

00345

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**APORTE DE NITRÓGENO A  
*Pleurotus sajor-caju*  
CRECIDO EN RASTROJO MAÍZ POR  
BACTERIAS FIJADORAS DE VIDA  
LIBRE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA VEGETAL  
P R E S E N T A**

**GILBERTO MARTÍNEZ LÓPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ENRIQUETA AMORA LAZCANO**

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo fue desarrollado bajo la asesoría  
de la Dra. Enriqueta Amora Lazcano  
en el Laboratorio de Microbiología Industrial  
de la Escuela Nacional de Ciencias biológicas  
del I.P.N

México D.F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

***La más elevada realización en la  
naturaleza y en el arte es la  
consecución de una forma significativa***

**Goethe**

***Buscamos la esencia que está  
detrás de lo azaroso***

**Paul Klee**

**Al comité tutorial...**

***Le agradezco las sugerencias que hizo  
tanto al trabajo experimental,  
como a la escritura de la tesis.***

**A mis padres...**

***Mi más sincero agradecimiento por su  
respaldo . Su experiencia y sus valiosos consejos,  
me sirvieron durante mis estudios de maestría.***

**A mi hermana...**

***Le agradezco su valiosa ayuda.***

***En este andar por la vida y  
tomados de las manos, escalaremos los riscos  
hasta llegar a la cima de la humanidad.***

***Reciban este trabajo como un humilde regalo que les doy.***

# ÍNDICE

RESUMEN.....	i
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	12
III. OBJETIVO .....	12
IV. METAS .....	13
V. MATERIAL Y MÉTODOS .....	14
VI. RESULTADOS .....	29
VII. DISCUSIÓN .....	68
VIII. CONCLUSIONES .....	81
IX. APÉNDICE.....	83
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## RESUMEN

El rastrojo de maíz que se utiliza como sustrato para el crecimiento en estado sólido de *Pleurotus sajor-caju* fue usado para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Se obtuvo un total de 23 cepas, de las cuales mediante pruebas bioquímicas, 11 correspondieron al género *Azotobacter*, 11 a *Azospirillum* y una a *Beijerinckia*.

La atracción que ejercen los metabolitos de *P. sajor-caju* sobre las bacterias, pudo ser observada una vez que los cultivos del hongo se incubaron por 15, 20 y 30 días. El paquete micelial obtenido se mantuvo en regulador de fosfatos por 12 horas, el sobrenadante fue utilizado como agente quimiotáctico frente a las suspensiones bacterianas. En todos los casos se observó mayor migración celular hacia los sobrenadantes con relación al testigo. La cepa A6 de *Azospirillum lipoferum* fue la que presentó mayor migración celular hacia el sobrenadante de 20 días; mientras que la cepa DB01 de *Beijerinckia dextrii* migró hacia los extractos obtenidos a los 15 y 30 días de incubación el hongo.

Con el propósito de conocer si el nitrógeno que es fijado por las bacterias aisladas, influye en el crecimiento de *Pleurotus sajor-caju*, se diseñó un experimento en el que se consideró el tiempo de incubación de los cultivos del hongo y la concentración celular de cinco cepas, además de los testigos correspondientes.

El cultivo del hongo incubado previamente 15 días e inoculado con la cepa A6 de *Azospirillum lipoferum* ajustada a  $10^7$  UFC/ml, registró el mayor contenido de nitrógeno (2.66 mg/g de sustrato) y el tratamiento del hongo también incubado 15 días e inoculado con la cepa F de *Azotobacter vinelandii* ajustada a  $10^9$  UFC/ ml registró la mayor actividad de  $\beta$ -1-4 endoglucanasa (73.9 U/g de sustrato).

Con el presente trabajo se demostró que durante el crecimiento de *Pleurotus sajor-caju*, este produce metabolitos que atraen hacia él, bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre presentes en el rastrojo de maíz, las cuales pueden aportar parte del nitrógeno necesario para el desarrollo del hongo. Por otro lado, el tamaño del inóculo bacteriano y la edad del cultivo, son factores determinantes en la fijación de nitrógeno, además de la cepa bacteriana.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. El GÉNERO *Pleurotus* (Fr.) Kumm.

Por la facilidad de su cultivo, diversas especies de *Pleurotus* han sido seleccionadas para cultivarse en diferentes países. Esta seta comestible ganó gran importancia en la década pasada. En Europa se cultiva la seta ostra (*Pleurotus ostreatus*), en China se usa la seta abalon (*Pleurotus abalone* o *Pleurotus cystidiosus*). También son cultivadas otras especies, como son *Pleurotus sajor-caju*, *P. florida*, *P. sapidus*, *P. erengii*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae* y *P. flabellatus*.

El cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre árboles y troncos fue descrito a comienzos del siglo XX (Flack, 1917). Veinte años más tarde, Etter (1929) produjo cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* en cultivo; esta metodología fue modificada por Kaufert (1935) cuando estudió el ciclo de vida de las setas. Así mismo, Block *et al.* (1958) describieron por primera vez los requerimientos de las setas en cultivos sobre aserrín.

Las diferentes especies de *Pleurotus* crecen en un intervalo de temperatura de 15 a 30°C. *P. sajor-caju* tolera una temperatura de 28 a 30°C, aunque sus cuerpos fructíferos se forman más rápido y de mayor tamaño a temperaturas de 25°C, durante los meses fríos del año o en las tierras altas intertropicales.

La luz es esencial para la formación y maduración de estructuras reproductoras en muchas especies de basidiomicetos que crecen sobre celulosa (Kitamoto *et al.*, 1972; Perkins y Gordon, 1969). El fototropismo positivo en las especies de *Pleurotus* fue observado por

Gyurko (1972). Una intensidad luminosa de 10 lux es suficiente para inducir la respuesta (Zadrazil, 1978).

Las setas se han utilizado como alimento o como material saborizante por su único y sutil sabor, éste es debido a compuestos no volátiles tales como aminoácidos y nucleótidos (Litchfield, 1967) y compuestos C-8 volátiles, incluyendo 1-octanol, 3-octanol, 3-octenona, 1-octen-3-ona (Cronin y Ward, 1971; Pyysalo y Suihko, 1976; Fisher y Grosh, 1987). El 1-octen-3-ol es la sustancia volátil asociada a las setas frescas, la cual se forma por el rompimiento enzimático del ácido linoleico (Grosh y Wurzenberg, 1984).

## 1.2. *Pleurotus sajor-caju* (Fr) Singer

El hongo comestible *Pleurotus sajor-caju* fue introducido por primera vez como cultivo comercial por Jandaik y Kapoor (1974). Bajo condiciones ideales de cultivo, cerca del 11.2% del substrato celulósico es convertido en biomasa como cuerpos fructíferos, el 1.53% no se utiliza y el remanente 87.27 % se pierde en forma de agua y CO<sub>2</sub>. El porcentaje de degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina muestra que *P. sajor-caju* es capaz de utilizar a estos tres componentes (Kandaswamy y Ramaswamy, 1976).

Los cuerpos fructíferos del hongo, contienen proteínas, grasas y carbohidratos. La energía obtenida de los residuos orgánicos por el hongo fluctúa entre 4.19 y 8.73 Kcal/100g de substrato seco (Patrabansh y Madan, 1997).

*Pleurotus sajor-caju* al igual que el resto de los hongos, asimila el amonio mediante vías y control diferentes a las utilizadas por las bacterias. En esencia la vía de la glutamina sintetasa no juega un papel central en el control del metabolismo del nitrógeno. Las enzimas involucradas en la síntesis del glutamato y glutamina son NADP-glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH) y la glutamina sintetasa. Sin embargo, es frecuente encontrar en la mayoría de los hongos a la NAD-glutamato deshidrogenasa (NAD-GDH), pero la función principal de esta enzima parece ser el catabolismo del glutamato.

La NADP-GDH tiene un  $K_m$  alto para el amonio y en ausencia de un sistema de alta afinidad (tal como GS/GOGAT) la mayoría de estos organismos son incapaces de crecer en presencia de bajas concentraciones de amonio o sobre fuentes pobres en nitrógeno tales como el nitrato. No hay reportes que se conozcan del GOGAT en hongos, aunque relativamente pocos de esos organismos han sido estudiados intensamente (Brown, 1980; Griffin, 1994)

### I.3. FIJACIÓN DE NITRÓGENO

Todos los organismos pueden convertir el amonio en compuestos orgánicos nitrogenados, es decir, sustancias que contienen enlaces C-N. Sin embargo, no todos los organismos pueden transformar el nitrógeno atmosférico en amonio.

El nitrógeno molecular constituye aproximadamente un 80% de la atmósfera de la Tierra, su reducción a amoníaco se produce por un número relativamente limitado de sistemas vivos (fijación biológica de nitrógeno), básicamente algunos microorganismos procariotes la llevan a

cabo y en ocasiones solo la llevan a cabo mediante una relación simbiótica con ciertas plantas.

Dado que la disponibilidad de nitrógeno es un factor que limita la fertilidad de los suelos, la fijación de nitrógeno por lo tanto, está directamente relacionada con el aumento del aporte de alimento en el mundo (Atlas y Bartha, 2002).

Todas las especies que pueden fijar nitrógeno poseen el complejo enzimático llamado *nitrogenasa*, cuya estructura es similar en todas las especies investigadas.

Básicamente consiste de dos proteínas:

- ♦ La proteína-Fe, que es un dímero de ~64 kD con subunidades idénticas que contiene un centro [4Fe – 4S] y dos sitios de enlace para ATP.
  
- ♦ La proteína Mo-Fe, es una proteína de ~220 kD de estructura 2:2 que contiene Fe y Mo. Cada dímero contiene dos centros de enlace redox:  
(1) el centro P, el cual consiste de un centro [4Fe – 4S] enlazado a un centro [4Fe – 3S] que están colectivamente ligados por el átomo de azufre de los residuos de 6 cisteínas y una serina.  
(2) Un cofactor MoFe, el cual consiste de un centro [4Fe – 3S] y un centro [Mo – 3Fe – 3S] por medio de un puente de 3 iones sulfhidrilo. El ion de molibdeno es coordinado por 3 iones sulfhidrilo, un nitrógeno una histidina y 2 átomos de oxígeno del homocitrato. El N<sub>2</sub> es enlazado en la cavidad central del cofactor FeMo (Voet et al., 1999).

La reacción se inicia cuando la ferredoxina reduce a la proteína-Fe y a continuación se une el ATP. Esta unión modifica la conformación

de la proteína y disminuye su potencial de reducción, de esta manera reduce a la proteína Mo-Fe. El ATP se hidroliza cuando se produce esta transferencia de electrones. Finalmente, la proteína Mo-Fe reducida cede los electrones al nitrógeno molecular. La nitrogenasa es bastante sensible al oxígeno por lo que debe protegerse en el interior de la célula (Voet et al., 1999).

De la biota del suelo, solo microorganismos como bacterias y cianobacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se dividen en dos grupos que se basan en su habilidad para llevar en vida libre o en forma simbiótica dicho proceso (Tabla 1)

#### I.4. CONCEPTO DE INTERFASE

Los ecosistemas se caracterizan por la presencia de diversas especies microbianas que desempeñan varias actividades de importancia dentro de éste.

Un microorganismo en su hábitat natural se enfrenta a interacciones físicas, químicas y biológicas, raramente encontradas en condiciones de cultivo puro. El microorganismo puede estar sujeto a fluctuaciones en la disponibilidad de nutrimento, en la temperatura, el pH o la presión osmótica, también en el grado de estimulación o inhibición causados por otros microorganismos. Las condiciones ambientales varían entre un micrómetro y otro, influyendo en los microorganismos individuales en cuanto a tamaño, movilidad limitada, velocidad de crecimiento y su habilidad para secretar subproductos metabólicos (Marshall, 1976).

**Tabla 1.** Clasificación de los microorganismos fijadores de nitrógeno

MICROORGANISMOS DE VIDA LIBRE	AEROBIOSHETERÓTROFOS	<i>Azospirillum</i> spp. <i>Azotobacter</i> spp. <i>Beijerinckia</i> spp.
	ANAEROBIO FACULTATIVO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	FOTOTROFOS CIANOBACTERIAS	<i>Anabaena azollae</i> <i>Gleocapsa</i> spp.
	ANAEROBIOS HETEROTROFOS	<i>Desulfotomaculum</i> spp. <i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	FOTOTROFOS BACTERIAS	<i>Chromatium vinosum</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter capsulata</i>
MICROORGANISMOS SIBIÓTICOS	ASOCIACIÓN CON LEGUMINOSAS	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i>
	ASOCIACIÓN CON PLANTAS NO LEGUMINOSAS	<i>Frankia</i> spp.

(Adaptado de Madigan *et al.*, 1998)

El conocimiento de la conducta de los microorganismos dentro de los microhábitats es esencial para definir sus actividades en diferentes ecosistemas.

En términos fisicoquímicos, una interfase es el límite entre dos fases de un sistema heterogéneo. Los hábitats naturales microbianos son un sistema heterogéneo con un amplio intervalo de interfases líquido - líquido, gas- líquido, sólido - líquido y sólido - gas. Estas fases poseen propiedades físicas y químicas diferentes, que le confieren ciertas características a un microhábitat, y a la relación entre los microorganismos dentro de cada fase.

Las fuerzas que operan en las interfases son pobres y son efectivas solo a cierta distancia, éstas tienen un efecto significativo sobre la distribución de iones, macromoléculas y materiales de tamaño coloidal en la vecindad de la interfase. La actividad microbiana en o cerca de la interfase es modificada por tales cambios microambientales, como puede ser la alteración en la disponibilidad de gas, los cambios de pH como resultado de la atracción o repulsión de iones  $H^+$ , la concentración de los nutrientes microbianos o de los inhibidores (antibióticos), y la actividad de las enzimas extracelulares (Marshall, 1976)

Puesto que muchos hábitats naturales tienen un bajo nivel de nutrientes, las superficies sólidas son un sitio potencial de concentración de nutrientes (como iones o macromoléculas) y, por lo tanto de actividad microbiana.

La filosfera es la superficie externa de las hojas de las plantas, y el hábitat sobre la superficie de las hojas se conoce como filoplano (Last, 1955; Ruenen, 1956). Last y Warren (1972) notaron que hongos, algas, líquenes y bacterias se establecían en las hojas de las plantas. Sin embargo, no solo en las hojas hay crecimiento, sino también en ramas y frutos. A estos microorganismos se les denominó epífitos (Preece y Dickinson, 1971; Collins, 1976; Dennis, 1976).

Las bacterias son generalmente predominantes en la colonización inicial sobre las nuevas hojas expandidas, mientras que las levaduras y hongos filamentosos lo hacen más tarde. Los componentes dominantes de las poblaciones bacterianas epífitas y la dinámica de poblaciones varía con el genotipo del hospedero, edad, posición de las hojas y condiciones ambientales. Se ha demostrado que la edad y posición de las hojas influye en el tamaño de la población epífita sobre las plantas con una gran variedad de morfologías. Sin embargo, la edad de la hoja es raramente considerada en procedimientos de muestreo para determinar el tamaño de la población microbiana sobre los vegetales.

Los procesos implicados en la dinámica de poblaciones microbianas, sobre las partes aéreas de las plantas, son inmigración, emigración, crecimiento y muerte de microorganismos. La inmigración como un factor que afecta el tamaño de la población microbiana asociada con las hojas ha sido poco estudiada. A las bacterias epífitas las podemos encontrar en el follaje de las plantas, suelo y semillas. Su movimiento aéreo a partir de fuentes distantes o su movimiento de hoja a hoja como fuentes de inmigración, no se conoce bien

El desarrollo bacteriano sobre las partes aéreas de las plantas, ha sido estudiado mediante la introducción de cepas o poblaciones microbianas autóctonas. Sin embargo, la importancia de la inmigración en relación con el crecimiento dentro de una dinámica de poblaciones microbianas, ha recibido poca atención, y hay que considerar que su papel es relevante para el desarrollo de nuevas estrategias para el control de las bacterias epífitas (Jacques *et al.*, 1995).

## I.5. EL EFECTO BENÉFICO DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE OTROS ORGANISMOS.

Park y Agnihotri (1969), reportaron que cuando bacterias aisladas del suelo y crecidas en medios con extracto de suelo, se inoculaban a cultivos de *Agaricus bisporus* y éstos se incuban en la oscuridad a 21°C, los primordios aparecían sobre la superficie como cabezas de alfiler después de 6 a 10 días, y a los 15 días se obtenían cuerpos fructíferos maduros. Además, reportaron que *Arthrobacter terrgens*, *Bacillus megaterium* y *Rhizobium meliloti* estimulan una abundante producción de esporóforos maduros de *A. bisporus*, y que el filtrado obtenido a partir de una suspensión bacteriana cuando era adicionado a un cultivo de *A. bisporus*, también favorecía la formación de esporóforos, los cuales eran comparados con un testigo, que contenía solamente agua destilada. Con esto quedó demostrado, que los metabolitos extracelulares microbianos favorecen la formación de esporóforos.

Staněk y Zatecká (1967), demostraron que los actinomicetos termófilos del género *Streptomyces* y hongos termotolerantes del género *Humicola* producen vitaminas que influyen ventajosamente en el crecimiento micelial de los hongos comestibles. Staněk (1972) estableció que los

polisacáridos producidos por las bacterias termotolerantes, son utilizados como fuente de carbono.

Thorton (1953), propuso dos conceptos, el de "hifosfera" y el de "microorganismo de la hifosfera", el primero se define como el área que rodea a una hifa particular, mientras que el segundo se refiere a los microorganismos que circundan esa área.

Se han descrito asociaciones entre organismos superiores y bacterias fijadoras de nitrógeno que no implican cambios anatómicos o fisiológicos como las que se observan en la simbiosis, y que además no presentan un alto grado de interdependencia. En estas asociaciones resulta algún beneficio para uno o ambos componentes de la misma. Así, podemos encontrar asociaciones entre microorganismos y las raíces o las hojas de las plantas, o incluso con ciertos animales. Por ejemplo, la asociación entre la gramínea tropical *Paspalum notatum* y una especie de *Azotobacter*, en la cual los microorganismos viven en la rizosfera de la planta, protegidos por un mucílago y la bacteria le proporciona a la planta una cantidad de nitrógeno de unos 20 kg/hectárea/año. Otra asociación importante la encontramos entre las bacterias del género *Azospirillum* y varias gramíneas, entre los que se encuentran el maíz y el sorgo, por lo que se ha sugerido su utilización en la agricultura (Döbereiner, 1970; Döbereiner y Day, 1976).

*Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella* proliferan en las hojas de plantas tropicales como el algodón, el café y las gramíneas. Para satisfacción de los agricultores, el aporte de nitrógeno en este caso es más bien escaso, tan solo 1 kg/hectárea/año (Pérez y Torralba, 1997).

Rangaswami et al. (1975) observaron que durante el crecimiento de *Pleurotus sajor-caju* había un incremento en el contenido de nitrógeno, sugiriendo que el hongo era capaz de fijar nitrógeno. Zheng Shi-li et al. (1984), investigaron cual era el sistema que aportaba nitrógeno durante el cultivo del hongo. Los resultados indicaron que había actividad de nitrogenasa en el sistema de crecimiento, más no en el hongo. De esta manera se descartó que el hongo pudiera fijar nitrógeno, concepto que ha quedado ampliamente demostrado, ya que sólo algunos procariotes tienen la capacidad de llevar a cabo este proceso.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años se han desarrollado una serie de estudios encaminados al mejoramiento de la producción de hongos comestibles mediante la manipulación de las condiciones de cultivo. En este estudio se estableció la relación que existe entre los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y el crecimiento del hongo *Pleurotus sajor-caju*.

## **III. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la existencia de alguna relación entre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre y *Pleurotus sajor-caju* cuando se hace crecer en rastrojo de maíz como sustrato.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años se han desarrollado una serie de estudios encaminados al mejoramiento de la producción de hongos comestibles mediante la manipulación de las condiciones de cultivo. En este estudio se estableció la relación que existe entre los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y el crecimiento del hongo *Pleurotus sajor-caju*.

## **III. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la existencia de alguna relación entre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre y *Pleurotus sajor-caju* cuando se hace crecer en rastrojo de maíz como sustrato.

## IV. METAS

- 1.- A partir de rastrojo de maíz, recolectado de una zona agrícola, aislar e identificar la microbiota fijadora de nitrógeno de vida libre por medio de sus características morfológicas y bioquímicas.
- 2.- Evaluar la respuesta quimiotáctica de las cepas bacterianas, hacia un extracto de *Pleurotus sajor-caju*, obtenido a diferentes tiempos de incubación.
- 3.- Evaluar el contenido de nitrógeno en cultivos de *Pleurotus sajor-caju* al ser inoculados con las especies bacterianas seleccionadas en la prueba de quimiotaxis, en forma individual o una mezcla de ellas.
- 4.- Establecer sí, la concentración bacteriana del inóculo, puede afectar el contenido de nitrógeno del hongo.
- 5.- Determinar sí, el tiempo de incubación del hongo, influye en la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno.
- 6.- Estimar la actividad de la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa producida por el hongo, cuando éste crece en presencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.
- 7.- Medir el pH y la concentración de azúcares, producidos durante el crecimiento de *P. sajor-caju*, cuando es cultivado en presencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1. PROCEDENCIA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

En esta investigación se utilizó como material celulósico, rastrojo de maíz, el cual fue recolectado en el poblado de San Pedro, Municipio Villa Nicolás Romero en el Estado de México.

La cepa de *Pleurotus sajor-caju* 393 A, fue proporcionada por Forintek Canadá Corp.

