

24  
21



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DEL  
GERMOPLASMA DE Bradyrhizobium japonicum  
DE LA COLECCION DE LA  
FACULTAD DE QUIMICA U.N.A.M.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
GLORIA CRUZ ALMANZA



MEXICO, D. F.



1989

**FALLA DE ORIGEN**

EXAMENS PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA



## **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

I.	INTRODUCCION	
II.	ANTECEDENTES	
2.1	Características de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> .....	7
2.2	Taxonomía.....	8
2.3	Ensayos de caracterización de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> .....	13
2.3.1	Desarrollo en glucosas peptona agar púrpura de bromocresol .....	14
2.3.2	Reacción de la leche tornasolada.....	14
2.3.3	Desarrollo en citrato de Koser.....	15
2.3.4	Desarrollo en agar sulfito de bismuto.....	15
2.3.5	Medio de Bergensen modificado.....	16
	(utilización de manganeso)	
2.3.6	Desarrollo en extracto de levadura manitol agar rojo congo.....	16
2.3.7	Desarrollo en extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol.....	17
2.3.8	Utilización de xilosa.....	17
2.3.9	Actividad de Hidrogenasa ó Reducción del tetrazolium.....	17
2.3.10	Infectividad.....	18
2.4	Ensayos básicos de Aplicación Industrial y Agrícola.....	19
III.	OBJETIVOS.....	22
IV.	PARTE EXPERIMENTAL.....	24
4.1	Material y Métodos.....	25
4.2	Tablas de Tratamientos y Resultados.....	31
V.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	54
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59

VII.	RESUMEN.....	61
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	64
IX.	APENDICE.....	69

**I INTRODUCCION**

En la producción agrícola la asociación simbiótica Rhizobium-leguminosa ha demostrado ampliamente su beneficio, y ha dado origen al desarrollo de la tecnología de producción de inoculantes cuya aplicación es cada vez de mayor significado económico debido a la actual crisis energética.

La conservación y mantenimiento de una colección de cepas, en la actualidad, es de gran importancia, ya que la formación de un cepario con un criterio estricto de control de la pureza y actividad de las cepas seleccionadas proporciona un firme apoyo a los profesionales vinculados con la microbiología y su aplicación en las diversas áreas de la investigación, colaborando en gran medida al desarrollo de la enseñanza, la ciencia y la tecnología.

En México existen varias instituciones de enseñanza e investigación que realizan el mantenimiento y distribución de cultivos microbianos, sin que exista un organismo oficial que rija las condiciones bajo las cuales deben ser distribuidas.

Con base en lo anterior una colección de cepas fijadoras simbióticas de nitrógeno, implica un manejo profesional que garantice el mantenimiento de aquellas características esenciales que permiten que dichas cepas tengan éxito al ser aplicadas en la agricultura.

Los principales métodos de conservación que se aplican a los cultivos microbianos son varios y entre ellos se tienen: refrigeración, liofilización, gel de sílice y suelo estéril. La mayoría de estas técnicas de conservación no tienen una confiabilidad total ya que las características típicas de las cepas pueden variar en períodos prolongados de tiempo, de ahí la importancia de llevar a cabo una serie de pruebas periódicas para el control de la colección.

Considerando lo anterior y la importancia de Rhizobium y Bradyrhizobium en la agricultura y de que el éxito de su introducción depende de la utilización de cepas debidamente seleccionadas y conservadas, en el presente estudio se expone la metodología que se emplea para efectuar el control de una colección de cepas de Bradyrhizobium. Esta implica ensayos de laboratorio que permita detectar en forma rápida problemas de contaminación así como la pérdida de alguna de las características fisiológicas. Así mismo se incluye la metodología empleada a nivel de invernadero que constituye la base de la caracterización de la bacteria y de la selección de cepas para uso industrial y agrícola.

Estos ensayos fueron aplicados a la subcolección de cepas de interés agrícola existente en la Facultad de Química, UNAM,

lo que nos permitió corroborar que el método de conservación empleado en esta Institución es el adecuado, comprobándose que las cepas conservadas han retenido sus características iniciales.

Por otra parte a cinco de las cepas en estudio se les realizó un ensayo adicional que en la selección de cepas es considerado como criterio secundario pero que es de gran interés en la aplicación a nivel agrícola. De esta manera con la realización de técnicas de rutina se enriqueció la información con los resultados de la prueba que se llevó a cabo por primera vez.

**II ANTECEDENTES**



## 2.1 Características de Bradyrhizobium japonicum.

Las bacterias del género Bradyrhizobium son bacilos de 0.5 a 0.9 X 1.2 a 3 micras, son Gram negativos, móviles mediante un flagelo polar o subpolar, aerobios, no producen esporas. En cultivos viejos o bajo condiciones adversas de crecimiento, incluyendo bajas concentraciones de calcio y magnesio, las células se tiñen en bandas debido a que acumulan poli- $\beta$ -hidroxibutirato..

Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 - 30 °C; sin embargo, algunas cepas toleran temperaturas de 30 - 42 °C, el pH óptimo varía entre 6 - 7 aunque puede ser más bajo tratándose de cepas de suelos ácidos. Las colonias son circulares, blancas raramente rosas, convexas, cremosas y opacas, no exceden de un milímetro de diámetro, es considerada como una bacteria de crecimiento lento puesto que su desarrollo en medio extracto de levadura manitol agar rojo congo se observa después de 5 - 7 días de incubación a 28 °C.

Son quimioorganotróficas y utilizan como fuente de carbono diversos carbohidratos entre ellos: glucosa, galactosa, gluconato, glicerol, fructosa, arabinosa y manitol. La maltosa es utilizada por un 10% de las cepas, y la lactosa, ramnosa, sacarosa, dulcitol y dextrina son raramente usadas. (21,22,30). Las sales de ácidos orgánicos tales como: fumarato, malato, succinato, citrato y piruvato son utilizadas únicamente cuando en el medio basal existe suficiente Ca y Mg para inhibir la acción de estos ácidos.

Producen un polisacárido extracelular, no producen ácido sulfhídrico y no forma precipitado en un medio de glicerofosfato de calcio, no hidrolizan la caseína y el agar, no requieren vitaminas excepto la biotina, la cual también puede ser inhibitoria para algunas cepas.

Bradyrhizobium japonicum presenta poco o nulo crecimiento en un medio que contenga 2% de cloruro de sodio.

Como fuente de nitrógeno utiliza preferentemente las sales de amonio, aunque también emplea nitratos y algunos aminoácidos tales como glutamato, histidina, aspartato y prolina. La peptona es pobremente utilizada a excepción de algunas cepas aisladas de Lotononis.

La inmunodifusión revela que no se comparten antígenos entre bacterias de crecimiento rápido y bacterias de crecimiento lento y este comportamiento se observa con los antígenos somáticos y los antígenos flagelares ya que en ambos casos son diferentes.

Algunas cepas de Bradyrhizobium son resistentes a ciertos antibióticos entre ellos: tetraciclinas, estreptomycinas, penicilina G, viomicina y vancomicina, y su resistencia varía de cepa a cepa. Así mismo se reporta que algunas cepas son inhibidas con D-alanina.

Estos organismos se encuentran en forma libre en el suelo, presentándose como coccobacilos Gram negativos. Se caracterizan por invadir los pelos radiculares de plantas leguminosas de zonas tropicales y algunas templadas llevándose a cabo la formación de nódulos radiculares. Al localizarse la bacteria como simbiote intracelular, adquiere la forma de bastos o clavos y se le denomina bacteroide. Estos bacteroides son los reponsables de la fijación del nitrógeno atmosférico, procedimiento que consiste en la reducción del nitrógeno elemental a amonio que es una forma química utilizable para el vegetal con el que esta asociado. (20,34).

## 2.2 Taxonomía.

En la octava edición del manual de Bergey (1974) la familia Rhizobiaceae incluye dos géneros: Agrobacterium y Rhizobium, éste último esta ubicado en la parte VII abarcando todas aquellas especies capaces de establecer una simbiosis de tipo mutualista con las leguminosas. Esta clasificación taxonómica de las especies se basa en la capacidad de infección de un determinado tipo de leguminosas con la consecuente formación de nódulos. (15)

Graham citado por Elkan, (15), expuso las limitaciones de esta clasificación:

a) Infección cruzada: Los rhizobia que infectan un grupo de leguminosas son capaces de infectar y nodular a plantas de grupos afines; este efecto se ha observado en forma inducida y natural.

b) Datos insuficientes de nodulación: El manual de Bergey menciona que de 14000 especies conocidas de leguminosas solamente del 8 al 9% han sido estudiadas desde el punto de vista de nodulación y solamente del 0.3 - 0.4 estan estudiadas con respecto a sus relaciones simbióticas.

c) Escasez de datos bioquímicos: Muchos de los datos bioquímicos derivan del estudio de números reducidos de cepas, dificultando la generalización del significado taxonómico de diferencias bioquímicas.

Löhnis y Hansen en 1921 dividieron el género Rhizobium en dos grupos; Allen y Allen introdujeron en 1950 el término crecimiento rápido que comunmente era asignado a los rhizobia

asociados con alfalfa, trébol, frijol y chicharo debido a que en el medio de cultivo extracto de levadura manitol agar crecen mucho más rápido que las aisladas de soja, chicharo de vacá y lupino a las que se denomina de crecimiento lento. En el manual de Bergey clasifican a los dos grupos con base en su velocidad de crecimiento teniendo que las cepas de crecimiento rápido alcanzan su máximo desarrollo en 3 a 5 días, dentro de las cuales están: R. trifolii, R. leguminosarum, R. phaseoli y R. meliloti; y se clasifican como pertenecientes al grupo I en tanto que el grupo II incluye a las especies de crecimiento lento alcanzando su máximo desarrollo en un período de 5 - 7 días entre las cuales tenemos a R. japonicum y R. lupini. (15).

Las diferencias entre Rhizobium de crecimiento rápido y las de crecimiento lento también fueron basadas en:

- Evolución de la simbiosis (Graham 1964, citado en 20).
- Utilización de carbohidratos (Skotnicki y Rolfe 1978, citado en 20).
- Estudios metabólicos (Martínez - de - Drets y Arias 1972, citado en 20).
- Cambios en el pH del medio extracto de levadura manitol agar (Vincent 1977, citado en 15)
- Composición de bases del ácido desoxiribonucleico y flagelación (De Ley y Rossel 1965, citado en 20)
- Serología (Graham 1963, Humphrey et. al. 1973, Vincent 1977, Vincent y Humphrey 1970, citado en 20)

Otros estudios taxonómicos de Rhizobium incluyen:

- Hibridación de ácidos nucleicos (Gibbons y Gregory 1972, citado en 20)
- Composición protéica (Roberts et. al. 1980, citado en 20)
- Composición del polisacárido extracelular (Dudman 1976, Dudman 1978, Kennedy 1976, Kennedy y Bailey 1976, citados en 20)
- Sensibilidad a bacteriófagos (Napoli et. al. 1980, citado en 20)
- Tipo de cuerpos de inclusión bacteroide (Craig et. al. 1973, citado en 20)

- Sensibilidad a los antibióticos (Strzelcowa 1968, citado en 20)

Ligon en 1982 mediante la hibridación DNA-DNA realizó estudios de taxonomía genética de rhizobia aislado de chícharo de vaca, indicando que éste grupo comprende diversos organismos promiscuos los cuales han sido incluidos tradicionalmente en sistemas de inoculación cruzada. El rango de hospederos de rhizobia de chícharo de vaca es amplio e incluye una gran variedad de leguminosas tropicales así como el cacahuate que es de importancia agrícola. Los resultados indican que los rhizobia de chícharo de vaca son genéticamente diferentes y que la mayoría de los aislados no pertenecen a la misma especie. Estos datos sugieren que probablemente se trate de varios generos.

