

1985-2

Reg. No. 078329645

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Rhizobium phaseoli*
BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
ADRIANA VAZQUEZ NAVARRO

GUADALAJARA, JALISCO

1987

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JUAN MORA GALINDO

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Cirugía Experimental de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del I.M.S.S., a cargo del Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Guillermo Vázquez Navarro, por su valiosa colaboración en el presente trabajo.

Al M. en C. Juan Mora Galindo y al Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega, Director y Asesor respectivamente, por su valiosa ayuda en la revisión y corrección de este trabajo.

A la Q.F.B. Luz de la Madrid y a la Laboratorista Guadalupe Romo, por su ayuda en el Laboratorio.

Al Laboratorio de Ecología Microbiana del CINVESTAV - IPN Unidad Irapuato, por haber facilitado las cepas de Rhizobium empleadas en este estudio.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social y en especial al Dr. Alfredo Feria Velasco, por permitirme realizar los experimentos de la presente investigación.

A todos los maestros, que contribuyeron para mi formación como profesionista.

DEDICATORIA

A MIS PADRES Y HERMANOS CON CARINO

A MIS MAESTROS CON GRATITUD

A MI ESCUELA

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| 2-INTRODUCCION | 1 |
| 6-JUSTIFICACION | 3 |
| 3-ANTECEDENTES | 4 |
| FIJACION DE NITROGENO | |
| - Ciclo del nitrógeno | 4 |
| - Papel que desempeña el nitrógeno en las plantas. | 6 |
| - Diferentes tipos de fijación del nitrógeno | 7 |
| EL GENERO <u>Rhizobium</u> | |
| - Descripción | 9 |
| - Habitat | 9 |
| - Especies de <u>Rhizobium</u> | 10 |
| - Papel que desempeña el <u>Rhizobium</u> | 11 |
| - Formación de nódulos | 12 |
| - Infectividad y efectividad | 13 |
| - Fijación de nitrógeno por <u>Rhizobium</u> | 14 |
| FIJACION DE CARBONO | |
| - Ciclo de carbono | 18 |
| - Papel en el ecosistema | 19 |
| - Fijación de carbono por organismos autótrofos | 19 |
| - Antecedentes de fijación de carbono por bacterias del género <u>Rhizobium</u> | 21 |
| METABOLISMO DE MICROORGANISMOS | |
| - Clasificación en cuanto al metabolismo de los microorganismos | 23 |
| - Ventajas en organismos autótrofos en relación a los heterótrofos tanto metabólicas como ambientales | 25 |

| | |
|----------------------|----|
| 7-HIPOTESIS | 26 |
| 5-OBJETIVOS | 27 |
| MATERIALES Y METODOS | 28 |
| RESULTADOS | 35 |
| DISCUSION | 57 |
| CONCLUSIONES | 60 |
| BIBLIOGRAFIA | 62 |

INTRODUCCION

Hasta ahora, para la selección de cepas de Rhizobium phaseoli sólo se ha tomado en cuenta la infectividad y efectividad de dicha bacteria, sin embargo, no son los únicos aspectos en la vida y sobrevivencia de estos microorganismos en el suelo. Algunos atributos que no se han tomado en cuenta con la debida importancia, son los relacionados con la sobrevivencia en medios adversos, tales como: resistencia a la desecación, cambios en pH y una especialmente importante, la fuente de carbono que pueden utilizar.

Existe evidencia experimental que hace suponer que pueden no solo utilizar fuentes orgánicas de carbono, sino que también carbono inorgánico (Lowe y Evans, 1962; Stotzky y Goss, 1964; Vance y Col., 1983; Stupperich, 1983). Esto es muy importante, ya que así no tendrían, en cierta forma, tanta competencia por fuentes de carbono con otros microorganismos, además que esto pudiera implicar una mayor sobrevivencia de estas bacterias en suelos donde las fuentes de carbono orgánico fuesen limitadas.

Por lo anterior se decidió realizar experimentos de laboratorio con diferentes cepas de Rhizobium phaseoli con el fin de comparar su crecimiento al suministrar diferentes fuentes de carbono como: glucosa, manitol (azúcares que tradicionalmente utilizan los rizobios en medios de cultivo) y

HCO_3^- (bicarbonato) a diferentes concentraciones.

Con la determinación anterior se contribuye al mejor conocimiento de los rizobios, que es de gran importancia para la elaboración de inoculantes de alta calidad para la Agricultura.

JUSTIFICACION

Si tomamos en cuenta que no todos los suelos de México poseen las mismas características físico-químicas, entonces podemos considerar que no todos los microbios del suelo como Rhizobium, actúan en la misma forma en los diferentes suelos que existen en el planeta.

Se debería tomar en cuenta el pH, textura, composición y humedad del suelo para poder inocular Rhizobium, ya que - las compañías que se dedican a la inoculación de semillas no toman en cuenta esto, y además los laboratorios en donde se realizan este tipo de estudios se encuentran en Estados Unidos y las condiciones del clima y suelo son diferentes - en ese lugar a los del campo mexicano, y solo toman en cuenta que las cepas sean infectivas y efectivas y así las venden, en México se utilizan y muchas veces las cepas no presentan una buena sobrevivencia y muere, y por lo tanto el cultivo no presenta crecimiento adecuado a menos que se abone.

Por lo que es importante que adquiramos la capacidad de seleccionar y producir cepas infectivas y efectivas con una adecuada sobrevivencia en suelo.

ANTECEDENTES

FIJACION DEL NITROGENO

CICLO DEL NITROGENO

En la naturaleza, el nitrógeno puede circular indefinidamente, debido a esto se le da el nombre de ciclo, además es un sistema abierto, porque puede incorporarse al ciclo o abandonarlo en diversos puntos (Thompson y Troeh, 1980).

Tisdale y Nelson (1982), comentan que considerando por ejemplo el ciclo del nitrógeno en un ecosistema terrestre, se pueden observar entradas, salidas y transformaciones del mismo en donde destacan los siguientes aspectos importantes: Las formas en que se fija el nitrógeno y entra al ecosistema pueden ser: por vía industrial como son los fertilizantes nitrogenados; por la fijación simbiótica y asimbiótica, que realizan ciertos microorganismos en el suelo; por la adición de desechos o residuos de plantas y animales y por la oxidación del nitrógeno atmosférico (N_2) que ocurre con las descargas eléctricas durante las precipitaciones pluviales.

Las formas en que sale el nitrógeno de los ecosistemas terrestres son: las eliminaciones realizadas por las plantas; las filtraciones (lixiviación) de compuestos solubles (NO_2^- , NO_3^-); por reacciones químicas (volatilización de NH_3) y

desnitrificación. La desnitrificación es la conversión del nitrito y nitrato del suelo en óxido nitroso y nitrógeno atmosférico, este proceso se efectúa mediante bacterias desnitrificantes.

Las transformaciones que sufre el nitrógeno después de haber entrado son: simbióticamente convirtiendo el N_2 en NH_4 y es utilizado por las plantas, o puede formar parte de la materia orgánica del suelo. Asimbióticamente forman parte de la materia orgánica, la materia orgánica si no sufre ni procesos de inmovilización o de movilización, se absorbe con minerales para formar complejos organo-minerales. Si la materia orgánica sufre transformaciones sucede lo siguiente:

Sufre una modificación (Tamhane y col., 1978): que es la transformación de los compuestos nitrogenados orgánicos en amoníaco, por la acción de hongos y bacterias (Sutton y Harmon, 1976), después sufre la nitrificación que es un proceso aerobio que implica la producción de nitratos a partir de sales de amonio, esto lo realizan bacterias autotróficas (Sutton y Harmon, 1976).

El proceso de la amonificación y nitrificación se conoce con el nombre de mineralización y al proceso inverso se le llama inmovilización.

PAPEL QUE DESEMPEÑA EL NITROGENO EN LAS PLANTAS

Raras veces los suelos contienen suficiente nitrógeno para soportar una producción vegetal máxima. El color verde pálido es el mejor indicador de la deficiencia de dicho elemento, y como consecuencia es el síntoma clásico de insuficiencia nutricional en las plantas (Thompson y Troeh, 1980).

Las plantas absorben iones tanto de amonio como de nitrato (Cooke, 1975), es decir, que las plantas no pueden tomar el nitrógeno en la forma como se encuentra en la atmósfera, sino que necesariamente debe haber una conversión, y ésto es algo limitante, ya que es un elemento importante.

La disponibilidad de dicho elemento es de gran importancia para las plantas, este elemento es utilizado en la síntesis de proteínas, y de otros compuestos orgánicos vegetales como: azúcares, ácidos nucleicos, enzimas, para poder efectuar todas sus funciones (Fassbender, 1978).

Además es necesario este elemento para realizar la fotosíntesis y otros procesos más, es decir, es un elemento indispensable para el metabolismo de las plantas (Tisdale y Nelson, 1982).

Para facilitar que los vegetales tengan la disponibilidad del elemento en la forma que lo pueden utilizar, éste debe ser fijado, lo cual puede realizarse por diversos cam

nos.

DIFERENTES TIPOS DE FIJACION DEL NITROGENO.

La atmósfera contiene alrededor de un 78% de nitrógeno pero no puede ser utilizado por los vegetales superiores si previamente no se combina con hidrógeno, carbono u oxígeno (Thompson y Troeh, 1980). El proceso de combinación del nitrógeno con otro elemento recibe el nombre de fijación de nitrógeno.

Los cambios principales por los que el nitrógeno es convertido a formas utilizables por las plantas superiores son:

1) Fijación simbiótica: resulta de la asociación microorganismo-planta vascularizada, en la que las dos especies viven juntas y resultan beneficiadas (Lender-Delavavit le Moigne, 1982). Entre este tipo de fijación encontramos:

HUESPED

HOSPEDERO

Anabaena-Azolla

Helechos acuáticos del género Azolla.

Frankia-Alnus

Arbol del género Alnus

Frankia-Myricae

Planta leñosa del género Myricae

Rhizobium-Leguminosae

Leguminosas

2) Fijación por microorganismos que viven libremente en el suelo: según Alexander (1980), se pueden clasificar en:

a) Bacterias heterotróficas como: Achromobacter, Azotobacter, Azotomonas, Clostridium, Pseudomonas.

b) Bacterias quimioautotrofas como: Methanobacillus, Omelianskii.

c) Algas azul verdes: Anabaena, Colotrix, Anabaenopsis, Aulosira, Nostoc, Tolypothrix y Cylindrospermus.

d) Bacterias fotosintéticas: Chlorobium, Chromatium, Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum.

y quizás por microorganismos que viven en las hojas de plantas tropicales como: Beijerinckia, que es una bacteria heterotrófica.

3) Fijación por las descargas eléctricas atmosféricas.