### V.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE

#### V.2.1. Preparación del sustrato celulósico.

El material se cortó a un tamaño entre 3 y 5 cm de longitud. Tres muestras de 20 g cada una, se utilizaron para el aislamiento de las bacterias. La primera se denominó “**sustrato sin tratamiento térmico**”, a la segunda “**sustrato pasteurizado**” y a la tercera muestra “**sustrato esterilizado**”. Para el tratamiento térmico, el sustrato fue colocado en un recipiente con agua destilada y se calentó a 71°C por una hora, de acuerdo a la metodología propuesta por Stamets y Chilton (1983). En cuanto al sustrato esterilizado, primero se sumergió en agua destilada por 30 minutos, se drenó y se colocó en

recipiente de vidrio, se tapó con algodón y se esterilizó a 121°C por una hora.

V.2.2. Enriquecimiento para el aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno.

El substrato esterilizado se usó para demostrar la ausencia de microorganismos. Para esto se colocó aproximadamente 1g de substrato estéril, en matraces que contenían caldo nutritivo.

Para la etapa de enriquecimiento, se usaron los substratos con y sin tratamiento térmico como fuente de aislamiento. Se usaron matraces con 250 ml de los diferentes medio de enriquecimiento, que se indican a continuación (Fig.1).

- i) Para *Azospirillum lipoferum* se usó el medio propuesto por Becking (1962) denominado "**medio A**".
- ii) Para *Azotobacter vinelandii* se usó el medio propuesto por Derx (1951) denominado "**medio B**".
- iii) Para *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter beijerinckii* se usó el medio propuesto por Beijerinck en 1901 denominado "**medio C**".
- iv) Para *Azospirillum sp.* se usó el medio denominado "**medio D**".

Todos los medios fueron inoculados con 1g de substrato y se incubaron a 28°C por 72 h en agitación, excepto los medios A y D que se mantuvieron en condiciones estacionarias, a 37°C. Cada 24 h se observó la morfología microscópica con la finalidad de buscar los rasgos característicos de las bacterias deseadas. Transcurrido ese tiempo se tomaron 10 ml de inóculo de cada uno de los cultivos, y fueron transferidos a matraces que contenían 250 ml de medio de cultivo

fresco, los cultivos se incubaron por un periodo de 72 h, bajo las mismas condiciones de cultivo.

### V.2.3. Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno.

En esta etapa se usaron seis medios de cultivo, y se les asignó un número, su formulación se indica en el apéndice. El protocolo de aislamiento fue el siguiente, a partir del medio **A** se sembró el medio **6** para el aislamiento de *Azospirillum* (Krieg y Holt, 1984); del medio **B** se sembraron los medios **1, 2, 3, 4** para el aislamiento de *Azotobacter paspali*, *Derxia*, *Azotobacter vinelandii* y *Beijerinckia*, respectivamente (Krieg y Holt, 1984; Derx, 1950; Becking, 1962); el medio **5** para el aislamiento de *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter beijerinckii* (Krieg y Holt, 1984) fue sembrado a partir del medio **C**; y por último el medio **6** se sembró a partir del medio **D** para el aislamiento de *Azospirillum* (Krieg y Holt, 1984). Los medios del **1** al **5** fueron incubados a 28°C, mientras que el cultivo del medio **6** se incubó a 37°C hasta la formación de colonias y poder observar sus características morfológicas

También se utilizó el método de "tamizado en placa", para el aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre. Consiste en sembrar cajas de petri con sílica gel impregnada con solución nutritiva de Winogradsky (Krieg y Holt, 1984). En condiciones de esterilidad, se colocaron fragmentos de sustrato sin tratamiento térmico sobre la superficie de la sílica. Después de un periodo de incubación a 28°C, en una cámara para mantener la humedad, se pueden observar colonias alrededor de la muestra, y en algunos casos puede haber producción de pigmento por los microorganismos.

#### V.2.4. Identificación de los microorganismos fijadores de nitrógeno.

##### Identificación de *Azospirillum*

El método auxonográfico fue usado para la prueba de asimilación de biotina, manitol y  $\alpha$ -cetoglutarato. Cada una de las cepas aisladas en la etapa anterior, se sembraron en tubos con caldo soya tripticasa, a una temperatura de incubación de 28°C, hasta observar crecimiento. De estos cultivos se tomó una asada y se sembró por estría sobre la superficie del "agar base mineral" (Krieg y Holt, 1984). Sobre cada estría, se colocaron discos de papel filtro estériles, a los cuales se les adicionó 0.2 ml de las soluciones de biotina, manitol y  $\alpha$ -cetoglutarato al 10%. El crecimiento indicó la asimilación de las sustancias

Para la producción de ácido, se usó un medio de cultivo base mineral con glucosa, peptona (Krieg y Holt, 1984) y azul de bromotimol como indicador de pH. Las cepas fueron sembradas por estría cruzada y se incubaron a 37°C por 96 h. La producción de ácido, pudo ser observada mediante el vire del indicador, de azul a amarillo.

Dos pruebas adicionales fueron la movilidad y la reacción de la catalasa. Para observar la movilidad, se sembró por picadura el medio de cultivo SIM (Bioxon) con cada una de las cepas aisladas. La prueba fue positiva cuando se observó crecimiento alrededor de la picadura.

La reacción de la catalasa fue detectada cuando se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 2% sobre un portaobjetos y se mezcló con una gota del cultivo. La formación de burbujas indicó la presencia de la enzima.

Como parte de la caracterización, se realizaron tinciones de Gram con la finalidad de observar la morfología microscópica característica,

como son las formas alargadas y pleomórficas, y la presencia de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB).

#### Identificación de *Azotobacter*

Para la identificación de este microorganismo, se efectuaron cuatro pruebas. La primera fue la observación microscópica usando la tinción de Gram. La observación microscópica permitió buscar los rasgos característicos del género, como son las formas pleomórficas, la presencia de quistes y de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PBH).

Una segunda prueba fue la asimilación de fuentes de carbono. El procedimiento fue similar al descrito para *Azospirillum*, una vez que las cepas fueron sembradas en forma masiva sobre la superficie del agar base mineral mediante un hisopo, se colocó papel filtro estéril en forma de estrella, cuyas puntas eran discos, en cada uno se adicionó 0.2ml de las soluciones al 10% de maltosa, rafinosa,  $\alpha$ -cetoglutarato, malonato, benzoato y galactosa, los cultivos se incubaron a 28°C por 72 h. La prueba fue positiva cuando se observó crecimiento.

La tercer prueba fue la observación de la movilidad. Se usó el medio de cultivo SIM, que fue sembrado por picadura con las cepas aisladas, los cultivos se incubaron a 28°C por 72 h. El crecimiento alrededor de la picadura, indicó movilidad.

La última prueba que se realizó fue la retención de homopolisacaridos, con la finalidad de conocer si los microorganismos aislados retienen o difunden polisacaridos, en este caso se utilizó la técnica descrita por Thomson y Skerman (1979). Las cepas fueron sembradas por estría cruzada en el medio de agar base mineral más glucosa al 50%, los cultivos se incubaron a 28°C por 72 h, la producción de homopolisacaridos retenidos por la colonia se reconoce porque ésta es muy viscosa, transparente y con abundante exopolisacarido.

### Identificación de *Beijerinckia*

Se realizaron tres pruebas para poder identificar a este microorganismo. Una de ellas consistió en la simulación de fuentes de carbono de acuerdo a la metodología indicada en el Manual Bergey (Krieg y Holt, 1984). Las cepas aisladas, se sembraron por estria, sobre la superficie del agar se colocaron discos de papel filtro, a cada uno se le adicionó 0.2 ml de una solución al 10% de acetato, benzoato, lactosa, malato o propano, respectivamente, los cultivos se incubaron a 28°C por 72 h. La prueba fue positiva cuando se observó crecimiento.

Los rasgos que se buscaron durante la observación microscópica usando la técnica de Gram fueron, células en forma de campana con gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato polares y la presencia de abundante polisacarido que rodea a las células y adquiere un color rosa tenue, después de la tinción.

Con la finalidad de observar la movilidad de las cepas aisladas se sembró por picadura el medio SIM, con cada una de ellas. La movilidad se pudo observar cuando hubo crecimiento alrededor de la picadura.

### V.3. QUIMIOTAXIS DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE HACIA EL EXTRACTO DE *Pleurotus sajor-caju*.

#### V3.1. Evaluación quimiotáctica.

Para demostrar el efecto quimiotáctico que tienen las sustancias liberadas por *Pleurotus sajor-caju* incubado a diferentes tiempos, sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, se diseñó un dispositivo, tomando como referencia el diseñado por Villanueva-Díaz et al. (1992), el cual consiste de dos recipientes de plástico de 50 cm<sup>3</sup> de volumen cada uno, conectados por un tubo de plástico de 2 cm de longitud y 1mm de diámetro y 0.1414 cm<sup>3</sup> de volumen. El tubo contenía en la parte central un orificio por donde se adicionó la suspensión bacteriana. El protocolo experimental consistió de varias etapas:

#### Obtención del extracto del hongo

A partir de un cultivo en agar extracto de malta (Bioxon), se desprendió el micelio de *Pleurotus sajor-caju* y se cortaron cuadros de 1cm<sup>2</sup>. Cada uno se colocó en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de caldo extracto de malta (Bioxon), los cultivos se incubaron en agitación a 28°C. El primer matraz se retiró a los 15 días, el segundo a los 20 días y el tercero a los 30 días. En cada caso el micelio fue separado del sobrenadante mediante decantación en condiciones de esterilidad, se le lavó tres veces con regulador de fosfatos 50mM pH7.0. A continuación al micelio se le adicionaron 100 ml del mismo regulador y los matraces se agitaron a 28°C por 12 h con movimiento ligero. Transcurrido este tiempo, las esférulas fueron retiradas y al sobrenadante se le denominó "extracto del hongo", el cual fue mantenido en refrigeración hasta su uso.

### Preparación de las suspensiones bacterianas

Se utilizaron las cepas de *Beijerinckia dextrii* DBO1, *Azospirillum lipoferum* A6, *Azospirillum brasilense* A10, *Azotobacter vinelandii* E y *Azotobacter vinelandii* F. Cada una fue crecida en caldo de soya tripticasa por un período de incubación de 24 h a 28°C. Transcurrido ese tiempo, los cultivos fueron centrifugados a 3 000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el paquete se resuspendió en regulador de fosfatos 50 mM pH 7.0, este procedimiento fue repetido tres veces. Del último lavado, las células se resuspendieron en regulador de Adler (1969), (regulador de fosfatos 50 mM, pH 7.0, EDTA de sodio 0.1mM, MgSO<sub>4</sub> 1.0mM y CaCl<sub>2</sub> 0.2mM), se ajustó la concentración celular a 75 U.K. Todas las suspensiones bacterianas fueron usadas de inmediato.

### Procedimiento experimental de quimiotaxis

Los dispositivos de quimiotaxis fueron esterilizados en un horno de microondas, mediante 3 pulsos de 30 s cada uno con un intervalo entre uno y otro de 30 s. Se formaron 3 grupos de 5 dispositivos cada uno. Cada grupo correspondió al tiempo en el que se obtuvo el extracto (15, 20 y 30 días).

A través, del orificio central del tubo de plástico se adicionó 1 ml de regulador de Adler, seguido de 20 µl de la suspensión bacteriana correspondiente. De los dos frascos que conforman los dispositivos de quimiotaxis, a uno de ellos se le adicionó 2.5 ml de agua destilada estéril y al otro 2.5 ml del extracto del hongo según el grupo. Estos volúmenes de líquido evitaron que se desplazara el contenido del tubo de plástico. Cada dispositivo fue manejado con cuidado para evitar cualquier turbulencia. El primer muestreo se realizó de inmediato y se le denominó "tiempo cero", para éste y los siguientes muestreos se retiró 0.1 ml de ambos frascos. Todos los dispositivos fueron incubados a

28°C. Los siguientes muestreos se realizaron a una, cuatro y siete horas de incubación.

Se usó el método de Miles y Misra (Somasegaran y Hoben, 1985) para conocer el número de células que migraron hacia los frascos del dispositivo. A partir de los volúmenes muestreados se procedió a realizar diluciones decimales hasta 1:10<sup>6</sup>. Se usaron las diluciones 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup> y 1:10<sup>6</sup> del extracto del hongo, y las diluciones 1:10<sup>2</sup> y 1:10<sup>3</sup> del agua destilada. Se tomaron 50µl de cada dilución y se depositaron sobre la superficie del agar soya tripticasa, se dejó que la gota se absorbiera y las placas fueron incubadas a 28°C por 24h. Transcurrido este tiempo las colonias fueron contadas, seleccionando las placas que tuvieran entre 10 y 30 colonias. A los datos obtenidos de las cuentas viables del extracto y del agua destilada se calculó la Correlación de Pearson.

#### V.4. CONTENIDO DE NITRÓGENO EN CULTIVOS DE *Pleurotus sajor-caju* INOCULADOS CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE

##### V.4.1. Preparación del substrato

Se utilizó rastrojo de maíz como substrato, el cual se cortó en trozos de 1 cm aproximadamente y se remojó en agua destilada por 12 horas, se drenó y se le ajustó la humedad a un 80%. Se colocaron 30 g de éste en frascos de vidrio tapados con algodón, y se esterilizaron a 121°C por 1 h (Quimio *et al.*, 1990).

##### V.4.2. Preparación del inóculo del hongo

Se tomó un fragmento de micelio de *Pleurotus sajor-caju* 393A y se colocó en Caldo Extracto de Malta (Bioxon), el cultivo se incubó a 28°C

en agitación por 15 días. En condiciones de esterilidad se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y al paquete micelial se le adicionó regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.3, se mezcló suavemente y se centrifugó nuevamente, este procedimiento se repitió 3 veces. Finalmente el paquete micelial fue resuspendido en regulador.

#### V.4.3. Preparación de los inóculos bacterianos

En este estudio se usaron las 5 cepas seleccionadas en el estudio de quimiotaxis. Cada una de las cepas fueron sembradas en el medio de Winogradsky (1938) y se incubaron por 48h en agitación, a la temperatura óptima de crecimiento de cada una de ellas. Una vez crecidas, se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionó regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.3, el procedimiento se repitió 3 veces. Cada cepa fue ajustada a  $10^7$  y  $10^9$  células/ml usando la curva tipo del Nefelómetro de Macfarland.

#### V.4.4. Preparación de los tratamientos

En esta etapa se manejaron tres condiciones de cultivo:

- ❖ La inoculación de las cepas bacterianas en función del tiempo de incubación del hongo.
- ❖ El tamaño del inóculo bacteriano.
- ❖ La inoculación de las cepas en forma individual y una mezcla de todas ellas (Fig.1).

Se formaron dos grupos de tratamientos, los que correspondieron a **“edad del hongo de 0 días”** y los de **“edad del hongo 15 días”**. A su vez éstos se dividieron en dos sub-grupos, los correspondientes al tamaño del inóculo bacteriano ( **$10^7$  UFC/ml y  $10^9$  UFC/ml**).

Se manejaron como testigos, el cultivo del hongo sin inoculación bacteriana, el substrato con mezcla de cepas bacterianas con ausencia del hongo y el substrato estéril. El estudio se realizó por triplicado, lo que dio como resultado un total de 108 tratamientos (84 cultivos inoculados con el hongo y 24 sin la presencia del hongo).

Cada tratamiento se inoculó con 0.5cm<sup>3</sup> de paquete micelial. Los cultivos que correspondían a la edad del hongo de **"cero días"** fueron inoculados con la suspensión bacteriana junto con el paquete micelial, mientras que los cultivos de **"edad del hongo de 15 días"** se mantuvieron a 28°C hasta cumplir con ese tiempo y entonces se inocularon con la suspensión bacteriana.

Se adicionó 1 ml de las suspensiones bacterianas, excepto en los cultivos del "hongo sin bacterias" y en el substrato estéril. En el caso de los cultivos que se inocularon con la mezcla de las 5 cepas seleccionadas, se tomó 0.2 ml de cada suspensión bacteriana.

El periodo de incubación bajo las diferentes condiciones de cultivo fue de 30 días a una temperatura de 28°C.

#### V.4.5. Muestreo y Evaluaciones

Durante el periodo de incubación de todos los cultivos se realizaron tres muestreos, uno al inicio del experimento, otro a los 15 días y el último a los 30 días de incubación. Para cada tratamiento, se tomaron aproximadamente 5 g del cultivo bajo condiciones asépticas en los tiempos señalados. La muestra se depositó en un vial, se le adicionó 5 ml de agua destilada más 5 gotas de Tween 80 al 1% y se agitó vigorosamente por 5 minutos. El sobrenadante fue separado y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso. El substrato con crecimiento fue secado en un horno a 60°C hasta obtener peso constante.

A partir del sobrenadante se midió el pH, la actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa por el método de Mandels y Andreotti (1978), proteína soluble por el método de Lowry *et al.*(1951), azúcares totales reductores por el método de Miller (1959).

El substrato seco fue molido y se usó para medir el contenido de nitrógeno total por el método de micro Kjeldahl ( A.O.A.C., 1975).

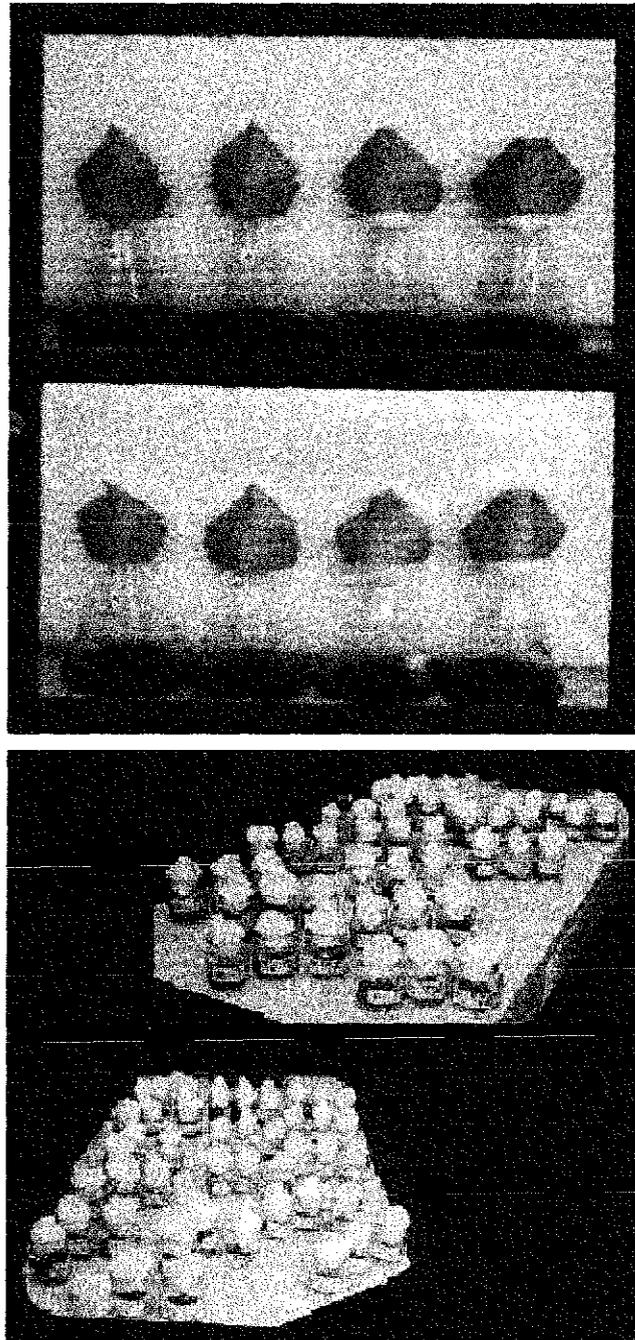


Fig. 1. **Cultivo de enriquecimiento (A)**. Los medios líquidos minerales fueron sembrados usando como fuente de aislamiento rastrojo de maíz. **Cultivos en estado sólido de *Pleurotus sajor-caju* (B)**. Una vez estéril el rastrojo de maíz, se formaron dos grupos, el primero correspondió a la edad del hongo de cinco días; el segundo a un cultivo de 15 días de edad del hongo. Posteriormente fueron inoculados con las suspensiones bacterianas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 2. PROCEDENCIA DE LAS CEPAS DE *Azospirillum*.**

Cepa	Medio de Enriquecimiento	Medio de Aislamiento	Tratamiento térmico al substrato
A1	D	6	Sin tratamiento
A2	A	6	"
A5	D	6	"
A6	D	6	"
A7	A	6	Tratamiento a 71°C
A8	D	6	"
A9	D	6	"
A10	A	6	"
A11	A	6	"
A12	A	6	"
A13	A	6	"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 3. PROCEDENCIA DE LAS CEPAS DE *Azototobacter*.**

Cepa	Medio de enriquecimiento	Medio de aislamiento	Tratamiento térmico al sustrato
A	-	Silica gel	Sin tratamiento térmico
B	B	1	"
C	B	3	"
D	B	3	"
E	-	Silica gel	"
F	B	3	"
G	B	5	"
H	B	3	Tratamiento a 71°C
J	B	1	"
K	B	3	"
L	B	3	"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI. RESULTADOS

### VI.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE

Durante el período de incubación (72 horas), los cultivos enriquecidos fueron revisados cada 12 horas, observando el aspecto del medio y la biota, a las 24 horas de cultivo se observó turbidez y la viscosidad se incrementó ligeramente (Fig.1).

Las observaciones microscópicas revelaron principalmente la presencia de células bacterianas, cuya morfología correspondió a cocos y bacilos. Los bacilos fueron Gram negativos, no se observó la presencia de quistes, estructuras características de *Azotobacter*, ni células pleomórficas de *Azospirillum*, ni las características células en forma de campana de *Beijerinckia*. En ningún caso se pudo observar la presencia de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, en los microorganismos.