En vista de lo anterior y la importancia de Rhizobium, la taxonomía de este género fué revisada a fin de reubicarlo y en el Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (20) aparece rhizobia dentro de dos géneros separados: Rhizobium y Bradyrhizobium.

**CARACTERISTICAS DE RHIZOBIUM Y BRADYRHIZOBIUM**

Criterios	<u>Rhizobium</u>	<u>Bradyrhizobium</u>
1.- Capacidad de nodulación en leguminosas independientemente de que fije o no nitrógeno.	+	+
2.- Infección		
a) Leguminosas tropicales	-	+
b) Leguminosas templadas	+	-
3.- En ELMA producen		
a) Acidez	+	-
b) Alcalinidad	-	+
4.- Crecimiento en ELMA		
a) Rápido	+	-
b) Lento	-	+
5.- Flagelación		
a) Periférica	+	-
b) Subpolar	-	+
6.- Carbohidratos de preferencia		
a) Pentosas	-	+
b) Hexosas	+	-
7.- pH óptimo 6.0 - 7.0	+	+

Actualmente Jordan (20) en el manual de Bergey clasifica a la familia Rhizobiaceae en cuatro géneros: Rhizobium, Bradyrhizobium, Aerobacterium y Phyllobacterium.

El género Rhizobium comprende a tres especies reorganizadas como: R. leguminosarum, la cual contiene tres biovarias (biovar trifolii, biovar phaseoli y biovar viciae); R. meliloti; y R. loti. Los miembros de crecimiento rápido de rhizobia de chícharo de vaca y los de lupinus han sido incluidos en la especie de R. loti. El nuevo género: Bradyrhizobium tiene una especie bien clasificada B. japonicum que incluye a las cepas que formaban a R. japonicum más los miembros de crecimiento lento de rhizobia del chícharo de vaca.

En la siguiente tabla se resumen las características más importantes de los géneros de la familia Rhizobiaceae (20).

Características	<u>Rhizobium</u>	<u>Bradyrhizobium</u>	<u>Acroacterium</u>	<u>Phyllobacterium</u>
1.- Arreglo flagelar				
Manotrico	B	+	-	D
Lofotrico	-	-	-	D
Peritrico	D	-	D	-
2.- Producción de nódulos en raíces	+	+	-d	-
3.- Producción de nódulos	-	-	-	+
4.- Actividad de la nitrogenasa	+	+	-d	±
5.- Habilidad para iniciar hipertrófia	-	-	+	-
6.- Producen 3 cetolactosa	-	-	D	
7.- Crecimiento rápido en ELMA*	+	-	+	+
8.- Reacción alcalina en medio azucarado	-	+	-	-
9.- Producción de H <sub>2</sub> S	D	-	-	
10.- Respuesta a la biotina	±h	+	-	
11.- Glucanos β-2 en el polisacrido extracelular	+	+	+	
12.- I en sol de guanina y citocina del ácido desoxirribonucleico	59-64	61-65	57-63	60-61

D: Reacciones diferentes en varias taxonomías (especies de un género o géneros de una familia)  
 d: No ocurre en forma natural. Cepas modificadas genéticamente pueden producir nódulos y pueden tener actividad de la nitrogenasa  
 ±: Controversial  
 q: Colonias de 2-4 mm. de diámetro en un período de 2-3 días a 28 °C  
 h: Puede haber diferencias entre cepas de algunas especies

### 2.3 Ensayos de caracterización de Bradyrhizobium japonicum

Como se indicó en las páginas anteriores la característica determinante de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium es la referente a la capacidad de infectar leguminosas y formar nódulos en las raíces de las mismas.

Por lo que la caracterización de los géneros de la familia Rhizobiaceae se basa en ensayos de infección y nodulación. Sin embargo cuando se efectúa el aislamiento las pruebas bioquímicas se utilizan frecuentemente como ensayos presuntivos que permiten seleccionar de un gran número de aislamientos a aquellas que probablemente pertenecen a la familia o género de interés y eliminar a las cepas aisladas que presenten características bioquímicas atípicas. Estos ensayos bioquímicos preliminares ofrecen la ventaja de reducir el tiempo en que se obtienen resultados, debido a que la serie completa de bioquímicas requiere de un periodo de 15 días, en tanto que la prueba de infección se observa después de los 30 días.

Por otra parte las pruebas bioquímicas aplicadas en forma periódica para la conservación y mantenimiento de una colección de cepas permite corroborar las características propias de la cepa en estudio, así como detectar posibles cambios de su actividad. Estos ensayos de rutina también permiten detectar la presencia de contaminantes.

Con fines de control de cepas de colección es recomendable efectuar las pruebas bioquímicas y las pruebas de invernadero. Las primeras permiten en periodos cortos detectar cualquier posible cambio y con las segundas se comprobará el mantenimiento de otras características tales como grado de infectividad y efectividad en la fijación de nitrógeno.

Las pruebas bioquímicas más comunes para la caracterización presuntiva y control de cepas del género Bradyrhizobium corresponden a:

- 1.- Desarrollo en glucosa-peptona-agar-púrpura de bromocresol
- 2.- Reacción en la leche tornasolada
- 3.- Desarrollo en citrato de Koser
- 4.- Desarrollo en agar sulfito de bismuto
- 5.- Medio modificado de Bergensen (Utilización de manganeso)
- 6.- Desarrollo en extracto de levadura manitol agar rojo congo
- 7.- Reacción ácida o alcalina en extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol

### 8.- Utilización de Xilosa

Una prueba adicional corresponde a:

### 9.- Actividad de hidrogenasa por reducción del tetrazolio

#### 2.3.1 Desarrollo en glucosa peptona agar púrpura de bromocresol

Este medio es útil para determinar la presencia de contaminantes ya que éstos se desarrollan en forma abundante en períodos de 24-48 h. acidificando el medio por la utilización de la glucosa, lo que determina el viraje del indicador. (38)

Bradyrhizobium japonicum se caracteriza por producir un escaso o ningún desarrollo en este medio después de 24-48 hrs. a temperatura de 28 °C, debido a que no es capaz de utilizar eficientemente a la peptona como fuente de nitrógeno por tal motivo la prueba se debe de leer 24-48 h.

Este organismo utiliza como única fuente de nitrógeno o fuente suplementaria el amonio. Algunas cepas son incapaces de usar el nitrógeno inorgánico y generalmente se desarrollan con aminoácidos simples como por ejemplo: el ácido glutámico.

#### 2.3.2 Reacción en la leche tornasolada

Es empleada como prueba diferencial de bacterias: fermentación de la lactosa, la caseólisis y la coagulación de la caseína.

A la leche se le añade el indicador tornasol para detectar cambios de pH en el medio, este indicador tiene la ventaja de ser reducido rápidamente por ciertas bacterias a su forma incolora cuando se trata de una reacción ácida y cuando se trata de una reacción alcalina el medio se torna de color azul (tornasol más oscuro).

Las bacterias que fermentan con rapidez la lactosa producen suficiente ácido para precipitar ó coagular la caseína la cual es una proteína capaz de reaccionar como ácido débil ó base poco energética. Algunas bacterias tienen la capacidad de segregar una enzima parecida a la renina capaz de hidrolizar la caseína transformándola en paracaseína soluble y en cuerpo similar a la peptona. La paracaseína soluble



reacciona entonces con las sales cálcicas disueltas y se forma un precipitado de paracaseinato de calcio, el líquido claro que rodea el coágulo de paracaseína se conoce como suero. (11,19)

Las especies de Rhizobium producen la reacción alcalina con formación de zona de suero, mientras que las de Bradyrhizobium producen una reacción alcalina sin formación de zona de suero. (17)

### 2.3.3 Desarrollo en citrato de Koser

El citrato es un intermediario del ciclo del ácido tricarbóxico, Bradyrhizobium japonicum tiene este ciclo activo (Keele et. 1969, 1970; Mulogoy y Elkan 1977, citado en 15). Sin embargo al estudiar 36 cepas de B. japonicum se observó que ninguna utilizó citrato o malato y solamente dos crecieron bien con succinato; y que de 11 carbohidratos diferentes e intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico solo emplearon 8; en tanto que Rhizobium trifolii y Rhizobium leguminosarum utilizaron 20 de las fuentes de carbono probadas (Elkan y Kwik 1977, citado en 15).

Tuzimura y Meguro en 1960 estudiaron la oxidación de varios carbohidratos e intermediarios del ciclo tricarbóxico por Bradyrhizobium japonicum provenientes de nódulos de soja y compararon su desarrollo con un cultivo de B. japonicum conservado en succinato o glucosa. Ellos concluyeron que la fuente de energía de Bradyrhizobium en estado simbiótico es proporcionada por ácidos orgánicos pero no por carbohidratos.

De este modo el medio de cultivo de citrato de Koser ofrece un buen sustrato para detectar contaminantes, los que utilizan el citrato como fuente de carbono y se desarrollan en periodos de incubación cortos produciendo turbiedad. Solo en casos raros ésta es producida por Bradyrhizobium pero necesita de periodos de incubación más largos.

### 2.3.4 Desarrollo en agar sulfito de bismuto

Permite detectar la acción enzimática sobre los aminoácidos que contienen azufre, el cual es liberado como ácido sulfhídrico y éste al precipitar al bismuto produce un color negro de sulfuros de bismuto.

Algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de efectuar esta reacción. La enzima responsable de esta actividad es la cisteinasa. (11,19)

Algunos organismos cultivados en un medio orgánico que contiene peptona reducen el azufre por hidrogenación, produciendo el gas  $H_2S$ . Por lo tanto dicho gas puede ser producido por la reducción de una fuente de azufre inorgánico como el tiosulfato ( $S_2O_3$ ) o la reducción de azufre orgánico proporcionada por el grupo funcional  $R_1-SH$  del aminoácido cisteína el cual se encuentra en la peptona.

El ácido sulfhídrico es un gas incoloro que al entrar en contacto con ciertos metales como plomo, hierro o bismuto forma con ellos sulfuros los cuales se manifiestan como un precipitado negro insoluble.

Bradyrhizobium japonicum se caracteriza por no producir o producir muy poco ácido sulfhídrico.

### 2.3.5 Medio de Bergensen modificado (Utilización de manganeso)

La utilidad del manganeso adicionado a un medio de cultivo que contiene lactosa para diferenciar Bradyrhizobium de Agrobacterium es una prueba de gran importancia debido a que Agrobacterium es el contaminante más común y semejante a Bradyrhizobium y por lo tanto ocasiona confusiones durante los procedimientos rutinarios de aislamiento. Clark (8) propuso una modificación al medio de Bergensen (4) que contiene lactosa y 20 m.e. de Mn/l; éste permite el desarrollo de todas las especies de Agrobacterium y excluye a Bradyrhizobium.

### 2.3.6 Desarrollo en extracto de levadura manitol agar rojo congo

Este medio favorece el desarrollo de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium y permite diferenciarlos ya que Rhizobium tiene crecimiento rápido desarrollándose en periodos de 3 a 5 días en tanto que Bradyrhizobium que corresponde al grupo de crecimiento lento se desarrolla después de 5 a 7 días. (20)

El medio es adecuado básicamente para determinar las características macroscópicas de ambos grupos. También podemos detectar la presencia de contaminantes ya que éstos toman el colorante, manifestándose una coloración roja muy intensa en las colonias.

