

67  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA PRODUCCION  
INDUSTRIAL DE INOCULANTE DE  
Azospirillum”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JUSTO HERNANDEZ DEL REAL

México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



## **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	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Taxonomía	4
2.2. Características morfológicas y culturales	5
2.3. Distribución ecológica	8
2.4. Importancia agrícola	9
2.5. Importancia económica y ecológica de los biofertilizantes	10
2.6. Producción de inoculantes de <u>Azospirillum</u>	15
2.7. Aspecto fisiológico y bioquímico de <u>Azospirillum</u>	18
2.7.1. Fuentes de Carbono y su metabolismo	18
2.7.2. Fuentes de Nitrógeno y su metabolismo	23
2.7.3. Fijación biológica del Nitrógeno	27
2.7.4. Metabolismo del Hidrógeno	30
2.7.5. Metabolismo del Oxígeno	31
2.7.6. Efecto de Temperatura y pH	32
2.7.7. Carotenos	33
III. PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1. Activación de cepas y comprobación de pureza	37
3.2. Selección de medio de cultivo	37
3.3. Producción del Inoculante	45
3.4. Control de Calidad	48

IV. RESULTADOS Y DISCUSION	50
4.1. Optimización del medio de cultivo	50
4.2. Análisis económico de medios de cultivo	60
4.3. Efecto de los medios de cultivo seleccionados	60
V. CONCLUSIONES	64
5.1. Conclusiones	64
5.2. Recomendaciones	65
VI. BIBLIOGRAFIA	66
VII. APENDICE	75

# I. Introducción

## I. INTRODUCCION

Azospirillum es una bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico y productora de fitohormonas. Tiene amplia distribución y se ha reportado en la rizosfera y/o asociada con un gran número de vegetales entre los que son de particular importancia las gramíneas.

Desde el punto de vista agronómico ha llamado la atención por el efecto que puede tener sobre la producción agrícola. A la fecha existen controversias sobre la utilidad de la misma, sin haberse definido, si la inoculación con este microorganismo aumenta la producción agrícola a través de la fijación de nitrógeno, a la producción de fitohormonas o por un posible efecto combinado de ambos. Tampoco existe información que permita concluir cuales son los factores que limitan el efecto benéfico de esta bacteria, lo que indica la necesidad de seguir estudiando a este microorganismo.

Por otra parte, se tiene que, para introducir a Azospirillum a nivel agrícola es necesario producir el inoculante. Este proceso a la fecha esta basado en la tecnología aplicada para Rhizobium.

Sin embargo al igual que otros microorganismos el desarrollo y viabilidad de Azospirillum esta condicionado por las propiedades fisicoquímicas del suelo, del soporte sobre del que se encuentra o del medio de cultivo en el que se desarrolla, así como de las condiciones ambientales imperantes en los mismos, por lo que es necesario considerar lo anterior para elaborar inoculantes a base de este microorganismo.

La utilidad de los inoculantes (Azospirillum o Rhizobium) y su vida de anaquel dependen básicamente de la calidad de la cepa y viabilidad del microorganismo en un soporte dado. Estos a su vez están condicionados por el medio de cultivo y condiciones de operación empleadas en la fermentación y conservación del producto. Con base en lo anterior en este trabajo se realizaron una serie de ensayos preliminares a fin de producir un inoculante de bajo costo empleando a Azospirillum como microorganismo de importancia agronómica. Estos incluyen el estudio del desarrollo de Azospirillum en diferentes concentraciones y fuentes de carbono y nitrógeno, así, como la producción del inoculante en los medios seleccionados a nivel de matraz y el control de calidad de los inoculantes preparados.

### Hipótesis

- El desarrollo de Azospirillum varía en función de las concentraciones de las fuentes de carbono.

- El desarrollo de Azospirillum varía en función de la fuente de nitrógeno.

- El desarrollo de Azospirillum es afectado por las diferentes fuentes de nitrógeno.

## II. Antecedentes

## II. ANTECEDENTES

Uno de los microorganismos que benefician el desarrollo de los cultivos agrícolas (gramíneas) es Azospirillum. Este ha sido estudiado con diversos enfoques y a continuación se resume la información más reciente.

### 2.1. Taxonomía

Beijerinck en 1925 basado en la forma espiral de la bacteria y en estudios sobre la utilización de diferentes ácidos orgánicos le asignó el género Spirillum. En 1978 Tarrand y Dohereiner con base en la comparación de sus características fenotípicas y genotípicas respecto a otros géneros bacterianos (Pseudomonas, Azuaspirillum, Azomonas, Derrxia, etc) determinaron un nuevo género, Azospirillum (33,53). Posteriormente mediante estudios de homología de DNA, en los que se emplean técnicas de desnaturalización térmica, usando DNA de Escherichia coli E de referencia se diferenciaron tres especies de este género (33,53). Falk (1985) y Magalhaes (1983), citados en (14):

- a) Grupo I: representado por Azospirillum brasilense (cepa Sp7)
- b) Grupo II: representado por Azospirillum lipoferum (cepa Sp59b)
- c) representado por Azospirillum amazonense (cepa Am14)

A. brasilense contiene dos subgrupos, que no se pueden diferenciar por estudios de homología de DNA (13) y que sin embargo se han diferenciado con base en la capacidad para desnitrificar nitritos (13,53), así tenemos:

- a) A. brasiliense nir+ : desnitrifica  
b) A. brasiliense nir- : no, desnitrifica

Estos grupos tienen las enzimas:

- nitrito reductasa asimilatoria
- nitrato reductasa asimilatoria
- nitrato reductasa desasimilatoria

Pero lo que las diferencia es la presencia u ausencia de la nitrito reductasa desasimilatoria. Ambos subgrupos usan la enzima nitrato reductasa desasimilatoria para reducir nitrato y producir ATP para el proceso de fijación de nitrógeno (6,13).

## 2.2. Características Morfológicas y Culturales

Se trata de una bacteria Gram (-), ligeramente curva, corta, móvil, gruesa, presenta gránulos de polibetahidroxibutirato (PHB), de una micra de diámetro por 2.1-3.8 de largo (31,32).

Estas bacterias presentan un flagelo polar cuando se cultiva en caldo modificado, sales, succinato, peptona, (MPSS), que contiene  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ ,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  y peptona; cuando se cultiva en agar MPSS a 30 C presentan además flagelos laterales (31,32). El % de guanina + citocina (G+C) es de 67-71%. Bajo condiciones alcalinas o tensiones limitadas de oxígeno y en cultivo viejos, presenta formas largas, ovoides, encapsuladas o pleomórficas. En cultivos pobres de nitrógeno con extracto de levadura adquiere la forma de espirilos de tipo largo. En ciertas condiciones, en medio líquido se forman estructuras de microquistes (Becking, 1982), citado por (26).

En medios con nitrógeno o en agar nutritivo se forman colonias elevadas, con bordes lobulados, brillantes, las colonias viejas presentan pigmento rosa en la mayoría de los medios (1,5,26,53).

En agar modificado sales biotina (BMS) que contiene Acido málico, papa, azúcar de caña, biotina, piridoxina, solución alcohólica de azul de bromotimol y agar, da lugar a la formación de colonias rosas, opacas, irregulares, rugosas, redondas, típicamente elevadas, presentan mayor pigmento cuando se incuban en condiciones de luminosidad. En agar sólido libre de nitrógeno, se forma pequeñas colonias, duras, opacas, secas, de bordes completos (1,5,26,53).

Las células que se cultivan en medios con azúcar forman bastones curvos con gotas lipóides (31).

Los cultivos viejos en agar dan origen a células en forma de S y después de 3-4 semanas, se transforman en quistes de forma casi esférica los que son más resistentes a la desecación que las células vegetativas debido a su forma redonda e inmovilidad (5,53). A. lipoferum requiere biotina para su desarrollo (39).

Actualmente existen cinco especies: A. amazonense, A. brasilense, A. halopraeferens, A. lipoferum y A. irakense, según oddey, Dobereiner, (1984), y Okon (1985), citados en (58) y por Khamas et al (30).

Las diferencias entre A. amazonense, A. brasilense y A. lipoferum se muestran en la tabla 1.

	<u>A. amazonense</u>	<u>A. brasilense</u>	<u>A. lipoferum</u>
Crecimiento en medio con pH mayor de 6.8	Muy pobre	Bueno	Bueno
Tipo de colonia en agar papa	Blancas, plana borde elevado	Rosas Elevadas	Rosas Elevadas
Tolerancia a O <sub>2</sub> para la actividad nitrogenasa	Muy baja	Baja	Baja
Desasimilación de:			
NO <sub>3</sub> --> NO <sub>2</sub>	-, +	+	+
NO <sub>2</sub> --> N <sub>2</sub> O	-	-, +	-, +
Ancho de las células	0.68 +/- 0.8	1.0 a 1.5	0.09 +/- 0.03
Flagelo polar	+	+	+
Flagelo lateral en agar nutritivo	-	+	+
Células polimórficas en medio alcalino	-	-	+
Requerimiento de biotina	-	-	+
Uso de sacarosa	+	-	-
Composición de bases de DNA (% G + C)	67-68	69-70	69-70
Tiempo de generación en medio sin nitrógeno a PO <sub>2</sub> óptimo.	10 h.	5 h.	5-6 h.

TABLA 1  
 DIFERENCIAS ENTRE LAS ESPECIES DE AZOSPIRILLUM.  
 Según Okon. (1982), citado por (21)

En tanto que la caracterización de A. halopraeferens (50A) y A. irakense (30) aún se encuentra en estudio, estos han sido descritos como fijadores de nitrógeno y pertenecientes al género Azospirillum. Ambas fueron reportadas en suelos con alto contenido de sales.

La primera fue aislada del pasto Leptochloa fusca (L) desarrollado en la región del Punjab de Pakistan. A. irakense fue aislada de la rizosfera de arroz y se encontró también asociada con las raíces de este mismo cultivo desarrollado en la región de Diwanayah (qadisyah), Irak (30).

### 2.3. Distribución ecológica

Azospirillum se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en forma libre en el suelo y asociado a raíces de una gran variedad de plantas, cereales y pastos mediante la simbiosis asociativa, principalmente en zonas templadas y tropicales (6,44,52).

Según Dobereiner el 60% se localiza en suelos de regiones tropicales y el 10% en regiones templadas como lo es el extremo sur de Brasil, EEUU, Pakistán y Kenia, citado en (20) y por (15,39,43,52,59).

En los suelos europeos hay menor incidencia del microorganismo. De 50 muestras sólo el 4% lo contienen y 1% corresponde a A. brasilense y 3% a A. lipoferum (39,51).

En tanto que en muestras originarias de zonas templadas Vlassak y Reynders (59) reportan que el 50% presenta a Azospirillum y que la distribución varía dependiendo del gradiente de temperatura. Los países de zonas templadas donde

registró la bacteria fueron: Grecia, Bélgica, Canadá, Francia, Suiza, E.U. Nueva Zelanda y en zonas tropicales se encontró en: Egipto, India, Sri Lanka e Indonesia (59).

También ha sido reportada la presencia de Azospirillum en climas fríos y en suelos ácidos, como en Finlandia (24).

La gran distribución de esta bacteria se argumenta por los aislamientos efectuados en muchas zonas del mundo, incluyendo zonas subtropicales como Argentina (3) y México citados en (19,20,36). Lo cual sugiere que Azospirillum es una bacteria cosmopolita.

#### 2.4. Importancia Agrícola

Azospirillum es una bacteria que tiene características que son de importancia agrícola ya que ésta en forma libre o asociada a diferentes vegetales, es capaz de fijar nitrógeno y de producir fitohormonas (27,39,44,57).

Algunos investigadores consideran que el efecto benéfico de este microorganismo sobre la producción agrícola es causada por la producción de fitohormonas más que por la fijación biológica de nitrógeno (43,54). Reportándose la producción de cantidades importantes de citocinina, ácido indolacético y giberelinas, citado en (28) y (14,54).

Se cree que el mayor efecto de las sustancias reguladoras del crecimiento es el estimular el desarrollo de la raíz, lo cual permite una mayor captación de nutrimentos presentes en el suelo y de esta manera se da una o todas las respuestas de la planta a la inoculación (27,57).

Azospirillum en la naturaleza participa en la mayoría de los procesos involucrados en el ciclo del nitrógeno (38).

esto porque: todas las cepas son capaces de reducir el dinitrógeno a amoníaco, reducir el nitrato en forma asimilatoria y algunas cepas lo reducen en forma desasimilatoria cuando la concentración de oxígeno es limitada (16,17,38).

Lo anterior significa que Azospirillum puede fijar nitrógeno y desnitrificarlo lo que es muy importante en los procesos de transformación del nitrógeno en el suelo citado en (28) y (6,49).

#### 2.5. Importancia económica y ecológica de los biofertilizantes.

Desde el punto de vista ecológico Azospirillum es importante porque su biomasa representa en la rizosfera el 1-10% (42) y por su capacidad de fijar nitrógeno y de desnitrificar (7,45), procesos condicionados por la tensión parcial de oxígeno.

Se considera que cerca del 50% de las cepas de Azospirillum son desnitrificantes(39), y en México en ciertas zonas del Bajío se ha informado de la existencia de cepas desnitrificantes, Peña (1986) citado por (21).