4) Fijación como amoníaco, NO_3^- ó CN_2^- por algunos de los procesos industriales para la fabricación de los fertilizantes nitrogenados sintéticos.

Entre los aspectos más importantes entre la fijación simbiótica tenemos:

a) La dependencia planta microorganismo; el beneficio que obtienen al vivir juntas.

b) Según Russell (1972), es que la fijación simbiótica posee hemoglobina llamada por otros autores leghemoglobina tal como Alexander (1980)

EL GENERO Rhizobium

DESCRIPCION

El género Rhizobium comprende bacterias gram negativas que no forman esporas, son bacilos aerobios de 0.5 a 0.9 μm de diámetro y de 1.2 a 3.0 μm de largo, generalmente son móviles y utilizan carbohidratos, a veces acumulan ácido pero nunca gas.

Los rizobios crecen fácilmente en medios de cultivo que contienen fuentes de carbono tales como: manitol y glucosa además de otros compuestos como amonio o nitrato, vitamina B, tiamina y ácido pantoténico, requieren también de cobalto, son organismos saprófitos (Alexander 1980).

HABITAT

Los rizobios poseen dos habitats distintas:

1) Cuando los miembros del género Rhizobium causan la formación de nódulos en las leguminosas y participan en la fijación del nitrógeno atmosférico, estos viven en simbiosis en

las raíces de dichas plantas o pueden ser inoculadas con el fin anteriormente escrito (Alexander 1980), las ventajas - que poseen los rizobios en este caso son:

a) No tienen que compartir con otros microorganismos para poder sobrevivir.

b) No son atacados por protozoarios.

c) No hay competencia por nutrientes.

d) No hay competencia por espacio.

2) Cuando los rizobios viven y mantienen su viabilidad en el suelo, aún en ausencia de la leguminosa hospedante en particular, pueden vivir por 10 ó 20 años (Ortíz Villanueva, 1980), a menos que sean destruídos por condiciones desfavorables en el suelo como:

a) Cambios en pH

b) Cambios en temperatura

c) Desecación

d) Predación por protozoarios

e) Limitación por nutrientes

ESPECIES DE Rhizobium

Existen seis especies de Rhizobium según Alexander - (1980), las diferentes especies se distinguen entre sí por

la leguminosa a nodular, es decir, cada especie tiene especificidad de infección. Las especies de Rhizobium y la leguminosa que nodulan son:

| Huésped | Hospedero |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| <u>Rhizobium meliloti</u> | Alfalfa |
| <u>Rhizobium trifoli</u> | Trébol |
| <u>Rhizobium leguminosarum</u> | Chícharo, garbanzo, haba, lenteja |
| <u>Rhizobium phaseoli</u> | Frijol |
| <u>Rhizobium lupini</u> | Altramuz |
| <u>Rhizobium japonicum</u> | Soja |

Además de lo anterior Alexander (1980) agrega que se puede hacer una distinción razonable en cuanto al tiempo de generación:

- 1) El primer grupo es aquél que su tiempo de generación in vitro es de 2 a 4 h y producen ácido en medios de cultivo (R. meliloti, R. leguminosarum, R. phaseoli, R. trifoli).
- 2) El segundo grupo posee un tiempo de generación de 6 a 8 h y crean condiciones alcalinas en medios de cultivo, entre estos están: R. japonicum y R. lupini.

PAPEL QUE DESEMPEÑA EL Rhizobium.

Los rizobios tienen un papel importante dentro de la na

turalidad, ya que fijan nitrógeno atmosférico y lo transforman en amonio. De antemano sabemos que el atmosférico no puede ser utilizado por las plantas, pero en forma amoniacal sí lo utilizan. La relación leguminosa-Rhizobium juega este papel y directamente abastece a la leguminosa del nitrógeno que necesita para sus funciones vitales (Ortíz Villanueva, 1980).

FORMACION DE NODULOS

En el desarrollo de la estructura nodular el primer paso al parecer es la liberación de productos de excreción vegetal que son los que estimulan a la bacteria. Evidencias recientes indican que glucoproteínas (lectinas) de la superficie de las bacterias causan el enlace de éstas con la planta.

La invasión ocurre a través de los pelos radiculares (Ortíz Villanueva, 1980), que en presencia de la bacteria adecuada sufre un enroscamiento, las bacterias nodulares segregan una sustancia, probablemente ácido B indolacético (Russell, 1972), el cual ocasiona el encurvamiento del pelo radicular, es en esta región encurvada por la que la bacteria penetra en el pelo radicular. Allí se mueve dentro de ciertas células corticales de la raíz y estimula su división formándose el cordón de infección. El cordón se ramifica dentro de la porción central del nódulo en desarrollo y las bacterias son liberadas dentro del citoplasma de su simbionte para multiplicarse allí

(Alexander 1980).

Una vez liberado del cordón de infección dentro del citoplasma, el rizobio adquiere una morfología peculiar, una forma celular que se ha denominado bacteroide, los bacteroides que se encuentran dentro del nódulo están hinchados y son de forma irregular, aparentando ser una estrella.

Los nódulos poseen diferentes morfologías, dependiendo de la leguminosa, según Alexander (1980) son los siguientes:

Los nódulos de los tréboles rojos y blancos tienen forma de basto y lobulados; los nódulos de la alfalfa son ramificados y largos, en el cacahuete y en el frijol poseen una forma esférica, en el frijol terciopelado y los nódulos pueden alcanzar el tamaño de una pelota de beisbol, mientras que los nódulos de otras leguminosas tienen solo unos milímetros de diámetro.

Las leguminosas con raíces fibrosas tienen frecuentemente una mayor abundancia de nódulos que las plantas con raíces primarias bien formadas; las plantas que tienen nódulos grandes a menudo sólo tienen unos pocos, mientras que las raíces con estructuras pequeñas las tienen en cantidades mayores.

INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD

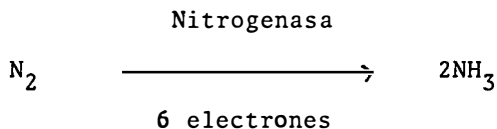
No todas las cepas de Rhizobium son capaces de invadir

plantas leguminosas, de manera que la infectividad es la capacidad de una cepa para nodular un hospedero dado. Entre las cepas infectivas, la capacidad de la bacteria de los nódulos para llevar a cabo la fijación de N_2 en conjunto con la planta varían mucho. La capacidad relativa de la asociación planta-bacteria, una vez establecida, para asimilar nitrógeno molecular se conoce como efectividad.

Las bacterias infectivas de los nódulos de las raíces producen un mayor número de nódulos que los cultivos efectivos, pero los nódulos son más pequeños en tamaño y tienden a estar más ampliamente distribuidos en el sistema radicular. Podemos concluir diciendo que no es posible que una cepa dada sea infectiva o efectiva en términos absolutos (Alexander 1980).

Fijación de nitrógeno por Rhizobium.

Según Bohinski (1978), el nombre que se le da al sistema enzimático responsable del proceso de fijación es nitrogenasa, la nitrogenasa es una enzima que cataliza la reacción de:



Hasta el momento no se conoce con exactitud el comple-

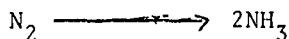
to funcionamiento del sistema de la nitrogenasa.

Los rasgos estructurales densos de la nitrogenasa indican que posee dos peptidos, dichos componentes aparte de las diferencias en tamaño y composición, difieren más significativamente en que una contiene molibdeno y hierro, y la otra sólo contiene hierro.

Otras características importantes establecidas con respecto al funcionamiento de la nitrogenasa son:

- 1) El ATP y Mg^{2+} son esenciales para la actividad. La hipótesis actual sugiere que la unión de al menos un ATP a la proteína-Fe se requieren para la transferencia de un electrón al N_2 que se puede unir a la proteína Mo-Fe.

Así se requeriría por lo menos seis ATP para la conversión completa:



- 2) Las proteínas ferredoxinas y las flavodoxinas se argumenta que son parte de una secuencia transportadora de electrones que funcionan antes del aceptor nitrogenasa.
- 3) La fuente original de los electrones es un metabolito intracelular, y varía de un organismo a otro, además un organismo puede utilizar materiales diferentes. Los organismos anaeróbicos pueden utilizar piruvato, H_2 ó formia

to. Una fuente común de los organismos aeróbicos es el NADH producido en la deshidrogenación de la glucosa 6 fosfato, isocitrato ó α -cetoglutarato.

Los nódulos de las leguminosas que metabolizan activamente el N_2 son característicamente de color rojo a causa de la presencia de una sustancia que contiene hierro conocida como leghemoglobina (Alexander 1980). Los nódulos inefectivos no poseen color rojo por carecer de dicha sustancia y como consecuencia son de color blanco.

Los nódulos contienen cantidades considerables de hemoglobina y son las únicas estructuras que la contienen en el reino vegetal (Lehninger 1980).

La hemoglobina ayuda a la fijación del nitrógeno en forma indirecta, al estimular el transporte del oxígeno a baja presión parcial hacia el nódulo, el oxígeno libre es inhibidor de la fijación del nitrógeno. La información genética para la biosíntesis de la hemoglobina nodular procede de la planta, pero el pigmento no se forma en ausencia de bacterias (Lehninger 1980).

La cantidad de nitrógeno fijado por Rhizobium depende de muchos factores (Buckman y Brady 1970; Fassbender 1978):

- Aireación del suelo
- Drenaje
- Humedad
- Ca^{++} activo

- Molibdeno, magnesio, fósforo, boro.
- pH
- Temperatura
- Sensibilidad de las leguminosas a la acidez del suelo.

Russell (1972) comenta que la necesidad de los cofactores tales como el molibdeno son indispensables ya que forman parte de las enzimas catalíticas del proceso. La fijación puede ser frenada por la presencia de nitrógeno inorgánico disponible (SARH, 1982). Cuando en el suelo existe nitrógeno mineral y está disponible para su uso por las bacterias y por la planta huésped o ambas, el nitrógeno inorgánico se utiliza en primer lugar, y el proceso de fijación funciona solamente para proporcionar la diferencia de nitrógeno que se necesite.

El promedio de fijación del nitrógeno por las leguminosas es el siguiente (Tisdale y Nelson, 1970):

Alfalfa 194 Kg/ha

En las diferentes especies de tréboles varía desde 103 hasta 179 Kg/ha.

Kudzu 107 Kg/ha

Guisante vacuno 90 kg/ha

Lespedesas 85 Kg/ha

Algarrobas 80 Kg/ha

Guisantes 72 Kg/ha

Cacahuete 42 Kg/ha

Judías 40 Kg/ha

FIJACION DE CARBONO

Ciclo del Carbono

El ciclo del carbono gira en torno al CO_2 , su fijación y regeneración del mismo.