Bradyrhizobium japonicum presenta las siguientes características macroscópicas: colonias menores de 1 mm. de diámetro, blancas, convexas, cremosas y opacas; y las de

Rhizobium son colonias de 2-4 mm., mucosas, lisas y brillantes.

### 2.3.7 Reacción ácida o alcalina en extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol

Esta prueba se utiliza para diferenciar a Rhizobium (que es capaz de degradar al manitol hasta ácido lo cual se observa con un viraje del indicador a amarillo) de Bradyrhizobium (que produce alcalinidad observándose un viraje a azul debido a que puede llevarse a cabo un desprendimiento de amonio durante el metabolismo de compuestos protéicos. (28,37)

### 2.3.8 Utilización de Xilosa

Se utiliza para diferenciar a Bradyrhizobium japonicum - que no produce ácidos - de Bradyrhizobium sp (lupinus) - que si la produce - .(14)

Cuando la Xilosa no es degradada a ácido sino a otro tipo de compuesto el medio se observa de color rojo en tanto que cuando se lleva a cabo la degradación a ácido se observa un viraje del rojo de fenol a amarillo.

### 2.3.9 Actividad de Hidrogenasa o Reducción del tetrazolio

Durante la reducción del nitrógeno a amoníaco se produce simultáneamente hidrógeno gaseoso, lo que constituye una pérdida de energía. En relación a esto se ha observado que algunas cepas de Bradyrhizobium japonicum disponen de un gen determinado llamado *hup<sup>+</sup>*, que permite que las bacterias sinteticen la hidrogenasa, enzima que cataliza la disociación del gas en protones y electrones y éstos son reutilizados en el proceso de fijación de nitrógeno. Se ha reportado (2) que aquellas cepas que poseen este gen son más eficientes en la fijación de nitrógeno.

Esta prueba es importante porque indirectamente ayuda a evaluar la fijación de nitrógeno por Bradyrhizobium japonicum, ya que la actividad de hidrogenasa es directamente proporcional a la cantidad de nitrógeno fijado (27).

En esta prueba se utiliza el reactivo clorhidrato de 2,3,5-trifenil tetrazolio el cual es reducido por la hidrogenasa. Las colonias se aprecian de color rojo encendido si se lleva a cabo la reacción. (24)



preferentemente en la parte superior de la raíz.

Sin embargo una cepa altamente infectiva no es necesariamente efectiva en la fijación de nitrógeno.

El grado de infectividad esta dado por el número y distribución de nódulos y la eficiencia en la fijación de nitrógeno por la cantidad de nitrógeno elemental que es incorporado a la planta y que se traduce en un mayor contenido de nitrógeno total, mayor peso seco del vegetal y de masa nodular. (32,36)

Lo anterior indica la importancia de esta determinación que se describe a continuación como ensayos básicos de aplicación industrial y agrícola.

#### 2.4 Ensayos Básicos de Aplicación Industrial y Agrícola

En la producción de inoculantes para leguminosas es esencial efectuar estudios de selección de cepas basados en: las características fisiológicas de la bacteria en presencia y ausencia del hospedero, así como en la respuesta de la asociación sometida a diferentes condiciones ambientales. (10,25). De este modo la selección de cepas implica su evaluación secuencial bajo diferentes condiciones (invernadero y campo) en las que se consideran los siguientes criterios:

- 1.- Infectividad
- 2.- Efectividad
- 3.- Interspecificidad
- 4.- Efecto sobre la productividad agrícola bajo diferentes condiciones de campo. (18)

Las etapas 1, 2 y 3 se llevan a cabo a nivel invernadero, mientras que la 4 puede realizarse a nivel invernadero o campo.

La nodulación efectiva es el criterio más usado en selección de cepas.

Otros criterios que se consideran como complementarios a los anteriormente citados corresponden a:

- 5.- Comportamiento satisfactorio en el proceso de producción a nivel industrial
- 6.- Tolerancia a fungicidas e insecticidas
- 7.- Tolerancia a la acidez y altas concentraciones de NaCl, Al y Mn

Los últimos permiten establecer en forma presuntiva el comportamiento que tendrán las cepas al ser introducidas a

suelos con estas características. (9,12,13,26,33).

Los ensayos para determinar efectividad se realizan en jarras o macetas bajo condiciones nutrimentales y microbianas controladas y los parámetros que se evalúan corresponden a:

De los nódulos: Color y peso seco o fresco

De la planta: Peso seco o fresco de la planta total o de la parte aérea y contenido de nitrógeno en tejido expresado en %. (35)

La coloración roja en el interior del nódulo indica la presencia de la leghemoglobina cuya función es regular la tensión de oxígeno en concentración tal que permita la manifestación óptima de la actividad de la nitrogenasa (la cual es sensible al oxígeno) y a su vez la oxidación de los fotosintatos por la bacteria para obtener los electrones y energía necesarios para efectuar la reducción del nitrógeno molecular. (5)

Una cepa efectiva mostrará una actividad nitrogenásica elevada y por tanto una mayor incorporación de nitrógeno atmosférico que se traduce en un mayor peso seco de nódulos y de tejido vegetal, por lo que estos parámetros están íntimamente correlacionados con el criterio de interés y constituyen un índice adecuado para efectuar la selección de cepas. (35)

Interespecificidad. La expresión de una simbiosis eficiente en la fijación de nitrógeno es regulada por características genéticas de ambos simbioses. De este modo se ha reportado que existen variedades de una especie de leguminosa que establecen asociaciones más eficientes con una cepa determinada. En este sentido las cepas más útiles desde el punto de vista industrial y agrícola son aquellas que establecen asociaciones eficientes con un mayor número de variedades.

Para evaluar lo anterior se efectúan ensayos en jarras de Leonard o macetas en donde se evalúa el efecto de la inoculación de numerosas cepas, probando cada una de ellas frente a diversas variedades del hospedero en estudio y se procede a evaluar la masa nodular y tejido vegetal fresco o seco. (18,29).

Existen algunas pruebas adicionales que se realizan cuando el inoculante va a ser utilizado en suelos que presentan condiciones específicas como son: altas concentraciones de sales, aluminio, manganeso; así como también un pH ácido o alcalino, puesto que se ha visto que no todas las cepas de Bradyrhizobium toleran tales condiciones.

Hay que hacer hincapié de que estas pruebas no aseguran que el comportamiento de la cepa in vitro se va a reproducir igual en campo, ya que esta prueba sólo nos proporciona una idea de cómo va a ser dicho comportamiento.

Si una cepa no es tolerante "in vitro" no tiene caso usarla en campo cuyo suelo tenga las características mencionada anteriormente. (1,9,12,13,26).

La validación en campo es fundamental, debido a que en el suelo existen otros factores que pueden anular el comportamiento deseado de la bacteria, entre éstos se tienen: microorganismos antagonicos a Bradyrhizobium o depredadores del mismo, características físicas especialmente el pH y químicas en donde se incluyen la concentración de los diferentes compuestos que pueden actuar estimulando o limitando el desarrollo de la bacteria y el establecimiento de la simbiosis .

### III OBJETIVOS



Considerando la importancia que tiene el mantenimiento y conservación de una colección de cepas en el desarrollo de la enseñanza, la ciencia y la tecnología y ya que en el laboratorio de Microbiología Experimental se cuenta con una subcolección de interés agrícola a la que se aplican periódicamente ensayos estrictos de control para la buena conservación así como la recomendación de su uso a nivel agrícola en este estudio se estableció como objetivo:

-Contribuir a la conservación de la colección de cepas de Bradyrhizobium japonicum existente en la Facultad de Química, UNAM.

Mediante

- La comprobación de las características de 19 cepas de Bradyrhizobium japonicum a través de una serie de pruebas bioquímicas y ensayos de infectividad y efectividad, y
- El enriquecimiento de la información de la subcolección de cepas de interés agrícola perteneciente a la Facultad de Química, UNAM; a través de la determinación de la tolerancia a la salinidad.

**IV PARTE EXPERIMENTAL**

#### 4.1 Material y métodos

##### 4.1.1 Cepas de Bradyrhizobium japonicum

Las cepas empleadas pertenecen al cepario de la Facultad de Química, UNAM. Subcolección de Microbiología Experimental. Las claves y procedencia de estas se registran en la tabla 1.

##### 4.1.2 Activación de las cepas y preparación de cultivo madre

Las ampollitas con las cepas liofilizadas se desinfectaron externamente con una solución de fenol al 5%. En condiciones de asepsia se procedió a la hidratación de cada una mediante la adición de una gota de caldo extracto de levadura manitol. Este volumen se vertió en tubos que contenían el mismo medio de cultivo y se incubaron a 28 °C durante 5 días.

Posteriormente cada una de las cepas se propagó en 5 tubos que contenían el medio de cultivo antes mencionado adicionado de agar y rojo congo (ELMARC).

Los tubos con crecimiento en agar inclinado se conservaron en refrigeración y constituyeron el cultivo madre con el cual se inocularon los diferentes medios empleados en las pruebas de control de características morfológicas, bioquímicas, de infectividad y efectividad.

##### 4.1.3 Ensayos de caracterización

El control de cepas de una colección de Bradyrhizobium involucra las siguientes determinaciones básicas:

- Morfología microscópica y reacción al colorante de Gram
- Morfología colonial en extracto de levadura manitol agar rojo congo
- Producción de alcalinidad en extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol
- Ausencia de desarrollo o desarrollo escaso en glucosa peptona agar

- Infectividad
- Efectividad

Otras características que presentaron algunas cepas de Bradyrhizobium se refieren a:

Capacidad de producir hidrogenasa

Capacidad para crecer en presencia de concentraciones elevadas de sal

La efectividad y la capacidad de producir hidrogenasa son características fundamentales en aquellas cepas que se emplearán en la industria productora de inoculantes, en tanto que la capacidad de desarrollarse en condiciones críticas ofrece la posibilidad de introducir exitosamente este tipo de cepas en suelos cuyas propiedades físicas o químicas limitan el establecimiento de los inoculantes.

En este estudio se realizaron las pruebas anteriores y adicionalmente otros ensayos bioquímicos que se utilizan en los procedimientos de aislamiento y que permiten diferenciar a Bradyrhizobium de Rhizobium, así como de otras bacterias frecuentes en la rizósfera y que se decidió aplicar a fin de comprobar las características inicialmente determinadas en las cepas en estudio.

Para un mejor entendimiento de las pruebas realizadas, éstas se agrupan en:

-Pruebas bioquímicas para:

- Diferenciación
- Control o caracterización básica y
- Especiales

-Ensayos de invernadero para observar y comprobar características de infectividad y efectividad

#### 4.1.3.1 Pruebas bioquímicas de diferenciación

En la tabla número 2 se describen los ensayos que permiten

diferenciar a Bradyrhizobium de bacterias afines.

En la tabla número 3 se exponen las 5 pruebas de diferenciación empleadas, las condiciones de incubación y los resultados obtenidos en trabajos previos y en el estudio actual.

#### 4.1.3.2 Pruebas de control o caracterización básica

Incluyen la observación microscópica y reacción al colorante de Gram, determinación de características coloniales y tiempo de desarrollo en el medio de cultivo extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC).