La agricultura es de interés en la alimentación humana, de aquí la importancia del nitrógeno en la producción agrícola. El papel que juegan los fertilizantes minerales como fuente de nitrógeno ha creado ciertas inconveniencias tales como su costo elevado, el mal empleo que se hace de ellos, lo que produce excesos de nitratos y nitritos que son contaminantes del agua de lixiviación, (2,43).

Se sabe también que la producción mundial de fertilizantes no cubre la demanda, por lo que se hace necesario aplicar técnicas auxiliares que coadyuven a la solución de éste

problema. Una de éstas es el uso de procesos microbianos, como lo es el de la fijación biológica del nitrógeno.(55).

Se ha comprobado que este proceso aporta por sí mismo la mayor cantidad de nitrógeno que las plantas requieren para su desarrollo, lo que favorece la fertilidad del suelo puesto que parte del nitrógeno fijado permanece en él disponible para cultivos posteriores (55).

En México se reportan pérdidas en la industria de los fertilizantes, Del Muro (1987) citado en (21) lo que determinó la necesidad de importar el 10% de la demanda nacional (1983), limitando el desarrollo del agro en los últimos años.

Considerando la información anterior se ha propuesto como una de las alternativas para resolver los problemas generados por la producción y consumo de fertilizantes químicos el uso de Biofertilizantes, en los que se emplean cultivos de microorganismos que habitan la rizosfera del suelo, tal es el caso de Azospirillum que establece simbiosis asociativa con especies de gramíneas (50).

En la tabla 2 se presentan algunos resultados del efecto de la inoculación de Azospirillum en diversos cultivos. Observándose que la respuesta de los vegetales a la inoculación con Azospirillum, es muy variable.

Estos tipos de variaciones han sido reportadas por otros autores Albrecht y colaboradores (1981) y O'Hara y colaboradores (1981) reportan respuesta a la inoculación, Okon (1982 y 1983), Avivi y Feldman, Schanck y colaboradores (1981) indican incremento en el peso seco total de follaje y raíz, así como de nitrógeno total en trigo, maíz y otros vegetales, lo cual

Cultivo	Tratamiento con	Aumento Respecto al control	Referencia
Zea mays	<u>A. lipoferum</u>	28% de producc. en grano.	Dobereiner y De-Polli, 1980 (17)
Zea mays	<u>A. lipoferum</u>	34% de producc. en grano	Dobereiner y De-Polli, 1980 (17)
Zea mays	<u>A. brasilense</u>	37% en cont. de Nitrógeno.	Nur, Okon y Henis, 1980 (41)
Setaria italica	<u>A. brasilense</u>	122% en peso seco. (g/planta).	Nur, Okon y Henis, 1980 (41)
Sorghum bicolor	<u>A. brasilense</u>	30% peso seco raíz(g/planta).	Kapulnik, Okon, Nur, 1981 (29)
Triticum aestivum	<u>A. brasilense</u>	142% peso seco raíz(g/planta).	Kapulnik, Okon, Nur, 1981 (29)
Panicum miliaceum	<u>A. brasilense</u>	61% peso seco raíz(g/planta).	Kapulnik, Okon, Nur, 1981 (29)
Zea mays	<u>A. lipoferum</u>	32% en cont. de nitrógeno.	Bodey, Dobereiner, 1984 (7A)
Zea mays	<u>A. lipoferum</u> Materia Orgánica, Fertilizante nitrogenado.	42% en cont. de nitrógeno.	Bodey, Dobereiner, 1984 (7A)
Pisum sativum	<u>A. brasilense</u>	4% peso seco raíz(g/planta).	Sarig, Kapulnik-Okon, 1986 (50B)

Tabla 2. Efecto de inoculación de Azospirillum en diversos cultivos.

no siempre ocurre. Finalmente Smith y colaboradores (1978) y Barber y colaboradores (1979) indican que no obtuvieron respuesta a la inoculación, citado en (58). La falta de respuesta se atribuye a la competencia de las bacterias nativas que impiden el establecimiento de las bacterias inoculadas y/o a las condiciones ambientales del suelo en el campo las que en ocasiones limitan el desarrollo de las bacterias (58).

Sin embargo Kapulnik y Okon (29) consideran que la inoculación con Azospirillum en maíz y sorgo pueden reemplazar parcialmente la fertilización nitrogenada. El incremento en la producción lo atribuyen a que Azospirillum suministra compuestos hormonales además de nitrógeno, ya que los inoculantes con esta bacteria inducen cambios en las relaciones entre el tallo y la raíz. Glatzle y Martin (1981), y Murayama y Germida (1988), citados en (58), trabajando con maíz establecieron que la producción de ácido indolacético por Pseudomonas spp y Klebsiella, incrementan el crecimiento radical aumentando de este modo la superficie de contacto raíz-suelo y la absorción de nutrimentos.

Casas Campillo (1989), citado en (58) afirma que estas bacterias así como Azospirillum producen sideróforos, que son sustancias que quelatan el hierro favoreciendo el crecimiento de las plantas.

Azospirillum tiene la capacidad para transformar el triptofano en ácido indolacético, Reynders y Vlassak (1979) citado por (58) y de producir giberelinas y citocininas (54) que son fitohormonas que promueven el crecimiento de las plantas (58).

La planta juega un papel importante, ya que además de las particularidades del microorganismo, le proporciona un ambiente adecuado al microorganismo diazotrófico(44) y suministra energía en el lugar donde se está efectuado la fijación de nitrógeno por la bacteria; en el primer caso la planta debe proporcionar un ambiente con baja tensión de oxígeno, un pH casi neutro y una temperatura relativamente alta.

Vlassak y Reynders (1981), citado en (58), indican que para obtener una asociación Azospirillum-raíz provechosa es necesario seleccionar cepas de Azospirillum con:

- \* Alto poder de infección
- \* Alto poder competitivo
- \* Alta y eficiente actividad de la nitrogenasa
- \* Baja actividad en la desnitrificación
- \* Producción elevada de fitohormonas

Así mismo considerando otros factores como:

- \* Selección adecuada de plantas y cultivos.
- \* Suministro de condiciones ambientales en la rizosfera como son: baja tensión de oxígeno, pH neutro y la presencia de organismos cooperativos en la zona de la raíz.

Proveer condiciones óptimas para el desarrollo del vegetal y de la asociación:

- \* Aplicación de dosis adecuadas de nitrógeno mineral
- \* Alto contenido de materia orgánica y contenido relativamente bajo de potasio en el suelo.

Por otra parte indican que los suelos neutros, húmedos y la temperatura y radiación solar elevadas favorecen esta interacción.

## 2.6. Producción de inoculantes conteniendo Azospirillum

Los estudios de Beijerinck (1898), indican la necesidad de suministrar en forma artificial bacterias a los suelos, a fin de estimular el desarrollo de las plantas. Con lo que se favoreció el florecimiento de la industria de los inoculantes (26).

El éxito de la utilización de biofertilizantes se basa en los resultados de investigaciones con diferentes enfoques referentes a:

- Selección de cepas.
- Determinación del o los mecanismos de acción.
- Determinación de los factores que limitan o estimulan el establecimiento de los microorganismos introducidos al suelo, así como el mecanismo mediante el cual se favorece el desarrollo vegetal.
- Evaluación del efecto de inoculación.
- Producción de inoculante, la cual implica la obtención de un producto de buena calidad y a bajo costo, el desarrollo de formulaciones que mantengan poblaciones elevadas de microorganismos viables y que sean de fácil aplicación a nivel agrícola (50).

La producción de inoculantes de Azospirillum está basada en la tecnología empleada para Rhizobium, Okon y Hadar (1987), citado por (50).

Los inoculantes son cultivos de células bacterianas seleccionadas y concentradas, que son impregnadas a un soporte estéril. El soporte es un tipo de suelo que dadas sus características físico-químicas permite mantener al

microorganismo viable el tiempo que se necesita para llevar a cabo la inoculación en semillas sin que éste pierda la habilidad para crecer e infectar.

El soporte más adecuado es la turba, que se forma en climas húmedos, de temperaturas bajas, y es el resultado de la acumulación y descomposición de depósitos vegetales que se conservan en condiciones de poca aireación en remansos de lagos, estanques y pantanos. Esta debe presentar características como: Alto contenido de materia orgánica, alta retención de humedad, pH cercano a la neutralidad, de fácil pulverización, adecuada adhesión a la semilla, de bajo costo, y fácil esterilización (9,25,48).

Otros materiales que pueden servir como soporte son: Aserrín descompuesto, roca fosfórica molida, levadura y sacarosa, carbón vegetal, compostas de cáscara de arroz, de mazorca de maíz, bagazo de caña de azúcar.

Los soportes tienen diferente capacidad para mantener la humedad, esto determina la proporción de cultivo líquido que debe agregarse al hacer la inoculación y ésta debe ser del 50-60% (9,25,48).

La producción de inoculantes se divide en cinco etapas:

- 1.- Recolección y preparación del soporte
- 2.- Propagación del inóculo en el cultivo líquido
- 3.- Mezcla del soporte con el cultivo líquido
- 4.- Empacado adecuado
- 5.- Control de calidad de los inoculantes (en las

diversas etapas de su elaboración).

El método para inocular a Azospirillum se basa en lo reportado para Rhizobium, Okon y Hadar (1987), citado en (50).

Estos mismos autores indican dos formas de efectuar la inoculación: por suspensión y dispersión granular al momento de la siembra.

Aun cuando la respuesta a la inoculación con Azospirillum es muy variable los incrementos que se reportaron (tabla 2) indican que este microorganismo ofrece una alternativa para mejorar la producción agrícola. A la fecha este tipo de inoculante se produce con fines de investigación para lo cual, el microorganismo se propaga en un medio con ácido succínico y se impregna en turba. Lo anterior indica que es necesario generar la tecnología específica para la producción de biofertilizantes a base de Azospirillum. Para lo cual si bien son útiles los antecedentes de Rhizobium, debe enriquecerse con estudios sobre las características nutricionales y condiciones óptimas de desarrollo de este microorganismo en particular, así como en la utilización de sustratos disponibles y de bajo costo que permitan obtener productos de calidad y de un precio accesible a los consumidores.

Con base en lo anterior a continuación se describen los aspectos básicos sobre el metabolismo de Azospirillum y de los factores físicos que favorecen el desarrollo de este microorganismo.

## 2.7. Aspecto fisiológico y bioquímico de Azospirillum

### 2.7.1. Fuentes de carbono y su metabolismo

Son usados propiamente ácidos orgánicos e hidratos de carbono.

Tanto A. brasilense como A. lipoferum crecen y fijan nitrógeno en diferentes ácidos orgánicos e hidratos de carbono (35). Al parecer A. brasilense está más restringido en el uso de fuentes de carbono, ya que si bien se desarrolla en la mayoría de los ácidos orgánicos tales como el láctico, piráxico, succínico y málico no lo hace en alfa-cetoglutarato, y no fija nitrógeno en presencia de la mayor parte de hidratos de carbono tales como Eritrosa, D-ribosa, D-glucosa, D-manosa, D-sorbosa, sacarosa, manitol y glicerol, pero si en L-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa y gluconato. Mientras que A. lipoferum desarrolla en gran número de hidratos de carbono, los mismos que para A. brasilense y otros como glucosa, así como en los ácidos orgánicos ya mencionados (1,31,34,53).

A. brasilense y A. lipoferum al parecer crecen bien en metano y metanol como únicas fuentes de carbono (31).

Otros hidratos de carbono que apoyan el crecimiento de A. lipoferum son: maltosa, rhamnosa, meso-inositol, sorbitol y glicerol. El metanol apoya pobremente su desarrollo (1,23,52)

A. amazonense ha sido reportado como capaz de metabolizar: malato, sacarosa y trans-aconitato citado en (26).

También se reportan como fuentes de carbono para Azospirillum, aminoácidos (medio semisólido) tales como la L-alanina y glutamato que fueron empleados por esta bacteria y L-tirosina y L-triptofano que no fueron metabolizados (47).

A. brasilense es capaz de metabolizar mono y disacáridos componentes de la pared celular de las plantas, pero incapaz de utilizar polisacáridos que componen dicha pared (37).

Azospirillum fija nitrógeno molecular empleando como única fuente de carbono CO<sub>2</sub>. Estos estudios fueron realizados con Azospirillum aislado de la rizosfera de arroz y de Panicum maximum, Muñoz García, Caballero-Mellado (1982), citado en (26).

La actividad más alta en la reducción de acetileno se obtienen con malato, gluconato y fructosa en A. brasilense (42) y en A. lipoferum con malato, arabinosa, glucosa, xilosa (26).

A. brasilense y A. lipoferum muestran elevada actividad de 1-fosfofructocinasa, cuando desarrollan en fructosa, no así cuando los cultivos desarrollan en malato con NH<sub>4</sub> o N<sub>2</sub>. La actividad de la 6-fosfofructocinasa es muy baja en ambas cepas (35).

Cuando A. lipoferum se desarrolla en fructosa o glucosa, se presenta actividad de la hexocinasa, mientras que A. brasilense desarrollada en fructosa o malato no la presenta (35).

La glucocinasa y enzimas relacionadas con la ruta Embden Meyerhof-Parnas (EMP) han sido detectadas en A. brasilense y A. lipoferum.

Las enzimas relacionadas con la ruta de Entner-Duodoroff (ED) estuvieron presentes en A. lipoferum.

