

2 E No. 31

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



IDENTIFICACION DE FOSFOBACTERIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A:

Claudia Espinosa Ortega

MEXICO. D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
OBJETIVOS	7
MATERIALES Y METODOS	9
RESULTADOS Y DISCUSION	19
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	42
APENDICES	
I DESCRIPCION DEL FUNDAMENTO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS	43
II MEDIOS DE CULTIVO	51
III REACTIVOS	66
BIBLIOGRAFIA	68

INTRODUCCION

El fósforo es importante en la agricultura porque junto con el nitrógeno es un nutriente vital para plantas, animales y microorganismos y con frecuencia se encuentra deficiente en los suelos de cultivo (Fassbender, 1975), motivo por el cual es común la adición de fertilizantes fosfatados para corregir ésta condición, pero al ser aplicados a ciertos suelos sufre una serie de reacciones que provocan que el fósforo soluble pasa a formar compuestos insolubles que a su vez limitan en gran parte su aprovechabilidad ocasionando una disminución en los rendimientos de los cultivos.

El uso y manejo razonable y eficiente de los fertilizantes constituye uno de los problemas que mayor atención requieren, por jugar éstos un papel sumamente importante en la producción agrícola. Es decir aplicar las cantidades requeridas de nutrientes adecuadas a las características del suelo, clima y cultivos, con el fin de obtener rendimientos óptimos que ayuden a la producción de alimentos que la creciente población requiere.

La forma usual de producir fertilizantes fosfatados es tratando la roca fosfórica con ácido sulfúrico o fosfórico con lo que se obtiene un aumento en la solubilidad del fosfato, pero el precio del ácido causa un aumento en el costo del fertilizante, a éste hecho se debe el interés de incrementar la producción vegetal, reduciendo el consumo de fertilizantes químicos de elevado costo y contaminantes de los ecosistemas aprovechando la actividad de los microorganismos que es de gran utilidad por su repercusión directa en el crecimiento y nutrición de las plantas, y consecuentemente - en la nutrición de los animales y el hombre.

De ahí el interés de mejorar las poblaciones microbianas que habitan en el suelo y que intervienen en los ciclos de los nutrientes, con el fin de mejorar su contenido de formas asimilables por las plantas cultivadas. Y la importancia de realizar estudios de éste índole para incrementar los rendimientos unitarios y por consiguiente la producción nacional. Su redituabilidad ha dado como resultado que en algunos países de Europa y Rusia (Saber M. y colaboradores, 1977), se utilicen microorganismos que transforman el fósforo como inoculantes o fertilizantes biológicos con el objeto de incrementar la productividad agrícola beneficiando al hombre nutricional y económicamente.

GENERALIDADES

En el suelo, plantas y microorganismos el fósforo se encuentra en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos. Participe principalmente en las fases metabólicas tanto de acumulación como de liberación de energía.

Las fosfobacterias son microorganismos que llevan a cabo ciertas transformaciones del fósforo del suelo, su actividad muestra dos efectos relacionados entre sí que contribuyen a aumentar la disponibilidad del fósforo referentes a:

- a) Solubilización de compuestos inorgánicos
- b) Mineralización de compuestos orgánicos

Otro efecto que se atribuye a algunas fosfobacterias es la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, todos ellos de gran importancia en el incremento de la productividad agrícola.

Los primeros estudios realizados con microorganismos movilizados de fósforo, fueron orientados a demostrar su capacidad para solubilizar y/o mineralizar compuestos de fósforo ya que éste es uno de los criterios para la selección de cepas,

a) SOLUBILIZACION DEL FOSFORO INORGANICO.- Algunos investigadores proponen que los microorganismos heterotróficos y autotróficos solubilizan los compuestos insolubles de fósforo por medio de la producción de ácidos orgánicos liberados durante la oxidación de materia orgánica (carbohidratos) o bien de ácidos inorgánicos, producidos por la oxidación de material nitrogenado o azufre nativo que conducen a la formación de ácido nítrico y sulfúrico respectivamente.