Las plantas verdes utilizan este gas como única fuente de carbono (CO_2) y la materia carbonada sintetizada de esta manera sirve para abastecer el mundo animal como carbono orgánico preformado.

El metabolismo ocupa el papel principal en la secuencia cíclica después de la muerte de plantas o animales. Los tejidos muertos son descompuestos y transformados en células microbianas y en un amplio conjunto heterogéneo de compuestos carbonados, que se conoce como humus o fracción orgánica del suelo.

El ciclo se completa y el carbono se hace disponible nuevamente, con la descomposición final y la producción de CO_2 a partir del humus y tejidos en descomposición (Alexander 1980).

Las plantas no son los únicos organismos autotrofos, sino que existen microorganismos autotrofos y por lo tanto

también son capaces de fijar carbono, entre estos tenemos: Chlorobium, Chromatium, Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum.

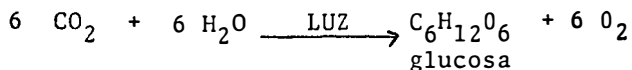
Papel en el ecosistema.

El elemento más importante en el reino biológico que sirve como piedra angular de las estructuras celulares es el carbono. Aún cuando la fuente principal del carbono es el CO₂, en la atmósfera representa el 0.03%, lo cual es muy poco, pero en los organismos es del 40 al 50% de su peso se co.

El carbono es uno de los elementos más importantes, ya que organismos autótrofos y heterótrofos se alimentan de él, ya sea en forma orgánica o inorgánica, además todos los componentes celulares poseen carbono (Alexander 1980).

Fijación de carbono por organismos autótrofos.

Fotosíntesis es la conversión del CO₂ a compuestos orgánicos en presencia de la luz, el producto inmediato es azúcar (Ray 1981).



La fotosíntesis solo puede efectuarse en presencia de luz y presenta dos aspectos básicos:

- 1) La conversión de la energía luminosa a energía química.
- 2) La transformación del CO_2 a compuestos orgánicos, la cual se denomina fijación del CO_2 (Ray 1981).

La fotosíntesis consiste en dos procesos separados, pero relacionados, las llamadas reacciones luminosas y reacciones oscuras, siendo la última absolutamente dependiente de la primera. En la reacción luminosa, la energía solar es captada por los fotosistemas que contienen clorofila, compartalizados dentro de las membranas de las láminas de los tilacoides, lo que resulta es la formación de un compuesto reductor, el NADPH, y energía en forma de ATP. La fuente última de poder reductor es el H_2O . En la reacción oscura o también conocida como ciclo de Calvin, se produce en el estroma de los cloroplastos, el ATP y el NADPH se utilizan en la asimilación enzimática del CO_2 en compuestos orgánicos, de la que la ribulosa, 5 difosfato es la molécula aceptora principal. La oxidación de los carbohidratos por los organismos aeróbicos no fotosintetizadores completa la reacción bioquímica principal en nuestra biosfera (Bohinski 1978).

Fuchs y Stupperich (1983) comentan que el ciclo de Calvin es supuestamente la forma universal de fijación de carbono en plantas y microorganismos autótrofos. Sin embargo es cierto que algunas bacterias anaerobias estrictas crecen con CO_2 como fuente única de carbono. Existen tres formas

Hace algunos años que se conoce que algunos organismos heterotróficos requieren de CO_2 para su crecimiento, Valley y Rettger (1927), examinaron 100 organismos diferentes y concluyeron que el CO_2 era esencial para el crecimiento de estos en todos los casos.

Lowe y Evans en 1962 realizaron experimentos con 5 especies de Rhizobium y ninguna de las especies crecieron cuando el aire estaba libre de CO_2 , pero se obtuvo un crecimiento rápido cuando este poseía CO_2 . Estos resultados indicaron que el efecto del CO_2 fue directo. Además trataron de reemplazar el CO_2 con diferentes compuestos orgánicos sin éxito. Con estos antecedentes vemos que hace tiempo que se conoce la importancia del CO_2 en organismos heterotrófos para su crecimiento y desarrollo y que aparentemente ningún compuesto puede ser capaz de sustituir el efecto del CO_2 en el crecimiento de estos microorganismos. Además estos autores realizaron análisis en extractos libres de células de R. japonicum encontrando actividad de fosfoenol piruvato carboxilasa y propionil CoA carboxilasa, la cual es una evidencia de que algunas cepas de Rhizobium poseen la capacidad de fijar CO_2 , ya que estas enzimas solo se encuentran en organismos capaces de fijar CO_2 .

Vance y col., (1983) realizaron experimentos con nódulos de alfalfa y sus resultados demostraron que la fijación de CO_2 está correlacionada con la fijación de nitrógeno.

no en nódulos de alfalfa, de esta forma podemos pensar que la cantidad de nitrógeno que puedan fijar los rizobios es proporcional a la capacidad que tengan algunas cepas para la fijación de CO_2 .

Experimentos realizados por Jackson y Coleman en 1959 con extractos de raíces de frijol demostraron que éstos son capaces de fijar grandes cantidades de CO_2 a través de la carboxilación de fosfoenol piruvato. Además que la cantidad de CO_2 fijada está estrechamente relacionada con la producción de fósforo inorgánico. El crecimiento y las reacciones de carboxilación están asociadas con el ciclo de - Krebs, con esto se puede concluir que el fosfoenol piruvato carboxilasa es la enzima responsable de la fijación de CO_2 en estas bacterias.

Con lo anteriormente dicho podemos mostrar que hay suficientes bases para poder decir que existen algunas cepas de Rhizobium capaces de fijar CO_2 .

METABOLISMO DE MICROORGANISMOS

CLASIFICACION EN CUANTO AL METABOLISMO DE LOS MICROORGANISMOS.

Las células pueden dividirse en dos grandes grupos según la forma química del carbono que precisan tomar del entorno:

Las células autotrofas pueden utilizar el CO_2 como fuente única de carbono y construir a partir de él los esqueletos carbonados de todas sus biomoléculas orgánicas.

Las células heterotrofas no pueden emplear el CO_2 y tienen que obtener el carbono de su entorno en una forma reducida, relativamente compleja tal como la glucosa.

Las células fotosintéticas y algunas bacterias son autotróficas, mientras que los animales superiores y la mayor parte de microorganismos son heterotrofos.

Los organismos heterotrofos pueden dividirse en:

1. Aerobios que viven en presencia de oxígeno.
2. Anaerobios que viven en ausencia de oxígeno.
3. Facultativos que pueden vivir con o sin oxígeno, (Lehninger 1980).

Ville (1978) por su parte clasifica a los organismos autotrofos de la siguiente manera:

Fotosintéticos: como plantas verdes y bacterias púrpuras, que obtienen su energía para sintetizar moléculas orgánicas de la luz solar, ejemplo: Chlorobium, Chromatiu, Rhodomicrobium.

Quimiosintéticas: unas cuantas bacterias que obtienen su energía necesaria por la oxidación de sustancias inorgánicas, ejemplo: Nitrosomas.

Los heterotrofos los divide según su tipo de nutrición en:

Saprófitos: que se alimentan de animales o vegetales en descomposición o masas de productos de deshecho de los mismos, ejemplo: Rhizobium, Clostridium, Pseudomonas, Bacillus.

Parásitos: viven dentro o sobre un animal o vegetal y obtienen de él su alimento, ejemplo: Fusarium, Phytium, Rhiztonia, Verticillium.

Ventajas en organismos autotrofos en relación a los heterotrofos, tanto metabólicas como ambientales.

Los organismos autotrofos son relativamente autosuficientes, mientras que los heterotrofos no, ya que poseen necesidades de carbono en forma más elaborada, y deben subsistir a partir de los productos formados por otros organismos (Lehninger 1980). Por su parte los autotrofos sólo necesitan agua, CO_2 , sales inorgánicas y una fuente de energía, los heterotrofos en estas condiciones no podrían vivir.

Los autotrofos poseen menor competencia tanto por espacio como por el alimento y los heterotrofos tienen mayor competencia.

HIPOTESIS

Existen cepas de Rhizobium phaseoli capaces de utilizar HCO_3 como fuente de carbono.

OBJETIVOS

Los logros que se pretenden alcanzar con la realización del presente trabajo son:

1. Determinar el crecimiento, con fuentes orgánicas (glucosa y manitol) e inorgánicas (HCO_3^-) de carbono, de cinco cepas de Rhizobium phaseoli.
2. Comparar el crecimiento observado, dentro de una misma cepa, con las diferentes fuentes de carbono.
3. Determinar si existen diferencias en los comportamientos mostrados por las diferentes cepas.
4. Apoyar la evidencia experimental de la capacidad de algunas cepas de Rhizobium phaseoli de poder utilizar carbono inorgánico con el fin de hacer más eficiente la selección de cepas para la fabricación de inoculantes comerciales.

MATERIAL Y METODOS

Con el fin de observar el crecimiento de cepas de Rhizobium phaseoli bajo diferentes fuentes de carbono, se decidió realizar experimentos de laboratorio, en los cuales se evaluó el crecimiento de cinco cepas de R. phaseoli bajo diferentes fuentes de carbono a diferentes concentraciones, comparando así los crecimientos observados entre las cepas y determinar si existían diferencias tanto entre ellas como en una sola cepa.

Las cepas estudiadas de Rhizobium phaseoli fueron proporcionadas por el laboratorio de Ecología Microbiana del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato.

Se utilizaron cinco cepas diferentes, las cuales se aislaron de suelos con diferentes características como son: pH, textura y de plantas de frijol de diferente hábito de crecimiento (guía, semiguía y mata) y se denominaron:

CIEA 01: Se aisló de un vertisol pélico de Salvatierra, Gto. El suelo era ligeramente alcalino y de textura arcillosa, los nódulos se aislaron de la variedad apetito morado.

CIEA 02: Se aisló de un vertisol pélico de San Luis de la Paz, Gto. El suelo era ligeramente alcalino y de

textura arcillosa, los nódulos fueron aislados de la variedad canario 107.

CIEA 03: Se aisló de un vertisol pélico de Apasco el Alto Gto. El suelo ligeramente alcalino y de textura arcillosa, los nódulos se aislaron de la variedad flor de mayo.

CIEA 04: Se aisló de un entisol éutrico, el suelo ligeramente ácido 6-6.5, la textura del suelo es franca, se aisló de Romita, Gto., del frijol peruano.

CIEA 05: Se aisló de Zacatecas, el tipo de suelo es castaño zen, el suelo tenía una textura franca, pH 7.2 - prácticamente neutro, se aisló de la variedad frijol bayo.