La presencia de las enzimas involucradas en catabolizar malato, succinato y piruvato han sido demostradas

(35) en A. brasiliense y A. lipoferum desarrolladas en fructosa o malato, con lo que se comprueba la existencia de los ácidos tricarbónicos (TCA) (31), además de que estas cepas muestran actividades enzimáticas propias del ciclo del glioxilato (35,61).

Ninguna de las dos especies mencionadas es capaz de desarrollar y fijar nitrógeno en sacarosa, no así una especie recientemente descrita, A. amazonense, que redujo el acetileno cuando se desarrolló en sacarosa (35).

Das y Mishra (12) demostraron que A. brasiliense usa muy efectivamente la fructosa para su desarrollo y reducción del acetileno, también reportaron un alto incremento en la producción celular con fructosa cuando se le añadió ión amonio (35,61).

Cuando se usa la glucosa las enzimas relacionadas con las rutas EMP y ED están presentes, por lo que la glucosa y la fructosa probablemente sean catabolizadas por A. lipoferum por las rutas EMP y ED.

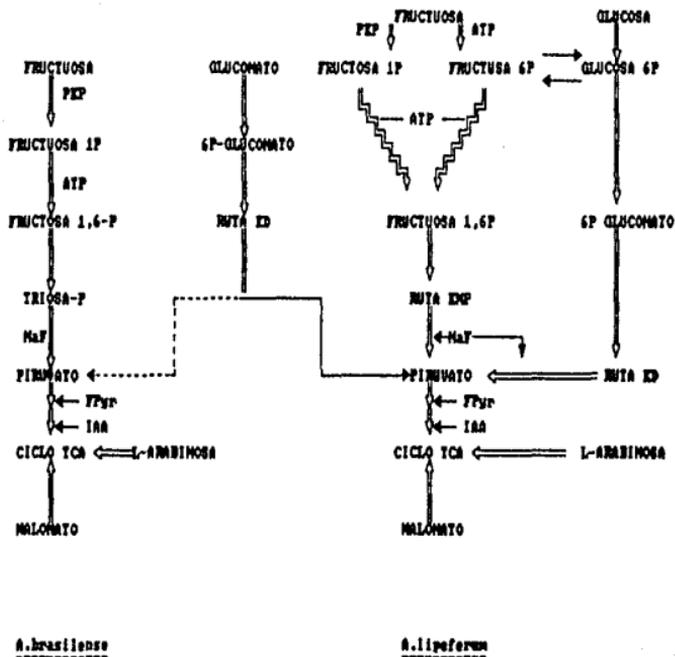
La ausencia de fosfogluconato deshidrogenasa en ambas especies de Azospirillum sugiere que ninguna ruta oxidativa de la hexosa-monofosfato es efectuada por estas cepas (35).

El efecto de algunos inhibidores relacionados con las rutas EMP, ED y el ciclo de los TCA han sido reportados (35). Así, el fluoruro de sodio inhibió el desarrollo y bloqueó la formación de  $C_2H_4$  en A. lipoferum y A. brasiliense en medio de fructosa sin  $NH_4$ , no ocurriendo esto cuando cuando desarrollaron en malato o succinato.

El iodo acetato (IAA) de sodio, el fluoropiruvato de sodio (FPyr) y el malato de sodio inhibieron el crecimiento de las células desarrolladas en fructosa y malato (35).

La capacidad metabólica del género Azospirillum aún no es bien conocida. actualmente han sido reportadas cinco diferentes especies A. amazonense, A. brasilense, A. halopraeferens, A. irakense y A. lipoferum (12,30,40,58). Los estudios más completos sobre el metabolismo corresponden a A. brasilense y A. lipoferum, mientras que los otros se encuentran en investigación. Figura 1.

FIGURA No.1. RUTAS POSIBLES PARA EL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO POR *ASCOPIHYLLUM*. (35)



IAA: IODOACETATO  
PPyr: FOSFOROPIRUVATO

### 2.7.2. Fuentes de nitrógeno y su metabolismo

Los microorganismos usan una gran variedad de moléculas nitrogenadas como fuente de nitrógeno.

El nitrógeno gaseoso, el amonio, el glutamato, y la glutamina son las mejores fuentes de nitrógeno, sin embargo existen otras fuentes secundarias entre las que se encuentran nitratos, nitritos, purinas, proteínas e incluso aminoácidos (22,47), extracto de levadura y peptona (26).

El amonio, producto de la reducción del nitrógeno por la nitrogenasa, es preferido por todas las bacterias fijadoras de nitrógeno como la fuente de nitrógeno que promueve más rápidamente el crecimiento, que cualquier otro sustrato (6).

Azospirillum puede usar como única fuente de nitrógeno para su desarrollo el N<sub>2</sub> en condiciones microaerofílicas y produce altos niveles de polibetahidroxibutirato, su peso seco aumenta en un 25% más, a consecuencia de este (1).

En cultivo la síntesis de la nitrogenasa y su actividad son reprimidas por la inclusión de cantidades significativas de nitrógeno combinado (NH<sub>4</sub>), lo que puede cambiar la morfología de la bacteria haciéndolas más largas, disminuyendo su diámetro y al parecer formando más espirales que con N<sub>2</sub> (1).

Se ha reportado que A. brasiliense desarrolla en cultivos continuos utilizando nitratos, nitritos, y óxido nítrico como aceptores de electrones en la respiración (10). Bajo condiciones anaeróbicas, Azospirillum utiliza nitrato como aceptor de electrones en la respiración y/o reduce a nitrógeno molecular vía nitrito y óxido nítrico (10).

Azospirillum se distingue por su versatilidad con

respecto al metabolismo del ciclo del nitrógeno. La bacteria puede llevar a cabo todas las reacciones del ciclo del nitrógeno excepto la nitrificación (10), Figura 2.

Dependiendo en particular de las concentraciones de O<sub>2</sub> y de nitratos y de la disponibilidad de carbono orgánico, Azospirillum puede ser involucrado en los siguientes procesos (38):

1.- Fijación de nitrógeno en raíces o suelos para lo que requiere de sustratos de carbono que son suministrados a través de la fotosíntesis de la planta o de la descomposición de materia orgánica.

2.- Reducción desasimilatoria de nitrato a nitrito.

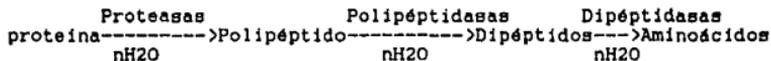
3.- Desnitrificación de nitrato, liberado en el suelo o agregado como fertilizante, con la consecuente liberación de nitrógeno gaseoso.

4.- Asimilación de amonio, nitrito o nitrato.

5.- Síntesis de materiales orgánicos.

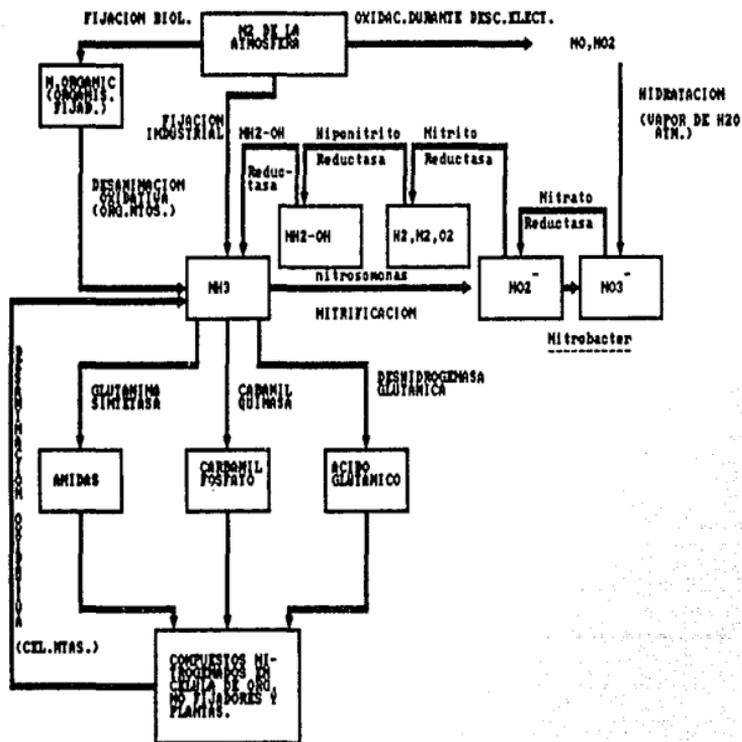
De las transformaciones llevadas a cabo por Azospirillum en el suelo tenemos (22):

La amonificación, que es el proceso mediante el cual las proteínas y otros compuestos orgánicos nitrogenados son degradados por la microflora del suelo, con la liberación final de amonio.



Los aminoácidos (aa) son degradados también, liberando amonio a través de diferentes mecanismos:

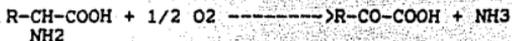
FIG. No.2  
CICLO DEL NITROGENO



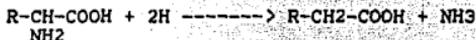
a) Desaminación por remoción directa de amonio



b) Desaminación oxidativa



c) Desaminación reductiva

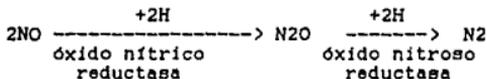
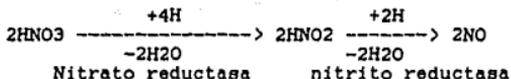


d) Descarboxilación

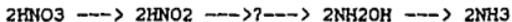


Desnitrificación, reducción microbiana de NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>

con pérdida de nitrógeno del suelo, al ser liberado como nitrógeno molecular y óxido nitroso.



Asimilación, existe en el suelo otra reacción de reducción de nitratos, también mediada por nitrato reductasa que difiere de la desnitrificación en que no se forman NO y N<sub>2</sub> como productos finales, sino NH<sub>3</sub>. Esta reacción corresponde a la asimilación, o sea la utilización de NO<sub>3</sub> como nutriente.



### 2.7.3. Fijación Biológica Del Nitrógeno

El nitrógeno es abundante en la atmósfera terrestre, representa el 80% de los gases que la forman; sin embargo, las plantas y los animales son incapaces de utilizarlo, solamente las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden aprovecharlo reduciendolo a  $\text{NH}_3$ .

A la conversión de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$  se le llama fijación biológica de nitrógeno; entre las bacterias capaces de fijar nitrógeno están las del género Azospirillum. Estas bacterias pueden asociarse con plantas como las gramíneas en la llamada simbiosis asociativa, y efectuar la fijación del nitrógeno atmosférico (22).

La fijación biológica del nitrógeno se efectúa gracias a procesos acoplados al metabolismo del microorganismo donde una enzima la nitrogenasa cataliza tal sistema. La nitrogenasa, requiere para su acción condiciones tales como: escasez de oxígeno, de amonio, y de nitrato que la destruyen, Barbero (1982), citado en (26), para su activación requiere magnesio, de ATP y ADP, Bidwell, (1979) y Postgate, (1981), citado en (49).

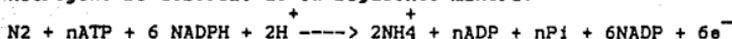
La nitrogenasa es pues la enzima que cataliza la reducción de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$  y está formada por dos componentes incapaces de fijar nitrógeno por separado y por un factor que contiene molibdeno, hierro y azufre.

El componente I o proteína Fe-Mo, pesa 200 000 Daltons y está formada por dos tipos de polipéptidos que se asocian en forma de tetrámero.

El componente II o proteína Fe, pesa 50 000 Daltons, y está formada por dos subunidades idénticas con 1 a 4 átomos de hierro.

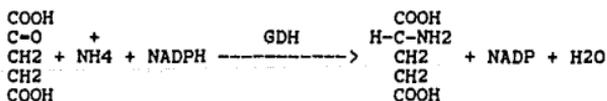
Este componente es reducido por ferredoxinas, flavodoxinas o NADPH; en el estado reducido se le une una molécula de Mg-ATP, esta unión resulta en un cambio conformacional que permite que este componente interaccione con el componente I transfiriéndoles sus electrones, durante este proceso se transforma el ATP en ADP. El componente I reducido, transfiere sus electrones al N<sub>2</sub> convirtiéndolo en NH<sub>3</sub>. La conversión de N<sub>2</sub> en dos moléculas de NH<sub>3</sub> gasta de 12 a 15 ATP (22).

La reacción general de la fijación biológica del nitrógeno se describe de la siguiente manera:



El amonio obtenido de la fijación biológica del nitrógeno es incorporado a los compuestos orgánicos para ser transportados a la planta huésped. Existen dos sistemas enzimáticos para la asimilación del amonio (39):

1.- Sistema mediado por la glutamato deshidrogenasa (GDH).

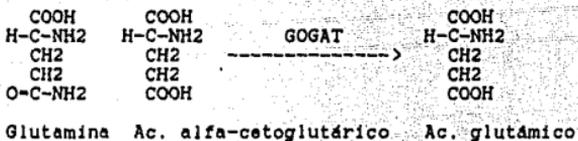
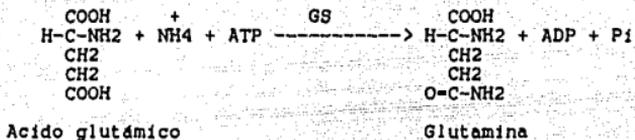


Acido alfa-cetoglutarico

Acido glutámico

2.- Sistema mediado por glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT).