La presencia de éstos ácidos provoca un aumento en la acidez del medio y posteriormente la liberación de fosfato soluble.

Algunas bacterias producen H_2S que reacciona con el fosfato férrico produciendo sulfuro ferroso y iones ortofosfato solubles. Otros microorganismos bajan el pH por liberación de CO_2 durante la respiración causando solubilización de fosfatos.

Microorganismos quimioautotróficos oxidan iones amonio o sulfuro produciendo ácido nítrico o sulfúrico pudiendo liberar iones ortofosfato de roca fosfórica.

b) MINERALIZACION DE FOSFATO ORGANICO.- En éste proceso el fósforo orgánico que procede de la degradación de los componentes de las plantas y los animales se convierte en fósforo inorgánico mediante la acción de un grupo de fosfobacterias, éste fenómeno se considera fundamental para el aprovechamiento agrícola de éstos compuestos fosforados.

La mineralización es un proceso enzimático, y las enzimas microbianas que participan en él reciben el nombre genérico de fosfatasa y de acuerdo al pH en el que intervienen se denominan; fosfatasa alcalinas a pH alto, fosfatasa ácidas a pH bajo, su actividad en el suelo se ve afectada por la estación del año, la profundidad y el tipo de vegetación.

Este efecto es mayor en suelos vírgenes que en suelos de cultivo y es favorecido por la elevación de la temperatura, aumento de pH y la concentración elevada de sustrato.

HORMONAS VEGETALES Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO.- Hace poco más de una década que los científicos descubrieron que la velocidad de crecimiento y otras múltiples funciones de las plantas se podían alterar y dirigir a voluntad, aplicando pequeñas cantidades de ciertos productos orgánicos en las hojas, tallos y raíces. Estas sustancias químicas son conocidas con los nombres de regulado-

res del crecimiento, fitohormonas u hormonas vegetales y con ellos se pueden conseguir efectos sorprendentes, los que en ocasiones son extremadamente útiles.

Los conceptos de reguladores del crecimiento y fitohormonas no son sinónimos. El primero se aplica, como generalización a los productos químicos de naturaleza sintética y de constitución diversas, que poseen una acción similar en algún punto a la de las hormonas vegetales naturales; reservándose, por consiguiente, ésta de nominación para los productos activos que elaboran las plantas en su bioquimismo normal.

Se han identificado sustancias reguladoras del crecimiento sintetizadas por las fosfobacterias, quedando clasificadas dentro de los grupos de las sustancias auxínicas, giberelínicas o citocínicas; así mismo un microorganismo puede producir uno o varios tipos de éstas sustancias.

Barea, Azcon y Hayman (1975) citado en Barea y colaboradores establecieron que después de inocular suelos con fosfobacterias, el crecimiento de plantas fué mayor, en trabajos posteriores usaron inoculantes de fosfobacterias junto con fosforita poco soluble le adicionaron al suelo, encontrando que las bacterias aumentan el retorcido de la raíz y el peso seco de las plantas, valores que se incrementan con el aumento en la concentración de fosforita, aunque el por ciento de fósforo en plantas fué el mismo independientemente del aumento de fosforita.

Los autores sugieren dos posibles explicaciones a esto:

a) Las bacterias estimulan el crecimiento de las plantas, al producir sustancias que promueven el desarrollo de la raíz, y de éste modo la raíz es capaz de explorar más suelo y zonas donde los iones fosfato son liberados a partir de las partículas de fosforita.

b) Las bacterias solubilizan el fosfato aumentando el fósforo soluble en suelo.

En 1976 Barea y colaboradores realizaron estudios con bacterias solubilizadoras de fósforo desarrolladas en cultivo líquido y el sobrenadante fué examinado para la búsqueda de reguladores de crecimiento y sustancias que pueden inhibir el crecimiento de plantas.