Las cepas anteriores se crecieron en placas por triplicado, en medio extracto levadura manitol agar (ELMA) el cual fue esterilizado en autoclave a 15 libras de presión, por 15 minutos, se inocularon y se colocaron sensidicos de la marca Bigaux Diagnóstica S.A. que contenían los siguientes antibióticos, para determinar el patrón de resistencia de las cepas a los mismos:

Ampicilina (Ampi) 10 μ g

Eritromicina (Eritro) 15 μ g

Kanamicina (Kana) 30 μ g

Penicilina (Peni) 10 U

Estreptomicina (Strep) 10 μg
 Tetraciclina (Tetra) 30 μg
 Cloranfenicol (Cloro) 30 μg
 Acido Nalidixico (Nali) 30 μg
 Gentamicina (Genta) 10 μg
 Sulfametoxaxol - Trimetropin (St) 25 μg

Las placas se incubaron a 29°C durante 24 h, después de lo cual se registraron 5 patrones diferentes a la resistencia de antibióticos, confirmando así que las cepas proporcionadas poseían características diferentes.

Una vez confirmado que se trata de organismos diferentes, las cepas se pasaron a tubos inclinados con medio ELMA sin azul de bromotimol, para mantener el cultivo puro y que sirviera de cepario. Los tubos se incubaron a 29°C de 24 a 48 h y después se mantuvieron a 4°C.

El diseño experimental empleado fue completamente aleatorio con 35 tratamientos y 3 repeticiones. Los tratamientos estuvieron dados por un factorial completo 5X7 en donde los factores en estudio fueron: cepas de Rhizobium phaseoli (5) y tratamientos de fuentes de carbono (7) los cuales se describen a continuación:

- 1) Medio extracto levadura 4 ml + glucosa (10 mM)
- 2) Medio extracto levadura 4 ml + manitol (10 mM)
- 3) Medio extracto levadura 4 ml + NaHCO_3 (1 mM)
- 4) Medio extracto levadura 4 ml + NaHCO_3 (3 mM)

- 5) Medio extracto levadura 4 ml + NaHCO_3 (5 mM)
- 6) Medio extracto levadura 4 ml + NaHCO_3 (10 mM)
- 7) Medio extracto levadura 4 ml + NaHCO_3 (20 mM)

La forma en que se realizó dicho experimento fue el siguiente:

Cada cepa se creció en 4 ml del medio Extracto levadura manitol (ELM) completo, esterilizado en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos, en tubos de ensayo con tapón de rosca, colocándose en baño metabólico de la marca American Optical modelo 02156, a 29°C y 45 rpm de 48 a 72 h.

Esto se realizó con el fin de tener la cepa en cultivo líquido (caldo) y de aquí tomarla para la siguiente etapa del experimento.

Se tomaron 21 tubos de ensayo a los cuáles se les agregó 4 ml del medio basal (Extracto levadura, EL) esterilizado en autoclave, sin fuente de carbono, ya que éste se le añadió de acuerdo al tratamiento correspondiente más 0.1 ml del cultivo líquido (ELM).

Los tubos se incubaron en baño metabólico a 29°C y 45 rpm realizándose lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 550 mm en un espectofotómetro Coleman.

Las lecturas se realizaron a las 0,2,4,6,12,24,48 y 72 h con el fin de observar la tasa generacional de cada cepa,-

así como el crecimiento de las mismas en las diferentes condiciones.

Los resultados se sometieron a análisis de varianza, para determinar las diferencias entre los tratamientos y conocer la variabilidad entre ellos. Se realizaron además gráficas con el objeto de conocer la tasa de generación y comportamiento de las cepas bajo los diferentes tratamientos.

Medio 1) COMPOSICION DEL MEDIO EXTRACTO LEVADURA MANITOL AGAR
(ELMA):

Para cultivo en caja.

pH 7

| | |
|-----------------------------|---------|
| Manitol..... | 10 g/l |
| K_2HPO_4 | 0.5 g/l |
| $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0.2 g/l |
| NaCl | 0.1 g/l |
| Extracto de levadura | 1.0 g/l |
| Agar bacteriológico | 21 g/l |
| $CaCO_3$ | 3 g/l |

H₂O destilada 1 litro

Azúl de bromotimol 0.5% ml/l como indicador de crecimiento en caja.

Medio 2) EXTRACTO LEVADURA MANITOL (ELM) PARA CRECIMIENTO
EN LIQUIDO.

pH 7

| | |
|-----------------------------|---------|
| Manitol | 10 g/l |
| K_2HPO_4 | 0.5 g/l |
| $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0.2 g/l |
| Extracto de levadura | 1.0 g/l |
| H_2O destilada | 1 litro |

Medio 3) EXTRACTO LEVADURA (EL)

pH 7

| | |
|-----------------------------|---------|
| K_2HPO_4 | 0.5 g/l |
| $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0.2 g/l |
| NaCl | 0.1 g/l |
| Extracto de levadura | 1.0 g/l |
| H_2O destilada | 1 litro |

PREPARACION DE LA SOLUCION DE $NaHCO_3$

1) Se pesaron 0.84 g de $NaHCO_3$ y se diluyeron a 100 ml en un matraz aforado con agua destilada y se esterilizó por filtración. Esta es la solución matriz.

*) 1 ml de la solución matriz para el tratamiento # 7 que contiene una concentración 20 mM.

*) 0.5 ml de la solución matriz + 0.5 ml de agua destilada para el tratamiento # 6 que contiene una concentración de 10 mM.

2) Se pasó 25 ml de la solución anterior y se aforó a 100 ml.

- *) 1 ml de dicha solución para el tratamiento # 5 para obtener una concentración de 5 mM.
- *) 0.6 ml de la solución + 0.4 ml de agua destilada para el tratamiento # 4 para obtener una concentración 3mM.
- *) 0.2 ml de la solución + 0.8 del agua destilada para el tratamiento # 3 para obtener una concentración mM.

SOLUCION DE GLUCOSA

Se pesó 0.900 g de glucosa y se aforó a 100 ml.

Se tomó 1 ml de la solución para una concentración de 10 mM.

SOLUCION DE MANITOL

Se pesó 0.91085 g de manitol y se aforó a 100 ml con agua destilada, se tomó 1 ml de la solución para la concentración 10 mM.

Las soluciones de glucosa y manitol utilizadas se esterilizaron en autoclave 15 minutos a 15 libras de presión.

La solución de NaHCO_3 fue esterilizada por filtración, a través de membranas Millipore con poro de $0.40 \mu\text{m}$ de diámetro.

RESULTADOS

A continuación se presentan los aspectos más relevantes del estudio, mostrando en primer lugar los correspondientes al crecimiento de las cepas bajo diferentes fuentes de carbono, y por último se contrastan dichos comportamientos en forma integral, contrastándolos con trabajos de otros investigadores.

Los resultados obtenidos de la resistencia a los diferentes antibióticos, de las cinco cepas estudiadas de R. phaseoli se muestran en la tabla 1.

Los resultados del crecimiento de las diferentes cepas de Rhizobium phaseoli bajo diferentes fuentes de carbono fueron los siguientes:

Los análisis de varianza realizados con los resultados obtenidos de este experimento mostraron diferencias estadísticas altamente significativas en el crecimiento de cada cepa bajo los tratamientos de carbono ensayados, ya que los valores de F calculados superaron ampliamente los valores de F al 0.05 y 0.01 de probabilidad (cuadros 1,3,5,7 y 9), además que los coeficientes de variación se mantuvieron por debajo del 20% lo que indica baja variación dentro de los tratamientos. A continuación se detalla el comportamiento de cada cepa.

Tabla 1

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS DE LAS CEPAS DE Rhizobium phaseoli

| Antibiótico | CIEA 01 | CIEA 02 | CIEA 03 | CIEA 04 | CIEA 05 |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Cloranfenicol | + | - | + | + | - |
| Acido Nalidixico | + | - | - | + | + |
| Sulfametoxazol trimetropin | + | - | + | + | - |
| Penicilina | + | - | + | + | - |
| Gentamicina | + | - | + | + | + |
| Kanamicina | + | - | - | + | + |
| Eritromicina | - | - | + | + | + |
| Tetraciclina | - | - | + | + | + |
| Ampicilina | + | + | + | + | - |
| Estreptomicina | + | - | + | - | + |

+ Resistente

- Sensible

± Poco sensible

Cepa CIEA 01

En la cepa CIEA 01 se encontró que la fuente de carbono mejor utilizada para su crecimiento fue la glucosa, ya que - su crecimiento promedio fue superior y diferente a los demás tratamientos (Cuadro 2).

El crecimiento observado con manitol, aunque fue menor y estadísticamente diferente que el mostrado con glucosa, - fue igual al observado con 5 mM de bicarbonato y si tomamos en cuenta que Alexander 1980, menciona que el manitol es un azúcar simple que es utilizado por los rizobios, se puede - concluir con ésto que esta cepa presenta una cierta capacidad de crecimiento utilizando bicarbonato como fuente de carbono.

El resto de los tratamientos tuvieron un crecimiento estadísticamente menor que los obtenidos con glucosa, manitol y 5 mM de bicarbonato, lo cual nos indica que bajo estas concentraciones el crecimiento se ve afectado significativamente. Con las concentraciones mas bajas de bicarbonato se puede pensar que son insuficientes para su crecimiento, ya que algunos autores (Robinson, 1967) mencionan que la concentración de bicarbonato en el suelo es de alrededor de 2 mM, y - las concentraciones mas altas pueden inhibir el crecimiento de esta cepa.