Producción de alcalinidad en extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol y desarrollo en glucosa peptona agar (GPA).

Es conveniente mencionar que aún cuando estos ensayos son empleados también en la diferenciación se han adoptado como pruebas de control ya que la producción de ácido en ELMA o el desarrollo en GPA dentro de las primeras 48 horas de incubación constituyen pruebas inequívocas de la presencia de microorganismos diferentes a Bradyrhizobium.

Las condiciones de incubación y resultados obtenidos se exponen en la tabla 4.

#### 4.1.3.3 Pruebas especiales

- Producción de hidrogenasa. Las cepas Hup<sup>-</sup> son más eficientes en la fijación de nitrógeno.

Para determinar la presencia de esta enzima, las cepas se inocularon en un medio de cultivo que contenía como indicador clorhidrato de 2,3,5-trifeniltetrazolio como indicador y se incubó a 28 °C durante 10 a 20 días, después de los cuales se observó la coloración roja o blanca de las colonias. El color rojo indica una prueba positiva para la hidrogenasa que redujo al clorhidrato 2,3,5 trifeniltetrazolio. Los resultados de este ensayo se exponen en la tabla 5.

- Tolerancia a altas concentraciones de sal. Se determinó únicamente en las cepas: FQ 5, FQ 8, FQ 12, FQ 17 y FQ 18.

#### • Propagación de la cepa

De los cultivos madre de cada una de las cepas anteriores se tomó una azada y se inoculó en caldo extracto de levadura manitol, incubándose a 28 °C y 200 rpm durante 7 días. A cada cultivo se le ajustó la población microbiana a una concentración de  $1 \times 10^7$  células por mililitro mediante la adición de medio de cultivo estéril hasta obtener una turbiedad que correspondía a 100 U.K.

#### • Determinación de curvas de crecimiento en caldo extracto de levadura manitol.

Se empleó una serie de matraces nefelométricos de 250 ml conteniendo 50 ml del medio de cultivo adicionándose las siguientes concentraciones de cloruro de sodio: 0.01% (medio de referencia), 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5% y 2%.

Todos los matraces fueron inoculados con 1.0 mililitro de los cultivos cuya población microbiana se había ajustado previamente y se incubaron a 28 °C y 200 rpm, procediéndose a determinar la turbiedad cada 24 hrs hasta la obtención de lecturas estables o decrecientes (9), tiempo que fue alcanzado entre los 7 y 9 días.

La turbiedad se determinó en un fotocolorímetro Klett Sumerson con filtro verde. Para calcular la población celular se utilizó la curva estándar de McFarland.(6). Tabla 6 y gráfica 1.

Los resultados de este ensayo se exponen en las tablas 7 a 11 y gráficas 2 a 6.

#### 4.1.3.4 Ensayo de invernadero para control de características de infectividad y efectividad en la fijación de nitrógeno.

Las cepas en estudio fueron propagadas e inoculadas en semillas de Glycine max a fin de comprobar su infectividad y comparar su eficiencia en la fijación de nitrógeno. Para ello se instaló un experimento con 21 tratamientos y 5 repeticiones de cada uno, las que se distribuyeron en un diseño completamente al azar. En el esquema 1 se resumen las actividades realizadas.

#### • Preparación de las semillas

En el experimento se utilizaron semillas certificadas de Glycine max, variedad Júpiter. (31) Se seleccionaron semillas que no poseían daño aparente y de tamaño uniforme. Se desinfectaron por tratamiento con etanol al 95% e hipoclorito de sodio al 5%. Se llevaron a cabo varios lavados con agua estéril con el objeto de eliminar el exceso de desinfectante.

Las semillas desinfectadas fueron colocadas en cajas Petri conteniendo algodón húmedo, todo en condiciones estériles, y se dejaron incubando a 28 °C durante 3 días para su germinación.

#### • Preparación de las unidades experimentales

Cada unidad estuvo constituida por una maceta de 20 cm de diámetro la cual fue lavada y desinfectada con alcohol cubriéndola con papel estraza.

Se empleó como soporte tezontle, el cual se lavó y se le ajustó el pH a 7. Posteriormente se colocó en bolses de polipropileno desinfectándose por exposición a vapor corriente durante 90 minutos. Asepticamente se llenaron las macetas con el tezontle se humedecieron con 350 ml de solución de Jensen.

#### • Preparación del inóculo

Se llevó a cabo la activación de las cepas y posteriormente la propagación de las mismas en caldo extracto de levadura manitol incubando a una temperatura de 28 °C en un agitador rotatorio, ajustando la población a  $1 \times 10^9$  células por mililitro de cultivo. Esto fue determinado turbidimétricamente en el fotocolorímetro.

#### • Inoculación y siembra de las semillas

Con pinzas o una espátula estériles se colocaron 6 semillas germinadas por maceta, se adicionó a cada una un mililitro de cultivo conteniendo  $1 \times 10^9$  células por mililitro. Se dejaron en el invernadero y a las dos semanas se dejaron dos plantas por maceta.

Las unidades experimentales se pusieron en el invernadero durante 45 días para detectar la presencia o ausencia de nódulos. En el período de crecimiento las macetas se regaron en forma alternada con solución nutritiva de Jensen y agua destilada estéril.

- Cosecha

La cosecha se efectuó a los 45 días

- Parámetros de evaluación

- Infectividad

Se detectó la presencia de nódulos

- Efectividad

Esta característica esta correlacionada con el peso de los nódulos y de la parte aérea.

Determinación de peso por nódulo. Estos se separaron de la raíz y se secaron a 70 °C durante 72 horas, se pesaron y el peso se dividió entre el número total de nódulos.

Determinación del peso seco de la parte aérea. Para ello se separó la fracción radicular de la del follaje y éste último se secó en la estufa en las mismas condiciones y se procedió a evaluar el peso seco.

Los resultados y análisis estadístico se observan en las tablas 12, 13, 14, 15 y 16.

Para evaluar la eficiencia en la fijación de nitrógeno se tomó como base el peso seco de los tratamientos testigos, considerando como el 100% el peso obtenido en el tratamiento al que se agregó nitrógeno mineral debido a que las plantas se desarrollaron en presencia de los nutrimentos necesarios, y como referencia mínima el peso obtenido en el testigo negativo. Con base en lo anterior se agrupó a las cepas en 4 categorías que corresponden a cepas altamente eficientes en la fijación de nitrógeno, cepas eficientes, de baja eficiencia e ineficientes. En la tabla 17 se registran los datos comparativos de los resultados obtenidos en estudios previos y en el estudio actual respecto al grado de eficiencia en la fijación de nitrógeno.



4.2 TABLA DE  
TRATAMIENTOS Y RESULTADOS

TABLE 1 Descripción de claves y procedencia de las cepas utilizadas

Clave interna	Clave sinónima	Institución donante
FQ 3	ENCB 511	E.N.C.B., I.P.N.
FQ 4	ENCB 515	E.N.C.B., I.P.N.
FQ 5	CC - 709	CINVESTAV., I.P.N.
FQ 6	CC - 717	CINVESTAV., I.P.N.
FQ 7	CP - 21	Colegio de Posgraduados, Chapingo
FQ 8	TAL- 102	Niftal, Universidad de Hawaii
FQ 9	TAL- 379	Niftal, Universidad de Hawaii
FQ 10	TAL- 411	Niftal, Universidad de Hawaii
FQ 11	TAL- 415	Niftal, Universidad de Hawaii
FQ 12	SEMIA-535	Ipagro, Brasil
FQ 13	SEMIA-527	Ipagro, Brasil
FQ 16	SEMIA-587	Ipagro, Brasil
FQ 17	31 IB 110	Universidad Autónoma de Tamaulipas
FQ 18	31 IB 136	Universidad Autónoma de Tamaulipas
FQ 19	31 IB 143	Universidad Autónoma de Tamaulipas
FQ 34	VMR 30	Colegio de Posgraduados, Chapingo
FQ 45	Aislada de nódulos	Fac. Química, U.N.A.M.
FQ 46	Aislada de nódulos	Fac. Química, U.N.A.M.
FQ NIT J	Aislada de inoculante Nitragin	Fac. Química, U.N.A.M.

**TABLA 2 Características bioquímicas de la Familia Rhizobiaceae**

Pruebas Bioquímicas	BRADYRHIZOBIUM	RHIZOBIUM	AGROBACTERIUM
Glucosa-peptona-agar	+ o -	+ o -	+++
Leche tornasolada	a	b	c
Citrato de Koser	-	-	+ (pellicula superficial)
Sulfito de bismuto-agar	+ o -	+ o -	+++
Medio de Bergensen modificado	-	-	++
Extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMA-RC)	Colonias menores a 2 mm., cremosas, convexas y opacas	Colonias de 2 mm. o mayores, mucosas, lisas y brillantes.	
ELMA-Azul de bromotimol	Alcalinidad	Acidez	

**CONDICIONES DE INCUBACION:**

Temperatura 28 grados centígrados  
 Tiempo Para Bradyrhizobium de 3 a 14 días excepto en la prueba d  
 Glucosa peptona agar en la que se incuba de 24 a 48 hrs.,  
 Para Rhizobium y Agrobacterium, 24 a 48 hrs. en todos los casos.

**CLAVES DE INTERPRETACION:**

Desarrollo +++ abundante  
 + escaso  
 - ausente

**En leche tornasolada:**

- a Reacción alcalina sin zona de suero
- b Reacción alcalina con zona de suero
- c Reacción neutra o alcalina con zona de suero

**Producción de Ácido sulfhídrico**

+++ abundante  
 + escaso  
 - ausente

TABLA 3: Resultados comparativos de las pruebas diferenciales (Incubación 28 °C)

Prueba Aplicada y Tiempo de Incubación	Cepa*	Cepas de <i>Bradyrhizodius</i> probadas																			
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	24	45	46	Kit J	
Leche tornasolada (5-10 días)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Desarrollo en Citrato de Koser (5-10 días)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S en sulfito de bisulfo agar (5-10 días)	+ ó -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desarrollo en medio de Bergensen modificado (14 días)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de acidez en hilosa (5-10 días)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* = Características descritas por Jordan (Citado en Bergey)

a = Reacción alcalina sin zona de suero

+ ó - = Poco o nulo desarrollo

- = Nulo desarrollo



Cuadro superior = Resultados en estudios previos

Cuadro inferior = Resultados actuales

TABLA 4: Resultados comparativos de las pruebas de control (Incubación 28 °C)

Prueba Aplicada y Tipo de Incubación	Cepas Tipo	Cepas de <i>Bradyrhizidium</i> probadas																		
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	24	45	46	Nat J
Morfología microscópica y reacción al Gram	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
Morfología colonial y tiempo de desarrollo en ELMA-RC (5-10 días)	I 5-10 días	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				
Producción de alcalinidad en ELMA-AB (5-10 días)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Desarrollo en glucosa peptona agar púrpura de broancresol (24-48 hrs)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