La capacidad de las bacterias para descomponer ácido indólicético (IAA) también fué estudiada porque se sugirió que bacterias con ésta propiedad pueden ser ecológicamente significativas en la rizosfera en ausencia de sustratos orgánicos (Strzelczyk, Kampert & Oehm, 1973) citado en Barea, Navarro y Montoya.

Ciento ocho cepas de bacterias fueron aisladas a partir de la rizosfera del suelo y produjeron zonas claras de solubilización sobre el medio de Ramos Callao conteniendo fitato de calcio. De éstas, 50 bacterias hidrolizaron fitato de sodio lo que indica que poseen actividad fitasa, a las que se les determinó su capacidad para producir reguladores de crecimiento y descomposición de IAA.

Las bacterias estudiadas fueron identificadas como cepas de: Bacillus, Pseudomonas, Chromobacterium, Acinetobacter, Flavobacterium, Arthrobacter, Micrococcus, Corynebacterium, Xantomonas, Aeromonas, Agrobacterium.

De las 50 bacterias estudiadas un 86% fueron productoras de auxinas, un 58% produjeron giberelinas, se obtuvo un 90% de productoras de citocinas, un 20% de bacterias con producción de sustancias inhibidoras del crecimiento y un 56% con habilidad para destruir el IAA, citado en Barea y colaboradores.

Baya, Boething y Ramos Cormenzana (1981) realizaron otros estudios en bacterias del suelo, para examinar la relación entre la capacidad de solubilización de fosfato bicalcico y producción de vitaminas.

Las plantas verdes generalmente sintetizan suficiente cantidad de vitaminas para satisfacer sus propias necesidades. Aunque las raíces no son capaces de producir todas las vitaminas que necesitan, de ahí la evidencia de que las vitaminas B exógenas pue-

dan ser absorbidas por las raíces, produciendo efectos favorables sobre respiración, síntesis de proteínas y transferencia de nutrientes (Rampe, 1973) citado en Baya y colaboradores.

En el estudio de Stoyanov y Kudrew (1978) citado en Baya y colaboradores, se estipula que el peso seco de raíces, tallos y hojas de maíz deficiente en Mg se pudo incrementar por tratamiento con vitaminas C₁, B₁ y B₆.

Hongos micorrizicos (Harley, 1969) y algas (Round, 1965) citados en Baya y colaboradores, mostraron ser dependientes o estimulados por ciertas vitaminas. Aunque las raíces pueden suministrar una cantidad adecuada de vitaminas para el desarrollo micorrizico, las bacterias de la rizosfera también constituyen una fuente de vitaminas para los hongos. La alta incidencia de bacterias productoras de vitaminas en la región de raíces (Cook y Lg chhead, 1959) citado en Baya y colaboradores y la mayor cantidad de vitaminas que ellas producen indica que las vitaminas sintetizadas por esas bacterias, pueden contribuir significativamente al desarrollo micorrizico y de las plantas.

Observándose en diferentes estudios (Baya y colaboradores, 1981; Gutierrez, 1980) que la inoculación con micorrizas y bacterias productoras de vitaminas resultó en mejoría del crecimiento de plantas.

Con base a lo anterior se considera que la introducción de éste tipo de microorganismos al suelo es de gran importancia en la producción agrícola.

Y para obtener los beneficios esperados se debe efectuar una selección de cepas adecuada con base a las actividades descritas, así como su adaptación al suelo.

Por lo que en éste trabajo los objetivos fueron:

- 1.- Seleccionar cepas bacterianas solubilizadoras y/o nitrificadoras de fósforo aisladas de suelos agrícolas de Tlaxcala y Puebla, que puedan conservar éstas propiedades durante tiempo pro

longado en condiciones "in vitro".

2.- Identificar las bacterias solubilizadoras y/o mineralizadoras de fósforo.

3.- Contribuir a la formación de una colección de cepas que posteriormente puedan ser utilizadas como fertilizantes biológicos para su inoculación en suelos de México.