#### Aislamiento de *Azospirillum*

. A las 48 horas de incubación del medio 6, se pudo observar la formación de colonias blancas puntiformes. La observación al microscopio mostró la presencia de bacilos ligeramente curvados, negativos a la coloración de Gram, no hubo presencia de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Las preparaciones en fresco teñidas con azul de metileno, mostraron células con movimiento vibratorio. También se encontraron colonias muy cremosas, de color verde oscuro, redondas, brillantes y convexas, aproximadamente de 3 mm de diámetro.

De acuerdo con la morfología colonial y microscópica, se seleccionaron 12 cepas que reunían algunos caracteres del género. Las cepas fueron conservadas en agar soya tripticasa.

### Aislamiento de *Azotobacter*

Los resultados obtenidos para los substratos tratados a 71°C y sin tratamiento térmico fueron similares. A las 48 horas, se observó en el medio 1, colonias blancas puntiformes, mate, no cremosas y sin difusión de pigmento. La morfología microscópica reveló la presencia de bacilos cortos Gram negativos que contenían gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. En el medio de cultivo 3, se observaron colonias blancas de 1 mm de diámetro, brillantes, cremosas y convexas, además se observó la difusión de un pigmento color café. En cuanto a la morfología microscópica se vieron bacilos cortos Gram negativos con gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, y quistes. En el medio 5, a las 48 horas de incubación se notó la difusión de un pigmento de color rojo violáceo alrededor de las colonias de 1 mm de diámetro, las cuales presentaban el mismo color, su morfología fue: convexas, brillantes y cremosas. Al microscopio se observó la presencia de bacilos cortos Gram negativos y la presencia de quistes.

Cuando se usó el método de tamizado, se pudo observar crecimiento alrededor del substrato, el cual fue abundante, además hubo gran producción de goma por la presencia de exopolisacaridos. También hubo producción de pigmento no difusible de color café, característico de *Azotobacter chroococcum*. La morfología microscópica reveló la presencia de bacilos cortos Gram negativos, así como de quistes, característicos de esta especie

### Aislamiento de *Beijerinckia* y *Derrxia*.

A partir del medio de enriquecimiento B se sembraron los medios de aislamiento 2 y 4. El medio 2 mostró la presencia de colonias puntiformes, blancas, cremosas y brillantes. Al microscopio observamos bacilos cortos Gram negativos, pero sin gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, ni de polisacáridos que rodearan al grupo de células, que es característico en estas especies. El medio 4 reveló la presencia de colonias transparentes que contenían gran cantidad de polisacáridos producidos durante el crecimiento. La morfología microscópica mostró bacilos cortos Gram negativos, algunas células presentaron forma cocoide y otras forma de campana. En todos los casos se observaron 2 gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato polares. Así mismo, se observó abundante polisacárido que rodeaba al grupo de células, el cual se tiñó de un color rosa tenue. Después del proceso de purificación y al ver que todas las colonias mostraban la misma morfología colonial y microscópicamente los microorganismos presentaban los mismos rasgos distintivos, se seleccionó solo una colonia bacteriana que fue conservada en medio de agar soya tripticasa.

## V.1.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE.

### Identificación de las especies de *Azospirillum*

Con la finalidad de diferenciar a las especies de *Azospirillum*, se efectuaron las pruebas de asimilación de  $\alpha$ -cetoglutarato y manitol, así como los requerimientos de biotina y la producción de ácido a partir de glucosa.

Los resultados indicaron que del total de cepas aisladas, solo las asignadas con las claves A1, A2, A5, A11 y A9 asimilaron el manitol. En cuanto a los requerimientos de biotina, las cepas A2, A5, A7, A8, A12, A10, A11 y A13 no la requirieron y solo la cepa A6 lo utiliza. Mientras que las cepas A1 y A9 no crecieron aún en presencia de biotina. En cuanto a la producción de ácido a partir de glucosa, las cepas A9 y A10 no lo producen. Las cepas A1, A2, A7, A8, A5, A9, A10, A11, A12 y A13 presentan movilidad. La única cepa que dio negativa la prueba de catalasa fue la cepa A6, (Figs.2, 3; Tabla 4).

### Identificación de las especies de *Azotobacter*

Para identificar a las cepas aisladas, se prepararon medios de cultivo sólidos, que contenían solo una base mineral. Después de sembrar en forma masiva cada una de las cepas aisladas, se colocó sobre la superficie del agar papel filtro en forma de estrella cuyas puntas terminaban en un disco, y sobre éste se adicionó 0.2 ml de soluciones al 10% de diferentes fuentes de carbono.

A cada cepa se le asigno una letra mayúscula como clave. Los resultados indicaron que las cepas B, C, E, F, J, K y L utilizaron a la manosa, que de acuerdo con el Manual Bergey's (Krieg y Holt, 1984), la

única especie que no la utiliza es *Azotobacter paspali*; sin embargo, *A. beijerinckii* y *A. nigricans* pueden o no utilizarla. La rafinosa, la ramnosa y el glutarato fueron utilizados por las cepas aisladas. Con relación al malonato, únicamente las cepas B, C, F y K lo asimilaron, mientras que el benzoato fue utilizado por las cepas B, C, F, K, E y L. Cuando se utilizó a la lactosa como fuente de carbono, las cepas D, G, H, A y J no la catabolizaron. En cuanto al sorbitol, solo las cepas G, H y J no lo usaron. Con respecto a la prueba de peroxidasa, las cepas H y L dan negativa esta prueba. (Figs. 4, 5; Tabla 5).

#### Identificación de las especies de *Beijerinckia*.

Como se indicó en la etapa correspondiente al aislamiento, solo pudo aislarse una cepa que reunía las características coloniales y microscópicas de *Beijerinckia*. Se realizaron pruebas de asimilación de lactosa, propanol, malato, acetato y benzoato. El microorganismo aislado solo pudo utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Además se realizaron dos pruebas adicionales, una fue la reacción de catalasa y la otra de movilidad, los resultados indicaron que la primera fue positiva, mientras que la segunda fue negativa. A la cepa caracterizada se le asignó la clave DBO1, (Fig. 6; Tabla 6).

**Tabla 4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Azospirillum*.**

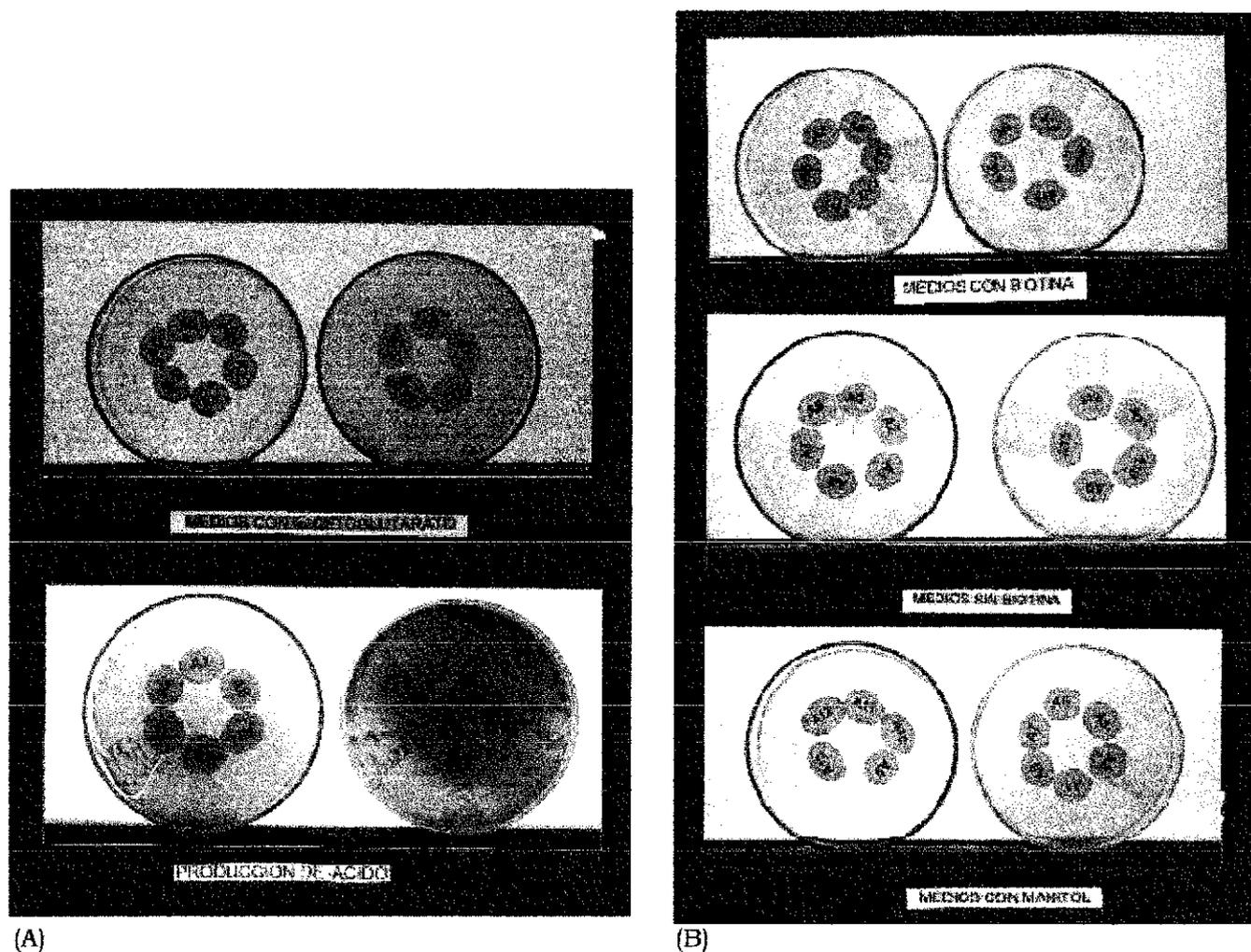
Asimilación de fuentes de carbono	Cepas										
	A1 A13	A2	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
Medio con biotina	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Medio sin biotina	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
$\alpha$ -cetoglutarato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Otras pruebas de identificación</b>											
Producción de ácido a partir de glucosa	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Asimilación +, no asimilación -

Movilidad +, no movilidad -

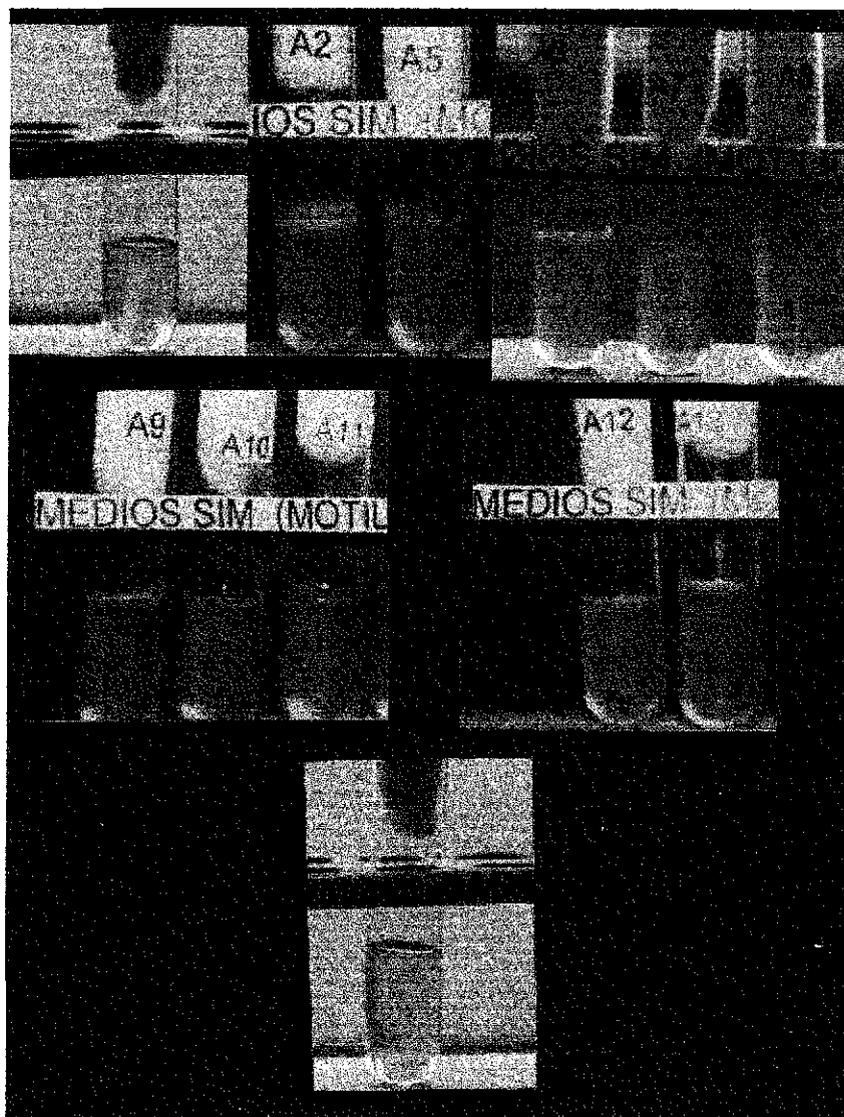
Producción +, no producción

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 2. Asimilación y producción de ácido por *Azospirillum*.** Cada una de las cepas fue sembrada por estría sobre la superficie de agar base mineral, colocando varias cepas por caja. Sobre cada estría se colocó un disco de papel filtro al cual se le adicionó 0.2 ml de  $\alpha$ -cetoglutarato. El vire del indicador, indicó la presencia de ácido (color amarillo).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 3. Prueba de movilidad para *Azospirillum*.** Una vez seleccionada cada cepa en la etapa de aislamiento, estas fueron sembradas por picadura usando el medio semisólido SIM.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Azotobacter***

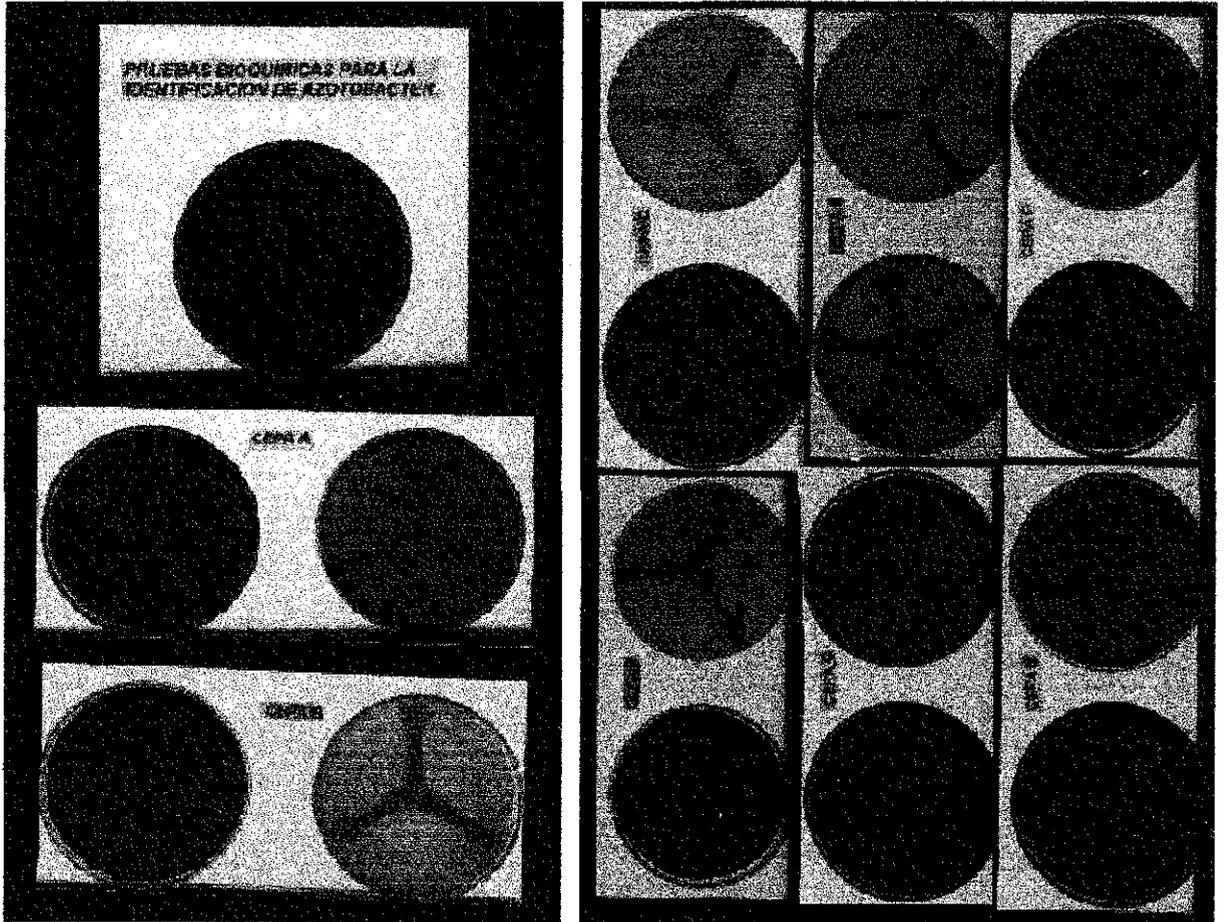
Asimilación de fuentes de carbono	Cepas										
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
Maltosa	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutarato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonato	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Benzoato	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Galactosa	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Sorbitol	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Otras pruebas para la identificación											
Difusión de homopolisacaridos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Peroxidasa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

Asimilación (+), no asimilación (-)

Movilidad (+), no hay movilidad (-)

Producción (+), no hay producción (-)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



(A)

(B)

**Fig. 4. Prueba de asimilación de fuentes de carbono por *Azotobacter*.** En cada disco se le adicionó 0.2 ml de una solución diferente al 10 % (maltosa, rafinosa,  $\alpha$ -cetoglutarato, malonato, benzoato y galactosa). Los cultivos se incubaron a 28 °C por 12 horas, el medio contenía azul de bromotimol, como indicador de pH (azul = alcalino, amarillo).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

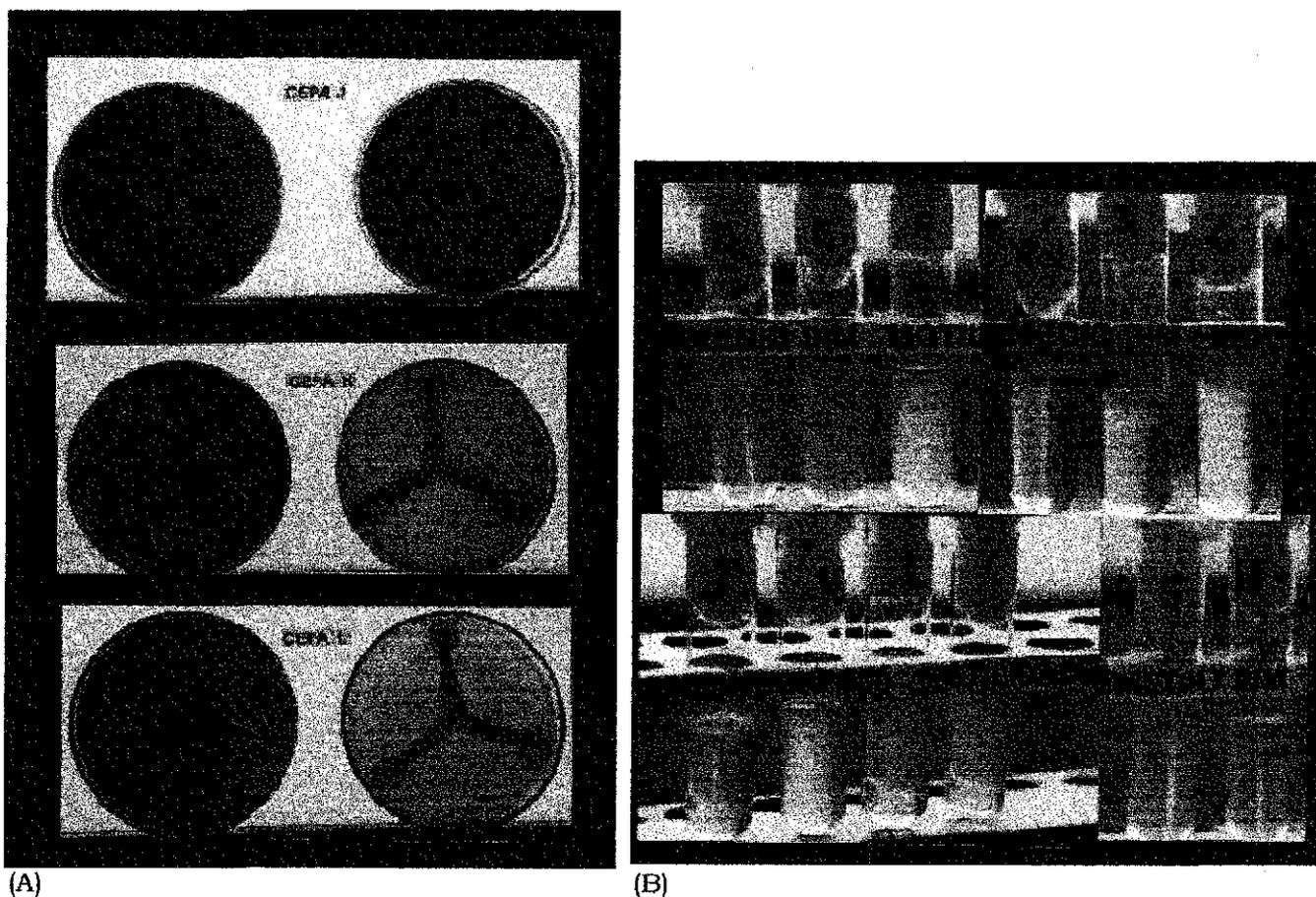


Fig. 5. **Prueba de asimilación de fuentes de carbono por *Azotobacter* (A)**, a los medios de agar base se colocó en condiciones de esterilidad papel filtro en forma de estrella, en sus extremos con forma de disco. En cada disco se le adicionó 0.2 ml de una solución diferente al 10 % (maltosa, rafinosa,  $\alpha$ -cetoglutarato, malonato, benzoato y galactosa). Los cultivos se incubaron a 28 °C por 12 horas, el medio contenía azul de bromotimol, el vire indicó cambio de pH (azul = alcalino, amarillo = ácido). **Prueba de movilidad para *Azotobacter*. Prueba de movilidad (B)**, una vez seleccionada cada cepa en la etapa de aislamiento de acuerdo a la morfología microscópica, estas se sembraron por picadura usando el medio semisólido SIM.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Beijerinckia***