\* = Características descritas por Jordan (Citado en Bergey)

x = Cocobacilos Gram negativos

T = Colonias típicas. Colonias menores a 2 mm, cremosas, convexas y opacas

A = Colonias atípicas

+ = Prueba positiva

- = Prueba negativa



Cuadro superior = Resultados en estudios previos

Cuadro inferior = Resultados actuales

TABLA 5: Resultados comparativos de la determinación de hidrogenasa

Cepas	Hidrogenasa Experimentos		Coloración de las colonias a los 10 días de incubación
	Anterior	Actual	
3	+	+	Rojas y blancas
4	+	+	Rojas
5	+	-	Blancas
6	+	+	Rojas y blancas
7	+	+	Rojas y blancas
8	+	+	Rojas y blancas
9	+	+	Rojas y blancas
10	+	+	Rojas y blancas
11	+	-	Blancas
12	+	+	Rojas
13	+	+	Rojas
16	+	+	Rojas y blancas
17	+	+	Rojas y blancas
18	+	+	Rojas y blancas
19	+	+	Rojas y blancas
34		+	Rojas y blancas
45		+	Rojas y blancas
46		+	Rojas y blancas
Nit J		+	Rojas y blancas

Nota: Al aumentar el periodo de incubación se observó que las cepas que mostraron simultáneamente colonias blancas y rojas se tornaron rojas en su totalidad

TABLA 6 Curva Patrón de McFarland

No. Tubo	Sol. Acuosa 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ml	Sol. Acuosa 1% BaCl <sub>2</sub> ml	No. de Bacterias x 10 <sup>6</sup> /ml (aprox)
1	9,9	0,1	300
2	9,8	0,2	600
3	9,7	0,3	900
4	9,6	0,4	1200
5	9,5	0,5	1500
6	9,4	0,6	1800
7	9,3	0,7	2100
8	9,2	0,8	2400
9	9,1	0,9	2700
10	9,0	1,0	3000

CURVA DE McFARLAND, GRAFICA 1

U. K.	BACTS. * 10 <sup>6</sup> /ml
30	300
47	600
84	900
105	1200
140	1500
165	1800
168	2100
225	2400
242	2700
283	3000

TABLA 7 Efecto de concentraciones variables de sal sobre el desarrollo de Bradyrhizobium japonicum

## Cepa FQ 5

Días concsi	Concentraciones de Cloruro de Sodio					
	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	1,50%	2,00%
0	6,00	7,87	7,47	7,87	7,47	7,77
1	8,43	8,47	8,02	7,87	8,98	8,29
2	9,00	9,05	8,35	7,87	8,98	8,43
3	9,24	9,24	8,41	7,87	8,17	8,47
4	9,32	9,33	8,47	7,87	8,17	8,29
5	9,32	9,35	8,41	7,87	8,17	8,29
6	9,35	9,43	8,43	7,87	7,87	8,35
7	9,38	9,43	8,43	7,87	8,02	8,35
8	9,41	9,44	8,43	7,87	7,95	8,35
9	9,43	9,45	8,43	7,87	7,95	8,35



TABLA B Efecto de concentraciones variables de sal sobre el desarrollo de Bradyrhizobium japonicum

Cepa FQ 8

Tiempo de incubación	Concentraciones de Cloruro de Sodio					
	Log del número de células / ml					
Días concs:	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	1,50%	2,00%
0	7,77	7,17	6,00	6,00		
1	7,77	7,87	7,82	8,17		
2	8,75	8,72	8,35	8,17		
3	9,27	9,27	8,66	8,29		
4	9,36	9,40	8,75	8,29		
5	9,38	9,41	8,73	8,65		
6	9,41	9,47	8,73	8,89		
7	9,43	9,49	8,68	9,00		
8	9,43	9,49	8,66	9,00		
9	9,43	9,49	8,66	9,00		

TABLA 9 Efecto de concentraciones variables de sal sobre el desarrollo de Bradyrhizobium japonicum

Cepa FQ 12

Tiempo de incubación

Concentraciones de Cloruro de Sodio  
Log del número de células / ml

Días concs:	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	1,50%	2,00%
0	7,65	7,95	8,02	8,02	8,02	8,02
1	8,57	8,66	8,55	8,27	8,38	8,35
2	8,90	8,92	8,75	8,35	8,47	8,43
3	9,06	9,05	8,97	8,53	8,47	8,49
4	9,10	9,12	8,98	8,43	8,47	8,57
5	9,22	9,21	9,00	8,43	8,47	8,57
6	9,27	9,25	9,00	8,43	8,47	8,57
7	9,31	9,34	9,00	8,43	8,47	8,57
8	9,33	9,33	9,00	8,43	8,47	8,57
9	9,33	9,33	9,00	8,43	8,47	8,57

TABLA 10 Efecto de concentraciones variables de sal sobre el desarrollo de Bradyrhizobium japonicum

Cepa FQ 17

Tiempo de incubación	Concentraciones de Cloruro de Sodio					
	Log del número de células / ml					
Días concs:	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	1,50%	2,00%
0	8,17	8,35	8,17	8,29	8,21	8,25
1	8,43	8,62	8,35	8,35	8,21	8,21
2	9,04	9,12	8,65	8,29	8,21	8,21
3	9,20	9,25	8,75	8,29	7,87	8,17
4	9,33	9,39	8,79	8,21	7,87	7,87
5	9,44	9,49	8,47	8,17	8,17	7,87
6	9,46	9,50	8,47	8,17	8,17	7,87
7	9,49	9,51	8,47	8,17	8,17	7,87
8	9,49	9,51	8,47	8,17	8,17	7,87
9	9,49	9,51	8,47	8,17	8,17	7,87

TABLA 11 Efecto de concentraciones variables de sal sobre el desarrollo de Bradyrhizobium japonicum

Cepa FQ 18

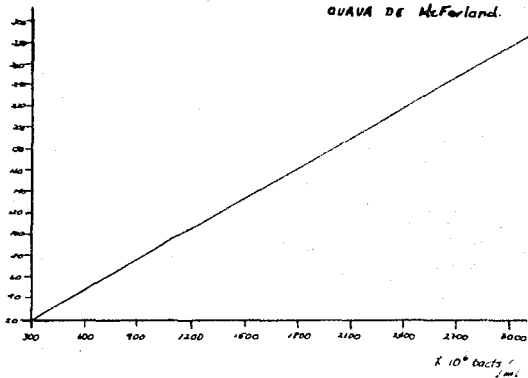
Días concs:	Concentraciones de Cloruro de Sodio					
	Log del número de células / ml					
	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	1,50%	2,00%
0	7,87	7,82	7,87	7,87	8,02	8,02
1	8,17	8,17	8,29	7,87	8,29	8,17
2	8,93	8,92	8,41	8,02	8,35	8,17
3	9,22	9,26	8,49	8,17	7,95	8,17
4	9,30	9,32	8,60	8,17	7,95	8,17
5	9,33	9,36	8,60	8,13	7,95	8,21
6	9,40	9,40	8,60	7,47	7,77	8,21
7	9,40	9,41	8,41	7,47	7,30	7,65
8	9,43	9,43	8,41	7,47	7,30	7,65
9	9,45	9,43	8,41	7,47	7,30	7,65

GRAFICA 1

43

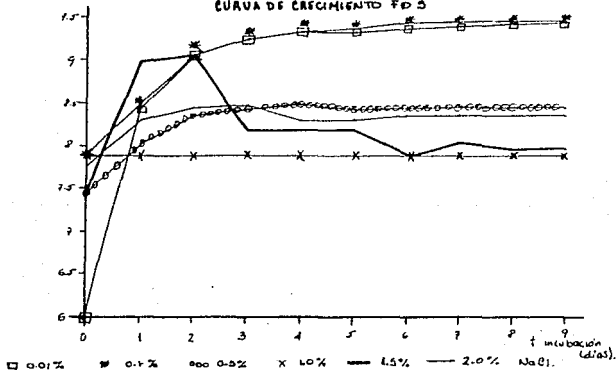
CUAVA DE McFarland.

U.K.

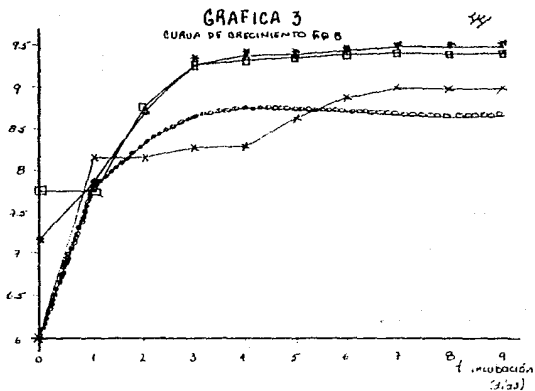


GRAFICA 2  
CUAVA DE CRECIMIENTO FDS

log. del número de  $100\text{g} / \text{ml}$

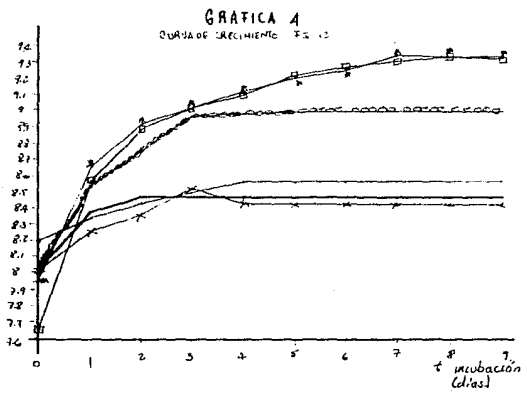


log. del número de Abo. / ml.



$\square$  55°C  $\blacktriangle$  50°C  $\bullet$  45°C  $\times$  40°C  $\text{—}$  35°C  $\text{---}$  30°C  $\text{---}$  25°C

log. del número de Abo. / ml.

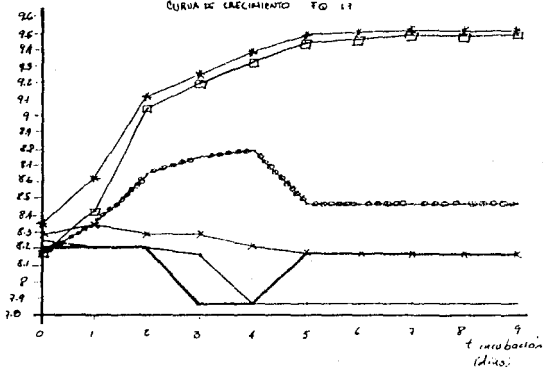


t incubación (días)

GRAFICA 5  
CURVA DE CRECIMIENTO FG 17

45

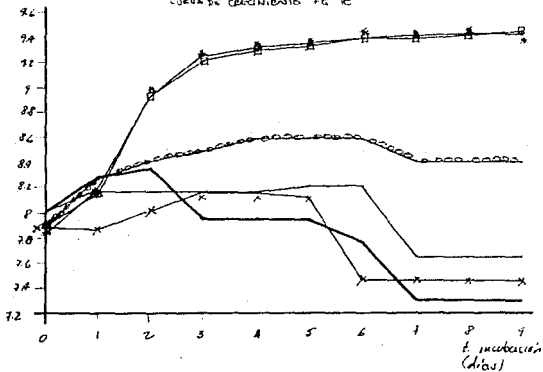
log. del número de  $A_{602}$  / pul.



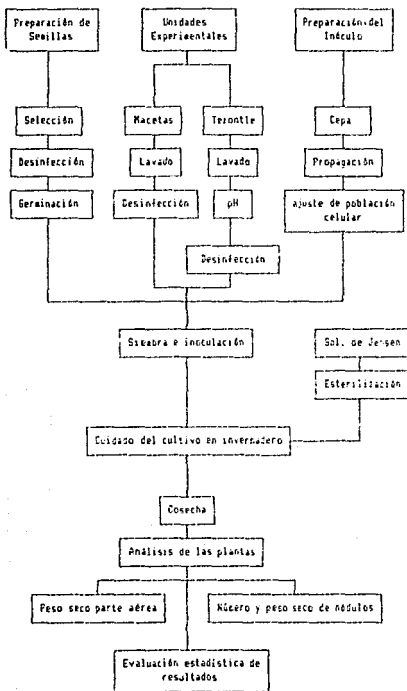
□ 0.01%   \* 0.05%   ○ 0.1%   . 1.0%   — 15%   — 20%   No O<sub>2</sub>

GRAFICA 6  
CURVA DE CRECIMIENTO FG 18

log. del número de  $A_{602}$  / pul.