MATERIALES Y METODOS

A) CEPAS: El trabajo se inició con 26 cepas aisladas de suelos procedentes de Tlaxcala y Puebla (Galeana, 1981), con base a su poder de solubilización y mineralización.

B) SELECCION DE CEPAS: Uno de los criterios utilizados para la selección de fosfobacterias, es la conservación de su efecto solubilizador y mineralizador bajo condiciones "in vitro" por periodos prolongados.

Para tal efecto se procedió a:

B.1 Activación de las cepas

B.2 Determinación de solubilización y mineralización empleando los medios de cultivo de Bunt Rovira modificado por t_2 ha para determinar solubilización y el de Ramos Calleo con lecitina y sin glucosa para determinar mineralización.

De las pruebas anteriores se seleccionaron 10 cepas que corresponden a las claves $T_{1t}3$, $T_{1t}13$, $T_{2m}17$, $T_{2m}23$, $T_{2m}27$, $T_{3a}33$, $T_{3a}37$, $T_{3a}39$, $P_{4m}45$ y $P_{4m}55$. Procediéndose a la identificación de las mismas.

C) IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS: El primer criterio usado en la clasificación de las bacterias fué la reacción al colorante de Gram.

Posteriormente los organismos se examinaron para ver su capacidad de producción de pigmento y su forma de metabolizar la glucosa.

La producción de pigmento se observó, estriando el microorganismo e identificar sobre placas de agar nutritivo, después de incubar por tres días a 26°C se examinó para observar producción de pigmento, y se incubó nuevamente por un período de 30 días repitiéndose la observación.

Para el metabolismo de la glucosa se uso la prueba de oxidación-fermentación en medio de Hugh-Leifson observándose fermentación, oxidación o incapacidad para utilizar la glucosa.

Una vez determinadas éstas características se seleccionaron las pruebas adecuadas para completar la identificación a nivel genérico y a continuación se enlistan todas las pruebas microscópicas, macroscópicas y de cultivos realizadas, así como la información complementaria de los criterios empleados en éste trabajo para lo que se anexan las tablas 1 a 7.

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

FORMA
 TAMAÑO
 AGRUPACION
 TINCION DE GRAM
 CAPSULA
 ESPORAS

CARACTERISTICAS DE CULTIVO

TIEMPO DE INCUBACION
 TEMPERATURA DE INCUBACION
 MOVILIDAD A 37°C
 22°C

COLONIAS:

FORMA
 TAMAÑO
 SUPERFICIE
 COLOR
 CONSISTENCIA
 OPACIDAD

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS

ADONITOL
 ALMIDON
 ARABINOSA
 DEXTRINA
 FRUCTOSA
 GALACTOSA
 GLUCOSA
 INOSITOL
 INULINA
 LACTOSA
 MANITOL
 MANOSA
 RAFINOSA
 RAMNOSA
 SACAROSA
 SORBITOL
 SORBOSA
 XILOSA

UTILIZACION DE:

ACETATO
 CITRATO
 MALONATO
 TARTRATO

CRECIMIENTO EN KCN
 CRECIMIENTO EN MEDIO BURK'S
 CRECIMIENTO EN MEDIO WAKSMAN 77
 FENIL-ALANINA DESAMINASA
 HIDROLISIS DE ALMIDON
 HIDROLISIS DE ARGININA
 HIDROLISIS DE UREA
 LECHE TORNASOLADA
 LICUEFACCION DE GELATINA
 LISIN DESCARBOXILASA
 ORNITIN DESCARBOXILASA
 OXIDACION-FERMENTACION
 OXIDASA
 PRODUCCION DE CATALASA
 PRODUCCION DE H₂S
 PRODUCCION DE INDOLE
 REDUCCION DE NITRATOS
 ROJO DE METILO
 VOGES-PROSKAUER