(GOGAT: L-glutamin-2-oxoglutarato aminotransferasa)



#### 2.7.4. Metabolismo del hidrógeno

Por muchos años se ha reconocido una relación entre el metabolismo del hidrógeno y la fijación de nitrógeno. El continuo interés en esta área se centra sobre el papel dual de la hidrogenasa para producir una alta eficiencia de fijación de nitrógeno. Por una parte determina el reciclamiento del poder reductor, e indirectamente provee una baja tensión de oxígeno para ejercer así una función protectora (62).

Se han encontrado dos sistemas diferentes en combinación, uno que produce hidrógeno y otro que lo oxida a través de reacciones que dependen del oxígeno, y que se acopla a la síntesis de ATP:

1.- La producción de hidrógeno, en el que la nitrogenasa cataliza varias reacciones de reducción, que incluye la producción de hidrógeno dependiente de ATP, donde por cada mol de hidrógeno generado, se necesita un par de electrones y cinco moles de ATP (8,18). Hasta el 33% del flujo de electrones a través del sistema nitrogenasa es empleado en la producción de hidrógeno (8,56). La producción de hidrógeno que depende de la nitrogenasa necesita de oxígeno (8).

2.- La oxidación del hidrógeno, se ha establecido que la concentración de hidrógeno presente por la actividad de la nitrogenasa alcanza niveles en que esta se inhibe (8), gracias a la hidrogenasa, se oxida el hidrógeno generado por la nitrogenasa a una velocidad equivalente a la máxima de producción que evita dicha inhibición (8). El mecanismo de oxidación del hidrógeno produce ATP, proceso que consume el exceso de oxígeno presente (8,17).

Los procesos de oxidación y reciclaje del hidrógeno son realizados en forma natural por la enzima hidrogenasa en sistemas aerobios fijadores de nitrógeno (6,8,18,46,60).

La función de la hidrogenasa, al parecer está influenciada por la concentración de la glucosa y posiblemente con el consumo y tolerancia al oxígeno dado que al final del crecimiento, cuando disminuye la glucosa y la fijación de nitrógeno es máxima se observa un incremento en su actividad, en la tolerancia y consumo de oxígeno, lo que sugiere que esta enzima protege a la nitrogenasa del oxígeno (6,60), dado que cuando hay demasiado oxígeno este participa en la oxidación de la fuente de carbono, disminuye su nivel y estimula la actividad de la hidrogenasa (8,46,60).

#### 2.7.5. Metabolismo del Oxígeno

La microaerofilia es un mecanismo eficiente de protección al oxígeno, que se necesita para la fijación de nitrógeno y para la expresión de la nitrogenasa (6).

En comparación con otros microorganismos fijadores de nitrógeno la velocidad de crecimiento de Azospirillum se ve limitada por su capacidad para fijar nitrógeno que depende de la concentración de oxígeno en el medio, ya que la nitrogenasa es muy sensible en presencia del oxígeno (1,6,17,39,53).

En medio semisólido (6,39), el microorganismo gracias a su movilidad, migra hacia la posición más favorable estableciéndose en el lugar donde existe la concentración adecuada de oxígeno para la producción de ATP y la óptima fijación de nitrógeno, así, se agrupa formando una película característica donde el oxígeno se consume rápidamente (11,17,39).

Ha sido reportado que cuando la concentración de glucosa o lactosa disminuye (0.05%), la fijación de nitrógeno, el desarrollo y la tolerancia a oxígeno aumentan (17).

En el caso de A. amazonense la concentración óptima de oxígeno respecto de las otras especies, es más baja y tiene un límite más pequeño, dada la baja tolerancia de su nitrogenasa al oxígeno.

#### 2.7.6. Efecto de temperatura y pH.

La temperatura óptima para el crecimiento dependiente de nitrógeno para Azospirillum ha sido reportada entre 32 y 40 C y es similar a la de otras bacterias fijadoras de nitrógeno tropicales. La actividad de la nitrogenasa de Azospirillum es sensible a temperaturas a bajo de 18 C, Day (1977) citado por (6), y la temperatura óptima para su actividad es de 33-40 C (1,11,39). La temperatura encima de 40 C incrementan la actividad de la nitrogenasa pero el período de vida se reduce y después de 5 h. es inhibida (1,11,39).

A 45 C se inhibe totalmente la actividad y desaparece en 30 min. (1,39).

La alta incidencia de Azospirillum en zonas tropicales se atribuye a los requerimientos de altas temperaturas de esta

bacteria (39). Sin embargo todas las cepas de Azospirillum reportadas tienen una temperatura óptima similar para la fijación de nitrógeno, aunque se ha reportado tolerancia al frío. Neves (1976) citado por (6).

Respecto al pH, el valor óptimo para el crecimiento dependiente de dinitrógeno para Azospirillum está situado entre 6.8 y 7.8 (11). Se especula que la fijación de nitrógeno por Azospirillum ocurre en la superficie o dentro de las células de la raíz, donde el pH específico puede ser encontrado.

Para A. amazonense el pH óptimo de desarrollo es 6.0 , Malgahes (1983) citado en (43).

Se ha demostrado que la presencia de Azospirillum en los suelos depende del pH de estos, sugiriéndose que las raíces de los pastos ofrecen condiciones óptimas para la bacteria permitiendo su desarrollo en suelos con valores bajos de pH (15).

#### 2.7.7. Carotenos.

Cuatro carotenos diferentes han sido aislados y purificados de la membrana de la bacteria fijadora de nitrógeno A. brasilense Cd, desarrollando en aerobiosis y 1 de la cepa cd-1. La síntesis de carotenos no ocurre en condiciones microaeróbicas. Las cepas mencionadas de Azospirillum contenían una cantidad similar de citocromo c (41).

La síntesis de carotenos fue inhibida en células cultivadas en presencia de concentraciones mayores de 10 mM de NH<sub>4</sub>Cl pero conforme disminuye el nivel (5 mM) se favorece la actividad de la nitrogenasa y se estimula la síntesis de carotenos formándose agregados (41).

Los carotenos parecen tener función de protección del sistema nitrogenasa sensible al oxígeno, en microorganismos que pueden consumir oxígeno y sus radicales (41).

# III. Parte Experimental

### III. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo se hizo en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM.

Con objeto de desarrollar la formulación de un medio de cultivo de bajo costo y que permita obtener poblaciones abundantes de Azospirillum en periodos de incubación cortos.

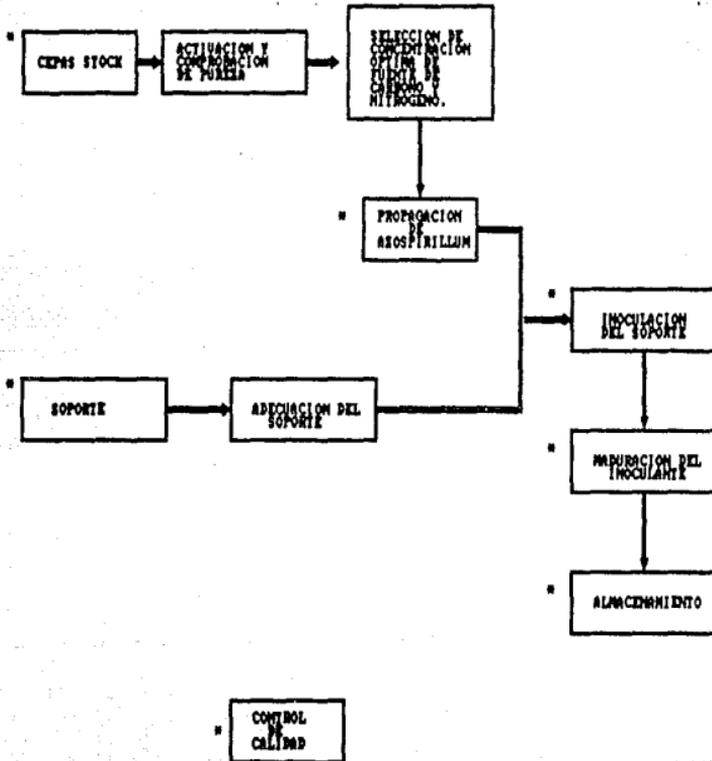
Se probaron dos cepas: Azospirillum brasilense Sp7 (ATCC 29145) y Azospirillum lipoferum VS-1 aislada de raíces de sorgo cultivado en Valle de Santiago, Gto.

Se determinó el crecimiento de esta cepas en cinco medios de cultivo en los que se varió la fuente y dosis de carbono, nitrógeno y vitamina.

Se hizo un estudio comparativo de costos del medio de cultivo de referencia y de los medios seleccionados.

En la figura 3 se presenta el esquema de trabajo.

FIGURA No. 3  
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.



### 3.1 Activación de las cepas y comprobación de su pureza

A los cultivos stock se les comprobó pureza por observaciones en fresco (morfológicas) y mediante tinciones de Gram.

La activación de las cepas se efectuó mediante resiembras sucesivas, por períodos de 72 h, en medio NFB, incubando a 33 C. Se verificó su actividad mediante la observación en fresco de su morfología y de la movilidad típica de cada cepa.

### 3.2 Selección de medio de cultivo

Se determinó la velocidad de crecimiento de Azospirillum en diferentes medios de cultivo. Para ello se procedió a:

- Activación de las cepas mediante inoculación de una asada en medio de cultivo NFB líquido, se incubó a 33 C durante 72 h en agitación a 200 rpm.

- Adaptación de las cepas en los diferentes medios.

En matraces nefelométricos de 250 cc conteniendo 100 ml del medio de cultivo a probar fueron inoculados con 10 ml del cultivo previamente activado, incubándose en las condiciones antes mencionadas.

#### Curva de Crecimiento

Los matraces que contenían los diferentes medios a probar fueron inoculados con 10 ml de los cultivos previamente inoculados con fines de adaptación a los medios a ensayar.

A los diferentes cultivos se les ajustó la población a  $5 \times 10^7$  células/ml mediante la adición de medio de cultivo estéril y

determinación de turbiedad en un nefelómetro Klett-Sumerson con filtro verde ( 7 Unidades Klett).

Cada cultivo fué inoculado en proporción de 10% en los diferentes medios a ensayar, procediéndose a incubar en las condiciones antes descritas y a determinar la turbiedad cada 8 horas a fin de elaborar las diferentes curvas de crecimiento. En todos los casos se verificó la pureza de los cultivos a diferentes períodos de tiempo. Este procedimiento se siguió en 6 experimentos realizados con Azospirillum brasilense y 2 con Azospirillum lipoferum.

En el primero se empleó un medio de referencia que contenía como fuente de carbono ácido succínico y se comparó con 4 medios que contenían glicerol. La dosis de glicerol se estableció con base al método estadístico propuesto por Box Wilson (7B), con cada una de las dosis de glicerol se probaron dos dosis de nitrógeno (ver tabla 3).

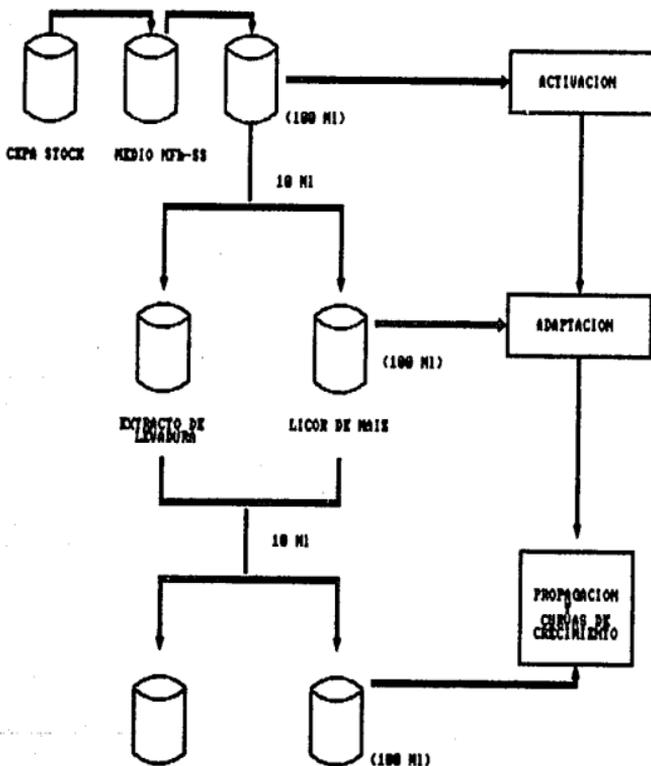
Con base en los resultados obtenidos, en el segundo experimento se aumentaron las dosis de glicerol (ver tabla 4) y en el tercero se probó la mezcla de ácido succínico y glicerol (tabla 5); manteniéndose en ambos las dosis de nitrógeno iniciales.

En el 4to experimento se probaron dosis crecientes de fuente de carbono y nitrógeno (tabla 6).

Para confirmar los resultados en el 5to experimento se eliminó la fuente de glicerol (tabla 6 sin glicerol) y en el 6to se repitieron las curvas de crecimiento en los medios seleccionados (tabla 6).

Con base en los resultados obtenidos para A. brasiliense y considerando que A. lipoferum requiere de biotina, se determinó la velocidad de crecimiento de esta especie en presencia de biotina y otras fuentes de vitamina de costos más reducidos (Tabla 7). De este experimento se seleccionaron tres medios cuyo efecto se comprobó en el último ensayo.