Para hacer más patente los resultados anteriormente des

Cuadro 1

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPa CIEA 01 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

| F.V. | G.L. | SUMA DE CUADRADOS | C.M. | F's CALCULADAS | F's DE TABLAS 0.05 | F's DE TABLAS 0.01 |
|--------------------|------|-------------------|--------|----------------|--------------------|--------------------|
| Tratamientos | 55 | 2.6288 | 0.0477 | 58.285 | | |
| Fuentes de Carbono | 6 | 0.139 | 0.0231 | 28.261 | 3.87 | 7.39 |
| Tiempo | 7 | 2.2293 | 0.3184 | 388.365 | 3.44 | 6.15 |
| Fuentes * | | | | | | |
| Tiempo | 42 | 0.2604 | 0.062 | 7.561 | 1.82 | 2.35 |
| E.E | 112 | 0.0918 | 0.0008 | | | |
| Total | 167 | 2.7207 | | | | |

Media General = 0.1594

Coefficiente de variación = 17.9661

Desviación de medias = 0.0165

SEPARACION DE MEDIAS DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 01 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

| CARBONO | FUENTES DE CARBONO | | HORA | T I E M P O | |
|--------------------------|---------------------|----------|------|---------------------|----------|
| | MEDIA | POSICION | | MEDIA | POSICION |
| Glucosa | 0.2144 [‡] | a | 24 h | 0.3119 [‡] | a |
| Manitol | 0.1856 | b | 48 h | 0.2824 | b |
| 5 mM NaHCO ₃ | 0.1636 | b c | 72 h | 0.2483 | c |
| 1 mM NaHCO ₃ | 0.1503 | c d | 12 h | 0.2474 | c |
| 3 mM NaHCO ₃ | 0.1394 | d | 6 h | 0.0726 | d |
| 20 mM NaHCO ₃ | 0.1313 | d | 4 h | 0.0411 | d e |
| 10 mM NaHCO ₃ | 0.1312 | d | 2 h | 0.0366 | e |
| | | | 0 h | 0.0345 | e |

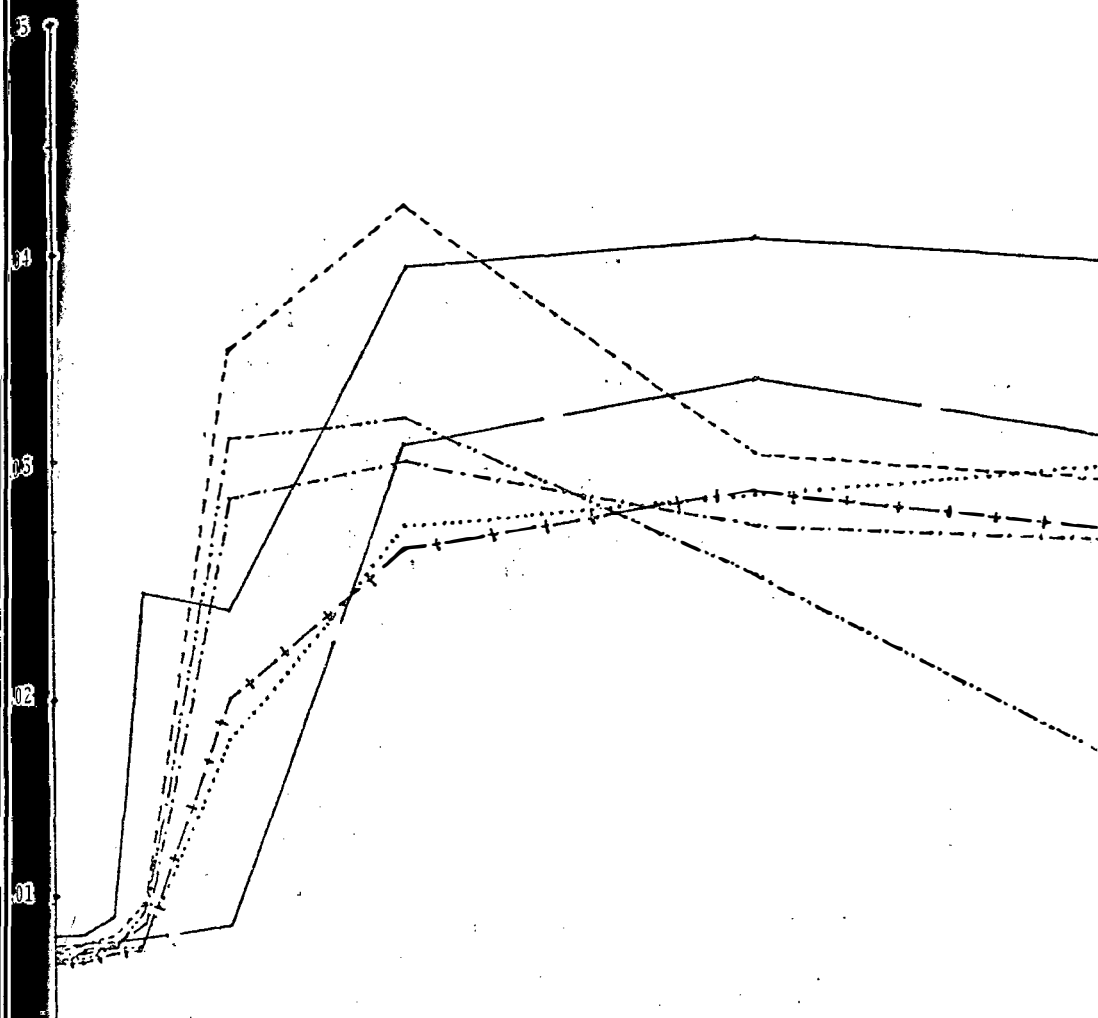
Tratamientos con la misma letra son iguales al 0.05 de probabilidad de acuerdo al método de Tukey.

‡/ Promedio de tres repeticiones.

GRAFICA 1

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA-01 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

OPACIDAD



0 2 4 6 12 24 48

TIEMPO h

Glucosa

Manitol

1 mM

3 mM

5 mM

10 mM

20 mM

critos se puede observar la gráfica No. 1 en donde se observa que el crecimiento mayor está en la curva de glucosa. Los crecimientos de manitol y 5 mM de bicarbonato son iguales entre sí, y los del resto de los tratamientos son menores que los anteriores.

Cepa CIEA 02

Los crecimientos observados en la cepa CIEA 02 fueron los siguientes:

La fuente de carbono mejor utilizada por esta cepa fue el manitol, ya que estadísticamente fue superior y diferente al resto de los tratamientos (Cuadro 4).

La fuente de carbono que le siguió para su crecimiento fue el de glucosa, el cual fue inferior al de manitol pero superior y diferente que los de bicarbonato.

Con las concentraciones 1,3 y 5 mM de bicarbonato se mostró el mismo crecimiento estadístico, aunque esta a diferencia de la cepa CIEA 01, ningún tratamiento de bicarbonato igualó a los de los azúcares simples, ya que estos fueron menores.

Las concentraciones mayores de bicarbonato estuvieron por debajo del crecimiento de los anteriormente dichos.

En la gráfica 2 se muestran las cinco curvas diferentes

CUADRO 3

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 02 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

| F.V. | G.L. | SUMA DE CUADRADOS | C.M. | F's CALCULADAS | F's DE TABLAS | |
|--------------------|------|-------------------|--------|----------------|---------------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| Tratamientos | 55 | 7.8589 | 0.1428 | 120.89 | | |
| Fuentes de Carbono | 6 | 1.0503 | 0.1750 | 148.101 | 3.87 | 7.39 |
| Tiempo | 7 | 5.5829 | 0.7975 | 674.767 | 3.44 | 6.15 |
| Fuentes* | | | | | | |
| Tiempo | 42 | 1.2256 | 0.0291 | 24.6890 | 1.82 | 2.35 |
| E.E. | 112 | 0.1323 | 0.0011 | | | |
| Total | 167 | 7.9913 | | | | |

Media General = 0.2020

Coefficiente de Variación = 17.028358

Desviación de Medias = 0.0198493323

CUADRO 4

SEPARACION DE MEDIAS DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 02 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

FUENTES DE CARBONO

| CARBONO | MEDIA | POSICION | HORA | MEDIA | POSICION |
|-------------------------|--------|----------|------|----------|----------|
| MANITOL | 0.351& | a | 48 h | 0.4321 & | a |
| GLUCOSA | 0.2707 | b | 72 h | 0.4111 | a |
| 3mM NaHCO ₃ | 0.1855 | c | 24 h | 0.4038 | a |
| 5mM NaHCO ₃ | 0.1855 | c | 12 h | 0.2650 | b |
| 1mM NaHCO ₃ | 0.1829 | c | 6 h | 0.0362 | c |
| 10mM NaHCO ₃ | 0.1508 | d | 4 h | 0.0313 | c |
| 20mM NaHCO ₃ | 0.0870 | e | 2 h | 0.0196 | c |
| | | | 0 h | 0.0170 | c |

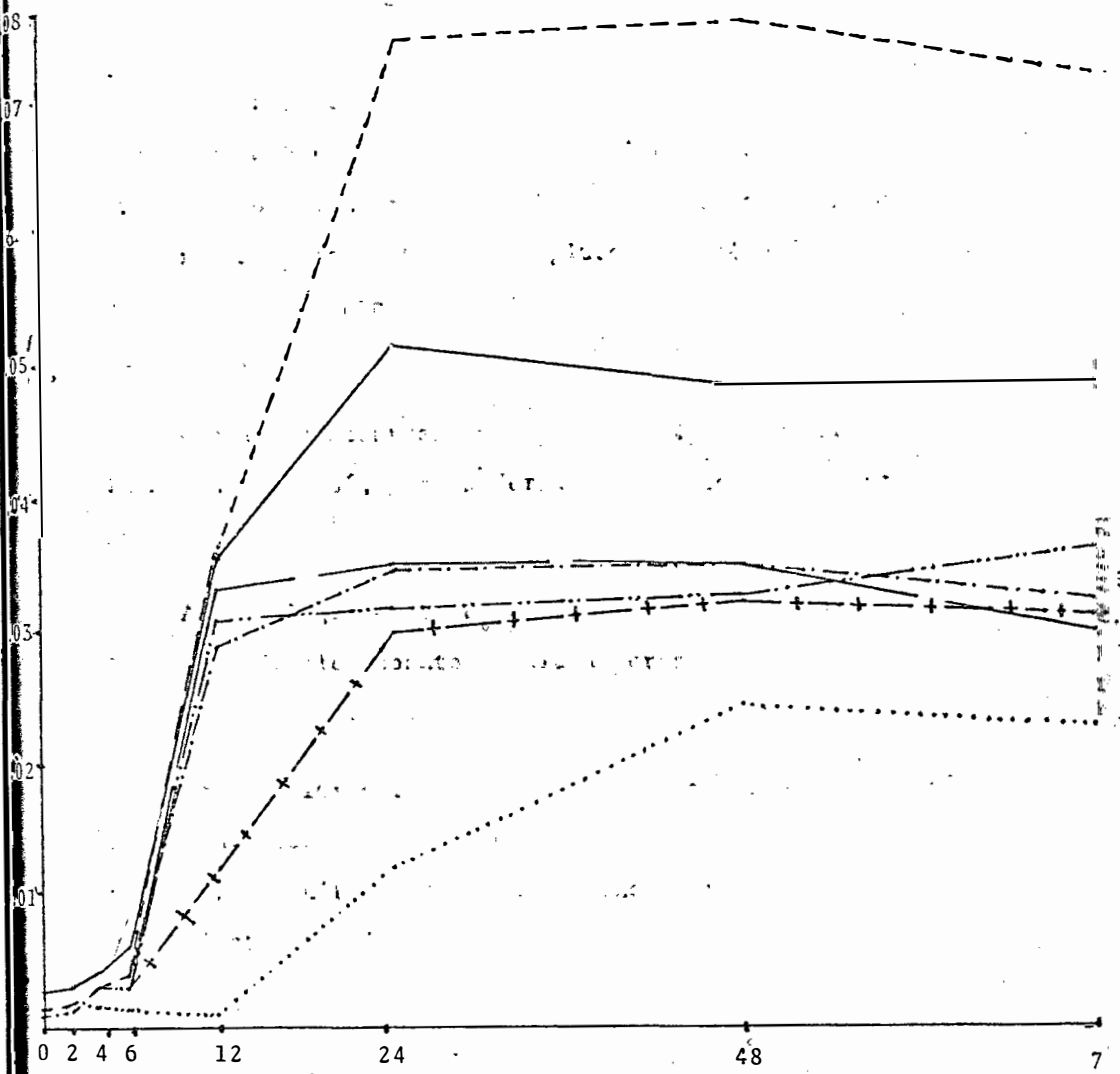
Tratamientos con la misma letra son iguales al 0.05 de probabilidad de acuerdo al método de Tukey.

