.12 se observa que las cepas nativas de Azospirillum en el suelo se encuentran en una concentración muy baja, mientras que en

los suelos después de la cosecha aumentó ligeramente la cantidad de Azospirillum para el suelo donde se sembró la variedad de trigo México 82 y en menor cantidad para el suelo donde se sembró la variedad Zacateca VI-74.

Es conveniente efectuar un seguimiento de la sobrevivencia en el suelo de las cepas introducidas, ya que esta es una de las características que deben reunir las cepas que se recomienda para la fabricación de inoculantes.

En el cuadro 5.13 se observa que el peso seco de la parte aérea de la variedad de trigo México 82 fué muy variable y no se registraron diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de peso seco y nitrógeno de la parte aérea (cuadro 5.14 y 5.15) indican que en la variedad Zacateca VI 74 se registró un mayor peso en los tratamientos inoculados, excepto en el que fué inoculado con la cepa de colección, sin embargo en el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas y en cuanto a contenido de nitrógeno también fueron muy variables.

En los cuadros 5.16 y 5.17 se reportan los resultados del contenido de nitrógeno en la variedad de trigo México 82 y la prueba de Duncan muestra que el tratamiento 5sc es significativamente diferente a los otros tratamientos empleados. Es importante hacer notar que esta cepa corresponde a la aislada de la región y que probablemente no tuvo problemas de adaptación al suelo en este estudio. Pero

este resultado no coincide con las pruebas de laboratorio, ya que fué la cepa que fijó menor cantidad de nitrógeno atmosférico. Los tratamientos VS-1 y VI-2 resultaron similares al testigo adicionado de nitrógeno y fueron mayores al testigo sin nitrógeno, pero no hay diferencia significativa entre ellos. En cuanto a la cepa Sp-7 y VI-1 fueron las que dieron los valores más bajos, a pesar de que en trabajos previos se les ha establecido como cepas altamente fijadoras de nitrógeno.

7.

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

1. De las cepas en estudio la 5sc fué caracterizada como A. lipoferum, en tanto que la Pox - y C₄ como A. brasilense.
2. Presencia de Azospirillum en los suelos en estudio.
3. La flora existente no es capaz de establecer asociación con la gramínea en estudio.
4. Los resultados obtenidos de la fijación de nitrógeno in vitro no se relacionan con el comportamiento de las cepas en presencia del hospederero.
5. La inoculación favorece la infección.
6. Se recomienda hacer más estudios del efecto - de estos microorganismo sobre el desarrollo - de las plantas. Y emplear el hospedero del - que fueron aisladas las cepas, ya que este - factor puede ser el que limita la expresión - de la fijación de nitrógeno.

8. ANEXO

Medio 1

Medio NFB semisólido libre de nitrógeno

Acido succínico	5.0 g/l
K_2HPO_4	0.5 "
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 "
NaCl	0.1 "
$CaCl_2$	0.02 "
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.002"
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01 "
FeEDTA (solución al 1.64%)	4 ml
Azul de bromotimol (solución alcohólica al 5%)	2 ml
Biotina (solución al 0.01%)	1 ml
KOH	4.5 g/l

Ajustar el pH 6.8 - 7.2 con solución de NaOH al 10%, agregar 1.75 gramos de agar previamente disuelto, completar el volumen a 1 litro. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Albrecht, 1980).

Medio 2

Medio NFB sólido

Igual al medio 1, pero sin biotina y con 20 miligramos de extracto de levadura y 15 g/l de agar. Döbereiner, 1980.

Medio 3

Medio LIC (infusión de papa)

Hervir durante 20 minutos 200 gramos de papa cortadas con cáscara en un litro de agua, filtrar con algodón o gasa. — Restablecer el volumen inicial. Adicionar 2.5 gramos de ácido succínico, 2.5 gramos de azúcar comercial y 2.5 gramos de KOH. Ajustar el pH a 6.8. Agregar 1 ml de solución de biotina al 0.01% y 15 gramos de agar. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Dobereiner, 1980).