FIGURA No. 4  
ESQUEMA DE PROCESO PARA  
CUMPLIR DE CECILIAERIO



En gramos/litro						
REACTIVOS	(Ref.) K	A	B	C	D	
!Ac. Succínico	5.0	-	-	-	-	-
!Glicerol	-	2.0	2.0	8.0	8.0	
!K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
!MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
!NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
!CaCl <sub>2</sub>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
!Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
!MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
!FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
!NH <sub>4</sub> Cl	1.0	0.4	1.6	0.4	1.6	
!KOH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	

Fuente: Cálculo de gabinete.

Tabla 3. Medios de cultivo probados inicialmente para *A. brasiliense*.  
Ver Gráfica I  
Ref- Medio de Referencia

En gramos/litro						
REACTIVOS	(Ref.) K	A	B	C	D	
!Ac. Succínico	5.0	-	-	-	-	-
!Glicerol	-	10.5	10.5	14.5	14.5	
!K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
!MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
!NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
!CaCl <sub>2</sub>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
!Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
!MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
!FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
!NH <sub>4</sub> Cl	1.0	0.4	1.6	0.4	1.6	
!KOH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	

Fuente: Cálculo de gabinete.

Tabla 4.- Medios de cultivo en los que se incrementa la concentración de Glicerol, para *A. brasiliense*.

Ver Gráfica II  
Ref- Medio de Referencia

En gramos/litro						
REACTIVOS	(Ref.) K	A	B	C	D	
Ac. Succínico	5.0	1.5	2.5	1.5	2.5	
Glicerol	-	2.0	2.0	8.0	8.0	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
CaCl <sub>2</sub>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
NH <sub>4</sub> Cl	1.0	0.4	1.6	0.4	1.6	
KOH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	

Fuente: Cálculo de gabinete.

Tabla 5. Combinación de fuentes de Carbono : Glicerol y Ac. Succínico, para A.brasiliense.

Ver Gráfica III  
Ref- Medio de Referencia

REACTIVOS	En gramos/litro							
	(Ref.) K	C	B	F	G	H	I	
!Ac. Succínico	5.0	1.5	1.0	2.1	2.4	2.7	3.0	
!Glicerol	-	14.5	15.5	16.5	17.5	18.5	19.5	
!K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
!MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
!NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
!CaCl <sub>2</sub>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
!Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
!MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
!FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
!NH <sub>4</sub> Cl	1.0	0.4	0.6	1.2	1.6	2.0	2.4	
!KOH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	

Fuente: Cálculo de gabinete.

Tabla 6. Variación de concentración de fuentes de Carbono, para A. brasiliense.

Ver Gráfica VI

Ref= Medio de Referencia

En gramos/litro							
REACTIVOS	(Ref.) K1	E1	I1	II	III	IV	
%c. Succínico	5.0	1.8	1.8	-	1.8	1.8	
%Glicerol	-	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	
%K2HPO4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
%MgSO4. 7H2O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
%NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
%CaCl2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
%Na2HPO4.H2O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
%NaSO4.H2O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
%FeCl3.6H2O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
%NH4Cl	1.0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	
%Biotina	.002	.002	-	-	-	-	
%Ext. Levadura	-	-	1.0	1.0	-	-	
%Licor de maiz	-	-	-	-	1%	2%	
%KOH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	

Fuente: Cálculo de gabaeta.  
 Table 7. Medios de cultivo probados inicialmente para *A. lipoferum*.  
 Ver Gráfica VI  
 Ref- Medio de Referencia

En gramos/litro							
REACTIVOS	<i>A. lipoferum</i>				<i>A. brasilense</i>		
	(Ref.) K1	E1	I1	V	(Ref.) K1	E	
%c. Succínico	5.0	1.8	1.8	-	5.0	1.8	
%Glicerol	-	15.5	15.5	15.5	-	15.5	
%K2HPO4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
%MgSO4. 7H2O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
%NaCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
%CaCl2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
%Na2HPO4.H2O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
%NaSO4.H2O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
%FeCl3.6H2O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
%NH4Cl	1.0	0.4	0.8	2.4	1.0	0.8	
%Biotina	.002	.002	-	-	-	-	
%Ext. Levadura	-	-	1.0	-	-	-	
%Licor de maiz	-	-	-	-	1%	-	
%KOH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	

Table 8. Medios de cultivo seleccionados para la preparación de inoculantes de *Aspergillus*.  
 Ver Gráfica VIII  
 Ref- Medio de Referencia

### 3.3 Producción del Inoculante

Se determinó el efecto de los medios seleccionados sobre la viabilidad de Azospirillum en el biofertilizante para lo cual se prepararon 8 tipos de inoculante 3 para A. brasilense y 5 para A. lipoferum.

Soporte. Se emplearon 2 tipos: turba y mezcla de turba con paja de maíz (vol/vol).

La turba fué tratada con carbonato de calcio en proporción de 5%, una vez neutralizada se molió y pasó a través de un tamiz de 200 mallas.

La turba se dividió en dos lotes, uno para emplearse directamente como soporte y el otro fué mezclado con la paja de maíz.

La turba se distribuyó en 35 frascos Gerber y la mezcla de turba con paja de maíz en 15; en proporciones de 20g/frasco procediéndose a esterilizar en autoclave a 121 C durante 2 horas.

Las cepas se inocularon en los medios seleccionados, se incubó a la temperatura de 33 C. en agitación a 200 rpm hasta alcanzar las poblaciones requeridas (mitad de la fase logarítmica) lo cual garantiza la presencia de microorganismos en crecimiento activo para lo que finalmente se ajustó la población a  $5 \times 10^7$  células/ml, adicionando medio de cultivo estéril.

Inoculación de los soportes: El volumen de inóculo que se agregó a cada soporte se estableció previamente para tener el % de humedad y consistencia que favorecen la multiplicación y sobrevivencia de la bacteria y que facilitan la adhesión del inoculante a semillas en su aplicación en la práctica agrícola.

Lo anterior corresponde a 20g de turba y 14ml de inóculo, 20g de turba + paja (v/v) y 14ml de inóculo.

Los frascos con turba se dividieron en 7 lotes. de 5. Dos lotes fueron inoculados con A. brasilense desarrollado en el medio de referencia y en el medio E (seleccionado); 4 lotes se inocularon con A. lipoferum desarrollado en el medio de referencia, y en los medios E1, II y V (seleccionados) y el último lote fué tratado con el cultivo previamente esterilizado el que se empleó como testigo.

En el caso de la mezcla de turba y paja de maíz, los 15 frascos se dividieron en 3 lotes, uno se empleo como testigo, y los otros se inocularon con A. brasilense o A. lipoferum cultivados en dos de los medios previamente seleccionados.

En la tabla 9 se resumen los tratamientos.

!SOPORTE!	T u r b a						!Paja de maiz-turba(Vol/Vol)!	
! CEPAS !	! A. brasilense !		! A. lipoferum !				! A. brasilense! A. lipoferum !	
!	!	!	!	!	!	!	!	!
!	!Medio !	!Medio !	T:Medio !	!Medio !	!Medio !	!Medio !	T:Medio !	!Medio !
!	!ref (k)!Selec. (E)!	!	!ref(k1)!Selec. (E1)!	!Selec. (I1)!	!Selec. (V)!	!	!Selec. (E)!	!Selec. (V) !
!	!	!	!	!	!	!	!	!

Tabla 9. TRATAMIENTOS

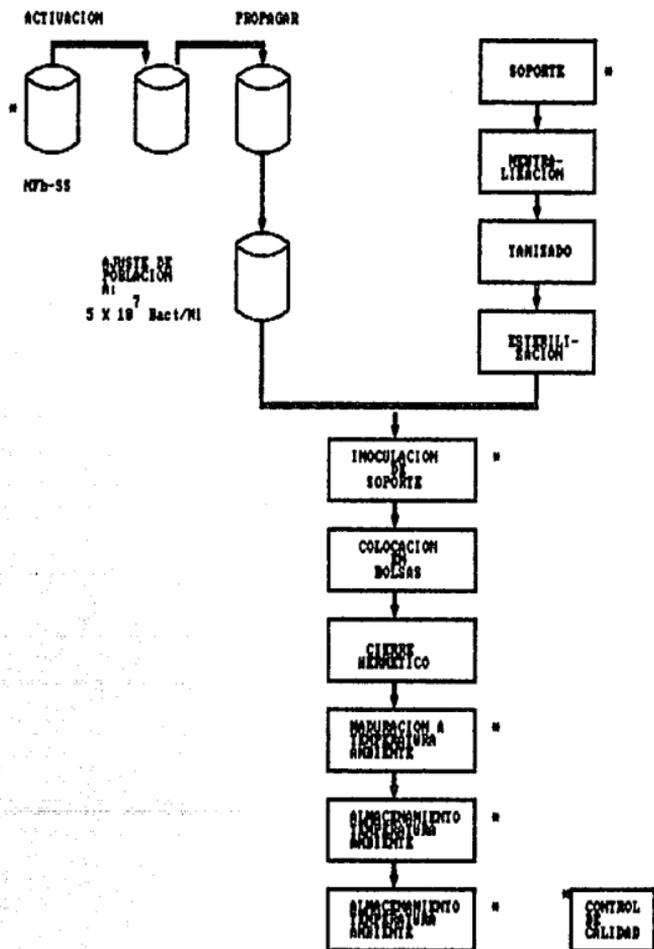
T: Testigo.

Posteriormente se distribuyó el contenido de cada lote en bolsas de polietileno, las que fueron selladas y almacenadas a temperatura ambiente.

3.4. Control de calidad. Se efectuó al tiempo 0: en el período de maduración (7 y 15 días), y durante el almacenamiento (30, 60 y 90 días).

En los tiempos indicados se tomaron 2 bolsas de cada tratamiento y se prepararon 2 series de diluciones, sembrando en gelosa nutritiva, se incubaron a 33 C por 72h, procediéndose a la cuenta en placa (figura 5).

FIGURA No. 3  
ESQUEMA DE LA PRODUCCION DEL INOCULANTE



# IV. Resultados y Discusión

#### 4.0. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1 Optimización del medio de cultivo

Los resultados del primer experimento (gráfica I) indican que las concentraciones de glicerol empleadas no fueron suficientes para alcanzar poblaciones elevadas de la bacteria. Resultados similares se observaron en el segundo ensayo aún cuando la concentración de glicerol se aumento de 8g/l hasta 14.5g/l.

Considerando los reportes de (32,52) que indican que este género utiliza eficientemente el glicerol, así como el costo económico de este sustrato, se decidió probar mezclas de glicerol y ác. succínico a fin de que este último favoreciera el desarrollo inicial del microorganismo y la población resultante utilizara eficientemente al glicerol. Este supuesto fué confirmado con los resultados del tercer experimento (gráfica III), en donde las poblaciones microbianas que se registraron fueron superiores a las obtenidas en el medio de referencia.

En la gráfica IV se observan los resultados del ensayo de confirmación y se observa que los medios B,C y D que contienen 1.5 y 2.5g/l de ác. succínico y 2.0, 8.0 y 14.5g/l de glicerol (tabla 5), fueron los más eficientes.

En cuanto al cuarto experimento, en este se observa la respuesta del microorganismo a un nuevo incremento en la concentración de ác. succínico y glicerol, registrandose un considerable aumento en su densidad de población (gráfica VI).

En el quinto experimento se muestra el efecto de la eliminación del glicerol y el efecto del ác. succínico en el

desarrollo de la bacteria (gráfica V). La información anterior corresponde a A. brasilense.

En la gráfica VII muestran los resultados del experimento seis en donde se observa el efecto de los medios seleccionados (con A. brasilense) sobre el desarrollo de A. lipoferum.

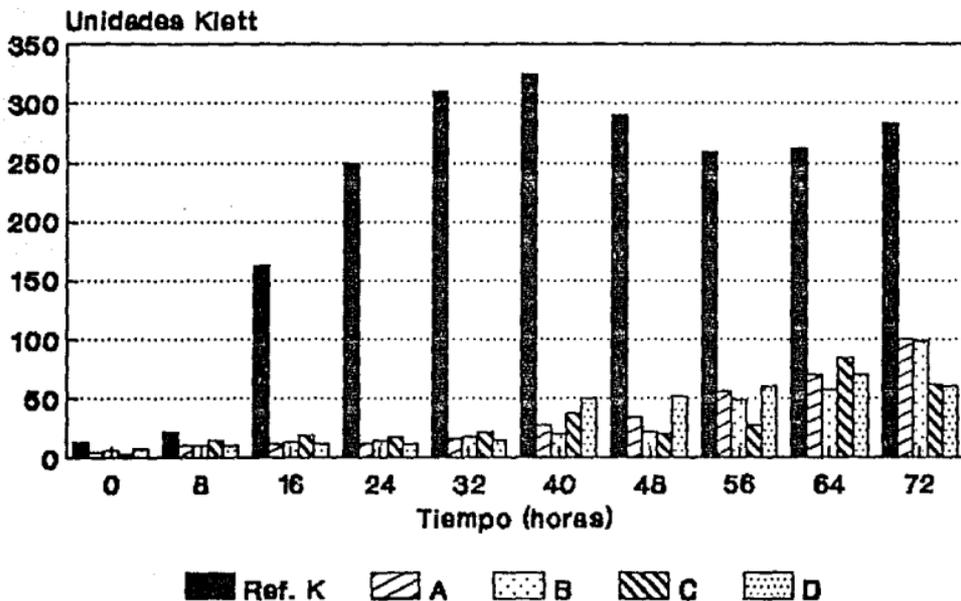
En la gráfica VIII se exponen los resultados del ensayo de confirmación y se observa que los medios E1, I1 y V son los de mayor eficiencia.