&/ Promedio de tres repeticiones

GRAFICA 2

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 02 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

OPORBANCIA



TIEMPO h
Glucosa
Manitol
1 mM

3 mM
5 mM
10 mM
20 mM

la de manitol que fue la mayor, siguiendo la de glucosa y los tres grupos de bicarbonato al final.

Cepa CIEA 03

Los crecimientos observados en esta cepa fueron similares a los observados en la cepa CIEA 02, ésto es, el mayor crecimiento obtenido fue en el tratamiento con manitol, el cual fue superior a todos, la glucosa le siguió siendo inferior el crecimiento que con manitol, pero mayor que con bicarbonato.

Con las concentraciones 1,3 y 5 mM de bicarbonato fue la misma entre sí, pero diferente a las demás concentraciones altas (cuadro 6).

Al igual que en la cepa CIEA 02 ninguna de las concentraciones de bicarbonato igualó al crecimiento que con los azúcares simples.

Lo anteriormente anotado se puede observar en la gráfica 3, en donde se ven las dos curvas de mayor crecimiento que fueron manitol y glucosa, y finalmente las curvas de crecimiento con bicarbonato.

Cepa CIEA 04

En la cepa CIEA 04 observamos que el mejor crecimiento

CUADRO 5

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 03 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

| F.V. | G.L. | SUMA DE CUADRADOS | C.M. | F's CALCULADAS | F's DE TABLAS | |
|------------------------|------|-------------------|--------|----------------|---------------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| Tratamientos | 55 | 7.4180 | 0.1348 | 193.919 | | |
| Fuentes de Carbono | 6 | 0.9139 | 0.1523 | 219.02 | 3.87 | 7.39 |
| Tiempo | 7 | 5.4185 | 0.7740 | 1112.959 | 3.44 | 6.15 |
| Fuentes * Tiempo | 42 | 1.0855 | 0.0258 | 37.16 | 1.82 | 2.35 |
| E.E. | 112 | 0.0778 | 0.0006 | | | |
| Total | 167 | 7.4959 | | | | |

Media General = 0.2002

Coefficiente de variación = 13.172222

Desviación de Medias = 0.0152262

CUADRO 6

SEPARACION DE MEDIAS DE ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 03
BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

| FUENTES DE CARBONO | | | | | |
|-------------------------|--------------|----------|------|--------------|----------|
| CARBONO | MEDIA | POSICION | HORA | MEDIA | POSICION |
| MANITOL | 0.3097 ξ | a | 48 h | 0.4497 ξ | a |
| GLUCOSA | 0.2830 | b | 72 h | 0.4329 | a |
| 1mM NaHCO ₃ | 0.2040 | c | 24 h | 0.3669 | b |
| 3mM NaHCO ₃ | 0.2021 | c | 12 h | 0.2241 | c |
| 5mM NaHCO ₃ | 0.1964 | c | 6 h | 0.0441 | d |
| 10mM NaHCO ₃ | 0.1166 | d | 4 h | 0.0301 | d |
| 20mM NaHCO ₃ | 0.0897 | e | 0 h | 0.0284 | d |
| | | | 2 h | 0.0260 | d |

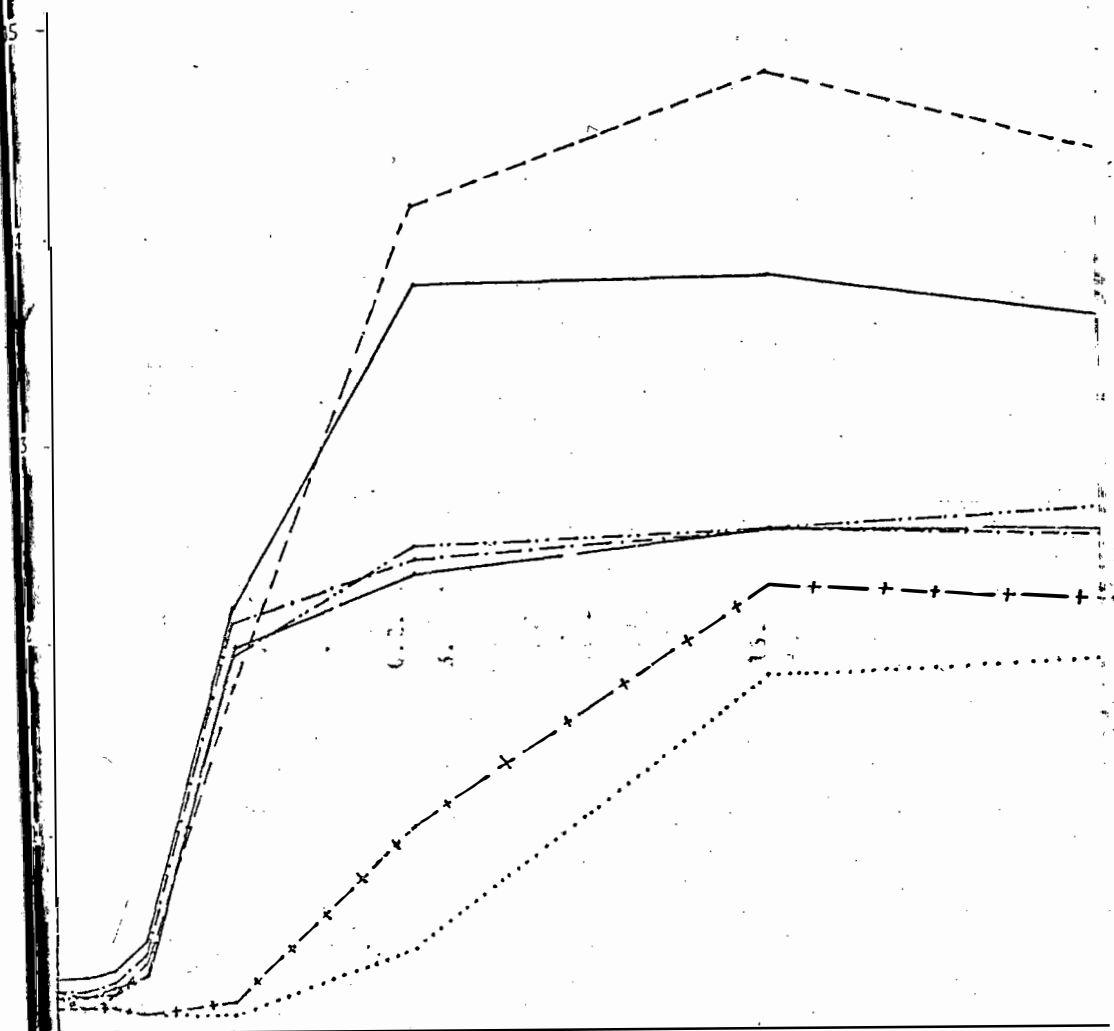
Tratamientos con la misma letra son iguales al 0.05 de probabilidad de acuerdo al método de Tukey

ξ / Promedio de tres repeticiones

GRAFICA 3

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 03 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

OPORTUNIDAD



TIEMPO h

Glucosa
Manitol
1 mM
3 mM
5 mM
10 mM

CUADRO 7

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 04 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

| F.V. | G.L. | SUMA DE CUADRADOS | C.M. | F's CALCULADAS | F's DE TABLAS | |
|------------------------|------|-------------------|--------|----------------|---------------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| Tratamientos | 55 | 3.8765 | 0.0704 | 131.652 | | |
| Fuentes de Carbono | 6 | 0.2287 | 0.0381 | 71.204 | 3.87 | 7.39 |
| Tiempo | 7 | 3.3145 | 0.4735 | 884.438 | 3.44 | 6.15 |
| Fuentes * Tiempo | 42 | 0.3333 | 0.0079 | 14.823 | 1.82 | 2.35 |
| E.E. | 112 | 0.0599 | 0.0005 | | | |
| Total | 167 | 3.9365 | | | | |

Media General = 0.1687

Coefficiente de Variación = 13.7236118

Desviación de Medias = 0.0133588303

CUADRO 8

SEPARACION DE MEDIAS DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 04 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