Medio 4

Agar nutritivo

Extracto de carne	3 g/l
Peptona	5 "
Agar	16 "
pH	7.0 ± 2

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio 5

Nfb glucosa semisólido

Igual al medio 1, pero sustituyendo el ácido succínico por glucosa (0.1%) y sin indicador. (Dobereiner, 1980).

Medio 6

Nfb sin biotina

Identico al medio 1 pero sin biotina

Medio 7

NFb semi sólido mas extracto de levadura

Igual al medio 1 pero con 50 miligramos de extracto de levadura, sin biotina. (Döbereiner, 1980; Tarrand; et al., 1978).

Medio 8

NFb con diferentes fuentes de azúcares y ácidos orgánicos como fuente de carbono.

Similar al medio NFb medio 1, pero sustituyendo el ácido succínico por las fuentes de carbono a probar; adicionandose estos en una concentración de 1% para azúcares y de 0.5% para ácidos orgánicos. En el medio glucosa-peptona estos se adicionaron en una concentración de 0.5% para tener una concentración final de 1%. Para la prueba de desarrollo y producción de acidez los medios glucosa y fructosa en anaerobiosis se adicionó a los tubos una capa de parafina sobre la superficie del medio, después de inocular. (Tarrand, et al., 1978).

Medio 9

Hidrólisis de gelatina

Medio gelatina nutritiva

Peptona de carne	5.0 g/l
Extracto de carne	3.0 g/l
Gelatina	120.0 g/l
pH	7.0 \pm 0.2

Disolver y esterilizar con cuidado 10 minutos a 115°C. (Difco)

Laboratorios 1953).

Medio 10

Hidrólisis de almidón

Esta prueba se realizó con el medio de agar nutritivo más - 0.2% de almidón.

Medio 11

Prueba de indol

Caldo triptona

Peptona de caseína	10.0 g/l
Cloruro de sodio	5.0 g/l
pH	7.0 ± 0.2

Disolver y distribuir en tubos, esterilizar en autoclave, - incubar 48-72 horas a 28-30°C, posteriormente recubrir el - medio de cultivo con una capa (de 0.5 cm. de altura, aproxi - madamente) de reactivo de Ehrlich o Kovac, en caso de culti - vo indol positivo, la capa de reactivo toma un color rojo - cereza al cabo de pocos minutos.

Reactivo de Ehrlich o Kovac

P-dimetilbenzaldehído	5.0 g
Alcohol Amílico	75.0 ml
HCl con.	25.0

Disolver el P-dimetilbenzaldehído en el alcohol amílico y - agregar al ácido clorohídrido (el reactivo es de color ama - rillo).

Medio 12

Prueba de catalasa

A una muestra de cultivo desarrollado en el medio 1 durante 48 horas a 28-30°C, se le adicionó una gota de H₂O₂ al 6%.

Medio 13

Prueba de esculina

El medio empleado fué igual al medio 1, sustituyendo el ácido succínico por la esculina (concentración 1%).

Medio 14

Prueba de oxidasa

Pocas gotas de solución al 1% del sustrato recientemente preparado, de clorhidrato de dimetil parafenilendiamina se puso en contacto con las colonias del microorganismo desarrolla -- das en medi o NFb (Medio 1). Los microorganismos productores -- de oxidasa toman un color rosa, después marron y finalmente -- negro. Los microorganismos oxidasa negativo no producen cam-- bios de color en las colonias.

Medio 15

Caldo urea

Extracto de levadura	0.1 g/l
Potasio dihidrogenofosfato	9.1 "
Disodio hidrogenofosfato	9.5 "
Urea	20.0 "

Rojo de fenol	0.01 g/l
pH	7.0 \pm 0.2

Disolver calentando a 60°C como máximo; esterilizar por filtración o calentando en marmita de vapor por 5 minutos. No esterilizar en autoclave.

Los microorganismos que utilizan urea producen un viraje del indicador hacia el rojo y eventualmente su crecimiento produce turbidez del medio de cultivo. (Difco - Laboratories, 1953).