En otro estudio en el que se emplearon las mismas cepas, Hernández y Ruiz en 1987 (26) indican que en el medio de referencia, Azospirillum alcanza su máximo desarrollo entre las 24 y 36 h. Estos resultados fueron confirmados en todos los experimentos realizados (Gráficas 1 a 8) observándose que dentro de este período se alcanzan poblaciones de 10<sup>9</sup> células/ml, que son las recomendadas para efectuar la impregnación del soporte.

Es importante hacer notar que con los medios E, E1 y I1 se obtienen concentraciones similares desde las 16 h. en tanto que con el medio V se registraron poblaciones similares entre las 24 y 32 horas.

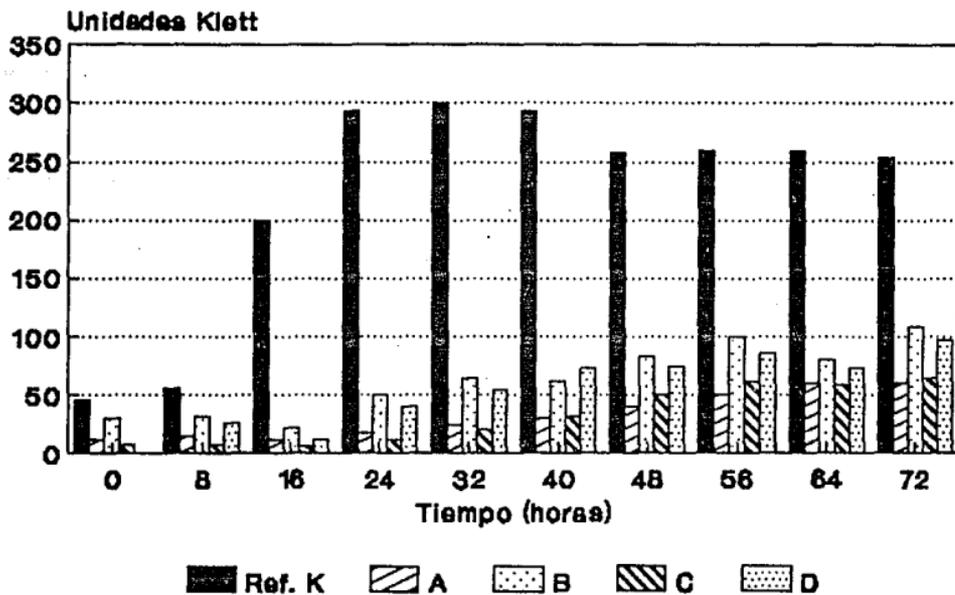
La reducción del tiempo de incubación repercute considerablemente en los costos de producción.