ESQUEMA 1.  
Diagrama de trabajo





## NOMENCLATURA

X <sub>e</sub>	Media de tratamientos
GL	Grados de libertad
SC	Suma de Cuadrados
CM	Cuadrado medio
F	Valor de F requerido para la significación estadística
P	Nivel de significancia
D	Diferencias

TABLA 12 Resultados del número de nódulos

Tratamiento	Repeticiones						D
	A	B	C	D	E	Xt	
1 (FQ 3)	89	34	83	134	141	96	abc
2 (FQ 4)	85	86	110	161	64	101	a
3 (FQ 5)	106	74	69	36	86	74	abcd
4 (FQ 6)	34	58	108	92	55	69	abcd
5 (FQ 7)	138	115	70	58	110	98	ab
6 (FQ 8)	109	79	56	55	78	75	abcd
7 (FQ 9)	82	74	101	61	69	77	abcd
8 (FQ 10)	97	44	43	71	43	59	cd
9 (FQ 11)							
10 (FQ 12)	95	91	44	112	89	86	abcd
11 (FQ 13)	45	68	66	58	106	68	abcd
12 (FQ 16)	128	19	75	23	43	57	abcd
13 (FQ 17)	121	107	87	73	53	88	bcd
14 (FQ 18)	36	103	33	101	79	70	abcd
15 (FQ 19)	68	45	30	74	62	55	d
16 (FQ 34)	92	84	68	37	74	71	abcd
17 (FQ 45)	60	65	53	97	26	60	bcd
18 (FQ 46)	76	69	70	111	55	76	abcd
19 (Nit J)	130	71	98	76	34	81	abcd
20 ( T + )							
21 ( T - )							

NOTA: Los tratamientos que comparten una misma letra se consideran iguales entre sí. (  $\alpha = 0.05$  )

Análisis de varianza	GL	SC	CM	F	P
Total	89	77939,028			
Tratamientos	17	16238,678	955,21638	1,11500	0,35767
Error	72	61700,350	856,94931		

TABLA 13 Resultados de masa nodular ( mg )

Tratamiento	Repeticiones						
	A	B	C	D	E	X1	D
1 (FQ 3)	196,5	52,0	142,3	233,0	252,0	175,1	abcde
2 (FQ 4)	189,5	243,0	453,0	315,0	197,5	279,6	a
3 (FQ 5)	99,0	96,1	108,0	50,0	127,5	98,1	e
4 (FQ 6)	68,0	142,8	240,0	166,0	78,0	138,9	cde
5 (FQ 7)	173,0	267,0	172,0	126,0	147,0	177,0	abcde
6 (FQ 8)	177,5	177,0	111,0	134,0	110,0	137,7	de
7 (FQ 9)	146,5	267,0	281,0	123,0	175,0	198,5	abcde
8 (FQ 10)	335,0	263,0	137,5	255,0	230,0	238,1	abc
9 (FQ 11)							
10 (FQ 12)	232,0	124,5	55,0	232,5	124,0	153,6	bcde
11 (FQ 13)	180,0	164,3	142,5	90,0	245,0	164,3	bcde
12 (FQ 16)	191,5	50,0	139,0	387,0	179,0	187,3	abcde
13 (FQ 17)	216,0	150,0	80,0	152,0	130,3	145,7	cde
14 (FQ 18)	60,0	149,0	55,0	264,0	207,0	147,0	cde
15 (FQ 19)	412,0	70,0	112,0	229,0	174,3	199,4	abcde
16 (FQ 34)	124,0	201,0	182,0	73,0	162,0	148,4	cde
17 (FQ 45)	195,0	365,0	235,0	428,0	88,0	262,2	ab
18 (FQ 46)	312,5	201,0	250,0	173,4	115,0	210,3	abcd
19 (Nit J)	321,0	156,0	301,0	103,5	65,0	193,3	abcde
20 ( T + )							
21 ( T - )							

NOTA: Los tratamientos que comparten una misma letra se consideran iguales entre si. ( alfa = 0.05 )

Análisis de varianza	GL	SC	CM	F	P
fuerza de variación					
Total	29	0,70478970			
Tratamientos	17	0,18342000	0,01078940	1,49000000	0,12322000
Error	72	0,52136970	0,00724120		

TABLA 14 Resultados de peso seco / nódulo ( mg )

Tratamiento	Repeticiones						D
	A	B	C	D	E	Xt	
1 (FQ 3)	2,200	1,520	1,710	1,730	1,780	1,786	d
2 (FQ 4)	2,220	2,820	4,110	1,950	3,080	2,836	bcd
3 (FQ 5)	0,930	1,330	1,560	1,380	1,480	1,336	d
4 (FQ 6)	2,000	2,460	2,220	1,800	1,410	1,978	cd
5 (FQ 7)	1,250	2,320	2,450	2,170	1,330	1,904	d
6 (FQ 8)	1,620	2,240	1,980	2,430	1,410	1,936	c
7 (FQ 9)	1,780	3,600	2,780	2,010	2,530	2,540	bcd
8 (FQ 10)	3,450	5,970	3,190	3,590	5,340	4,308	ab
9 (FQ 11)							
10 (FQ 12)	2,440	1,360	1,250	2,070	1,390	1,702	d
11 (FQ 13)	4,000	2,500	2,150	1,550	2,310	2,502	bcd
12 (FQ 16)	1,490	2,630	1,850	16,820	4,160	5,350	a
13 (FQ 17)	1,780	1,400	0,920	2,080	2,450	1,727	d
14 (FQ 18)	1,660	1,440	1,660	2,610	2,620	1,998	cd
15 (FQ 19)	6,050	1,550	3,730	3,090	2,810	3,446	abcd
16 (FQ 34)	1,340	2,330	2,670	1,970	2,180	2,110	cd
17 (FQ 45)	3,250	5,610	4,430	4,410	3,380	4,216	abc
18 (FQ 46)	4,110	2,910	3,570	1,560	2,090	2,648	bcd
19 (Nit J)	2,460	2,190	3,070	1,360	2,500	2,316	bcd
20 ( T + )							
21 ( T - )							

NOTA: Los tratamientos que comparten una misma letra se consideran iguales entre sí. (  $\alpha = 0.05$  )

Análisis de varianza fuente de variación	GL	SC	CM	F	P
Total	89	310,44016			0,02163
Tratamientos	17	99,88991	5,8758772	2,00900	
Error	72	210,55025	2,9243090		

TABLA 15 Resultados del peso seco de la parte aérea ( g )

Tratamiento	Repeticiones						Xt	D
	A	B	C	D	E			
1 (FQ 3)	1,305	0,710	1,045	1,485	1,905	1,290	ab	
2 (FQ 4)	0,720	0,965	1,395	1,030	0,825	0,987	abcd	
3 (FQ 5)	0,585	0,637	0,635	0,630	0,700	0,637	cde	
4 (FQ 6)	0,650	0,665	0,970	1,190	0,360	0,767	cde	
5 (FQ 7)	0,950	1,505	1,080	0,815	0,985	1,067	abcd	
6 (FQ 8)	0,950	1,135	0,775	1,370	0,740	0,994	abcd	
7 (FQ 9)	1,005	2,740	1,405	0,855	0,965	1,394	a	
8 (FQ 10)	1,990	1,415	0,765	1,300	1,390	1,372	a	
9 (FQ 11)	0,575	0,615	0,640	0,460	0,620	0,582	de	
10 (FQ 12)	1,785	0,675	0,460	1,700	0,915	1,107	abc	
11 (FQ 13)	2,370	1,421	0,835	1,160	1,320	1,421	a	
12 (FQ 16)	0,720	0,620	0,580	1,110	1,270	0,860	bcde	
13 (FQ 17)	1,320	0,935	1,010	1,830	0,860	1,195	ab	
14 (FQ 18)	0,930	1,095	0,940	1,925	1,510	1,280	ab	
15 (FQ 19)	1,580	0,640	0,850	0,930	0,695	0,939	abcde	
16 (FQ 34)	0,815	1,230	1,180	1,020	1,275	1,104	abc	
17 (FQ 45)	0,765	1,300	0,995	1,460	0,340	0,972	abcde	
18 (FQ 46)	1,165	0,770	1,115	0,800	0,440	0,858	bcde	
19 (Nit J)	1,755	1,035	1,070	0,730	1,830	1,284	ab	
20 ( T + )	0,655	0,590	0,610	1,490	0,495	0,768	cde	
21 ( T - )	0,485	0,480	0,510	0,565	0,315	0,471	e	

NOTA: Los tratamientos que comparten una misma letra se consideran iguales entre si. ( alfa = 0.05 )

fuente de variación	GL	SC	CM	F	P
Total	104	21,6513020			
Tratamientos	20	8,1056680	0,4052834	2,5130000	0,0018300
Error	84	13,5456340	0,1612575		

TABLA 16 Resultados de infectividad y efectividad de 19 cepas de Bradyrhizobium japonicum ( se expresa la media de 5 repeticiones )

Tratamientos	No. de nódulos	Masa nodular ( mg )	Peso/ nódulo ( mg )	Peso seco parte aérea ( mg )
1 (FO 3)	94,000	175,100	1,788	1,290
2 (FO 4)	101,000	279,600	2,836	0,987
3 (FO 5)	74,000	96,100	1,336	0,637
4 (FO 6)	69,000	138,900	1,978	0,767
5 (FO 7)	98,000	177,000	1,904	1,067
6 (FO 8)	75,000	137,700	1,936	0,994
7 (FO 9)	77,000	198,500	2,540	1,394
8 (FO 10)	59,000	238,100	4,308	1,372
9 (FO 11)				0,582
10 (FO 12)	86,000	153,600	1,702	1,107
11 (FO 13)	68,000	164,300	2,502	1,421
12 (FO 16)	57,000	189,300	5,390	0,860
13 (FO 17)	88,000	145,700	1,727	1,195
14 (FO 18)	70,000	147,000	1,998	1,280
15 (FO 19)	55,000	199,400	3,446	0,979
16 (FO 34)	71,000	148,400	2,110	1,104
17 (FO 45)	60,000	262,200	4,216	0,972
18 (FO 46)	76,000	210,300	2,848	0,858
19 (Nit J)	81,000	193,300	2,316	1,284
20 ( T + )				0,768
21 ( T - )				0,471

TABLA 17 Resultados comparativos del rendimiento en materia seca y grado de eficiencia

Tratamientos	Rendimientos		Grado de eficiencia	
	%			
	Experimentos Anterior	Actual	Anterior	Experimentos Actual
1 (FQ 3)		168		Altamente eficiente
2 (FQ 4)	101	128	Altamente eficiente	Altamente eficiente
3 (FQ 5)	92	83	Baja eficiencia	Baja eficiencia
4 (FQ 6)	124	99	Altamente eficiente	Eficiente
5 (FQ 7)	129	139	Altamente eficiente	Altamente eficiente
6 (FQ 8)	110	129	Altamente eficiente	Altamente eficiente
7 (FQ 9)	142	181	Altamente eficiente	Altamente eficiente
8 (FQ 10)	91	178	Baja eficiencia	Altamente eficiente
9 (FQ 11)	79	75	Baja eficiencia	Baja eficiencia
10 (FQ 12)	164	144	Altamente eficiente	Altamente eficiente
11 (FQ 13)	112	185	Altamente eficiente	Altamente eficiente
12 (FQ 16)	115	112	Altamente eficiente	Altamente eficiente
13 (FQ 17)	130	155	Altamente eficiente	Altamente eficiente
14 (FQ 18)	135	156	Altamente eficiente	Altamente eficiente
15 (FQ 19)	107	122	Altamente eficiente	Altamente eficiente
16 (FQ 34)	111	143	Altamente eficiente	Altamente eficiente
17 (FQ 45)		126		Altamente eficiente
18 (FQ 46)		111		Altamente eficiente
19 (Nit J)	109	157	Altamente eficiente	Altamente eficiente
20 ( T + )	100	100		
21 ( T - )	66	61		

Criterios:

Altamente eficiente > 100 %

Eficiente = 100 %  $\pm$  5

Baja eficiencia < 100 % y > T -

Ineficiente < T -

**DISCUSION**  
**DE LOS**  
**RESULTADOS**



## 5.1 Pruebas bioquímicas de diferenciación

5.1.1 Los resultados obtenidos en la leche tornasolada, citrato de Koser, sulfito de bismuto agar, medio de Bergensen modificado y caldo Xilosa, indican que las cepas conservaron las características inicialmente determinadas (tabla 3).