Medio 16

NFb líquido más 0.08% de agar

Similar al medio 1, pero sin indicador y con 0.08% de agar. (Döbereiner, 1980).

Medio 17

NFb líquido más nitrato de potasio

Igual al medio 1 adicionado de 1 g/l de NO_3K sin indicador y sin agar. (Döbereiner, 1980).

Medio 18

Solución NFb

Identico al medio 1, pero sin ácido succínico, sin indicador y sin agar. (Döbereiner, 1980).

Medio 19

Nfb semisólido para NMP

Igual al medio 1, pero con 0.5 g/l de ácido succínico y —
con 0.05 g/l de azúcar comercial. (Döbereiner 1980).

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Albrecht., L.S. and Okon, Y. (1980). Cultures of Azospirillum Methods in Enzymology, vol 69, pag. 740-750.
- 2 Alvarez, R. (1983). Presencia de Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense en la rizosfera de algunas plantas cultivadas y silvestres. Rev. de la facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina; 4(3): 271-276.
- 3 Alvarez, Morales R.A. y Lemos-Pastrana A. (1980). Quimiotaxis de Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense. Rev. Latinoamericana de Microbiology, 22: - - 131-135.
- 4 Aykroydy, W. R. and Dowghty, J. (1970). El trigo en la alimentación humana. FAO: Estudios sobre nutrición. Roma Italia.
- 5 Beijerinck, M. W. (1925). Uber ein Spirillum. Welches frein sticks toff binden kann Zentrbl. Bakteriologie Parasitenkd. Infektionskr. Abt 2, 63: 353-359.
- 6 Bulow, J. F. W. and Döbereiner, J. (1975). Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brasil. -- Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72: 2389-2393.
- 7 Chapman, H. D., Parker, F.P. (1973). Metodos de análisis para suelos, plantas y agua. Edición Trillas, México.

8. Cohen, E., Okon, Y., J. Kigel, I. Nur and Henis. (1980). Increase in dry weight and total nitrogen contain in Zea may and S. Italica associated with nitrogen-fixing - Azospirillum sp. Plant. Physiol, 64(4): 745-749.
- 9 Day, J.M. and Döbereiner, J. (1976). Physiological — aspects of nitrogen fixation by Spirillum from Digita - ria roots. Soil. Biol. Biochem., 8: 45-50.
- 10 Difco Laboratories (1953). Difco Manual of Dehydrated - culture media and reagents for microbiological and clini - cal laboratory procedurc. Ninth Edition, Vol. 1., Mi - chigan. U.S.A.
- 11 Döbereiner, J., Marriell, J.E. and M. Nery (1976). Ecolo - gical distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck, - Can. J. Microbiol., 22: 1464-1473.
12. Döbereiner, J. and Day, J. M. (1975). Associative sym - biosis in tropical grass: Characterization of microorga - nisms and dinitrogen fixing sites. Proc. Inst. Int. - - Symp. Nitrogen fixation. Pullman, Washinton, 2: 518-538.
- 13 Döbereiner, J., Day, J.M. and Dart, P.J. (1972). Nitro - genase activity and oxygen sensitivity of Paspalum nota - tum-Azotobacter paspali. J. Gen. Microbiol, 71: 103-116.
- 14 Döbereiner, J. (1980). Forage grass and grain crops. En: method for evaluating biological nitrogen fixation. Edi - ted by Bergensen, F.J. John, Wiley S. Ltd. New. York. — U.S.A. 535-555.