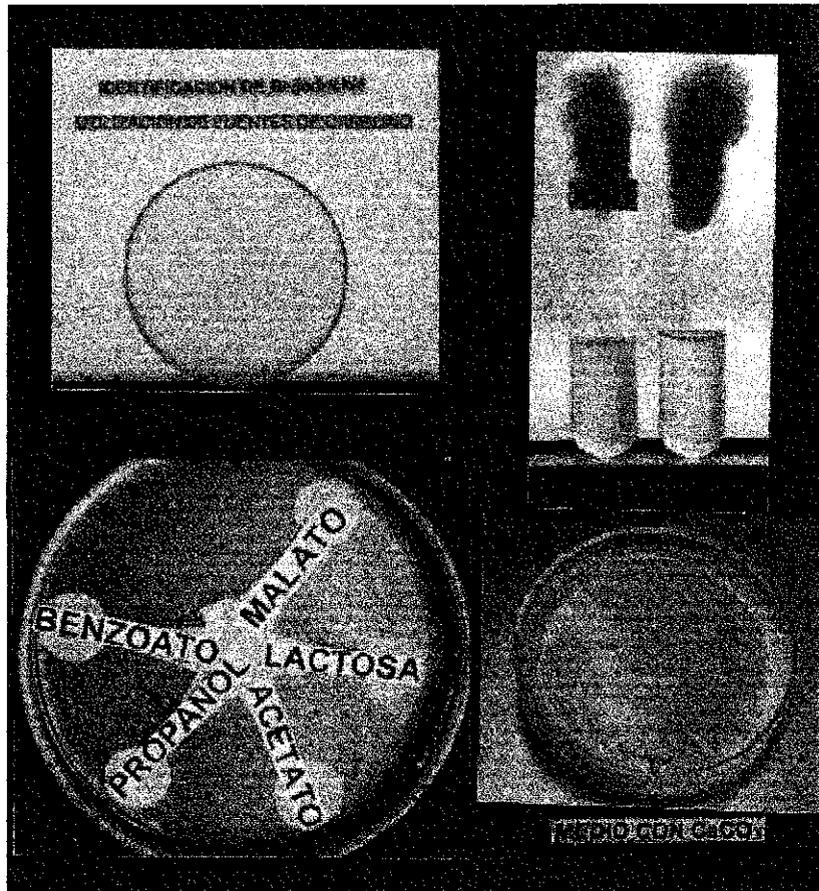
Asimilación de fuentes de carbono	
Acetato	-
Benzoato	-
Lactosa	+
Malonato	-
Propanol	-
Otras pruebas de identificación	
Prueba de la catalasa	+
Movilidad	-

Asimilación (+), no asimilación (-)

Producción (+), no hay producción (-)

Movilidad (+), no hay movilidad (-)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 6. Pruebas de asimilación de fuentes de carbono, movilidad y crecimiento en presencia de carbonato para *Beijerinckia*.** La cepa DBO1, fue crecida en forma masiva sobre la superficie de agar base mineral, se colocó papel filtro en forma de estrella. A cada extremo de la misma se le adicionó 0.2 ml de una solución diferente al 10 % de fuentes de carbono (malato, acetato, propanol y benzoato). Para la prueba de movilidad, se usó el medio semisólido SIM, el cual fue sembrado por picadura. El agar base minearl con  $\text{CaCO}_3$  muestra abundante crecimiento.

## VI.2. ESTUDIO SOBRE LA QUIMIOTAXIS DE LAS BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE SOBRE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS POR *Pleurotus sajor-caju*

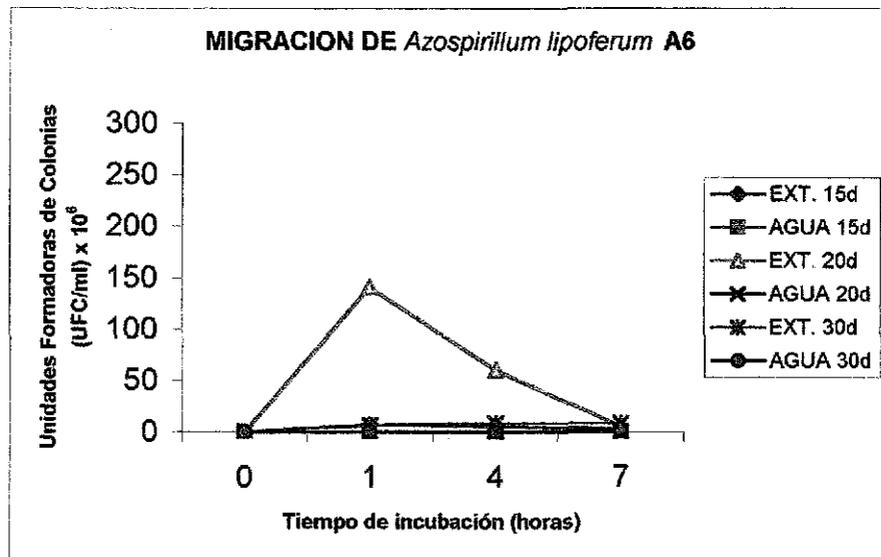
Con la finalidad de conocer si ciertos metabolitos producidos por *Pleurotus sajor-caju* ejercen atracción sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, se realizó un experimento de quimiotaxis.

Los resultados obtenidos a partir de las cuantas viables, indican que hubo mayor migración de las cepas bacterianas estudiadas, hacia los extractos del hongo obtenidos a diferentes tiempos de incubación, con respecto a la migración hacia el agua destilada que se usó como testigo. La respuesta de las bacterias hacia los metabolitos del hongo, varió de una cepa y otra, durante el tiempo que permaneció en incubación el dispositivo de quimiotaxis. En el caso de los extractos obtenidos a los 15 días. Se observó que las cepas A6 y E (fig. 7 y 9) presentaron una migración máxima a la primera hora, seguida por la cepa DBO1 (fig.11) que registró un mayor número de UFC/ml después de 4 h de incubación. Mientras que las cepas A10 y F tardaron 7 h en alcanzar el mayor número de células. Con respecto a los extractos obtenidos a los 20 días de incubación del hongo, solo la cepa A6 (fig. 7) registró un número alto de UFC/ml desde la primera hora de incubación, seguida por las cepas A10 y E (fig. 8 y 9) quienes presentaron migración a las 4 horas de incubación, y por último las cepas F y DBO1 (fig. 10 y11).

Para el extracto obtenido a los 30 días, solo la cepa E registró mayor migración desde la primera hora de incubación, mientras que la cepa A6 lo hace a las 4 horas de incubación, no así, las cepas A10, F, y DBO1 quienes tardaron 7 horas para alcanzar un valor máximo de movilidad.

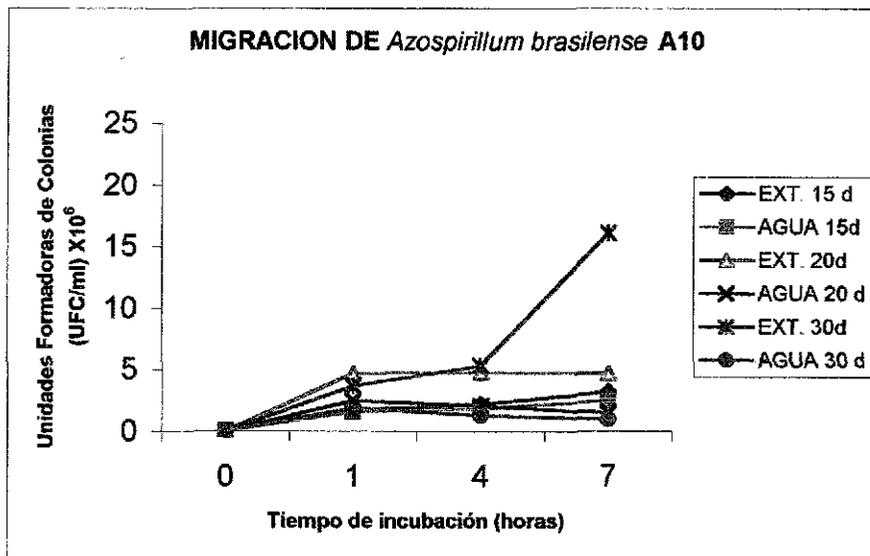
Por los resultados mencionados anteriormente puede establecerse que los extractos obtenidos a los 30 días de incubación del hongo influyen marcadamente en la migración bacteriana para las cepas A10, E y F, no así para la cepa A6 quien alcanza un valor máximo de migración en el extracto de 20 días de incubación del hongo, ya que en el extracto de 30 días, desciende marcadamente el número de UFC/ml. En el caso de la cepa DBO1 el número de células fueron similares para los extractos obtenidos a los 20 y 30 días de incubación del hongo.

Después de calcular el coeficiente de correlación entre los datos de UFC/ml obtenidos a partir del muestreo del extracto y el agua destilada, durante el tiempo que duró el experimento (7 h), se observa que en todos los casos se rechaza la hipótesis de nulidad (Castañeda, 1995) indicando que hay correlación para los extractos obtenidos a los 15, 20 y 30 días (Tabla 7). Bajo estas condiciones las cepas A6, E y DBO1 presentan un coeficiente de correlación ( $r$ ) cercano a cero, de manera que el grado de asociación lineal es menor, indicando que hay una correlación poco significativa (Méndez et al., 1997), lo cual es lógico ya que hubo mayor migración hacia el extracto. Por otro lado, las cepas A6 y E en los extractos obtenidos a los 15 días de incubación del hongo, la cepa E en el extracto de 20 días y, las cepas F y DBO1 en los extractos de 30 días, los valores del coeficiente de correlación son negativos, indicando estadísticamente, que el incremento de una variable corresponde al decremento de la otra (Méndez et al., 1997), avalando la mayor migración hacia el extracto que hacia el agua. Para las cepas A10 en los extractos de 15 y 20 días, la cepa F en los extractos de 15 y 20 días, los valores del coeficiente de correlación se aproximan a la unidad, esto puede ser entendido por el hecho de que a bajas concentraciones de metabolito la respuesta es baja, pero al incrementar la concentración de éste (por ejemplo el extracto de 30 días) la migración se incrementa bajando el valor del coeficiente de correlación.



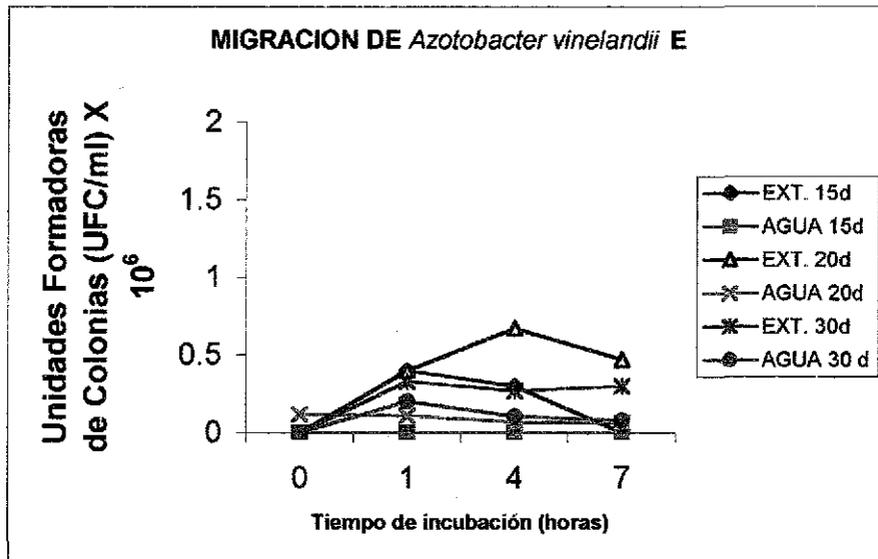
**Fig. 7. PRUEBA DE QUIMIOTAXIS.** Después de montar el dispositivo de quimiotaxis, se realizaron muestreos a las 0, 1, 4 y 7 horas de cada uno de los recipientes (agua destilada estéril - extracto de *P. sajor-caju*) y se procedió a realizar cuentas viables para conocer el número de UFC/ml de *Azospirillum brasilense* A6 que migraron.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



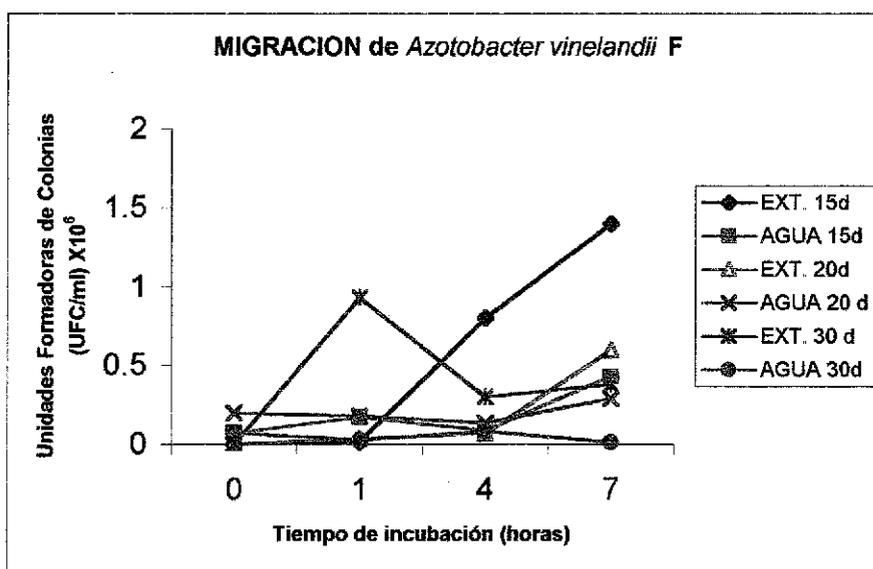
**Fig. 8. PRUEBA DE QUIMIOTAXIS.** Después de montar el dispositivo de quimiotaxis, se realizaron muestreos a las 0, 1, 4 y 7 horas de cada uno de los recipientes (agua destilada estéril - extracto de *P. sajor-caju*) y se procedió a realizar cuentas viables para conocer el número de UFC/ml de *Azospirillum brasilense* A10 que migraron.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



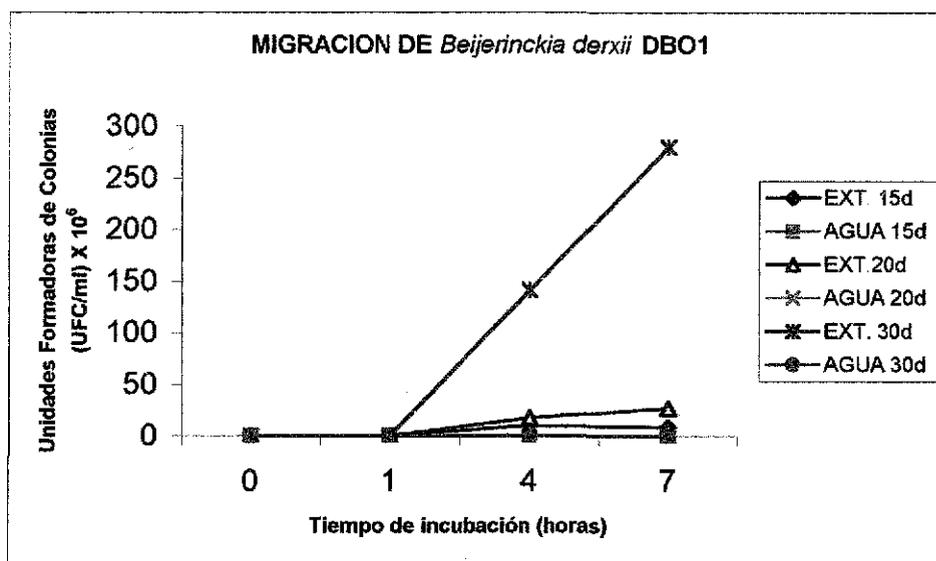
**Fig. 9. PRUEBA DE QUIMIOTAXIS.** Después de montar el dispositivo de quimiotaxis, se realizaron muestreos a las 0, 1, 4 y 7 horas de cada uno de los recipientes (agua destilada estéril - extracto de *P. sajor-caju*) y se procedió a realizar cuentas viables para conocer el número de UFC/ml de *Azotobacter vinelandii*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 10. PRUEBA DE QUIMIOTAXIS.** Después de montar el dispositivo de quimiotaxis, se realizaron muestreos a las 0, 1, 4 y 7 horas de cada uno de los recipientes (agua destilada estéril - extracto de *P. sajor-caju*) y se procedió a realizar cuentas viables para conocer el número de UFC/ml de *Azotobacter vinelandii*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 11. PRUEBA DE QUIMIOTAXIS.** Después de montar el dispositivo de quimiotaxis, se realizaron muestreos a las 0, 1, 4 y 7 horas de cada uno de los recipientes (agua destilada estéril - extracto de *P. sajor-caju*) y se procedió a realizar cuentas viables para conocer el número de UFC/ml de *Beijerinckia derxii* DBO1 que migraron.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 7. CORRELACION ENTRE LA MIGRACIÓN DE LAS BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE HACIA EL EXTRACTO DEL HONGO Y HACIA AL AGUA DESTILADA**

	Cepa	Coefficiente de Correlación ( r ) extracto/agua
Extracto de 15 días	A6	- 0.477
	A10	0.993
	E	- .0364
	F	0.782
	DBO1	0.600
Extracto de 20 días	A6	0.341
	A10	0.925
	E	- 3.328
	F	0.870
	DBO1	0.494
Extracto de 30 días	A6	0.413
	A10	0.224
	E	0.789
	F	- 0.826
	DBO1	- 0.463

Con los datos de UFC/ml para cada cepa se calculó el coeficiente de correlación, el cual fue comparado con los valores del coeficiente de correlación de las tablas cuando  $\alpha = 0.95$  (0.950).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### VI.4. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN CULTIVOS DE *Pleurotus sajor-caju* CRECIDO EN RASTROJO DE MAÍZ EN PRESENCIA DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE

Con la finalidad de conocer si el nitrógeno fijado por las bacterias fijadoras de vida libre influye en el crecimiento de *Pleurotus sajor-caju*, se prepararon cultivos del hongo que fueron inoculados con las suspensiones de las cepas A6, A10, E, F y DBO1, ajustadas a  $10^7$  y  $10^9$  UFC/ml. (Fig. 1)

Los resultados obtenidos después de realizar los muestreos a los 0, 15 y 30 días de incubación de los cultivos inoculados con las cepas bacterianas, se observó un incremento en el contenido de nitrógeno, conforme transcurre el tiempo, excepto en el cultivo del hongo inoculado después de 15 días de incubación con la cepa F ajustada a  $10^7$  y  $10^9$  UFC/ml (Fig. 13), en los que se observa un ligero incremento que no alcanza a la unidad a medida que transcurre el tiempo.

Por otro lado, se observó que el cultivo del hongo que tenía 15 días de incubación y que fue inoculado con la cepa A6 ajustada a  $10^7$  UFC/ml (Fig. 13A), fue donde se presentó mayor contenido de nitrógeno (2.66 mg/g de substrato), seguido por los cultivos del hongo de cero días de incubación, que fueron inoculados con las cepas F y E, ajustadas a  $10^9$  UFC/ml (Fig. 12B), cuyo valor fue 2.04 mg/g de substrato para ambos cultivos. Con respecto a la cepa A10 (Fig. 13A), el valor más bajo que se registró, ocurrió en el cultivo de 15 días de incubación del hongo cuando éste se inoculó con una suspensión bacteriana ajustada a  $10^7$  UFC/ml (1.20 mg/g de substrato), mientras que el valor mas alto se observó en el cultivo de 15 días de incubación del hongo (Fig.13B),

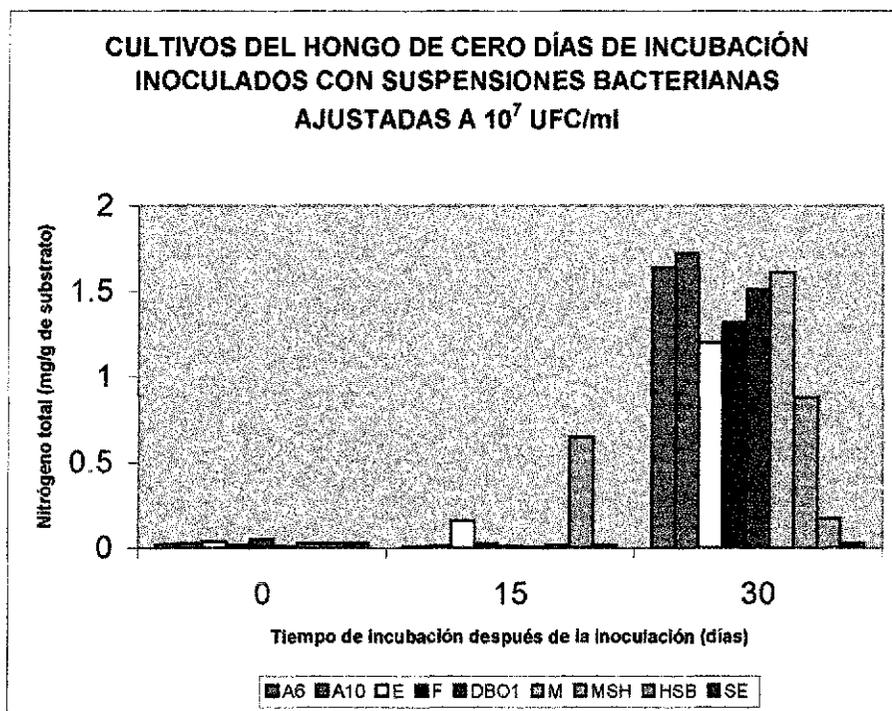
cuando la cepa se ajustó a  $10^9$  UFC/ml (1.856 mg/g de sustrato). La cepa DBO1 (Figs.12A y 13A) ajustada a  $10^7$  UFC/ml e inoculada a cultivos del hongo de cero y 15 días de incubación, registró valores bajos en el contenido de nitrógeno (1,512 y 1.86 mg/g de sustrato respectivamente), comparados con los valores obtenidos en los cultivos con cepa A6 (Tabla 8).