## 5.2 Pruebas de control

### 5.2.1 Características microscópicas y coloniales

En las 19 cepas en estudio se observaron coccobacilos Gram negativos y colonias con un diámetro menor a 2 mm, cremosas, convexas y opacas; características que demuestran que no hay alteración alguna respecto a lo anteriormente registrado. Se observó que las cepas en estudio dieron un desarrollo de colonias evidentes a diferentes períodos de incubación los que fructuaron entre 5 y 8 días lo que coincide con el tiempo de incubación para Bradyrhizobium japonicum que es considerado de desarrollo lento.

Los resultados de la producción de alcalinidad en extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol y de desarrollo en glucosa peptona agar púrpura de bromocresol coinciden con los reportados inicialmente (Tabla 4).

## 5.3 Pruebas especiales

### 5.3.1 Actividad de hidrogenasa por reducción del tetrazolio

En este ensayo con respecto a los resultados anteriores se registró variación en las cepas 5 y 11.

Es importante mencionar que la velocidad de síntesis de hidrogenasa parece estar influenciada por el tipo de cepas y condiciones ambientales.

De este modo a los 10 días, que es el tiempo recomendado por el método (24) para efectuar la lectura, se observó que las cepas 4, 12 y 13 dieron lugar a colonias rojas; en tanto que en las otras cepas, desarrollaron el color sólo las colonias que estaban incluidas en el medio y las superficiales se observaron blancas, lo que podría considerarse como un

resultado dudoso, por lo que se incubó por períodos hasta de 20 días durante los cuales fue reducida la sal de tetrazolio por las cepas 3, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19, 34, 45, 46 y Nit J (Tabla 5).

### 5.3.2 Tolerancia a la salinidad

Se determinó en 5 de las 19 cepas en estudio. Los resultados indican que todas las cepas crecen adecuadamente en concentración de 0.1% de cloruro de sodio, en donde el desarrollo fue similar al obtenido en el medio de referencia.

Sólo la cepa 12 mostró cierta tolerancia a la concentración de 0.5% en la que se registró un comportamiento similar al mostrado con concentraciones menores, en tanto que a concentraciones mayores aún cuando se registró turbiedad, ésta estuvo dada por la producción de polisacáridos extracelulares y no por el aumento de la población microbiana.

En estos casos habría sido conveniente efectuar la cuenta de microorganismos viables a diferentes períodos de incubación para determinar en forma confiable el aumento de población.

La cepa 8 fué la que mostró mayor sensibilidad por lo que no creció en las concentraciones más altas probadas (1.5-2.0%), observándose que en la concentración de 1% produjo abundante polisacárido extracelular (Tablas 7 - 11 y gráficas 2 - 6).

### 5.4 Ensayos de invernadero

En las tablas 12, 13 y 14 se observa que la cepa 11 perdió su capacidad infectiva. Encontrándose que este resultado esta estrictamente correlacionado con el peso seco de la parte aérea que resultó similar al testigo negativo.

En relación a las otras cepas probadas, todas conservaron su capacidad infectiva y efectiva como lo demuestra la presencia de nódulos y el mayor contenido de peso seco de la parte aérea respecto al testigo sin nitrógeno o testigo negativo. (16).

La comparación de medias indica que las cepas en estudio tienen diferentes grados de infectividad y efectividad. Sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas por lo que no fué posible establecer la separación de grupos que se esperaba, lo que indica que el modelo estadístico utilizado no es lo suficientemente

sensible para detectar estas diferencias. (23). (Tablas 12 a 15).

Considerando lo anterior la discusión de resultados se hizo con base en la comparación de medias, a través de lo cual fué posible corroborar los informes de la literatura referentes a que una cepa altamente infectiva y que origina un mayor número de nódulos y masa nodular no es necesariamente eficiente en la fijación de nitrógeno (10), en tanto que existen cepas que dan lugar a un número reducido de nódulos pero que en éstos la actividad de la nitrogenasa es muy elevada lo que se traduce en una mayor incorporación de nitrógeno y, mayor peso por nódulo y parte aérea de la planta.

En la tabla 16 se observa que el número de nódulos fructuó entre 55 y 101 por planta; la masa nodular varió de 96.1 a 279.6 mg por planta; el peso por nódulo de 1.3 a 5.3 mg y el peso de la parte aérea resultó de 0.47 g y 0.76 g en los testigos sin nitrógeno y con nitrógeno respectivamente, en tanto que en los tratamientos inoculados fructuó entre 0.58 g y 1.42 g por planta lo que corresponde a incrementos de 23% y 201% respecto al testigo negativo.

La mayor infectividad corresponde a la cepa 4 con la que se obtuvo el mayor número de nódulos y masa nodular, en tanto que respecto a la eficiencia en la fijación de nitrógeno que se evaluó a través del peso por nódulo y peso seco de la parte aérea, los valores obtenidos corresponden a 2.83 mg y 0.98 g los que están ubicados en la parte media de los extremos obtenidos.

Los resultados del peso seco indican que las cepas con mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno corresponden a 9, 10 y 13; y como confirmación a los informes de la literatura en los valores obtenidos con la cepa 10 se observa una estrecha correlación entre peso seco de la parte aérea, peso por nódulo y masa nodular, en tanto que el número de nódulos fué de 59 que corresponde a los más bajos obtenidos.

Una situación similar se observa con la cepa 5 cuyo peso seco de la parte aérea fué de 0.63 g, valor que es superior al testigo negativo pero inferior con respecto al testigo positivo lo que indica baja eficiencia en la fijación de nitrógeno. En este tratamiento se observa que el peso seco de la parte aérea, el peso por nódulo (1.33 mg) y la masa nodular (96.1 mg) corresponden a los más bajos obtenidos, en tanto que el número de nódulos fué intermedio (74).

Respecto al grado de efectividad relacionado con el porcentaje de incremento de materia seca respecto al testigo positivo se tiene que de 19 cepas, 16 son altamente eficientes, la 6 es eficiente y las cepas 5 y 11 poseen baja

eficiencia (Tabla 17).

**VI CONCLUSIONES****Y****RECOMENDACIONES**

1.- Los resultados de las pruebas bioquímicas de diferenciación y de control permitieron corroborar que las cepas pertenecen a Bradyrhizobium y que los resultados actuales concuerdan con los registrados previamente.

2.- Los resultados de la hidrogenasa permiten recomendar a las cepas 4, 12 y 13 para la producción de inoculantes.

3.- Para este ensayo se recomienda optimizar la metodología a fin de eliminar el efecto de variación en la tensión de oxígeno que parece influir sobre la manifestación de la actividad de la hidrogenasa

4.- Los resultados de tolerancia a salinidad indican que las cepas probadas no poseen esta característica y que por tanto no puede recomendarse su introducción a suelos con problemas de salinidad. Se sugiere efectuar este ensayo con las otras cepas.

5.- Para la cepa 11 se recomienda repetir los ensayos de control con otras ampollitas a fin de comprobar si esta cepa perdió sus características por efecto de la liofilización o este problema se originó al azar.

6.- Se observó correlación entre peso seco e hidrogenasa únicamente en la cepa 13. Es recomendable repetir esta determinación a fin de rectificar o ratificar los resultados obtenidos.

7.- De las 19 cepas en estudio se comprobó que 14 conservaron su grado de eficiencia; en 2 de ellas se registró variación y se calificó a 3 de ellas sobre las cuales no existía información previa.

8.- Para la producción de inoculantes es factible recomendar a 12 de las cepas probadas cuyo comportamiento ha permanecido estable en cuanto a infectividad y eficiencia elevada en la fijación de nitrógeno

**VII RESUMEN**

Los ceparios proporcionan un firme apoyo a los profesionales vinculados con la microbiología y su aplicación en las diversas áreas de la investigación, colaborando en gran medida al desarrollo de la enseñanza, la ciencia y la tecnología.

La conservación y mantenimiento de una colección de cepas implica la realización de pruebas de rutina periódicas que permitan corroborar las características establecidas así como detectar posibles cambios de su actividad.

En la producción agrícola los microorganismos fijadores de nitrógeno han demostrado ampliamente su beneficio, dando origen al desarrollo de la tecnología de producción de inoculantes cuya aplicación es cada vez de mayor significado económico debido a la actual crisis energética.

Con base en lo anterior, una colección de cepas fijadoras de nitrógeno implica un control de calidad en el mantenimiento de ciertas características que aseguren que dichas cepas tengan éxito al ser aplicadas en la agronomía.

Considerando la importancia de lo anteriormente expuesto y que dentro de las bacterias fijadoras de nitrógeno las de mayor importancia actual corresponden a las de la familia Rhizobiaceae, en donde se encuentra incluido el género Bradyrhizobium; en este trabajo se expone la metodología de los ensayos de rutina empleados para el control de cepas y los resultados que se obtuvieron al aplicarlos.

Estos incluyen nueve pruebas bioquímicas y ensayos de infectividad y efectividad que se aplicaron a 19 cepas de Bradyrhizobium japonicum que forman parte de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM.

Una prueba adicional corresponde a la determinación de salinidad en 5 de las cepas anteriores.

Los resultados obtenidos constituyen una contribución para alcanzar los objetivos establecidos en el Laboratorio de Microbiología Experimental en donde se pretende:

- Mantener y conservar adecuadamente la subcolección de cepas de interés agrícola
- Establecer el comportamiento de las mismas bajo diferentes condiciones mediante pruebas especiales
- Integrar información sobre características generales y especiales a fin de usarlas en los estudios realizados en



la propia Facultad o de distribuir las a otras instituciones para apoyar actividades de docencia, investigación o para su uso industrial y agrícola.

En este estudio se verificó mediante los ensayos rutinarios que los métodos utilizados en la conservación y manejo de las cepas es el adecuado, detectándose, variación en una sola de las cepas.

Se incorporó información acerca de la tolerancia a la salinidad de 5 cepas.