# Prueba preliminar para det.conc.de Fte. de C y N para A.brasilense.



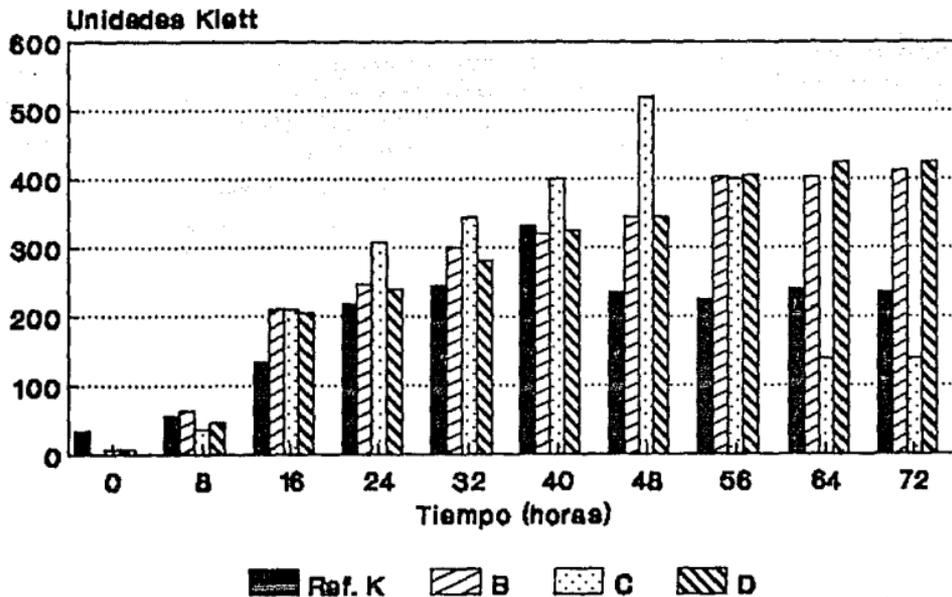
Gráfica I

## Prueba preliminar Incremento Fte.de C. Glicerol para A.brasilense.



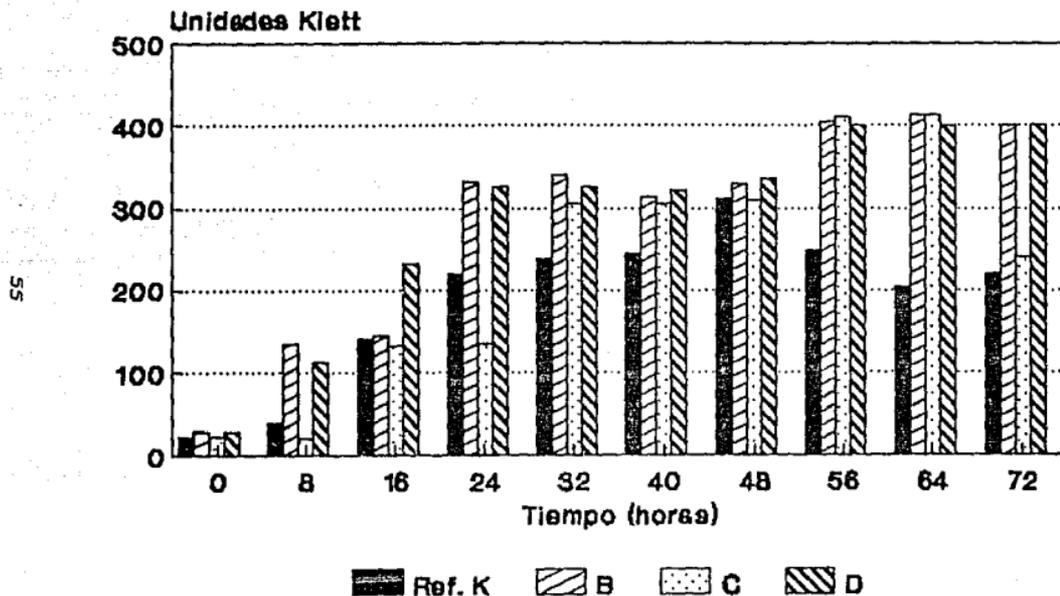
Gráfica II

# Combinación Fte.de C.Glicerol Ac.Succínico p/A.brasilense.



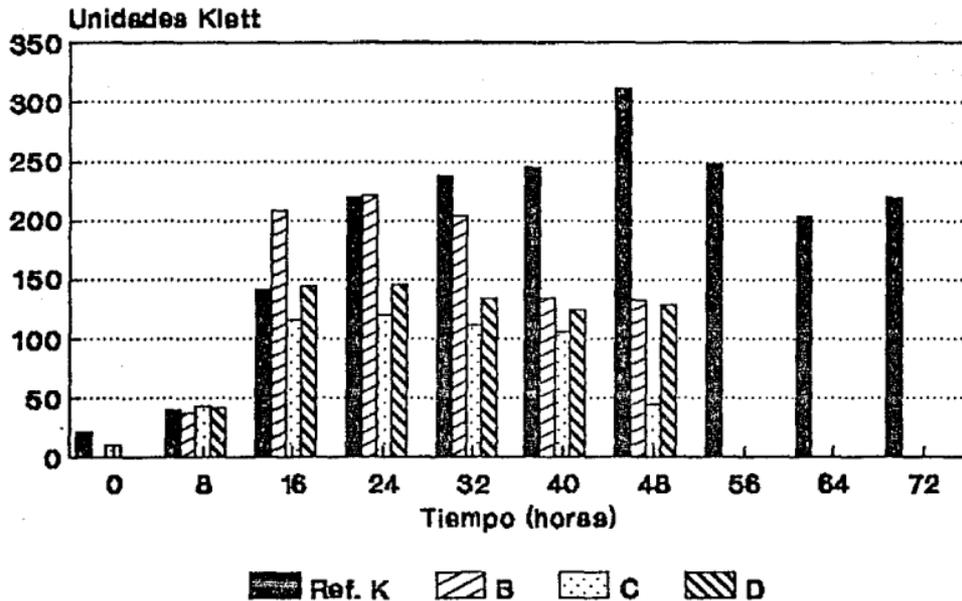
Gráfica III

# Pba. Confirmativa de Comb. Fte. C. Glicerol Ac. Succínico p/A. brasilense.



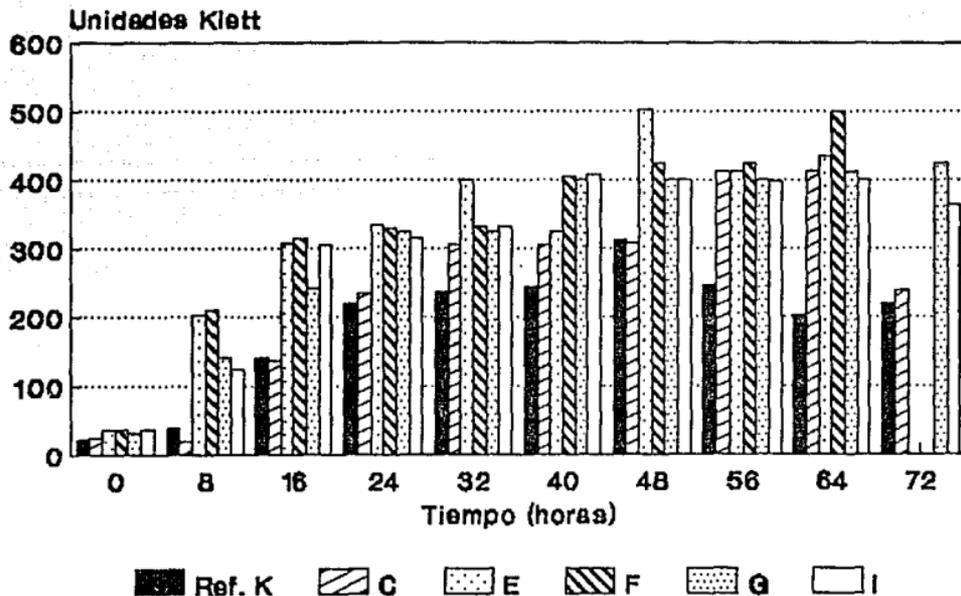
Gráfica IV

## Respuesta de *A. brasilense* a ácido succínico, única fte. C elim. Glicerol



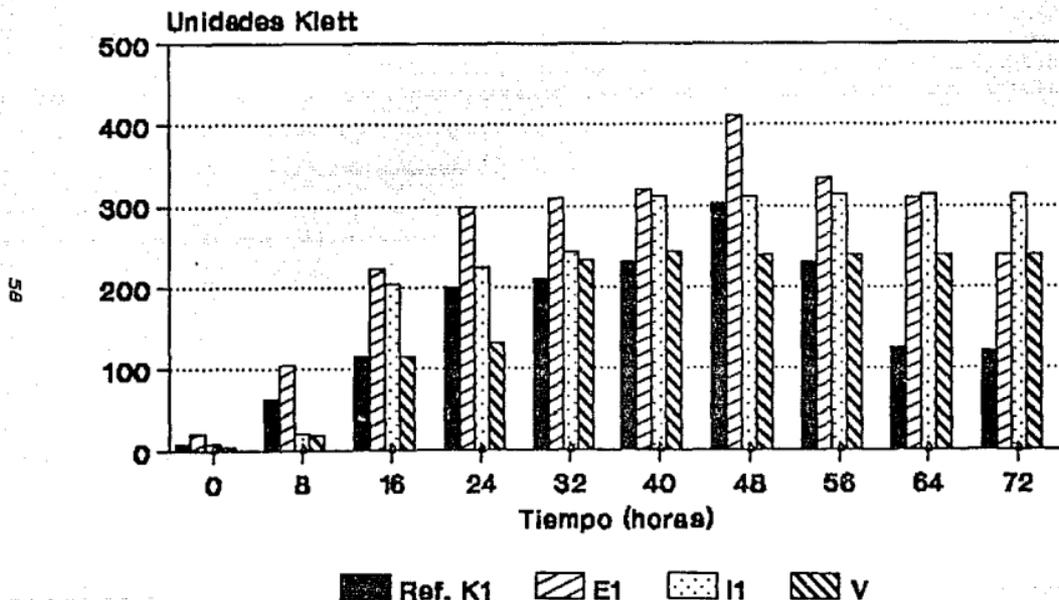
Gráfica V

## Incremento de fuente de C. Glicerol-Ac.Succínico A.brasilense



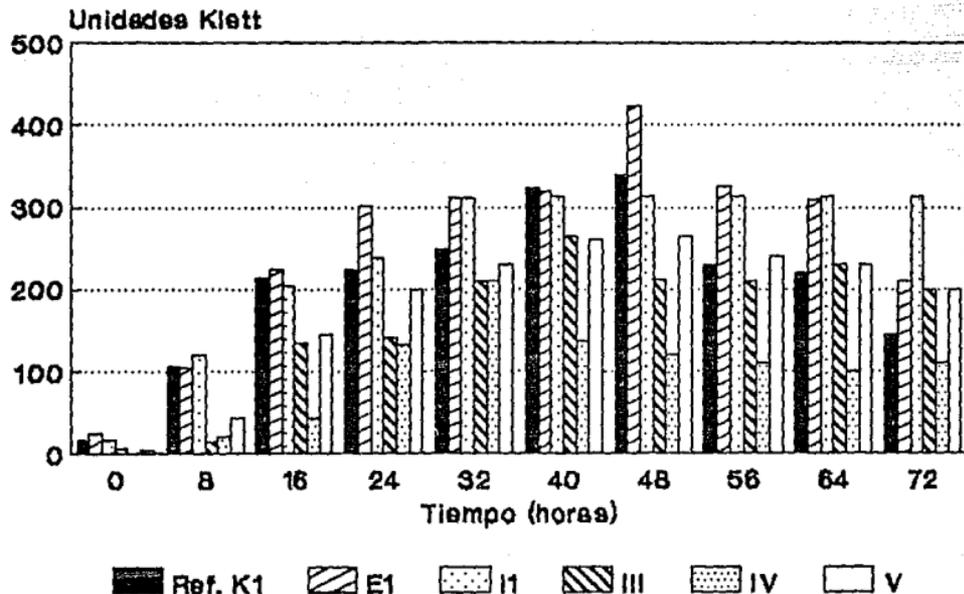
Gráfica VI

# Prueba confirmativa fte.de C y N para A. lipoferum



Gráfica VIII

## Prueba preliminar fte.de C y N para *A. lipoferum*



Gráfica VII

#### 4.2 Análisis Económico del Costo Directo de 1 y 1000 Litros de los Medios de Cultivo Seleccionados.

a) Considerando el costo de los reactivos de los medios de cultivo se tiene que el ácido succínico y la biotina son los componentes más caros.

b) Que el costo de los medios de cultivo de referencia corresponden para A. brasilense a \$ 4,426.39 y para A. lipoferum que requiere de biotina \$ 6,951.29, tabla 10.

c) Los resultados obtenidos indican que es factible disminuir las concentraciones de ácido succínico mediante la adición de glicerol (medio E) con lo que se reduce el costo en un 37% para A. lipoferum (medio E1) y un 58% para A. brasilense (medio E), tabla 11.

d) Que la biotina puede ser sustituida por extracto de levadura (medio I1) con lo que el costo del medio de cultivo se abate en un 70%, tabla 11.

e) Que el licor de maíz y el glicerol permiten eliminar el uso del ácido succínico y de la biotina con una disminución en el costo del medio de cultivo de un 95% (medio V).  
Tabla 11.

#### 4.3 Efecto de los medios de cultivo seleccionados y tipo de soporte sobre la viabilidad de Azospirillum

En la tabla 12 se exponen los resultados de las pruebas de control de calidad que hicieron a los nueve tipos de inoculantes preparados.

Esto indica que no hubo contaminación ya que en los controles (turba + células muertas de A. brasilense o A. lipoferum) no se registró desarrollo en ninguna de las

determinaciones realizadas.

Ambas cepas de Azospirillum (Sp7 y VS-1) mostraron un comportamiento muy parecido en los soportes usados.

La población de las cepas mencionadas tanto en la turba como en la turba + paja de maíz (v/v) es semejante casi durante los 90 días. Un mes antes de finalizar la cuenta viable la población de Azospirillum, descendió en forma notable en ambos soportes, lo que probablemente se justifique por una marcada disminución en la humedad de los mismos, ya que las bolsas en que estos permanecieron permitían observar cierto estado de poca humedad. Era de esperarse que en el soporte a base de turba + paja de maíz este efecto no fuera marcado dada la presencia de materia orgánica aportada por la paja, que probablemente aumentaría la sobrevivencia del microorganismo, lo cual no ocurrió.

La información anterior nos indica que hay sobrevivencia del microorganismo en los soportes usados durante cierto período de tiempo y que la mezcla de turba + paja de maíz es una alternativa que posiblemente abarate el costo en la producción de inoculante de Azospirillum, respecto al uso de la turba sola como soporte.

REACTIVOS	(Ref.) K1	E1	I1	V	(Ref.) K	Z
!Ac. Succínico	! 4,179.40	! 1,504.38	! 1,504.38	! 0.00	! 4,179.40	! 1,504.38
!Glicerol	! 0.00	! 108.50	! 108.50	! 108.50	! 0.00	! 108.50
!K2HPO4	! 19.30	! 19.30	! 19.30	! 19.30	! 19.30	! 19.30
!MgSO4. 7H2O	! 6.00	! 6.00	! 6.00	! 6.00	! 6.00	! 6.00
!NaCl	! 1.88	! 1.88	! 1.88	! 1.88	! 1.88	! 1.88
!CaCl2	! 0.68	! 0.68	! 0.68	! 0.68	! 0.68	! 0.68
!Na2MoO4.H2O	! 1.17	! 1.17	! 1.17	! 1.17	! 1.17	! 1.17
!NaSO4.H2O	! 1.12	! 1.12	! 1.12	! 1.12	! 1.12	! 1.12
!FeCl3.6H2O	! 0.34	! 0.34	! 0.34	! 0.34	! 0.34	! 0.34
!NH4Cl	! 22.00	! 17.60	! 0.00	! 0.00	! 22.00	! 17.60
!Biotina	! 2,525.00	! 2,525.00	! 0.00	! 0.00	! 0.00	! 0.00
!Ext. Levadura	! 0.00	! 0.00	! 217.35	! 0.00	! 0.00	! 0.00
!Licor de maiz	! 0.00	! 0.00	! 0.00	! 11.84	! 0.00	! 0.00
!KOH	! 194.40	! 194.40	! 194.40	! 194.40	! 194.40	! 194.40
!Total \$/lt.	! 6,951.29	! 4,380.57	! 2,055.32	! 345.23	! 4,426.29	! 1,855.57

Fuente: Cálculo de gabinete.

Tabla 10. Costo prom. por litro de medios de cultivos seleccionados para preparación de inoculantes de Azospirillum, en N.M.

Ref= Medio de Referencia

Medio de Cultivo	<u>a</u> !brasillense!	<u>b</u> !lipoferan!	!Costo por litro(NM)	!Costo por mil lit.	<u>a</u> ! (%)	<u>b</u> ! (%)
!Referencia K	! S1	! -	! 4,426.39	! 4,426,390	! 100.00%	! 100.00%
!Medio Z	! S1	! -	! 1,855.57	! 1,855,570	! 41.92%	! 58.08%
!Referencia K1	! -	! S1	! 6,951.29	! 6,951,290	! 100.00%	! 100.00%
!Medio E1	! -	! S1	! 4,380.57	! 4,380,570	! 63.02%	! 36.98%
!Medio I1	! -	! S1	! 2,055.32	! 2,055,320	! 29.57%	! 70.43%
!Medio V1	! -	! S1	! 345.23	! 345,230	! 4.97%	! 95.03%

Fuente: Cálculo de gabinete.

Tabla 11. Tabla comparativa de costos erogados utilizando los diferentes medios de cultivo investigados.

a  
!(%) : Puntos porcentuales por medio de cultivo por litro  
b  
!(%) : Reducción en el costo por medio de cultivo por litro y 1000 lt. expresado en puntos porcentuales.

Ref= Medio de Referencia

Tiempo de Incubación (días)	0	7	15	30	60	90
Cepa-Medio-Soporte \ Dilución	10	8   9   10	12	16   20   10	10	10
<u>A. brasilense</u> - Ref.K/T	52	NC	4	14	NC	33
<u>A. brasilense</u> - E/T	48	NC	2	88	<30	55
<u>A. brasilense</u> - E/T+P	78	NC	209.3	124	<30	<30
<u>A. brasilense</u> - Ref.K/C.M./T	-	-	-	-	-	-
<u>A. lipoferum</u> - Ref.K/T	NC	12	94.3	23	<30	48
<u>A. lipoferum</u> -E1/T	NC	NC	258	14	188	68
<u>A. lipoferum</u> -I1/T	NC	NC	NC	27	144	<30
<u>A. lipoferum</u> -V/T	NC	21	NC	22	174	<30
<u>A. lipoferum</u> -V/T+P	148	NC	NC	118	<30	51
<u>A. lipoferum</u> -Ref.K /C.M./T	-	-	-	-	-	-

Tabla 12  
Número de células de Azospirillum por gramo de  
Inoculante. Cepa Sp7 y VS-1.

T = Turba  
T+P = Turba + Paja de maíz  
NC = No contables (>300 colonias)  
C.M = células muertas como control.  
Ref= Medio de Referencia

# V. Conclusiones

## V. CONCLUSIONES

### 5.1. Conclusiones

1.- La concentración óptima de fuente de carbono y de nitrógeno seleccionados en los diferentes medios de cultivo investigados estimularon el desarrollo de A. brasilense y A. lipoferum. Los cuales aumentan la masa microbiana, disminuyen los costos de los medios de cultivo y permiten la viabilidad de los microorganismos en el soporte.

2.- El licor de maíz representa un posible sustituto del uso de la biotina, ya que contiene trazas de esta vitamina, así como aporta fuente de carbono y de nitrógeno, en medios de cultivo para A. lipoferum.

3.- Es posible en base al análisis económico hecho de los diferentes medios de cultivo investigados, llevar a nivel de escalamiento industrial la producción de inoculantes de importancia agrícola, utilizando microorganismos del género Azospirillum.

## 5.2. Recomendaciones

1.- Se recomienda hacer un estudio a nivel de invernadero, en el cual se apliquen los medios de cultivo investigados en este trabajo a gramíneas para estudiar la respuesta de la planta a estos y saber si Azospirillum conserva o no, sus características de interés agronómico.

2.- También es recomendable seguir investigando el desarrollo de formulaciones, con el objeto de abaratar el costo de medios de cultivo en los que se desarrolla el microorganismo.

3.- Se recomienda estudiar a escala piloto de fermentación industrial, el comportamiento de Azospirillum con el objeto de poder producir inoculantes de este microorganismo, ya que, no existe en este aspecto información, y la que está descrita en la bibliografía es exclusiva de Rhizobium.

# VI. Bibliografía

## VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albrech, L.S., and Okon, Y. (1980). Cultures Methods in Enzymology Photosynthesis and Nitrogen Fixation. Part C. Methods in Enzimology. 69:740-750.
- 2.- Alvarez, M.R.A., and Pastrana, C., (1980). Quimiotaxis de Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense hacia exudados radiculares de gramíneas. I. Actividad de maíz, trigo y sorgo. Revista Latinoamericana de Microbiología. 22:131-135.
- 3.- Alvarez, R.(1983). Presencia de Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense en la rizosfera de algunas plantas cultivadas y silvestres. Rev.Facultad de Agronomía. 4(3):271-276.
- 4.- Balandreau, J. (1983). Microbiology of the association. Can. J. Microbiol. 29:851-859.
- 5.- Berg, R.H., Tyler, M.E., Novich, N.J., Vogil, V., and Vasil, I.K. (1980). Biology of Azospirillum Sugarcane association; Enhancement of Nitrogenase activity. Applied and Environmental Microbiology. 39(3): 642-649.
- 6.- Berkum, P.Van., and Bohlool, B.B. (1980). Evaluation of nitrogen fixation by Bacteria in association with roots of tropical grasses. Microbiological Reviews. 44(3):491-517.
- 7.- Biothe, H., Klein, B., Stephan, M.P. and Dobereiner, J.(1981). Transformation on inorganic nitrogen by Azospirillum spp. Arch. Microbiol. 130:90-100.

7A.- Bodey, R.M., and Dobereiner, J. (1984). Nitrogen Fixation Associated with Grasses and Cereales. Current Developments in Biological Nitrogen Fixation. Edit by Subba Rao.

7B.- Galvez, A. (1989). Optimización de medios de cultivo en sistemas industriales de fermentación. Método de Box-Wilson. Comunicación personal. Postgrado en Alimentos. Facultad de Química. UNAM.

8.- Chan, Y.J., Nelson, L.M., Knowlton, R. (1980). Hydrogen metabolism of Azospirillum brasilense in nitrogen free medium. Can. J. Microbiol. 26:1126-1131.

9.- Córdova, U.R. (1986). Evaluación de la turba nacional como soporte para inoculantes de leguminosa con cepas de Rhizobium japonicum. Tesis Lic. Facultad de Química. UNAM.

10.- Danneberg, G., Kronenberg, A., Never, G., and Bothe, H. (1986). Aspects of nitrogen fixation and denitrification by Azospirillum. Plant and Soil. 190:193-202.