Por otro lado, cuando los cultivos del hongo con cero días de incubación, fueron inoculados con la mezcla de cepas ajustada tanto a  $10^7$  como a  $10^9$  UFC/ml (Fig. 12), presentaron valores de 1.61 y 1.053 mg/g de sustrato respectivamente. Mientras que en los cultivos del hongo sin bacterias o los sustratos inoculados solamente con la mezcla de bacterias y ausencia del hongo, tuvieron valores muy similares a los registrados en el sustrato estéril (Figs. 12 y 13).

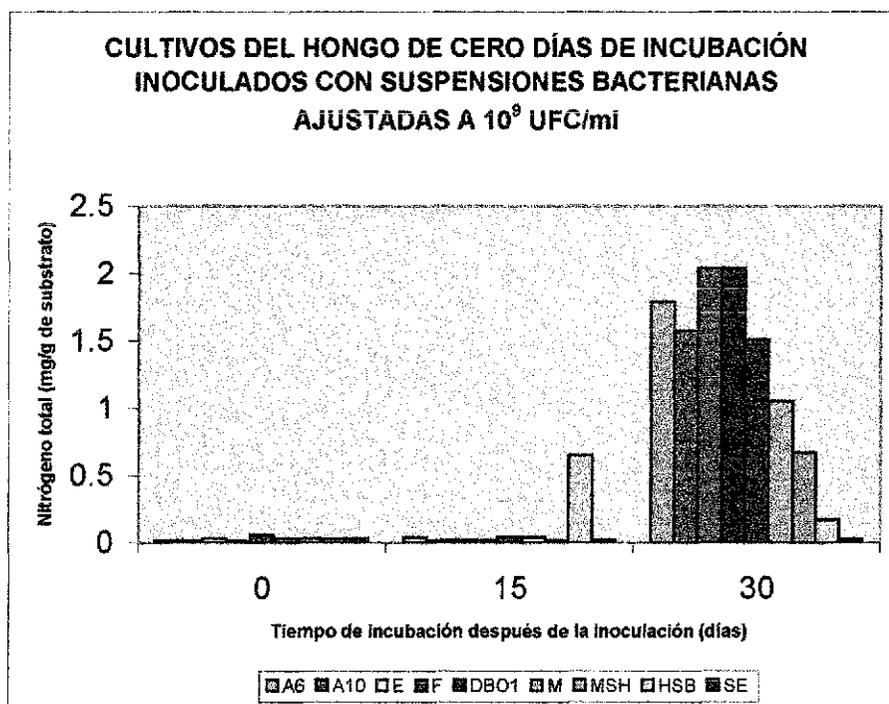
Los valores del contenido de nitrógeno en los cultivos fueron comparados por un lado para establecer la diferencia entre los cultivos de cero y 15 días de incubación del hongo, y por el otro lado, la diferencia entre la concentración celular de  $10^7$  y  $10^9$  UFC/ml (Tablas 8 y 9). Los valores más altos en el contenido de nitrógeno, se presentan en los cultivos de cero días; sin embargo, la cepa A6 presenta el valor mas alto de contenido de nitrógeno a los 15 días, seguida por la cepa A10. En cuanto a la concentración celular, no se puede establecer que en todos los cultivos hubo un incremento en el contenido de nitrógeno al aumentar la concentración celular, ya que solo en los cultivos del hongo de cero días inoculados con las cepas A10, E y F se observó un valor alto cuando se ajustaron a  $10^9$  UFC/ml (1.86, 2.04 y 2.0 mg/g de sustrato respectivamente) y para los cultivos de 15 días cuando la cepa A10 se ajustó a  $10^9$  UFC/ml (1.513 mg/g de sustrato). No así, cuando los cultivos del hongo de 15 días, son inoculados con la cepa A6 ajustada a  $10^7$  UFC/ml se observó un valor alto, lo mismo ocurre cuando la cepa DBO1 es ajustada a  $10^7$  UFC/ml.

No se observa diferencia en el contenido de nitrógeno cuando la cepa E ajustada a  $10^7$  y  $10^9$  es inoculada a cultivos de 15 días de incubación del hongo.

La Prueba de Duncan permite hacer todas las comparaciones múltiples posibles, mediante la utilización de un nivel de significancia variable dependiendo del número de medias que entran en una etapa (Montgomery, 1991; Steel y Torrie.1992). Las tablas 8 y 9, muestra que hay diferencia significativa en el contenido de nitrógeno en los diferentes tratamientos (tiempo de incubación del hongo previo a la inoculación y la concentración celular de las diferentes cepas incluyendo la mezcla total de ellas).



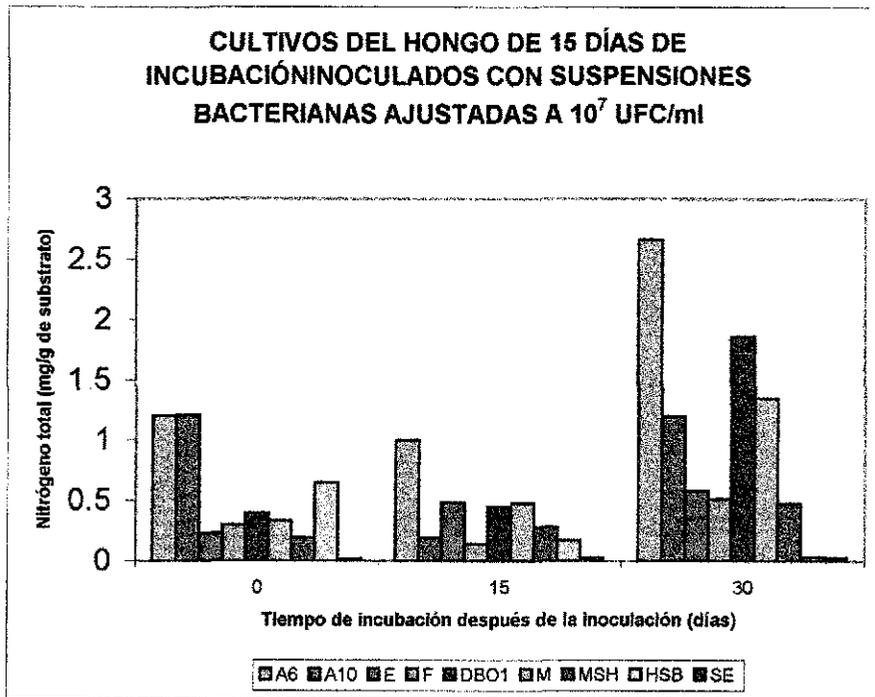
(A)



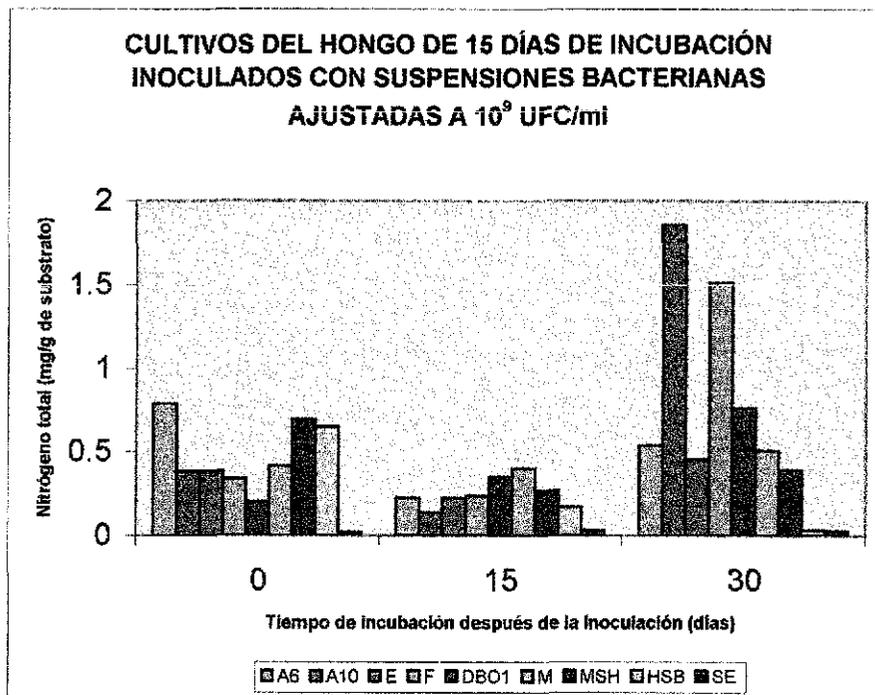
(B)

**Fig. 12. Contenido de nitrógeno.** Los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* fueron inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), cultivos del hongo sin bacterias (HSB), sustrato solo con mezcla de bacterias (MSH) y sustrato estéril (SE).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



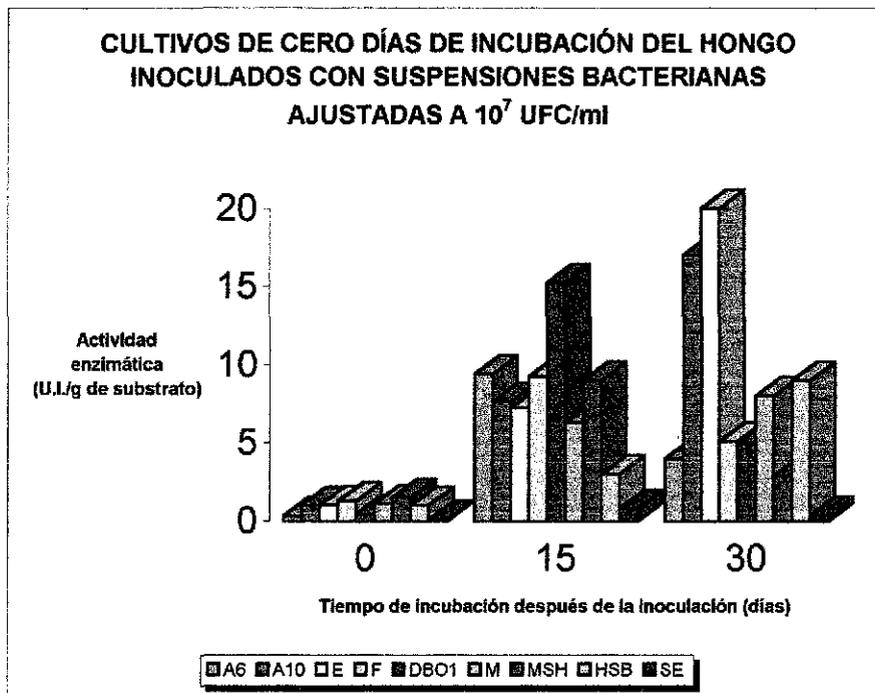
(A)



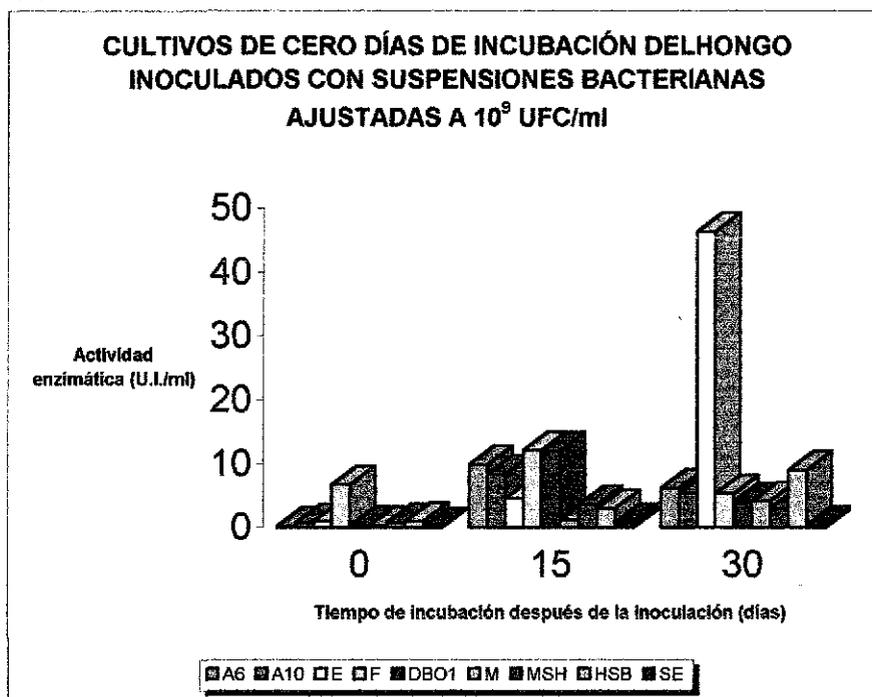
(B)

**Fig. 13. Contenido de nitrógeno.** Los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* fueron inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), cultivos del hongo sin bacterias (HSB), sustrato solo con mezcla de bacterias (MSH) y sustrato estéril (SE).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



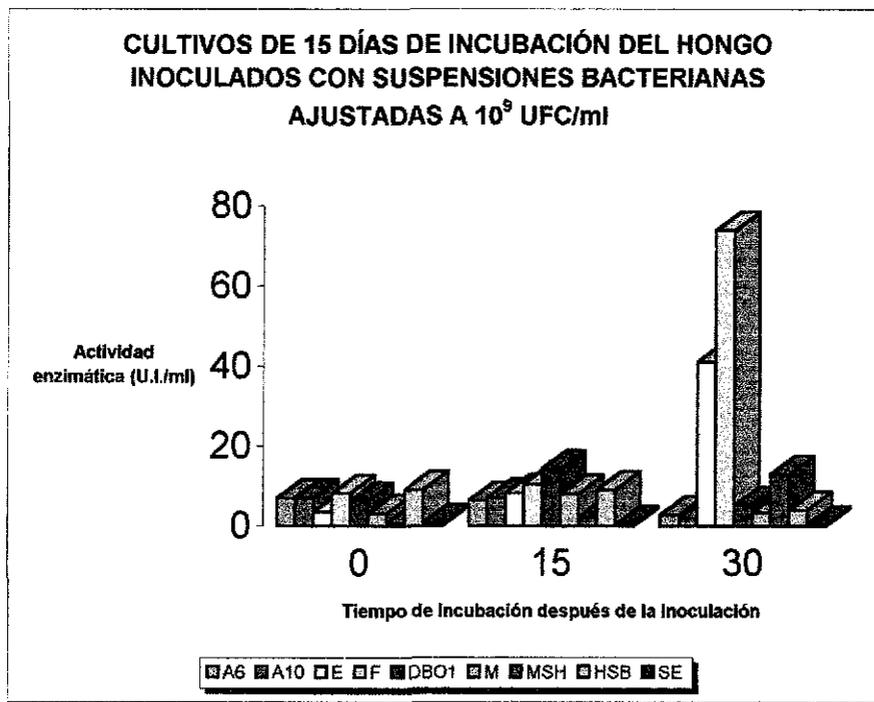
(A)



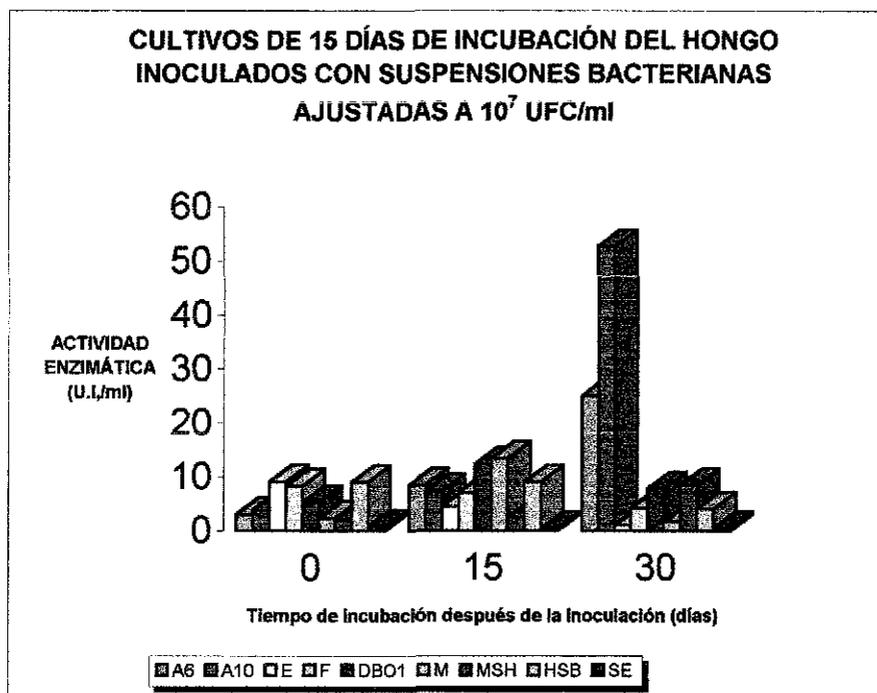
(B)

**Fig. 14. Actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa por el método de Mandels (1978).** La actividad enzimática se determinó a los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), cultivos del hongo sin inóculo de bacterias (HSB), sustrato solo con el inóculo de mezcla de bacterias (MSH) y sustrato estéril (SE).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



(A)



(B)

**Fig. 15. Actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa por el método de Mandels (1978).** La actividad enzimática se determinó a los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), cultivos del hongo sin inóculo de bacterias (HSB), sustrato solo con el inóculo de mezcla de bacterias (MSH) y sustrato estéril (SE).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Pleurotus sajor-caju* es un hongo que puede degradar a la celulosa, ya que presenta dos tipos de celulasas: la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa, por tal motivo fue importante evaluar la actividad de la endoglucanasa considerando que el nitrógeno fijado incorporado al micelio incrementaría la producción de la misma. El tratamiento que fue inoculado con la cepa F ajustada a  $10^9$  UFC/ml (Fig.15B) a los 15 días de incubación del hongo, fue el que presentó mayor actividad (73.9 U/g de sustrato), seguido por los cultivos inoculados con la cepa E ajustada a  $10^9$  UFC/ml cuando el hongo tenía 0 y 15 días de incubación, con valores de 46.4 y 41.07 U/g de sustrato (Fig. 14B y 15B). En el resto de los cultivos se registraron valores entre 3.5 y 9.1 U/g de sustrato. El coeficiente de correlación entre el contenido de nitrógeno y la actividad de la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa indica que hay una correlación baja, y los gráficos de dispersión lo demuestran (Figs. 20 y 21) indicando que la producción de la enzima no depende del contenido de nitrógeno.