## VIII BIBLIOGRAFIA

- 1.- A. R. J. Eaglesham and A. Ayanaba  
Tropical Stress Ecology of Rhizobia, Root Nodulation and Legume Fixation.  
In: Current Developments in Biological Nitrogen Fixation.  
N. S. Subba Rao. Edward Arnold. 1984.
- 2.- Amaya, L. G.  
Estudio comparativo a nivel de laboratorio de 16 cepas de Rhizobium japonicum.  
Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM 1985.
- 3.- Barrios L. M. y Tsuzuki R. M. G.  
Selección de cepas efectivas de Rhizobium japonicum para frijol soya variedad Júpiter  
Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM 1980.
- 4.- Bergensen, F. J. (1961).  
The growth of Rhizobium in synthetic media.  
Aust. J. Biol. Sci. 14 : 349.
- 5.- Berger C Mayne  
Photosynthesis and the Biochemistry of Nitrogen Fixation.  
In: Alexander. M. Plenum Press New York and London.  
pag : 225-242.
- 6.- Campbell, D., and J. Garvey, N. Cremer and D. Sussdorf.  
(1970).  
Methods in Immunology, 2nd Edition W. A. Benjamin Inc.  
USA p : 435
- 7.- Castillo y C. P. y Ronzon R. M. P.  
Determinación de la capacidad competitiva de tres cepas de Bradyrhizobium japonicum mediante técnicas serológicas.  
Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM 1987.
- 8.- Clark, A.G. (1969).  
The utility of manganese in lactose medium to differentiate rhizobia from agrobacteria. Appl. Bact. 32 : 48.
- 9.- Date, R. A. and J. Halliday. (1979)  
Selecting Rhizobium for acid infertile soils of the tropics.  
Nature : 277
- 10.- Date, R. A. (1976).  
Principles of Rhizobium strain selection  
In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants (Ed : P. S. Nutman) IBP 7 Cambridge UNIV Press

- 11.- Difco, (1953).  
Manual of dehydrated culture media and clinical laboratory procedures 9a. edition  
Ed. Difco Laboratories. Detroit Michigan. U. S. A.
- 12.- D. S. Amara and R. M. Miller  
Effect of moisture and salt stress on selected Rhizobium phaseoli strains  
In: Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 2 Number 3. 1986.
- 13.- D. S. Amara, W. A. Mohjadi and R. M. Miller  
Tolerance of Rhizobium phaseoli to acidity, aluminium and manganese  
In: Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 2 Number 2. 1986
- 14.- Elkan, M. G. (1971)  
Biochemical and genetical aspect of the taxonomy of Rhizobium japonicum.  
Plant and Soil. Vol. especial : 85 - 104.
- 15.- Elkan, H. G. (1984).  
Taxonomy and metabolism of Rhizobium in : Biological Nitrogen Fixation.  
Edited by Alexander. M. Plenun Press New York and London pag: 1 - 37.
- 16.- Franco A. A. and J. M. Vincent  
Competition Amongst Rhizobial strains for the colonization and Nodulation of two tropical legumes.  
In: Plant and Soil 45, 27-48 (1976)
- 17.- Gross D. C. and A. K. Vidaver (1978).  
Bacterocin Like sustances produced by Rhizobium japonicum and other slow - growing rhizobia.  
App. and Enviromental Microbiology 30 : 936 - 943.
- 18.- Hernandez, S. G. y Mesa, F. M. G.  
Inoculación de Rhizobium japonicum en diferentes variedades de soya (nivel invernadero).  
Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM 1987.
- 19.- Jean F. Mac. Faddin (1980).  
Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.  
Editorial Medica Panamericana S. A. pag: 94 - 96 y 121 - 125.

- 20.- Jordan, C. D.  
Family III. Rhizobiaceae Conn 1938, 32  
In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology  
Edition Krieg, N. R. E. Holt, J. G., Baltimore  
1 : 234 - 244, 1984.
- 21.- Keele Bernard B., J. R. Pat B. Hamilton, and Gerald H. Elkan  
Glucose Catabolism in Rhizobium japonicum  
In: Journal of Bacteriology, Mar. Vol. 97 Number 3  
(1969)
- 22.- KuyKendall L. D. and G. H. Elkan  
Rhizobium japonicum. Derivatives Differing in Nitrogen  
Fixing Efficiency and Carbohydrate Utilization  
In: Applied and Environmental Microbiology (1976)
- 23.- Little, T. M. y Jakson, F. H.  
Métodos estadísticos para la investigación en agricultura  
(1979)
- 24.- Maier, R. Ricampbell, E. R. Hanus, J. F. Simpson, B. F. Russell, S. A. and Evans H. J.  
Expresion of hydrogenase activity in free living  
Rhizobium japonicum.  
Pocc. Nat. Ac. Sci USA 75 : 325B - 3263, (1978)
- 25.- M. Alexander  
Introducción a la Microbiología del suelo. Ed. AGT S. A.  
México (1980)
- 26.- M. Kassem, A. Capellano and A. M. Gounot  
Effects du NaCl sur Rhizobium meliloti  
In: Mircen Journal of Applied Microbiology and  
Biotechnology Vol. 1 Number 1 (1985)
- 27.- Maier, R. J. Frank, J. and Harol J.  
Regulation of hydrogenase in Rhizobium japonicum.  
Journal of Bacteriology 137 : 824 (1979)
- 28.- Norris, D. O.  
Acid production by Rhizobium a unifying concept. Plant  
and Soil 22 : (2) 143 - 167, (1965)
- 29.- Paredes M. R. E. y Flores B. .M.  
Respuesta de cuatro variedades de Glicine max (L. MERR.)  
a la inoculación con Bradyrhizobium japonicum bajo  
condiciones controladas  
Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM 1988.

- 30.- Pedrosa O. Fabio and Glaci T. Zancan  
L-Arabinose Metabolism in Rhizobium japonicum  
In: Journal of bacteriology, Vol. 119 Number 1 (1974)
- 31.- Rewar R. B., M. K. Jain and R. S. Bhatnagar  
Varietal response of soybean (Glycine max (L.) Merr.) to  
different strains of Rhizobium japonicum  
In: Indian F. agric. Sci. 43(8) : 801 - 804 1973
- 32.- Scwingchamer, E. A.  
Studies on induced variation in the rhizobia.  
I. defined media and nodulation test techniques, Appl.  
Microbiol. 8 : 349., (1960)
- 33.- Singleton P. W.  
A split Root Growth System for Evaluating the Effect of  
Salinity on Components of the Soybean Rhizobium  
japonicum Symbiosis  
In: Crop Science Vol. 23 1983
- 34.- Somasegaran, P., Hoben, H. y Hallyday, J.  
Ejercicios prácticos en tecnología de Rhizobium en  
leguminosas (Curso Internacional de Tecnología de  
Rhizobium) CEDAF Colegio de Postgraduados Chapingo  
México (1981)
- 35.- Vincent, J. M.  
A manual for the practical of the root nodule bacteria  
IBP Handbook 15 Blackwell Scientific Publications, 1970.
- 36.- Vincent, J. M.  
Root nodule symbiosis with Rhizobium  
In : A Quispel (Ed) the biology of nitrogen fixation,  
North Holland. Publishing Co. Holanda p. 265 (1974).
- 37.- Vincent, J. M.  
Rhizobium. General Microbiology  
In : A Treatise on dinitrogen fixation section III :  
Biology R. W. Harday and C. S. Silver (Ed).  
John Wiley and USA p : 277 (1977).
- 38.- Vincent, J. M., P. S. Nutman and F. A. Skinner  
The identification and classification of Rhizobium.  
In : Identification Methods for Microbiologists 2nd  
Edition  
Edited by F. A. Skinner and D. W. Levelock.  
Academic Press pag : 49 - 59 (1979).

**IX APENDICE**

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**GLUCOSA-PEPTONA-AGAR**

Glucosa	10.0 g
Peptona	20.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g
Púrpura de bromocresol (solución alcoh. 1%)	10.0 ml / 1
Agua destilada	1000.0 ml
pH	7.0

Vincent J. M. 1975

**LECHE TORNASOLADA**

Se hidrata con agua destilada estéril  
105 g / 1000 ml de agua  
pH = 7.0

**CITRATO DE KOSEK**

Fosfato monopotásico	1.0 g
Fosfato de sodio y amonio	1.5 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Citrato de sodio	3.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Vincent J. M. 1975

**AGAR SULFITO DE BISMUTO**

Se hidrata con agua destilada estéril  
52 g / 1000 ml de agua  
Después de hidratar este medio no se esteriliza. Se  
debe de preparar el mismo día de la siembra, dejar  
reposer durante dos horas después de la preparación



**MEDIO MODIFICADO DE BERGENSEN**

Lactosa	5.0 g
KNO <sub>3</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.18 g
FeEDTA (0.25%)	10.0 ml
MnSO <sub>4</sub> (33.5%)	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	0.4 g
Rojo congo (Sol. ac. 1:400)	10.0 ml
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH	6.8

0.2 g

NaCl	0.1 g
Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	0.4 g
Rojo congo (Sol. ac. 1:400)	10.0 ml
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH	6.8

Vincent J. M. 1975

**ELMAAB. Extracto de Levadura Manitol Agar Azul de Bromotimol**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	0.4 g
Azul de bromotimol (Sol. alcoh. 0.5%)	5.0 ml
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH	6.8

Vincent J. M. 1975

## CELX. CALDO EXTRACTO DE LEVADURA XILOSA

Xilosa	10.0	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2	g
NaCl	0.1	g
Extracto de levadura	0.4	g
Rojo de fenol (conc. 0.018 g / l)	0.018	g
Agua destilada	1000.0	ml
pH	6.8	

## MEDIO SINTETICO PARA REDUCCION DE TETRAZOLIUM

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15	g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.15	g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25	g
NaFeEDTA	0.028	g
MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.010	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.010	g
Glutamato de Sodio	0.5	g
Inositol	1.0	g
Extracto de levadura	0.1	g
Arabinosa	5.0	g
Sacarosa	5.0	g
Gluconato de sodio	0.5	g
Trifeniltetrazolium	0.1	g / l
Agar	20.0	g
Agua destilada	1000.0	ml
pH	7.0	

**SOLUCIONES PARA LA COLORACION DE GRAM**

**SOLUCION A (CRISTAL VIOLETA)**

Cristal violeta	10.0 g
Oxalato de amonio	4.0 g
Alcohol absoluto	100.0 ml
Agua destilada	400.0 ml

**SOLUCION B (LUGOL)**

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Alcohol absoluto	25.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

**SOLUCION C (ALCOHOL YODADO)**

Solución de yodo (B)	5.0 ml
Alcohol absoluto	95.0 ml

**SOLUCION D (SAFRANINA)**

Safranina	2.5 g
Etenol	10.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

**SOLUCION NUTRITIVA DE JENSEN**

CaHPO <sub>4</sub>	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl <sub>3</sub>	0.1 g
Agua destilada	1000.0 ml
Micronutrientes	1.0 ml / l
pH	6.0 - 7.0

**Micronutrientes**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05 %
MnSO <sub>4</sub>	0.05 %
ZnSO <sub>4</sub>	0.005 %
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.005 %
CuSO <sub>4</sub>	0.002 %

**CELM. CALDO EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL**

Medio utilizado para la prueba de tolerancia a la salinidad

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	
Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	0.4 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH	7.0

Se añade la cantidad de NaCl deseada para obtener las diferentes concentraciones usadas (0.01%, 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0% de NaCl)