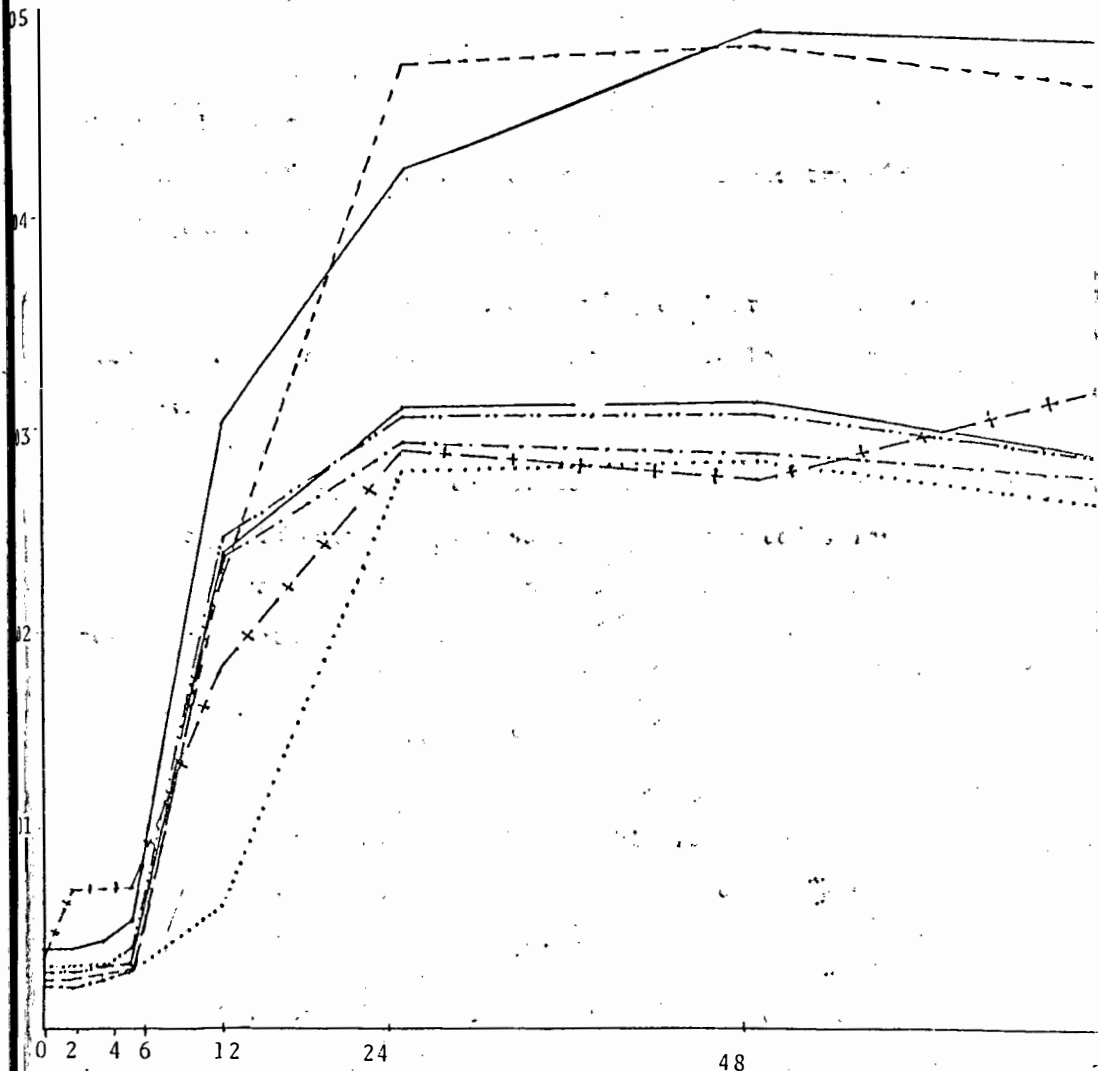
| FUENTES DE CARBONO | | | | | |
|-------------------------|--------------|----------|------|--------------|----------|
| CARBONO | MEDIA | POSICION | HORA | MEDIA | POSICION |
| GLUCOSA | 0.1725 ξ | a | 48 h | 0.3414 ξ | a |
| MANITOL | 0.2161 | b | 72 h | 0.3336 | a |
| 10mM NaHCO ₃ | 0.1582 | c | 24 h | 0.3327 | a |
| 3mM NaHCO ₃ | 0.1536 | c | 12 h | 0.2050 | b |
| 5mM NaHCO ₃ | 0.1534 | c | 6 h | 0.0398 | c |
| 1mM NaHCO ₃ | 0.1449 | c | 4 h | 0.0349 | c |
| 20mM NaHCO ₃ | 0.1225 | d | 2 h | 0.0335 | c |

Tratamientos con la misma letra son iguales al .05 de probabilidad de acuerdo al método de Tukey.

ξ / Promedio de tres repeticiones

CURVAS DE CRECIMIENTOS DE LA CEPA CIEA 04 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

OPORBANCIA



TIEMPO h

Glucosa

Manitol

1 mM

3 mM

5 mM

10 mM

que se obtuvo fue con glucosa, el que fue estadísticamente mayor a los demás tratamientos.

Con manitol hubo crecimiento menor que con glucosa, pero mayor que con bicarbonato.

Con las concentraciones 1,3,5 y 10 mM de bicarbonato se obtuvo el mismo crecimiento entre ellos, aunque fue menor que con los azúcares pero mayor que con la concentración de 20 mM (Cuadro 8).

En esta cepa tampoco se observó que el crecimiento con bicarbonato fuera similar o igualara a la de los azúcares simples.

Para demostrar lo anterior podemos observar la gráfica 4, en donde la curva de glucosa es superior a todas las demás, la curva de manitol es superior que las de los diferentes tratamientos de bicarbonato.

Cepa CIEA 05

En el crecimiento de esta cepa el efecto de glucosa y manitol fue el mismo, estadísticamente fueron superiores y diferentes a los de bicarbonato.

Con las concentraciones de 1,3,5 y 10 mM de bicarbonato fueron iguales entre sí, pero no se observó que alguna concentración igualara a la de manitol o glucosa (Cuadro 10).

En la gráfica 5 observamos que las dos curvas, la de ma nitol y glucosa son superiores a las observadas con bicarbonato, pero son iguales estadísticamente entre sí, y por debajo de ellas se encuentran las curvas con los diferentes tratamientos de bicarbonato.

CUADRO 9

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 05 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

| F.V. | G.L. | SUMA DE CUADRADOS | C.M. | F's CALCULADAS | F's DE TABLAS | |
|------------------------|------|-------------------|--------|----------------|---------------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| Tratamientos | 55 | 3.2884 | 0.0597 | 101.185 | | |
| Fuentes de Carbono | 6 | 0.1361 | 0.0226 | 38.392 | 3.87 | 7.39 |
| Tiempo | 7 | 2.9426 | 0.4203 | 711.433 | 3.44 | 6.15 |
| Fuentes * Tiempo | 42 | 0.2096 | 0.0049 | 8.448 | 1.82 | 2.35 |
| E.E. | 112 | 0.0661 | 0.0005 | | | |
| Total | 167 | 3.3546 | | | | |

Media General = 0.1262

Coefficiente Variación = 19.2677

Desviación de Medias = 0.01403

CUADRO 10

SEPARACION DE MEDIAS DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 05 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

| CARBONO | MEDIA | POSICION | HORA | MEDIA | POSICION |
|-------------------------|---------|----------|------|---------|----------|
| GLUCOSA | 0.1725& | a | 48 h | 0.3142& | a |
| MANITOL | 0.1657 | a | 24 h | 0.3008 | a |
| 5mM NaHCO ₃ | 0.1213 | b | 72 h | 0.2659 | b |
| 1mM NaHCO ₃ | 0.1119 | b | 12 h | 0.0797 | c |
| 10mM NaHCO ₃ | 0.1102 | b c | 6 h | 0.0119 | d |
| 3mM NaHCO ₃ | 0.1092 | b c | 4 h | 0.0119 | d |
| 20mM NaHCO ₃ | 0.0915 | c | 2 h | 0.0119 | d |
| | | | 0 h | 0.0119 | d |

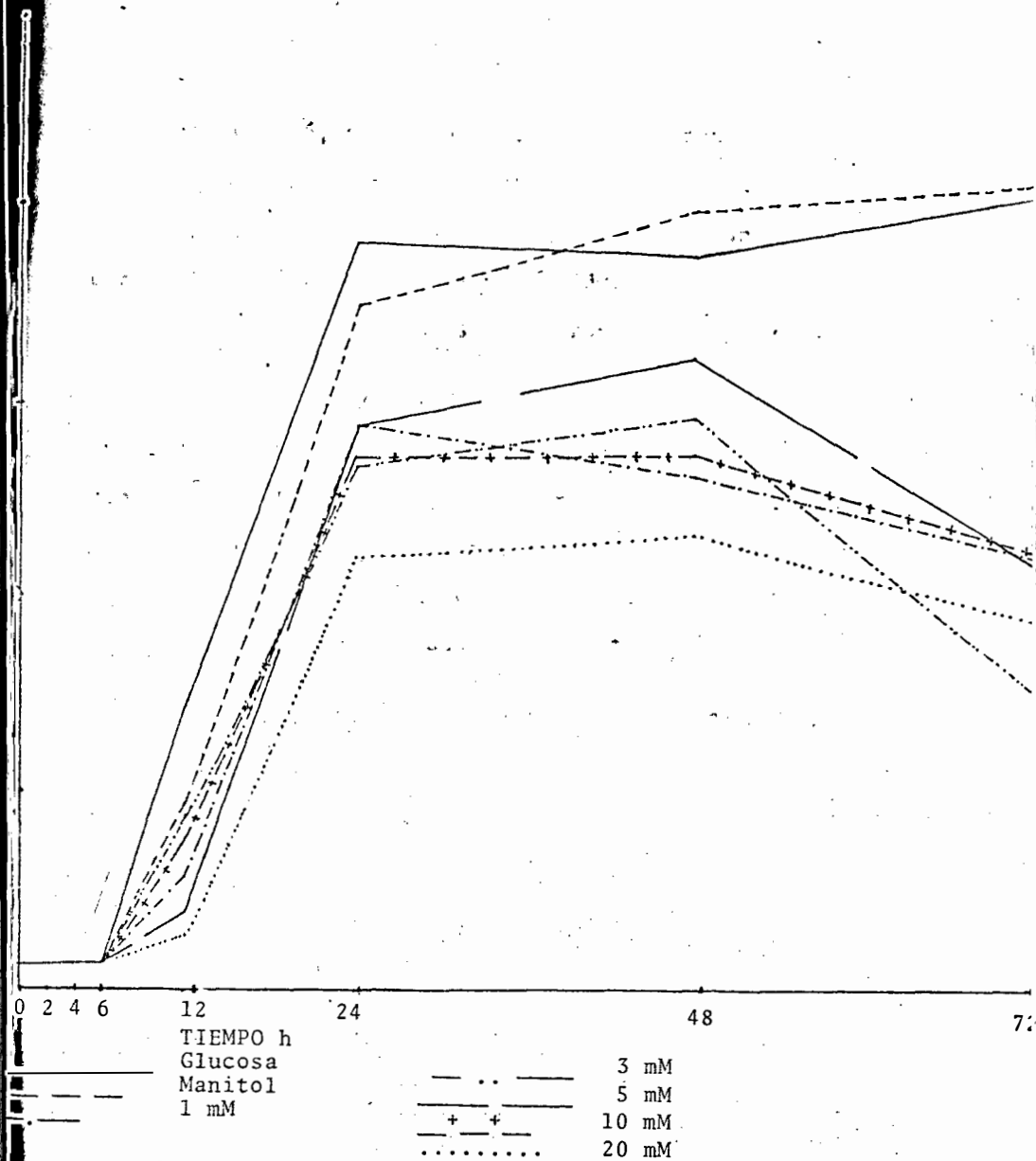
Tratamientos con la misma letra son iguales al 0.05 de probabilidad de acuerdo al método de Tukey

&/ Promedio de tres repeticiones

GRAFICA 5

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA CIEA 05 BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

BANCIA



DISCUSION

En base a los resultados anteriormente descritos, se aprecian diferencias en cuanto al comportamiento de cada cepa.