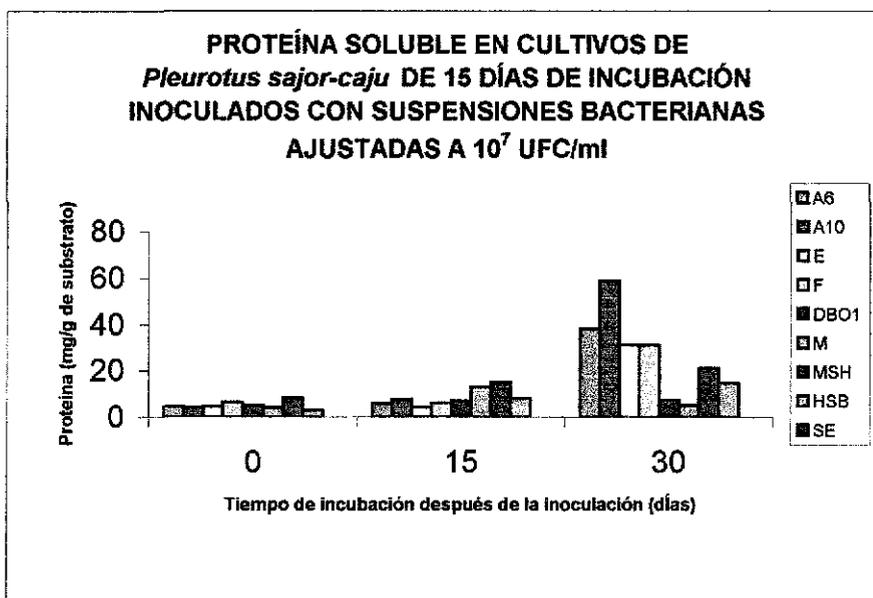
Durante el tratamiento térmico practicado al sustrato o durante la degradación de la celulosa por el hongo, se genera una gran cantidad de azúcares. Su determinación nos permite conocer como están siendo aprovechados por el hongo o si estos se acumulan en el cultivo. Después de analizar a todos los cultivos, se observó que el intervalo de concentración fluctuó entre 0.001 y 0.4 mg de azúcar/g de sustrato para todos los cultivos, (Figs. 18 y 19)

Conforme el hongo crecía sobre el sustrato, éste se enriqueció proteicamente (Figs. 16 y 17). El análisis de la proteína soluble nos indicó la evolución del enriquecimiento. Los resultados señalaron que solo el cultivo que se incubó por 15 días y luego fue inoculado con la cepa E a  $10^9$  UFC/ml (Fig. 17B) presentó mayor contenido proteico, con

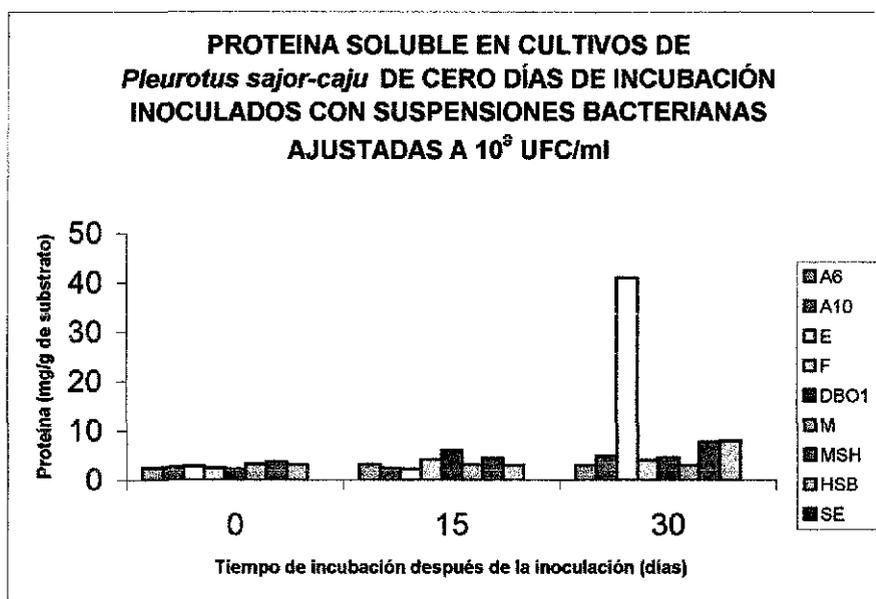
un valor de 70 mg/g de substrato, cuando la evaluación se realizó a los 30 días de incubación del hongo.

Como parte del enriquecimiento proteico, está la proteína en sólidos, para obtener estos valores se multiplicó el nitrógeno total por el factor 6.25 (Han y Anderson, 1975) y como era de esperarse, la cepa A6 fue la que presentó mayor contenido (16.625 mg/g de substrato, Tabla 10).

El intervalo de pH que se registró durante el experimento fluctuó entre 4.2 y 7.2.



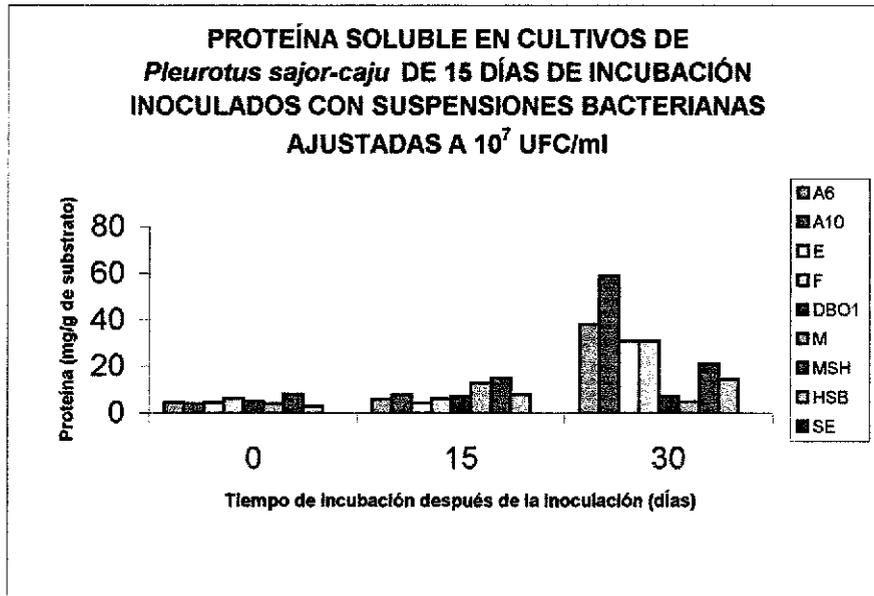
(A)



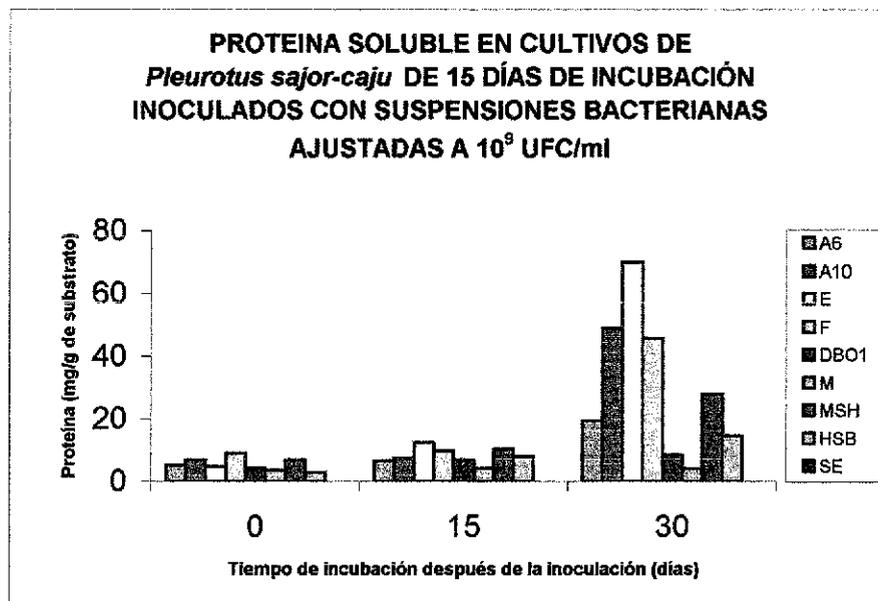
(B)

**Fig.16. Proteína soluble.** Una vez obtenidos los sobrenadantes a partir de las muestras de los cultivos, se procedió a determinar la proteína por el método de Lowry, de los cultivos inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), de los cultivos del hongo sin inoculación bacteriana (HSB), del sustrato solo con mezcla de bacterias (MSH) y sustrato estéril (SE).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



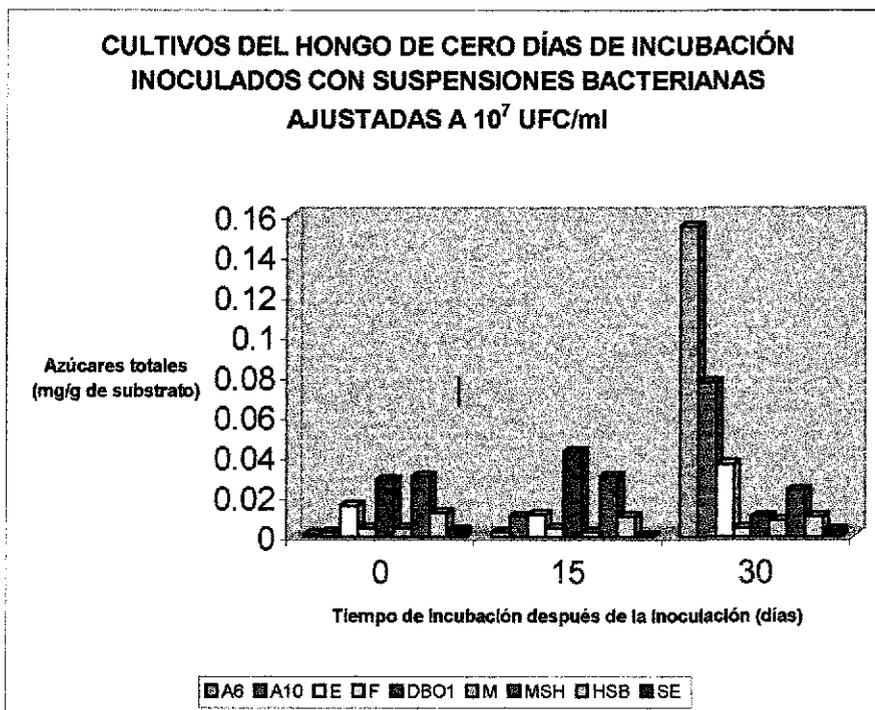
(A)



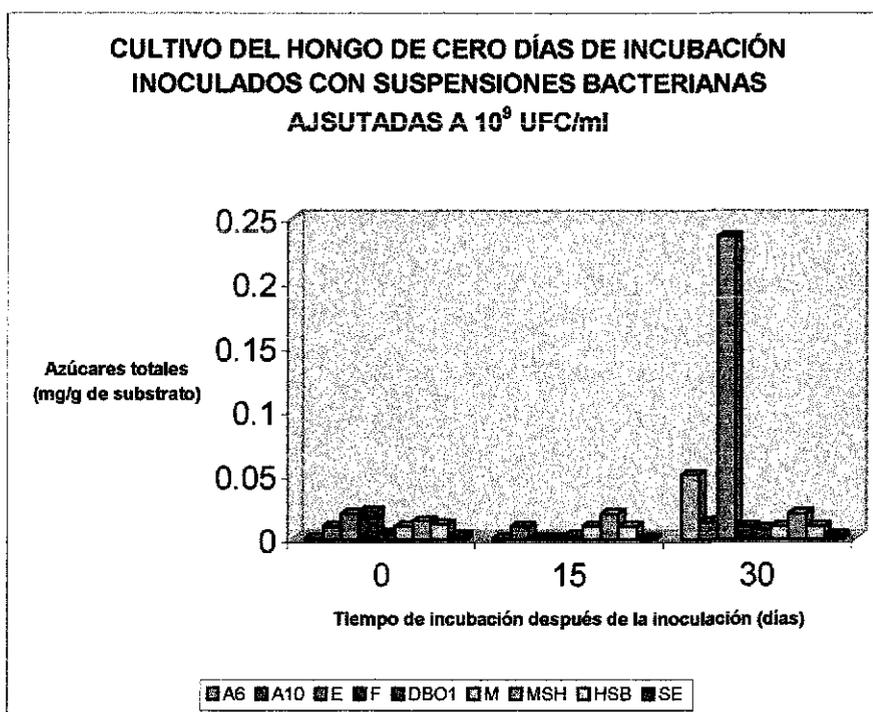
(B)

**Fig.17. Proteína soluble.** Una vez obtenidos los sobrenadantes a partir de las muestras de los cultivos, se procedió a determinar la proteína por el método de Lowry, de los cultivos inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), de los cultivos del hongo sin inoculación bacteriana (HSB), del substrato solo con mezcla de bacterias (MSH) y substrato estéril (SE).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

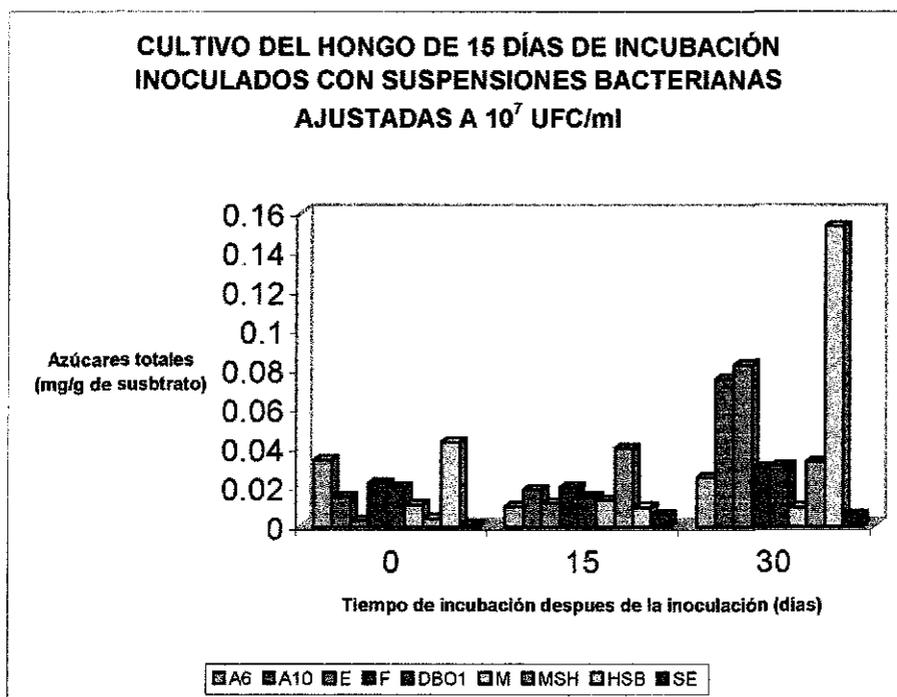


(A)

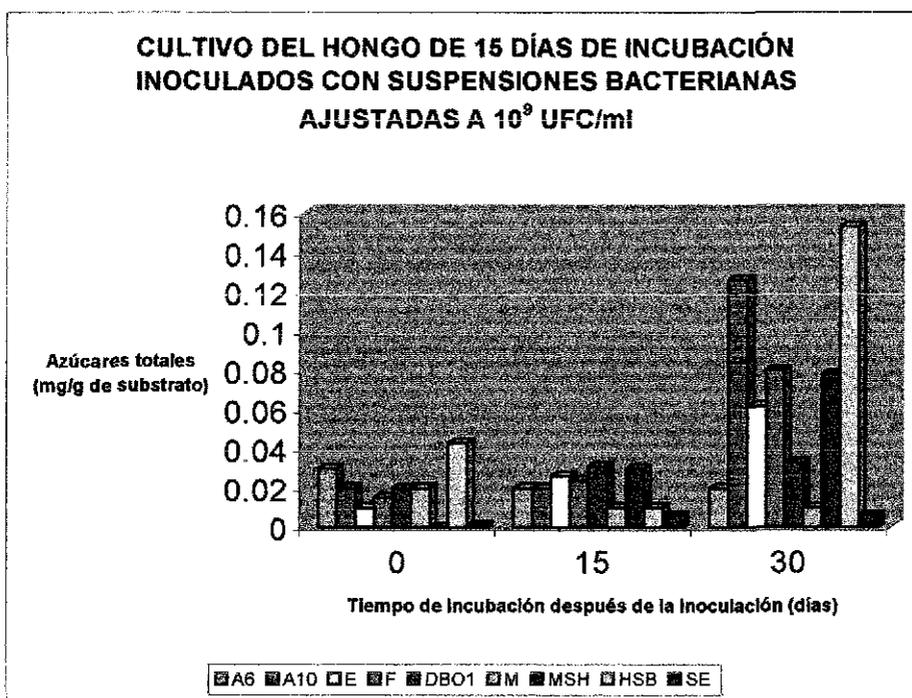


(B)

Fig.18. Azúcares totales. Se determinó el contenido de azúcares a los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), cultivos del hongo sin inóculo bacteriano (HSB), sustrato solo con el inóculo de mezcla de bacterias (MSH) y sustrato estéril.



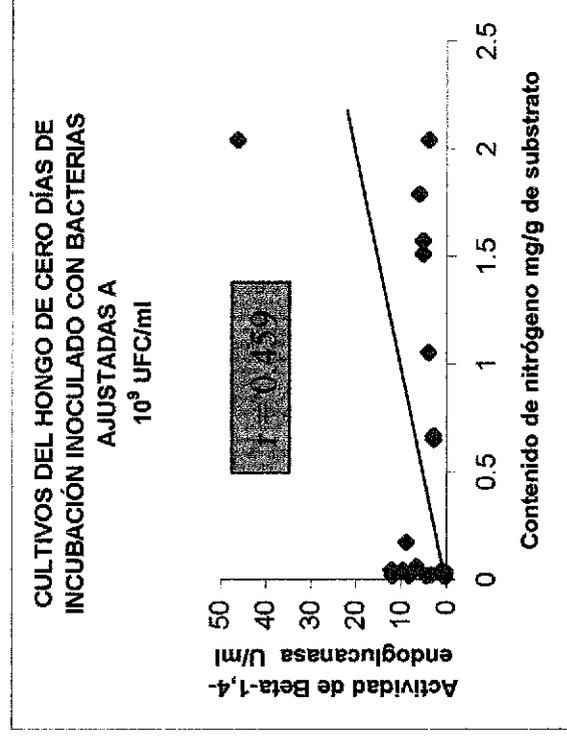
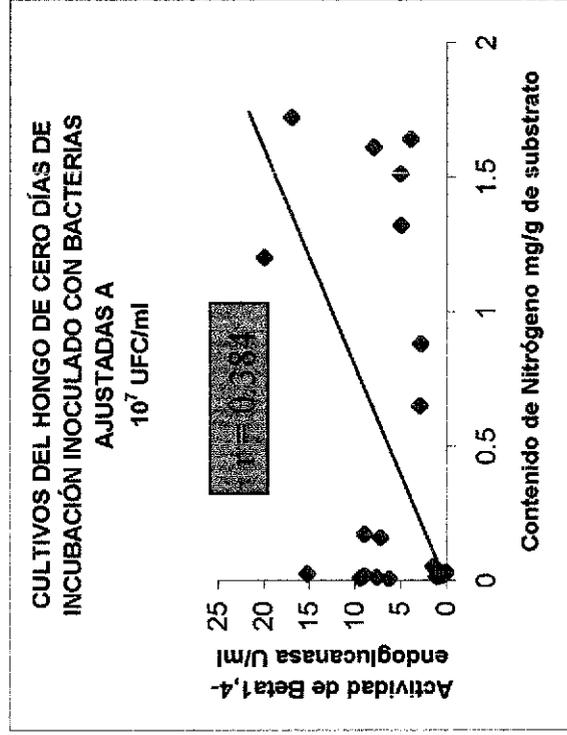
(A)



(B)

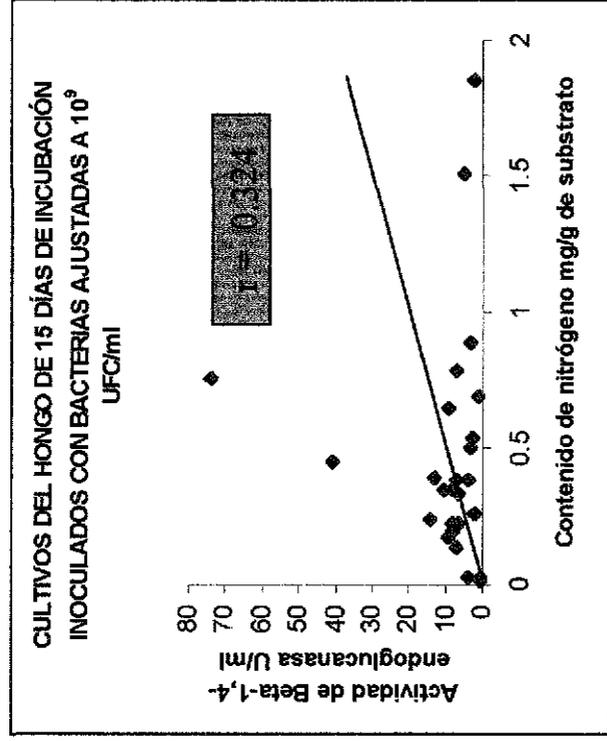
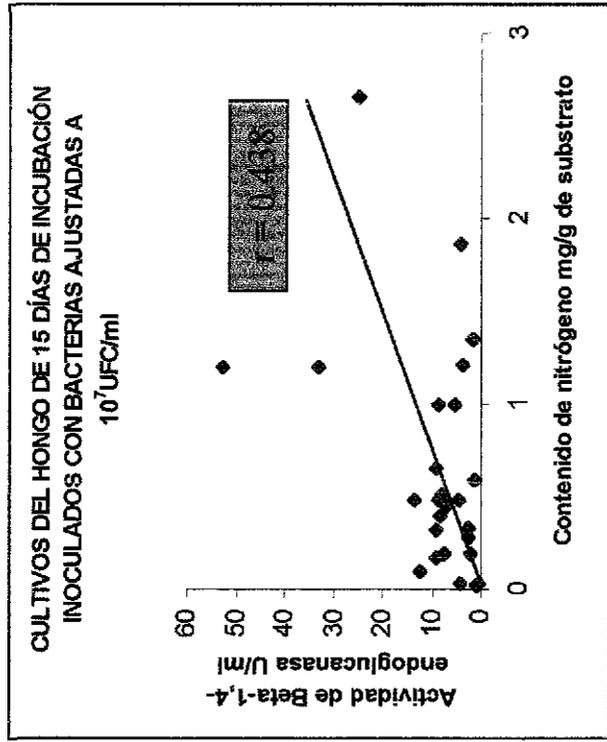
Fig.19. Azúcares totales. Se determinó el contenido de azúcares a los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* inoculados con diferentes cepas y mezcla de ellas (M), cultivos del hongo sin inóculo bacteriano (HSB), sustrato solo con el inóculo de mezcla de bacterias (MSH) y sustrato estéril.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig.20. Correlación.** Con los valores máximos de contenido de nitrógeno y de actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa obtenidos a partir de las muestras obtenidas a los 0, 15 y 30 días de incubación de los cultivos de cero días de incubación del hongo *Pleurotus sajor-caju*, previos a su inoculación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 21. Correlación.** Con los valores máximos de contenido de nitrógeno y de actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa obtenidos a partir de las muestras obtenidas a los 0, 15 y 30 días de incubación de los cultivos de 15 días de incubación del hongo *Pleurotus sajor-caju*, previos a su inoculación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 8. ANALISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE CONTENIDO DE NITRÓGENO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS**