11.- Day, J.M., and Dobereiner, J. (1976). Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation in Spirillum from digitaria roots. Soil. Biol. Biochem. 8:45:50.

12.- Das, A., and Mishra, A.K., (1983). Utilization of fructose by Azospirillum brasilense. Can. J. Microbiol. 29:1213-1217.

13.- De-Polli, H., Bohlool, B.B., and Dobereiner, J., (1980). Serological differentiation of Azospirillum species belongs to different host-plant specificity groups. Arch. Microbiol. 126:217-222.

14.- Devender, D.J., Patriquin, D.G., (1985).

Characterization of substance produced by Azospirillum with branching of wheat root hairs. Can. J. Microbiol. 31:206-210.

15.- Dobereiner, J., Marriel, I.E., and Nery, M. (1976). Ecological distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22:1464-1473.

16.- Dobereiner, J. (1978). Potential for nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. Limitation and potentials of biological nitrogen fixation. Ed. Dobereiner, J., Burr, R.H. Plenum Press N.Y., USA. p.13-23.

17.- Dobereiner, J., and De-Polli, H. (1980). Diazotrophic rhizodermoses. Annual Proceeding of the phytochemical Society of Europe Nitrogen Fixation. Cap.13(18):301-333.

18.- Evans, S.H.J., Ruiz, A.T., and Russell, S.A. (1978). Hydrogen Metabolism and nitrogen fixation in legumes. Limitation and potentials of biological nitrogen fixation in tropic. 10:209-222.

19.- Flores, A.A. (1985). Aislamiento y caracterización de Azospirillum de la rizosfera de sorgo del Valle de Santiago. Gto. Tesis Lic. Fac. de Química. UNAM.

20.- González, Ch.M.C. (1989). Estudio de la Endomicorriza V-A y la Fijación Biológica del Nitrógeno en un Agrosistema de bajo ingreso externo de energía, en Tamulté de las Sabanas Tabasco. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

21.- Gutiérrez, G.C.R. (1987). Estudios de pesticidas de uso común en el cultivo de gramíneas en el crecimiento in

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

vitro de Azospirillum. Tesis lic. Fac. de Química. UNAM.

22.- González, M.A.(1985). Algunos aspectos del metabolismo nitrogenado en microorganismos. Mensaje Bioquímico. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. UNAM.

23.- Haahtela, K., Kari, K., and Sundman, V.(1983). Nitrogenasa activity (Acetylene Reduction) of root Associated, Cold-climate Azospirillum, Enterobacter, Klebsiella, and Pseudomonas Species during Group on Various Carbon Sources and at Various partial pressures of oxygen. Applied Environmental Microbiology. 45:563-570.

24.- Haahtela, K., Wartiovaara, T. Sundman, V., Skujins, V.(1981). Root-association N2-fixation (Acetylene Reduction) by Enterobacteriaceae and Azospirillum in cold climate Spodosols. Applied Environmental Microbiology. 41(1):203-206.

25.-Hernández, G.R.(1980). Estudio comparativo para la elaboración de inoculantes de leguminosas en México. Tesis Lic. Fac. de Química. UNAM.

26- Hernández, P.S., Ruiz, S.(1987). Evaluación del comportamiento de cepas de Azospirillum en turba. Tesis Lic. Fac. de Química. UNAM.

27.- Hubell, D.M., Tien, M.F., Gaskins, M.H., Lee. (1981). Physiological interactions in the Azospirillum-grasses root association. En: Associative N2-fixation. Ed. Vose, P.B., Ruschel, A.P. CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA. p.1-15.

28.- Jiménez, G.M.(1986). Efecto de la inoculación de Azospirillum en dos variedades de trigo, realizado a nivel de invernadero. Tesis Lic. Fac. de Química. UNAM.

29.- Kapulnik, Y., Okon, Y., Kiegel, J., Nur, I. and Henis, Y.(1981). Effect of temperature nitrogen fertilization and plant age an nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). Plant Physiol. 68:340-343.

30.- Khamas, K.M., Ageron,E., Grimont, P.A.D. and Kaiser, P.(1989). *Azospirillum irakense* new species. A nitrogen-fixing bacteria associated with rice roots and rizosphere soil. Biological Abstracts. 89(10).May.1990.

31.- Krieg, R.N.(1984). Genus *Spirillum*. Ehremer 1832, 38 al Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Vol 1 p.90-93.

32.- Krieg and Dobreiner.(1984). Genus *Azospirillum*. Bergey's Manual Systematic Bacteriology. Vol 1. p.94-104.

33.- Krieg, N.R., and Trrand, J.J.(1978). Taxonomic of the root associated nitrogen fixing. Limitation and potentials for Biological Nitrogen Fixation in Tropics. 10:317-332.

34.- Magdalena del G.G., Mtnez,D.G.M., Goebel, R.H., Burris,N.R., Krieg.,N.R.(1984). Carbohydrate Metabolism in *Azospirillum* spp. Advance in Nitrogen Fixation Research. p.220.

35.- Martínez-Drets, G., Del Gallo, M., Borpee, Ch., and Burris, R.H.(1984). Catabolism of carbohydrates and organic acids and expresion of nitrogenase by *Azospirilla*. Journal of Bacteriology. 159:80-85.

36.- Martínez, P.(1979). Algunos aspectos ecológicos de la simbiosis *Azospirillum*-gramíneas. Tesis Lic. Fac. de Química.

37.- Myers, M.C., Hubell, D.V.(1987). Plant Cell Wall Carbohydrates as sustrates for *Azospirillum brasilense*. Applied Environmental Microbiology. 53:2745-2748.

38.- Neyra, C.A.(1977). Denitrification for fixing Spirillum lipoferum. Can. J. Microbiol. 23:300-305.

39.- Neyra, C.A., and Dobereiner, J. (1977). Nitrogen Fixation in Grasses. Adv. Agronomy. 29:1-39.

40.- Novick, N.J. and Tyler, M.E.(1982). L-Arabinose Metabolism in Azospirillum brasilense. Journal of Bacteriology. 149:364-367.

41.- Nur, I., Steinitz, L.Y., Okon, Y., and Henis, Y.(1981). Carotenoid Composition and function in nitrogen-fixing bacteria of the genus Azospirillum. Journal of bacteriology. 122:27-32.

42.- Okon, Y.(1985). Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology. 3(9):223-228.

43.- Ortega, R.S.E.(1989). Aspectos fisiológicos y bioquímicos de Azospirillum sp y su importancia en la agricultura. Tesis Lic. Fac. de Química. UNAM.

44.- Patriquin, D.G., Dobereiner, J., Jain, D.K.(1983). Sites and processes of association between diazotrophics and grasses. Can.J. Microbiol. 29:900-915.

45.- Payne, W.J., Sherr, B.F. and Chalmers, A.(1981). Nitrification-Denitrification Associated with plant roots. In associative N<sub>2</sub>-fixation. Ed. by P.B. Ruschel. CRC. Press. Florida, USA. p.15-25.

46.- Pedroza, F.O., Stephan, M.S., Dobereiner, J.(1981). Interaction of nitrogenase and uptake hydrogenase in Azospirillum brasilense. E.: Associative N<sub>2</sub>-fixation. Ed. Vose, P.B. Ruschel. A.P. CRC. Press. Boca Ratón, Florida, USA. p.15-25.

47.- Rai, N.R. and Gaur, C.(1982). Nitrogen fixation by Azospirillum spp and effect of Azospirillum lipoferum on the yield and N-uptake of wheat crop. Plant and Soil. 69:233-238.

48.- Ramírez,R.M.(1982). Estudio comparativo de Rhizobium phaseoli en compostas y turba. Tesis Lic. Fac. de Química. UNAM.

49.- Ramos,V.S., Tafolla, F.M.T.(1987). Estudio del efecto de la inoculación de algunas cepas de Azospirillum spp en el maíz en cultivo de temporal en Palmar Chico, Estado de México. Tesis Lic. ENEP-Zaragoza. UNAM..

50.- Rangel, L.J.A.(1987). Biofertilizantes (Azospirillum spp): Alternativas nutrición en maíz (*Zea mays* L). Tesis Lic.Universidad Autonoma de Chapingo.

50A.- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kertters, K., Thielemans, S., y De Ley, J. (1987). Azospirillum halopraeferens sp. nov., a Nitrogen Fixing Organism Associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunt).

50B.- Sarig, S., Kapulnik., and Dobereiner, J. (1986). Effect of Azospirillum inoculation on nitrogen fixation and of several winter legumes. Plant and Soil 90:335-342.

51.- Sarro de Silva, M.F., and Dobereiner,J.(1977). Occurrence of Azospirillum spp in soils and roots, Abstracts of original papers. Limitation and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. 10:372.

52.- Silvester-Bradley, R., Oliceira, L.A., De Podesta Filho, J.A., and ST. John, T.V.(1980). Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and occurrence of nitrogen fixing Azospirillum spp un representative soils of central amazonia.

Agro-Ecosistemas. 6:249-266.

53.- Tarrand, J.J. and Krieg, R.N. (1978). A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group with Descriptions of new tenus. Azospirillum lipoferum (Beijerinck) and Azospirillum brasilense sp nov. Can. J. Microbiol. 24:967-979.

54.- Tien, T.M., Gasking, M.H., Hubell, D.H. (1979). Plant growth Sustances produced by Azospirillum brasilense sp and their effects on the growth of Pearl millet (Pennisetum maximum L). Applied Environmental Microbiology. 37:1016-1024.

55.- Trujillo, G.G. (1988). Producción y estado actual de los inoculantes para leguminosas en México. XX Congreso Nacional de la ciencia del suelo. Zacatecas, Zac.

56.- Turner, G.L. And Gibson, A.H. (1980). Measurement of nitrogen fixation by indirect methods for evaluation biological nitrogen fixation. Cap. III. 111-113.

57.- Umali-García, H., Hubell, D.H., Gaskins, M.H. and Dazzo, F.B. (1980). Associated of Azospirillum with grasses roots. Applied Environmental Microbiology. 39(1):219-227.

58.- Villarreal, R.M. (1990). Efecto de la doble inoculación Azospirillum sp. Endomicorriza V-A en la producción de trigo (Triticum aestivum L.). Tesis maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

59.- Vlassak, K., Reynders, L. (1981). Agronomic aspects of biological dinitrogen fixation by Azospirillum spp. En: Associative N<sub>2</sub> -fixation. Ed: Vose, P.B. Ruschel, A.P. CRC Press. Boca ratón, Florida, USA. p.93-102.

60.- Volpon, A.G., De-Polli, H., Dobereiner,

J.(1981). Physiology of nitrogen fixation in Azospirillum lipoferum Br17. Arch. Microbiol. 128:371-375.

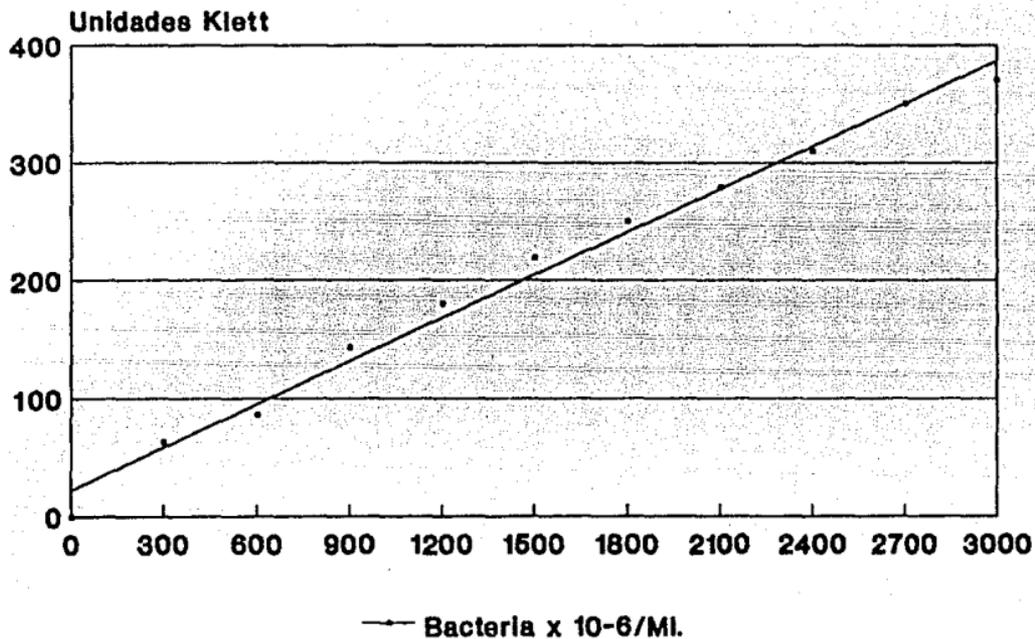
61.- Westby, C.A.,cutshall , D.S., and Vigil. G.V.  
(1983). Metabolism of various carbon sources by Azospirillum brasilense . J.Bacteriol. 156:1369-1372.

62.- Zumft, W.G.(1984). Physiology of free-living Diazotrophs Including cyanobacteria and Azospirillum with Special attention for amonic metabolism, H<sub>2</sub> metabolism and O<sub>2</sub> Protection. Advances in Nitrogen Fixation Research. p. 211.

# VII.

## Apendice

# CURVA DE Mc FARLAND



75

Apendice 1  
Citado en (26)