Como se vió, el comportamiento de la cepa CIEA 01 fue completamente diferente al resto de las otras cepas, ya que ésta creció estadísticamente igual con bicarbonato que con uno de los azúcares simples utilizados por los rizobios, ninguna de las cepas restantes mostraron esta capacidad.

En las cepas 02, 03, 04 y 05 aunque no crecieron igual que con manitol y glucosa, se observó que con las concentraciones bajas (1,3 y 5 mM) de bicarbonato tuvieron un crecimiento similar entre ellas y con las concentraciones altas (10 y 20 mM) de bicarbonato el crecimiento en todas las cepas fueron muy bajas y poco significativas.

Se habla de concentraciones altas y bajas de bicarbonato que influyen de alguna manera el crecimiento de los rizobios, pero es importante destacar la concentración del mismo que existe generalmente en el suelo.

Como sabemos el CO_2 cuando se disuelve con el agua forma H_2CO_3 y ésto es en proporción directa a la concentración de CO_2 en el aire circundante.

En base a ésto y a estudios hechos por Robinson (1967)

indican que al iniciarse una cosecha la concentración de HCO_3^- en el suelo es de alrededor de 83 ppm que equivalen a 1.36 mM de HCO_3^- por Kg de suelo. Al terminar la cosecha, la concentración se eleva a unas 155 ppm lo que equivale a 1.98 mM de HCO_3^- por Kg de suelo.

En el rango de estas concentraciones la cepa CIEA 01 crece al igual que con manitol, lo cual nos indica que esta cepa podría crecer perfectamente en estas condiciones sin que exista materia orgánica de la cual pudiera alimentarse.

La diferencia de concentración de HCO_3^- al inicio y al término de la cosecha se debe (Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio 1980) a que el CO_2 en el suelo aumenta por los productos de deshecho de plantas y microorganismos.

Cuando mencionamos los efectos de las altas concentraciones de HCO_3^- y el bajo crecimiento de los rizobios se puede pensar que es afectado porque las concentraciones elevadas afectaron el metabolismo de las bacterias y a ésto se le puede atribuir el poco crecimiento de Rhizobium en estas condiciones, sin embargo no se puede hablar de una mortalidad porque hubo crecimiento, se puede pensar en una inhibición, pero no existen antecedentes que nos indiquen concentraciones de más de 10 mM de HCO_3^- en el suelo.

Por lo tanto como ya ha sido anotado, la cepa CIEA 01 demostró tener la capacidad de crecer tanto con azúcares sim

ples como con bicarbonato en la misma magnitud, con ésto mos tramos otra evidencia experimental mas sobre los trabajos - que han sido realizados con algunas cepas del género Rhizo-bium capaces de fijar CO_2 .

En este sentido se pueden mencionar los experimentos - que realizaron Valley y Rettger (1927), Jackson y Coleman - (1959), Lowe y Evans (1962), Vance (1983), los cuales demostraron la fijación de CO_2 por los rizobios, encontrando las enzimas características como son fosfoenol piruvato carboxilasa que poseen organismos capaces de fijar CO_2 , además cuando no había CO_2 en el aire no se obtenía crecimiento de estas cepas. En otros experimentos demostraron que la fijación de nitrógeno estaba correlacionada con la fijación de CO_2 en estas bacterias. Estos experimentos se han realizado desde hace varios años, pero nadie ha enfocado esta característica para una mejor selección de cepas.

En nuestro trabajo, la cepa que más nos llamó la atención fue la cepa CIEA 01 por su comportamiento dentro del experimento ya que esta cepa creció muy rápido, sus colonias - fueron grandes y abundantes, mientras que las demás cepas como la CIEA 05 tenía colonias pequeñas y fueron lentas para - crecer, en relación a la cepa CIEA 01. Esta cepa además de - tener la capacidad para utilizar bicarbonato, mostró una - gran resistencia a cambios de pH y temperatura, ya que no importaba si el medio de cultivo estuviera ácido o alcalino. -

Si además tomamos en cuenta que las cepas con las que se realizó el experimento fueron de crecimiento rápido, infectivas y efectivas (parámetros dados por CINVESTAV) debieran tomarse en cuenta para otros experimentos posteriores como sobrevivencia en suelo.

Con lo anteriormente expuesto sobre la cepa CIEA 01 podemos apreciar una gran ventaja, que no necesita materia orgánica para su crecimiento. Ya que los suelos de México son bajos en materia orgánica (2% aproximadamente) limitan el desarrollo de estas bacterias, por lo que cepas como las CIEA 01 serían útiles en nuestro país.

Como sabemos, para la selección de cepas de Rhizobium se ha tomado en cuenta solamente la infectividad y la efectividad pero con el experimento anterior y tomando en cuenta los resultados obtenidos, podemos observar que existen algunas cepas con la capacidad de tomar carbono inorgánico y esta capacidad debiera, además de las anteriores, tomarse en cuenta para la selección de cepas, ya que no sería una limitante para el crecimiento de rizobios en suelos con materia orgánica escasa.

CONCLUSIONES

1. Las cepas de Rhizobium phaseoli estudiadas utilizaron diferentes fuentes de carbono para su crecimiento óptimo.
 - a) La cepa CIEA 01 creció en la misma proporción con 5 mM de bicarbonato y 10 mM de manitol.
 - b) Las cepas CIEA 02 y 03 crecieron mejor con manitol 10 mM.
 - c) La cepa CIEA 04 obtuvo mayor crecimiento con glucosa 10 mM.
 - d) La cepa CIEA 05 creció en la misma magnitud con manitol 10 mM y glucosa 10 mM.
2. La cepa CIEA 01 de Rhizobium phaseoli fue la única que mostró capacidad de crecer en condiciones óptimas con bicarbonato como fuente de carbono.
3. Las cepas CIEA 02, 03, 04 y 05 no fueron capaces de utilizar bicarbonato para un crecimiento óptimo.
4. En una misma cepa existieron diferencias en cuanto al crecimiento, en función de la fuente de carbono y la concentración de la misma.
5. Cepas de Rhizobium con capacidad de utilizar bicarbonato serían útiles para mejorar los inoculantes utilizados en los diferentes suelos dedicados a la Agricultura.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor. México. p. 240-250, 308-351.
- 2) Allen, L.H., y col., 1971. Plant response to carbon dioxide. Enrichment Under Field Conditions: A simulation. Science, 173: 256-258.
- 3) Bañados, L.L. y Fernández, W.L., 1954. Nodulation among the leguminosae. The Philippine Agriculturist p. 529-533.
- 4) Bohinski, H. 1978. Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano. España. p. 476-478, 536-538.
- 5) Buckman, H.O. y Brady, N.C., 1970. Naturaleza y propiedades de los suelos. Montaner y Simons editores. España p. 426-449.
- 6) Cooke, G.W. 1975. Fertilización para rendimientos máximos. CECOSA. México. p. 79-92.
- 7) Fassbender, H.W. 1978. Química de los suelos con énfasis en suelos de América Latina. Editorial IICA. Sn. José - Costa Rica. p. 221-262.
- 8) Fuchs, G y Stupperich, E. 1983. CO₂ Fixation pathways in bacteria. Phisiol. Veg. 21: 845-854
- 9) Gilbert W. Robinson, 1967. Los suelos, ediciones Omega, S.A., Barcelona. p: 36-46.
- 10) Greenwood, D.J. 1970. Distribution of carbon dioxide in the aqueous phase of aerobic soil. J. Soil. Sci. 21:314-329.

- 11) Jackson, W.A. y Coleman, N.T., 1959. Fixation of carbon dioxide by plant roots through phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant and soil*. 11:1-15.
- 12) Lehninger, A. 1980. *Bioquímica*. Editorial Omega, México, p. 1130-1134.
- 13) Lender-Delavavit, Le Moigne. 1982. *Diccionario de Biología*. Grijalbo, referencia. Francia.
- 14) Lowe, R.H. y Evans, H.J. 1962. Carbon dioxide requirement for growth of legume nodule bacteria. *Soil Sci.* 94: 351-356.
- 15) Ortíz Villanueva, B. y Ortíz Solorio, C. 1980. *Edafología*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. p. 116-133.
- 16) Peñaloza, A.V. y Villarreal, E.I. 1986. Caracterización química de la peptidoglicana de paredes celulares de Rhizobium y Bradyrhizobium, *Rev. Lat-amer-Microbiol.* 28:133-137.
- 17) Ray, P.M. 1981. *La planta viviente*. CECSA. México, p. 54.
- 18) Russell, E.J. y Russell, E.W. 1972. *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas*. Edición Revolucionaria Cuba. p. 343-393.
- 19) SARH 1982. *La materia orgánica en el suelo*. SARH. México. p. 88
- 20) Stotzky, G. y Groos, R.D. 1965. Effect of high CO_2 low O_2 tensions on the soil microbiota. *Can J. Microbiol.* 11:853-867.

- 21) Sutton, B. y Harmon, P. 1976. Fundamentos de Ecología. Limusa. México p. 142-148.
- 22) Tamhane, R.V. y col., 1978. Suelos su química y su fertilidad en zonas tropicales. Diana. México. p. 248-267.
- 23) Thompson, L.M. y Troeh, F.R. 1980. Los suelos y su fertilidad. Editorial Reverté. España. p. 299-327.
- 24) Tisdale, S.L. y Nelson, W.L. 1982. Fertilidad de los suelos y fertilizantes. Editorial UTEHA, México, p. 138-201.
- 25) Vance, C.P. y col. 1983, Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. I. Association with nitrogen fixation and incorporation into aminoacids. Plant Physiol. 72: 469-473.
- 26) Ville, C.A. 1978. Biología. Interamericana. México. p. 112-119.
- 27) Valley, G.S. y Rettger, L.F. 1927, The influence of carbon dioxide on bacteria. J. Bacteriol. 14:101-127



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Facultad de Ciencias

Expediente

Número

Srita. Adriana Vázquez Navarro
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "Crecimiento de Cepas de *Rhizobium phaseoli* bajo diferentes fuentes de Carbono" para obtener la
Licenciatura en Biología, con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido acep-
tado como Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora Galin-
do.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Diciembre 18 de 1985

El Director


Ing. Edmundo Ponce Adame.



FACULTAD
DE CIENCIAS
El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El M. en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Guadalajara, Jal., Julio 2 de 1987.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA,
Director de la Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara,
P r e s e n t e.

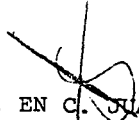
Estimado doctor Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que la señorita ADRIANA VAZQUEZ NAVARRO, Pasante de la Licenciatura en Biología, con número de registro 078329645 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulada: CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Rhizobium phaseoli* BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO, realizado en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del I.M.S.S.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviar le un cordial saludo.

Atentamente,



M. EN C. JUAN MORA GALINDO
Director de Tesis.