Concentración celular UFC/ml	cepa	Incubación del hongo previo a la inoculación			
		Cero días		15 días	
10 <sup>7</sup>	A6	1.64•	AB ±0.69	2.66	A ±0.91
	A10	1.72	AB ±0.32	1.201	ABC ±0.045
	E	1.2	ABC ±.04	0.586	BC ±0.064
	F	1.512	AB ±0.27	1.86	AB ±0.15
	DBO1	1.32	AB ±0.57	0.513	BC ±1.0
	M	1.61	AB ±0.13	1.35	ABC ±0.79
	MSH	0.880	BC ±0.17	0.478	BC ±0.23
	HSB	0.172	C ±0.04	0.0306	C ±0.006
	SE	0.027	C ±0.003	0.027	C ±0.003
10 <sup>9</sup>	A6	1.79	AB ±0.3	0.539	BC ±0.11
	A10	1.573	AB ±0.02	1.856	ABC ±0.53
	E	2.04	A ±0.27	0.455	BC ±0.063
	F	1.51	AB ±0.27	0.760	ABC ±0.78
	DBO1	2.04	A ±0.25	1.513	ABC ±0.24
	M	1.053	ABC ±0.41	0.507	BC ±0.15
	MSH	0.668	BC ±0.40	0.393	BC ±0.30
	HSB	0.172	C ±0.004	0.0306	C ±0.006
	SE	0.027	C ±0.003	0.027	C ±0.027

• (mg/g de sustrato)

Comparación de los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* de cero y 15 días de incubación previos a la inoculación. Los datos corresponden a los valores máximos del contenido de nitrógeno. Se calculó la cota del error de estimación y se aplicó la prueba de Duncan cuando  $\alpha = 0.05$ , los datos seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 9. ANALISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE CONTENIDO DE NITRÓGENO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS**

Incubación del hongo previo a la inoculación	cepa	Concentración celular	
		10 <sup>7</sup> UFC/ml	10 <sup>9</sup> UFC/ml
Cero días	A6	1.64• ABC	1.79 AB
	A10	1.72 ABC	1.573 AB
	E	1.2 ABC	2.04 A
	F	1.512 ABC	1.51 AB
	DBO1	1.32 ABC	2.04 A
	M	1.61 ABC	1.053 ABC
	MSH	0.880 ABC	0.668 ABC
	HSB	0.172 BC	0.172 C
	SE	0.027 C	0.027 C
15 días	A6	2.66 A	0.539 BC
	A10	1.201 ABC	1.856 ABC
	E	0.586 BC	1.455 BC
	F	1.86 AB	0.760 ABC
	DBO1	0.513 BC	1.513 ABC
	M	1.35 ABC	0.507 BC
	MSH	0.478 BC	0.393 BC
	HSB	0.0306C	0.0306 C
	SE	0.027 C	0.027 C

• mg/g de substrato

Comparación de los cultivos de *Pleurotus sajor-caju* inoculados con suspensiones bacterianas ajustadas a diferente concentración. Los datos corresponden a los valores máximos del contenido de nitrógeno. Se aplicó la prueba de Duncan cuando  $\alpha = 0.05$ , los datos seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 10. CONTENIDO DE PROTEÍNA EN SÓLIDOS**

Concentración bacteriana UFC/ml	cepa	Proteína (mg/g de sustrato)	
		Tiempo de incubación del hongo previo a la inoculación	
		Cero días	15 días
10 <sup>7</sup>	A6	10.25	16.625
	A10	10.75	7.50
	E	7.5	3.67
	F	8.25	3.2
	DBO1	9.45	11.63
	M	10.06	8.44
	MSH	6.25	2.99
	HSB	1.075	1.075
	SE	1.68	1.68
10 <sup>9</sup>	A6	11.18	3.369
	A10	9.83	11.6
	E	12.75	2.84
	F	12.75	9.46
	DBO1	9.44	4.75
	M	6.58	3.17
	MSH	4.175	2.5
	HSB	0.1913	0.1913
	SE	1.68	1.68

Con los valores máximos del contenido de nitrógeno, se calculó la proteína en sólidos multiplicando cada valor por 6.25.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VII. DISCUSIÓN

La literatura ha reportado que cuando se cultivan hongos comestibles usando algún material celulósico tratado por debajo de 71°C, la presencia de los microorganismos favorece el crecimiento micelial y enciende de alguna manera el proceso de fructificación. Actualmente se sabe que los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el substrato incrementan el contenido de nitrógeno.

En este trabajo se hicieron una serie de experimentos para demostrar la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno durante el crecimiento del hongo *Pleurotus sajor-caju*. Para esto, se desarrolló un cultivo en estado sólido del hongo usando rastrojo de maíz como substrato, el cual fue tratado térmicamente a 71°C. A los cultivos se les adicionó suspensiones de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Se pretendía conocer si el nitrógeno fijado era incorporado al micelio, bajo dos condiciones de cultivo, por un lado la edad del hongo y por el otro el tamaño del inóculo bacteriano. Así mismo, se diseñó un ensayo para conocer si los metabolitos liberados por el hongo favorecían la atracción de las bacterias hacia éste.

La técnica de enriquecimiento para el aislamiento de bacterias se basa principalmente en una libre competencia entre los diferentes tipos de organismos en un medio de cultivo líquido, es decir que al inocular un medio con una variedad de microorganismos e incubarlos bajo un conjunto de condiciones de cultivo seleccionadas, solo aquellos organismos para los cuales el ambiente es más favorable, crecerán más que los otros y finalmente se harán predominantes.

Para enriquecer a la población de *Azospirillum*, fueron manejadas dos condiciones de cultivo, por un lado la composición del medio y por el otro la tensión de oxígeno. En este caso se usó el medio propuesto por Becking (1962), el cual estuvo libre de nitrógeno, de tal manera que solo la población fijadora de nitrógeno crecería, además las condiciones estacionarias de incubación permitieron que la concentración de oxígeno fuera baja, esto fue importante, ya que a altas concentraciones de este gas se inhibe la actividad de la nitrogenasa. Este procedimiento permitió el desarrollo de células bacterianas con características del género, tales como bacilos curvos y la presencia de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (Krieg y Holt, 1984)

Las especies de la familia Azotobacteraceae son aerobios típicos, heterótrofos y fijadores de nitrógeno. Por lo tanto, cualquier medio con un pH apropiado, con una fuente de carbono orgánica, minerales (especialmente fósforo) y elementos traza (especialmente molibdeno) y libre de nitrógeno, será apropiado para microorganismos que puedan desarrollarse a expensas del nitrógeno atmosférico (Krieg y Holt, 1984).

Para el enriquecimiento de *Azotobacter* se usaron dos condiciones de cultivo selectivas, una fue el pH y la otra la composición del medio, la concentración de oxígeno no fue determinante, por lo tanto los cultivos se mantuvieron en agitación. En el caso de *Azotobacter vinelandii* se usó el medio diseñado por Reuszer en 1939, modificado por Derx (1951), dentro de la composición del medio se encuentra el benzoato de sodio, el cual suprime el desarrollo de *Azotobacter chroococcum*, además se utilizó el manitol que es rápidamente asimilado por este microorganismos, el pH inicial fue de 7.0. Bajo esta condición se pudo seleccionar a este género, considerando los rasgos característicos.

Derx (1951), en sus primeros aislamientos observó que cuando adicionaba ácido benzoico, benzoato o algún otro compuesto fenólico se suprimía la presencia de *A. chroococcum*, además se favorecía el incremento de la población de *A. vinelandii* cuando usaba como fuente de carbono manitol o etanol ya que son rápidamente asimilados por el microorganismo.

El medio propuesto por Beijerinck (1901) puede ser utilizado para el enriquecimiento de *A. chroococcum* y de *A. beijerinckii*. La selección de cualquiera de estas especies depende básicamente de la adición de  $\text{CaCO}_3$  o de  $\text{CaCl}_2$ , el primero permite obtener condiciones alcalinas importantes para el desarrollo de *A. chroococcum*, además las condiciones aerobias evitan el desarrollo de *Clostridium pasteurianum*, que es una bacteria productora de ácido butírico y es fijadora de nitrógeno. Por su parte, *A. beijerinckii* la cual es una bacteria resistente a las condiciones ácidas, puede desarrollarse en el mismo medio, manejando un pH entre 4.9 - 5.5, con la adición de  $\text{CaCl}_2$  (Krieg y Holt, 1984). En nuestro caso el enriquecimiento fue dirigido hacia la selección de *A. chroococcum*, obteniéndose como resultado bacilos cortos Gram negativos, sin la presencia de quistes.

Una vez que el enriquecimiento se llevó a cabo, se continuó con la etapa de aislamiento. Para el caso de *Azospirillum* se utilizó el medio de Döbereiner y Day (1976). El autor menciona que una de las características de este medio es la utilización del malato de calcio por el microorganismo y el desarrollo de colonias blancas irregulares con centros verdes. Sus observaciones al microscopio indicaron que cuando se utilizó malato, se produjeron formas pleomórficas debido a la oxidación del malato. Cuando aplicamos esta metodología para nuestros aislamientos, se obtuvieron resultados muy similares, como fue la

presencia de colonias verde oscuro. Las observaciones microscópicas mostraron la presencia de bacilos ligeramente curvos.

Durante el aislamiento de *Azotobacter*, no se presentó ningún problema ya que se obtuvieron células con los rasgos característicos del género. El medio de enriquecimiento B fue ajustado a un pH de 7.0 y se usó para el aislamiento de *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter paspali*, *Beijerinckia* y *Derxia*, sin descartar la posibilidad de aislar otros géneros y especies de bacterias fijadoras de nitrógeno que crecen bajo estas condiciones.

*A. vinelandii* puede ser aislado a partir de suelos alcalinos, suelos calcáreos o suelos derivados de sedimentos marinos, donde los valores de pH fluctúan entre 8.0 y 9.5 (Becking, 1962). Sin embargo, en nuestro estudio se manejó un pH de 7.0 tanto para el enriquecimiento como para el aislamiento. Según la metodología propuesta por Derx (1951), el uso del benzoato de sodio, suprime el desarrollo de *A. chroococcum*. Además, se usó manitol, que es fácilmente metabolizado por *A. vinelandii*. Estas condiciones del trabajo permitieron el desarrollo de colonias blancas de 1 mm de diámetro, brillantes y cremosas. El estudio microscópico mostró la presencia de bacilos cortos Gram negativos, así como la presencia de quistes. Los resultados obtenidos concuerdan con la descripción de Lipman (1903), quien indicó que las colonias no son mucoides, pero son elevadas debido a la producción de exopolisacáridos, y además producen un pigmento fluorescente.

Con la finalidad de aislar a *A. paspali* se usó el medio propuesto por Lipman (1903), modificado por Döbereiner (1970). La característica de este medio es que está constituido por una base mineral, sacarosa como fuente de carbono y el azul de bromotimol como indicador de las variaciones de pH. Ha sido reportado que *A. paspali* forma colonias

densas y elevadas, de color amarillo, produce ácido después de 2 a 3 días de incubación. Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron muy similares a los obtenidos por Döbereiner (1970). Microscópicamente se observaron células muy alargadas, rasgo característico de esta especie.

Para el aislamiento de *A. chroococcum* se siguieron dos caminos, uno por el método de tamizado, usando sílica gel con solución de Winogradsky más glucosa, y mediante el uso de medio de cultivo 5 sembrado a partir del medio de enriquecimiento C. En el primer caso, se observaron a las 48 horas, colonias con pigmento no difusible de color café, característico en este microorganismo.

Döbereiner (1970) quién diseñó este medio, informó que se producían colonias con abundante exopolisacarido, con producción de un pigmento café no difusible, cuya producción depende de bajas concentraciones de hierro en el medio. Además, en este medio se puede utilizar como fuente de carbono a la glucosa, sacarosa o benzoato. Las colonias obtenidas siguiendo este procedimiento produjeron gran cantidad de exopolisacarido, lo que hacía que estas fueran muy gomosas. También reportó la presencia de células pleomórficas y en cultivos viejos la presencia de quistes, datos que avalan lo observado por nosotros.

Cuando se utilizó el medio 5, se aislaron colonias redondas, convexas, brillantes y densas por la presencia de exopolisacaridos. La observación microscópica mostró la presencia de bacilos cortos Gram negativos y de quistes. Una de las características de este medio fue la utilización de  $\text{CaCO}_3$ , dando una apariencia opaca al medio, lo que permitió seleccionar a las bacterias fijadoras de nitrógeno de las no

fijadoras, ya que estas últimas solubilizan al carbonato por la producción de ácido (Krieg y Holt, 1984).

Por otro lado, *A. beijerinckii* no fue aislado, debido a que en esta etapa se trabajó un pH de 7.0 y este microorganismo crece a un pH por debajo de 6.5.

*Beijerinckia* es otro microorganismo fijador de nitrógeno al cual se pretendía aislar, de tal manera que se siguió la metodología propuesta por Becking (1961) y Derx (1950). El medio utilizado contenía glucosa como fuente de carbono y una base mineral. Un rasgo importante de este microorganismo es que requiere bajo contenido de calcio y alto contenido de fierro, aspecto contrario a los requerimientos de *Azotobacter* (Becking, 1961). Por otro lado, ha sido establecido que el uso de  $\text{CaCO}_3$ , tiene un efecto inhibitorio para el crecimiento, ya que prolonga la fase lag de crecimiento (Krieg y Holt, 1984). En este trabajo se obtuvieron colonias muy elásticas, transparentes, cubiertas por una goma. Microscópicamente, se observaron bacilos ligeramente curvos, además de células en forma de campana o redondas, todas ellas Gram negativas, que contenían gránulos polares de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Otro aspecto, fue la presencia de una cápsula que encierra a un número de células, de color rosa tenue debido a los polisacaridos, esta información concuerda con lo establecido por Becking (1961). Sin embargo, solo pudo aislarse una cepa.

Una vez obtenidas las colonias característica para cada uno de los microorganismos fijadores de nitrógeno que se pretendían aislar, avaladas mediante observaciones microscópicas, se identificaron a las especies mediante pruebas bioquímicas. En el caso de *Azospirillum* se obtuvo un total de 11 cepas. Las pruebas realizadas fueron la asimilación de manitol y  $\alpha$ -cetoglutarato, el requerimiento de biotina, la

producción de ácido, la prueba de la catalasa y la movilidad. Las cepas A1 y A9 no fueron identificadas.

La cepa A6 fue la única que se identificó como *Azospirillum lipoferum*, a pesar de que la prueba de asimilación de  $\alpha$ -cetoglutarato dio negativa, contrario a lo establecido por Child y Kurtz (1978) quienes establecieron que puede asimilarlo, sin embargo, las pruebas de la catalasa y movilidad fueron negativas, rasgos característicos de esta especie (Dobereiner, 1978).

El resto de las cepas no requirió de biotina, por lo que se trata de *Azospirillum brasilense*. Cuando se analizó la utilización de manitol, las cepas A1, A2, A5 y A11 fueron las únicas que crecieron lo que nos hizo pensar que se trata de *A. lipoferum*, sin embargo la asimilación de  $\alpha$ -cetoglutarato fue negativa para estas cepas, situación que no coincide con lo establecido por Child y Kurtz (1978).

En cuanto a la producción de ácido a partir de la glucosa más peptona, sólo *A. lipoferum* dio la prueba positiva (Tarrand y De-Polli, 1978), en nuestro caso observamos que solo las cepas A9 y A10 dieron negativa la prueba. Con esta información no fue posible identificar a las cepas A1, A2, A5, A9 y A11 ya que estas no requirieron de biotina, pero si crecen sobre manitol además de producir ácido. Por otro lado, las pruebas bioquímicas confirmaron que las cepas A7, A8, A10, A12 y A13 correspondieron a *A. brasilense*. Sin embargo, la prueba de producción de ácido a partir de glucosa-peptona fue positiva, siendo que esta especie no puede utilizarla como única fuente de carbono (Tabla 4). Tarrand y De-Polli (1978) establecieron que ésta puede utilizarla en pequeñas cantidades.

A pesar de que ha sido reportado que algunas especies de *A. lipoferum* producen catalasa, la cepa A6 dio negativa esta prueba.

Para la identificación de las especies de *Azotobacter* fueron realizadas 11 pruebas bioquímicas, (Tabla 5). Según el Manual Bergey (Krieg y Holt, 1984), la maltosa puede ser utilizada por *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter armeniacus*, pero también puede ser utilizada por *Azotobacter vinelandii*. La rafinosa es utilizada por *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*, *A. vinelandii*, *A. armeniacus*, *A. nigricans*. El malato es utilizado por *A. vinelandii* y *A. beijerinckii*, pero puede ser o no utilizado por el resto de las especies. La galactosa puede ser utilizada por *A. vinelandii* y, ser utilizada o no por *A. chroococcum*, *A. beijerinckii* y *A. nigricans*. El sorbitol es asimilado por *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. armeniacus*, pero puede o no asimilarse por *A. chroococcum* y *A. nigricans*. Por otro lado, las únicas especies que presentan movilidad de acuerdo a la literatura son *A. beijerinckii* y *A. nigricans*.

Después de analizar los resultados de cada una de las cepas en cuanto asimilación, se determinó que las cepas B, C, E, F, K y L correspondieron a *Azotobacter vinelandii*, siendo pruebas clave, la de asimilación de ramnosa y  $\alpha$ -cetoglutarato. Aquellas cepas en las cuales los resultados no conducían a la identificación de alguna especie, fueron asignadas como *Azotobacter* sp. (Tabla 5).

Al revisar nuevamente la morfología microscópica de cada cepa aislada, se pudo observar que aún en cultivos jóvenes, las cepas B, C, E, G, H, J, K y L muestran filamentos celulares largos que concuerdan con la morfología de *Azotobacter paspali* en cultivos viejos; sin embargo, de acuerdo a las pruebas bioquímicas, correspondieron a *A. vinelandii*, este hecho nos hace pensar que tal vez ambas especies pudieran encontrarse juntas, ya que éstas son bacilos cortos Gram negativos. De

igual manera, si consideramos que los valores de pH de los hábitats donde se pueden aislar van de 7.5 a 8.0 para *A. vinelandii* y de 6.5 a 7.5 para *A. paspali* (Becking, 1961), es factible que ambas especies se encuentren juntas. Sin embargo, un hecho que nos restringe en tal aseveración, es que los reportes que se tienen indican que la asociación de *A. paspali* a las especies de *Paspalum* es altamente específica y nunca ha sido reportada en otras gramíneas, leguminosas y otras dicotiledoneas (Döbereiner, 1970).

Para la identificación de *Beijerinckia* se usaron como pruebas bioquímicas la asimilación de acetato, benzoato, lactosa, maltosa y propanol, así como la prueba de catalasa y movilidad. La única cepa aislada utilizó tan solo lactosa y considerando la descripción de Tchan (1957), fue identificada como *Beijerinckia derxii*, (Tabla 6). Estas características fueron como ya se mencionó, la presencia de colonias altamente elevadas, húmedas y con gran producción de goma; una morfología microscópica que reveló la presencia de bacilos cortos Gram negativos y células en forma de campana.

Adler (1969) propuso que ciertas bacterias móviles responden a sustancias químicas por una interacción entre la sustancia y quimiorreceptores específicos sobre la superficie de la bacteria. Sin embargo, hasta ahora no ha sido reportado que los metabolitos liberados por *Pleurotus sajor-caju* durante su crecimiento ejerzan algún efecto quimiotáctico sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Por esta razón nos dimos a la tarea de averiguar la respuesta que presentan 5 cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno de vida libre aisladas a partir del rastrojo de maíz cuando se ponen en contacto con los metabolitos liberados por el hongo, obtenidos en diferentes etapas de su crecimiento.

Los resultados presentados en los gráficos indicaron que todas las cepas bacterianas probadas migraron hacia todos los extractos, siendo la cepa de *Beijerinckia dextrii* DBO1 (Fig.11), la que mejor respondió hacia los extractos obtenidos a los 15 ( $101 \times 10^6$  UFC/ml) y 30 días ( $268 \times 10^6$  UFC/ml) del crecimiento del hongo, y la cepa de *Azospirillum lipoferum* A6 (Fig.7) respondió mejor cuando se usó el extracto obtenido a los 20 días ( $570 \times 10^6$  UFC/ml). Estos resultados nos hacen pensar que conforme el hongo se desarrolla hay una liberación de metabolitos que se incrementan en cuanto a concentración y tipo.

Por otro lado, la pronta respuesta hacia el extracto evaluada por el número de individuos que migraron dependerá básicamente de la especie bacteriana, como es el caso de *A. lipoferum* A6 (Fig. 7) que respondió muy bien al extracto del hongo obtenido a los 20 días, pero además a la primera hora de muestreo el número de células era muy alto, comparado con la cepa de *B. dextrii* DBO1 quien respondió mejor al extracto obtenido a los 30 días, pero requirió de 7 horas para tener un valor máximo de migración. Sin embargo, esto resulta lógico si recordamos que esta especie no presenta movilidad.

La respuesta podría deberse a los tipos de receptores presentes, considerando su baja especificidad, aunque en otras especies tales como *Escherichia coli* los receptores son muy específicos, esto hace que se desencadene un mecanismo que dé la señal al flagelo, para que se inicie el movimiento (Prescott et al., 2000).