- 15 Eskew, D.L. Focht, D.D. and I.P. Ting. (1977). Nitrogen fixation, dinitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented Spirillum lipoferum. Appl. Environ. Microbiol., 34: 582-585.
- 16 Kapulnik, Y., Kigel, J., Y. Okon, I. Nur and Y. Henis. (1981). Effect of Azospirillum inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and Panicum. Plant and Soil. 61: 65-70.
- 17 Kapulnik, Y., Kigel, J., Y. Okon, I. Nur and Y. Henis. (1981). Effects of temperature, nitrogen fertilization and plant age on nitrogen fixation by S. italica with Azospirillum brasilense (strain Cd). Plant. Physiol., (strain Cd). Plant. Physiol., 68(2): 340-343.
- 18 Kielo, H., Warti, O.T., V. Sundman and Skujins. (1981) Root-associated nitrogen fixation (acetyl reduction) by Enterobactereaceae and Azospirillum in cold-climate-spodosols. Appl. Environ. Microbiol., 41(1): 204-206.
- 19 Lamm, R. S. and Nevra, C.A. (1981). Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and U.S.A., Can. J. Microbiol., 27(12): 1320-1325.
- 20 Ladha, J. K., Barroquio, W.L. and I. Watanabe. (1982). Immunological technique to identify Azospirillum associated with wetland rice. Can. J. Microbiol., 28: 478-485.

- 21 Mitchell, H. L. (1972). Microdetermination of nitrogen in plant tissues. J. of the AOAC. 55: 1-3.
- 22 Monzon de, A. Ma. A. (1982). Estudios sobre la infección de raíces de trigo. Rev. Facultad de Agronomía, -- Universidad de Buenos Aires Argentina; 4(3) : 283-289.
- 23 Otake, H. G., Echegaray, A.A., G. Ramírez M. y J. J. Márquez. (1985). Evaluación de la fijación del nitrógeno en la Asociación Azospirillum-maíz, bajo condiciones de temporal, en el Valle de Toluca. Resúmenes de la Reunión sobre fijación Biológica del nitrógeno. Fac. -- Química, UNAM., 36-37.
- 24 Rao, A. V. Venkateswarlu, B. (1982). Associative symbiosis of Azospirillum lipoferum with disotyledonous succulent plants of the Indian desert. Can. J. Microbiol., - 28: 778-782.
- 25 Rennie, R. J. and Larson, R. I. (1979). Dinitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of spring wheat. Can. J. Bot. 57: 2771-2775.
- 26 Rai, S. N. and Gaur, A.C. (1982). Nitrogen fixation by Azospirillum sp. and effect of Azospirillum lipoferum on the yield and N-uptake of the wheat crop. Plant and Soil. 69: 233-238.
- 27 Rodríguez, C.E. (1982). Improved medium for isolation of Azospirillum sp. App. Environ. Microbiol, 44: 990-991
- 28 Schank, S.C., R. L. Smith, G.C. Weiser. (1979). Fluorescent antibody technique to identify Azospirillum brasi-

- lense associated with roots of grasses. Soil. Biol. - - Biochem. 11: 287-295.
- 29 Sector Agropecuario y Forestal. (1985) Tercer informe de Gobierno. Agro-Síntesis, Vol. 16, No. 12: 17.
- 30 Smith, R. L., Bouton, H. B., S.C. Schank, K. H. Kesem-berry, M. C. Tyler, J. R. Milan, M. H. Gaskin and Littell. (1976). Nitrogen fixation in grasses inoculation with -- Spirillum lipoferum. Science, 193: 1003-1005.
- 31 Subba, Rao NS., Tilak, K. V. B. R., Kumari, M. L. and C. S. Singh. (1979). Azospirillum: new bacterial fertilizer - for tropical crops. Sci. Rep., 16: 690-692.
- 32 Tarrand, J. R., Krieg and J. Döbereiner. (1978). A taxo-nomic study of the Spirillum lipoferum group, with des-criptions of a new genus, Azospirillum gen. Nov. and two specie, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. - and Azospirillum brasiliense sp. nov. Canadian J. Micro -biol., 24: 967-980.
- 33 Taylor, R. W. (1979). Response of two grasses to inocula-tion with Azospirillum sp. a Bahamian soil. Trop. Agric. (Trinidad). 56(4): 361-365.
- 34 Tyler, M. E., Milam, J., Smith, R., A.D. Zuberer. (1979) Isolation of Azospirillum from diverse geographic regions. Can. J. Microbiol., 25: 693;697.