El cultivo en substrato sólido ha sido valorado como un sistema útil para la producción de enzimas y otros metabolitos valiosos, además de ser útil para el enriquecimiento proteico de residuos agrícolas, especialmente aquéllos derivados de especies fúngicas. Un ejemplo de este tipo de cultivo es el de los hongos comestibles, el cual ha adquirido

gran auge en las últimas décadas. Durante este tiempo se ha implementado un conjunto de investigaciones con la finalidad de optimizar el proceso, mediante la manipulación de las condiciones de cultivo, principalmente las relacionadas con el tipo y concentración de sustrato. En la última etapa de este trabajo, se manejaron cultivos en estado sólido de *Pleurotus sajor-caju*, los cuales fueron suplementados con suspensiones de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Con la finalidad de conocer si el nitrógeno fijado por estas bacterias era asimilado por el hongo, además de establecer una posible correlación entre la actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa y el nitrógeno fijado.

Los resultados obtenidos indicaron que cuando el cultivo del hongo fue inoculado con las cepas bacterianas en forma individual o una mezcla de ellas, el incremento en el contenido de nitrógeno comparado con el sustrato estéril (testigo) fue mayor. Estos resultados coinciden con los reportados por Zheng Shi Li et al. (1984), quienes después de cultivar a *P. sajor-caju* en un sustrato celulósico previamente pasteurizado, encontraron tanto actividad de nitrogenasa como incorporación de  $N^{15}$  comparado con un cultivo del hongo sobre sustrato estéril. En nuestro caso, de todos los cultivos del hongo, el que fue inoculado a los 15 días de incubación con la cepa de *Azospirillum lipoferum* A6 (Fig. 13A) ajustada a  $10^7$  células/ml, fue el que registró mayor contenido de nitrógeno (2.66 mg de N/g de sustrato), seguido por los cultivos del hongo que fueron inoculados desde el inicio del crecimiento con las cepas de *Azotobacter vinelandii* E o F ajustadas a  $10^9$  células/ml, que en ambos casos los valores fueron de 2.04 mg de N/g de sustrato (Fig. 12B).

Estos resultados nos sugirieron que la edad del hongo, la cepa bacteriana y el tamaño del inóculo son factores determinantes en la fijación de nitrógeno

Hay dos hechos importantes que hay que destacar, uno es el tiempo de incubación después de la inoculación bacteriana y el uso de testigos que solo contenían al hongo, o la mezcla de cepas únicamente sobre el substrato. En el primer caso, en todos los cultivos se observó que se requirió de 30 días para que se registrara un incremento de nitrógeno en el substrato (Figs. 12 y 13); mientras que en el segundo caso, las bacterias sin el hongo no contribuyeron a un incremento del nitrógeno en el mismo. Además, cuando el cultivo del hongo fue inoculado con la mezcla de bacterias, se observó un efecto antagónico, ya que los valores de nitrógeno en el substrato fueron inferiores al obtenido con la cepa A6. Esto tal vez se deba a que se reducen las actividades de los microorganismos por la competencia por fuentes como, nutrimentos orgánicos, factores de crecimiento, oxígeno y espacio (Sylvia et al., 1999).

Zheng Shi Li et al. (1984), observaron que cuando el substrato es pasteurizado, la actividad de la nitrogenasa era de 19 a 62 veces más alta que cuando se esteriliza y que bacterias fijadoras de nitrógeno crecidas en presencia del hongo, incrementan el contenido de  $N^{15}$  en la hifa de 10 a 40 veces más, que cuando están ausentes las bacterias, por lo que sugieren que durante el cultivo de *Pleurotus sajor-caju* el nitrógeno se incrementa debido a la actividad de diversos géneros de bacterias fijadoras, esto dependerá también de la efectividad de las cepas que estén presentes, como se ha demostrado en este ensayo, ya que cuando los cultivos del hongo se inoculan con una mezcla de cepas, el contenido de nitrógeno no es muy alto.

Otra evaluación que se llevó a cabo fue la actividad de la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa. El tratamiento donde se registró mayor actividad, fue aquel donde el hongo tenía 15 días de crecimiento y se inoculó con

*Azotobacter vinelandii* F ajustada a  $10^9$  células/ml, con un valor de 73.9 U/g de substrato (Fig. 15B); así mismo, cuando se comparó esta actividad con el contenido de nitrógeno (1.512 mg de N/g de substrato), se observó que éste también era alto (Fig. 13B). Le siguieron en orden decreciente, el cultivo del hongo incubado previamente 15 días e inoculado con la cepa de *Azospirillum brasilense* A10 ajustada a  $10^7$  células/ml donde se registró un valor de 52.63 U/g de substrato (Fig. 15A). Sin embargo, el cultivo inoculado con la cepa A6 que presentó mayor contenido de nitrógeno (2.66 mg/g de substrato) registró una baja actividad, tan solo 25 U/g de substrato (Fig. 15A). Esta información nos hace pensar que el nitrógeno fijado puede ser o no utilizado para la síntesis de enzima extracelular.

El tamaño del inóculo bacteriano ( $10^7$  y  $10^9$  UFC/ml) no favoreció el incremento en la actividad enzimática del hongo y los valores más altos se observaron entre los 15 y 30 días de muestreo a partir de los cultivos de cero y 15 días de incubación (Figs. 14 y 15).

Hasta ahora, la literatura no ha reportado algún sistema como el que se efectuó en este trabajo, de tal manera que nuestros resultados, aportan nueva información sobre los requerimientos de *Pleurotus sajor-caju* para crecer en un substrato celulósico.

Kim (1992), estableció que es difícil comparar los valores de actividad enzimática, con los reportados en la literatura para la producción de celulasas en un cultivo en estado sólido, debido a las diferentes formas en las que se expresa la actividad enzimática. Además, Lal y Panda (1995), al manejar cultivos sólidos de *P. sajor-caju* manipularon ciertas condiciones ambientales, tales como concentración de substrato, temperatura y pH, obteniendo buena actividad y producción de proteína; sin embargo, no tomaron en cuenta la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno.

## VIII. CONCLUSIONES

La alimentación es una de las prioridades del hombre para el sustento de la vida. Esta necesidad crea una gran responsabilidad a la industria alimentaria que a su vez exige un mayor desarrollo tecnológico. Precisamente, una de las tecnologías alimentarias es el cultivo de hongos comestibles, el cual ha adquirido gran popularidad en los últimos años, por su valor culinario y también por su potencial como fuente de proteína, vitaminas y minerales.

El presente trabajo aporta a la tecnología del cultivo de hongos comestibles, una metodología que permitirá el enriquecimiento nutritivo de *Pleurotus sajor-caju* utilizando la propiedad de fijación de nitrógeno que presentan algunas bacterias.

Se aislaron 23 cepas autóctonas del rastrojo de maíz, capaces de fijar nitrógeno en forma asimbiótica, después de aplicar una serie de pruebas bioquímicas y morfológicas, solo se identificaron como *Azotobacter vinelandii* 6 cepas, una de *Azospirillum lipoferum*, 5 cepas de *Azospirillum brasilense* y una cepa de *Beijerinckia dextrii*.

Los estudios de quimiotaxis y de incorporación de nitrógeno fijado, mostraron que las bacterias responden quimiotácticamente a los metabolitos liberados por el hongo, y que parte del nitrógeno fijado por las bacterias enriquece el cultivo del hongo en estado sólido.

Este sistema de cultivo permitiría que se presente una asociación hongo-bacteria, en la que ambos organismos puedan resultar beneficiados. Además, el tamaño del inóculo bacteriano y la edad del cultivo del hongo, son factores determinantes para la fijación de nitrógeno y esto dependerá básicamente de la cepa bacteriana que este presente.

El comportamiento de cada una de las cepas bacterianas inoculada en los cultivos del hongo fue diferente, cabe destacar que *Azospirillum lipoferum* (A6) respondió al extracto del hongo obtenido a los 20 días de su incubación ( $570 \times 10^6$  UFC/ml) y aportó mayor cantidad de nitrógeno fijado al cultivo del hongo comestible (2.66 mg/g de subsstrato).

Se encontró que hay una correlación baja entre el incremento de nitrógeno en el micelio del hongo y la actividad de la enzima  $\beta$ -1,4 endoglucanasa. La producción de la enzima no depende del contenido de nitrógeno.

# **APÉNDICE**

## **MEDIOS DE CULTIVO**

### **Medios para el enriquecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno:**

Medio A para *Azospirillum lipoferum* (Becking, 1926)

Agua destilada	1000 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.2 g
Malato de calcio	10.0 g
pH 5.0	

Medio B para *Azotobacter vinelandii* (Derx, 1951)

Agua destilada	100 ml
Manitol	0.5 g
ó C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	1.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
Benzoato de sodio	1.0 g

Medio C para *Azotobacter chroococcum* (Beijerinck, 1901)

Agua destilada	1000 ml
Glucosa	20.0 g
CaCO <sub>3</sub>	20.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g

Medio D para *Azospirillum*

Agua destilada	1000 ml
Malato de calcio	10.0 g
ó glucosa	20.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02 g
Extracto de lavadura	0.1 g
pH 6.9	

**Medios para el aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno:**

Medio 1 para *Azotobacter paspali* (Döbereiner, 1970)

Agua destilada	100 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.005 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.015 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g
CaCl <sub>2</sub>	0.002 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.0002 g
FeCl <sub>3</sub> (al 10% p/v)	1 gota
Azul de bromotimol (0.5% p/v disuelto en etanol)	10 ml
Sacarosa	2.0 g
Agar	2.0 g
pH 2.0	

Medio 2 para *Derxia* \*

Agua destilada	100 ml
Almidón	2.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.005 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.015 g
MgSO <sub>4</sub>	0.02 g
CaCl <sub>2</sub>	0.002 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 g
FeCl <sub>3</sub> (al 10% p/v)	1 gota
Azul de bromotimol (0.5% p/v disuelto en etanol)	5 ml
Agar	2.0 g

Medio 3 para *Azotobacter vinelandii* \*

Agua destilada	100 ml
Manitol	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
Benzoato de sodio	1.0 g
Agar	2.0 g

Medio 4 para *Beijerinckia*\*

Agua destilada	100 ml
Glucosa	2.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g
FeCl <sub>3</sub>	0.0025 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.005 g
CaCl <sub>2</sub>	0.05 g
pH 9.0	
Agar	2.0 g

Medio 5 para *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter beijerinckii*\*

Agua destilada	100 ml
Glucosa	2.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8 g
FeCl <sub>3</sub>	0.01 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.005 g
CaCl <sub>2</sub> ó	
CaCO <sub>3</sub>	0.05 g
pH 7.4 - 7.6	
Agar	2.0 g

Medio 6 para *Azospirillum*\*

Agua destilada	100 ml
Malato de sodio	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g
NaCl	0.01 g
CaCl <sub>2</sub>	0.002
FeCl <sub>3</sub>	0.001 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.0002 g
Azul de bromotimol (0.5% p/v en etanol)	5 ml
pH 6.8	
agar	2.0 g

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

(\*Krieg y Holt)

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, J. 1969. Chemoreceptors in bacteria. **Science** 166: 1558-1597
- AOAC (**Official Methods of Analysis Association of Agricultural Chemistry**). 1975. Washington D. C
- Atlas R. M. y Bartha R. 2002. **Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental**. Prentice Hall Addison Wesley, Madrid.
- Becking, J. H. 1961. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I. Geographical and ecological distribution in soil. **Plant and Soil** 14: 49-81.
- Becking, J. H. 1962. An aerobic heterotrophic *Spirillum* fixing atmospheric nitrogen. **Proceeding of the Eight International Congress of Microbiology**. Montreal, Canada. Abstract B 14.5.
- Beijerinck, M. W. 1901. On oligonitrophilus bacteria. **Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen** 3: 586-595.
- Block, S. S., G. Tsao and L. H. Han. 1958. Production of mushroom from sawdust. **J. Agric. Food Chem.** 6: 923-927.
- Brown, C. M. 1980. Ammonia assimilation and utilization in bacteria and fungi. In: Paine J. W. (ed.). **Microorganisms and Nitrogen Sources**. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Castañeda, R.P. 1995. Bioestadística Aplicada. Ed. Trillas S.A. de C.V. México D.F.
- Collins, M. A. 1976. Colonization of leaves by phyloplane saprophytic and their interactions in this environment. In: **Microbiology of Aerial Plant Surfaces**. C. H. Dickinson and T. F. Preece (eds.). Academic Press, London.
- Cronin, D. A, and M. K. Ward. 1971. The characterization of some mushroom volatile substances. **J. Sci. Fd. Agric.** 22: 47.
- Child, J. J. and W. G. W. Kurtz. 1978. Inducing effect of plant cell on nitrogenase activity by *Spirillum* and *Rhizobium* "in vitro". **Can J. Microbiol.** 24: 143-148.

- Dennis, C. 1976. The microflora on the surface of soft fruit. In: **Microbiology of Aerial Plant Surfaces**. C. H. Dickinson and T. F. Preece (eds.). Academic Press, London.
- Derx, H. G. 1950. *Azotobacter insigne* spec. Nov. fixateur d'azote à flagellation polaire. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**. Series C 54: 342-350.
- Döbereiner, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. **Zentralblatt für Bakteriologie**. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten und Hygiene. Abt. 2. 124: 224-230.
- Döbereiner, J. and J. M. Day. 1976. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: E. Newton (ed.). **Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Fixation**. Vol 2. Washington.
- Döbereiner, J. 1978. Section 2. Aerobic/Microaerophilic. Motile, Helical/Vibroid, Gram-negative bacteria; Genus *Azospirillum*, Tarrand, Krieg and Döbereiner. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.) **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Etter, B. E. 1929. New media for developing sporophores of wood-rot fungi. **Mycologia** 21: 197-203.
- Flack, R. 1917. Über die Walkultur des Austernpilzes (*Agaricus ostreatus*) auf Laubholzstubben. **Z. Forst- und Jagdwiss.** 49: 159-165.
- Fisher, K. H. and W. Grosch. 1987. Volatile compounds of importance in the aroma of mushroom. (*Psalliota bispora*). **Lebensm. Wiss. Technol.** 20: 233.
- Griffin, T.H. 1994. Fungal Physiology. **John Wiley & Sons**. New York.
- Grosch, W. and M. Wurzenberger. 1984. Enzymic formation of 1-octen-3-ol in mushroom. **Develop. Food Sci.** 10: 253.
- Gyurko, P. 1972. Die Rolle der Belichtung bei dem Anbau des Austernseitlings (*Pleurotus ostreatus*). **Mushroom Sci.** 8: 461-469.
- Han, Y. W. and A. W. Anderson. 1975. Semisolid fermentation of ryegrass straw. **Appl. Microbiol.** 30(6): 930-934.

- Jandaik, C. L. and J. M. Kapoor. 1974. Artificial cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (fr.) Singer. **The Mushroom J.** 22.
- Jaques, M. A., L. L. Kinkel and C. E. Norris. 1995. Population sizes, immigration and grow of epyphytic bacteria leaves of different ages and positions of field-grow endive (*Cichorium endivia* var. *tatiofolia*). **Appl. Envir. Microbiol.** 61(3): 899-906.
- Kandaswamy, T. K., and K. Ramaswamy. 1976. Effect of organic sustrates with differen C:N ratio on yield of *Pleurotus sajor-caju* In: **Proc. first Symposium on survey and cultivation of edible mushroom in India. Vol. II.** pp 81-85.
- Kaufert, F. 1935. The production of asexual spores by *Pleurotus corticatus*. **Mycologia** 27: 33-340.
- Kitamoto, Y., A. Susuky and S. Furukawa. 1972. An action spectrum for light induced primordium formation in basidiomycetes, *Favohus arcuarius* (fr.) Ames. **Plant Physiol.** 49: 338-340.
- Kim, L. 1992. Solid substrate fermentation of leached beet pulp with *Trichoderma aureoviride*. **World J. Microbiol Biotech.** 8: 488-493.
- Krieg, N. R. and J. G. Holt (eds.) 1984. **Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol. 1 Williams & Wilkins. Baltimore.
- Lal, N. and T. Panda. 1995. Studies on protein enrichment in sawdust by *Pleurotus sajor-caju*. **Bioproc. Engineering** 12: 163-165.
- Last, F. T. 1955. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 38: 221-239.
- Last, F. T. and R. C. Warren. 1972. Non-parasitic microbes colonizing green leaves: their form and functions. **Endeavor** 31: 143-150.
- Lipman, J. G. 1903. Experiments on the transformation and fixation of nitrogen by bacteria. New Jersey State Agricultural Experiment Station. **Ann. Report** 24: 215-285.
- Litchfield, J. H. 1967. Morel mushroom mycelium as a food-flavoring material. **Biotechnol Bioeng.** 9: 289.
- Lowry, O. H., M. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randell. 1951. Protein measurement with the Folin Fenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

- Madigan M. T., J. M. Martin and J. Parker. 1998. **Brock, Biología de los Microorganismos**. Prentice Hall Iberia. Madrid.
- Mandels, M. and R. E. Andreotti. 1978. Problems and challenges in the cellulose fermentation. **Process Biochem.** 13: 6-13.
- Marshall, K. C. 1976. **Interfaces in Microbial Ecology**. Harvard University Press. pp 1-5.
- Méndez, I. et al. 1997. **El protocolo de investigación, lineamientos para su elaboración y análisis**. Ed. Trillas S.A. de C.V. México D.F.
- Miller, G. H. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 3: 426-428.
- Montgomery, D.C. 1991. **Diseño y análisis de experimentos**. Grupo Editorial Iberoamérica. S.A de C.V. México D.F.
- Park, J.Y. and A. Agnihotri. 1969. Bacterial metabolites trigger sporophore formation in *Agaricus bisporus*. **Nature** 222: 984.
- Patrabansh, S. and M. Madan. 1997. Mineral content of the fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer cultivated on different kinds of biomass. **Acta Biotechnol.** 19: 101-109.
- Pérez, S. y A. Torralba. 1997. La fijación de nitrógeno por los seres vivos. **Seminario de Fisiología Vegetal. N° 21.01**. Facultad de Biología, Oviedo, España.
- Perkins, J. H. and S. A. Gordon. 1969. Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. II. Effects of monochromatic light. **Plant Physiol.** 44: 1712-1716.
- Preece, T. F. and C. H. Dickinson. 1971. Interactions with aerial plant structures. In: Atlas, M. R. and R. Bartha (eds.), **Microbial Ecology, fundamentals and applications**. Addison Wesley Longman, Inc. New York.
- Prescott, L. M., J. P. Harley y D. A. Klein. 2000. **Microbiología, estructura y función de la célula procariote**. McGraw\_Hill Interamericana. Madrid.
- Pyysalo, H. and M. Suihko. 1976. Odor characteristic and threshold value of some volatile compounds in fresh mushroom. **Lebensm. Wiss. Technol.** 9: 371.

- Quimio, T. H., S. T. Chang and D. J. Royse. 1990. **Technical guidelines for mushroom growing in the tropics**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Paper 106.
- Rangaswami, G. T., T. K. Kandaswami and K. Ramasamy. 1975. *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer protein rich nitrogen fixing mushroom fungus. **Curr. Sci.** 44: 403-404.
- Reuszer, H. W. 1939. The effect of benzoic acid compounds upon the abundance of microorganisms, including *Azotobacter* organisms, in a soil. Proceeding of the Third Commission of the International Society of Soil. **Science A**: 151-160.
- Ruenen, J. 1956. Occurrence of *Beijerinckia* species in "phyllosphere". **Nature** 177: 220-221.
- Somasegaran, P. and M. J. Hoben. 1985. **Methods in legume Rhizobium technology**. Niftal and Mircen, Hawwaii.
- Stamets, P. and J. S. Chilton. 1983. **The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushroom at home**. Agarikon Press. Olympia, Wa.
- Staněk, M. and J. Zatecká. 1967. Effect of cellulose-decomposing microorganisms on the growth of mycelium of cultivated mushroom. **Mushroom Growing** 4: 4-8.
- Staněk, M. 1972. Microorganisms inhabiting mushroom compost during fermentation. **Mushroom Sci.** VIII: 707-811.
- Steel, G.R. y J.H. Torrie. 1992. **Bioestadística. Principios y procedimientos**. 2<sup>da</sup> Edición. McGraw-Hill/Interamericana. México D.F.
- Sylvia, D. M., J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel and D. A. Zuberer. 1999. **Principles and applications of soil microbiology**. Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- Tarrand, J. J. and H. De-Polli. 1978. **A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.** **Can. J. Microbiol.** 24: 967-980.

- Tchan, V. T. 1957. Studies of nitrogen-fixing bacteria. VI A new species of nitrogen fixing bacteria. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales** 82: 314-316.
- Thompson, J. P. and V. B. D. Skerman. 1979. **Azotobacteraceae: The taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria.** Academic Press, London.
- Thornton, R. H. 1953. Feature of growth of actinomycetes. In: soil. Research 6(6) London (ex: Garret, S. D.). 1965. **Toward biological control of soil-borne plant pathogen.** University of California Press. Berkeley, Los Angeles..
- Villanueva-Díaz, C., J. Arias Martínez, M. Bustos-López and F. Vadill-Ortega. 1992. Novel model for study human sperm chemotaxis. **Fertility and Sterility** 58: 392-395.
- Voet, D., J. G. Voet, and C. W. Pratt. 1999. **Fundamentals of Biochemistry.** John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Winogradsky, S. 1938. Etudes sur la microbiologie du sol et des esuz. Sur la morphologie et l'écologie des Azotobacter. In: **Microbiologie du Sol.** Masson et Cie. Paris.
- Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*. In: Chang, S. T. and W. A. Hayes (eds.). **The biology and cultivation of edible mushroom.** Academic Press. New York.
- Zheng Shi-li, Yang Pei-yu, He Jin-xing, Lin Xing-jian and Zhang Weiguan. 1984. Nitrogen fixation in the cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Mushroom Newsletter for the Tropics** 3(2): 3-7.