TABLA 1

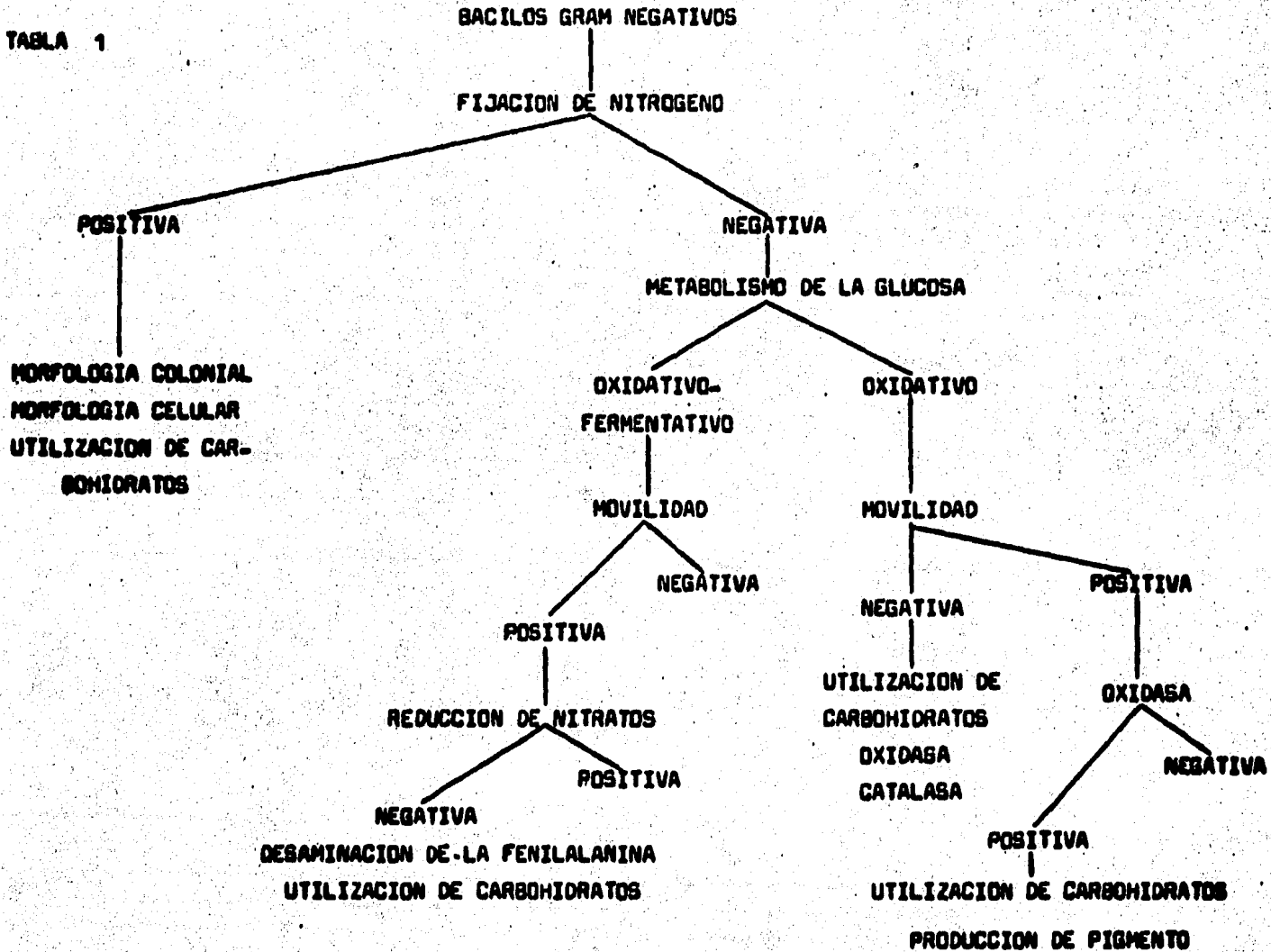


TABLA 2

METABOLISMO DE LA GLUCOSA
(HUGH-LEIFSON)

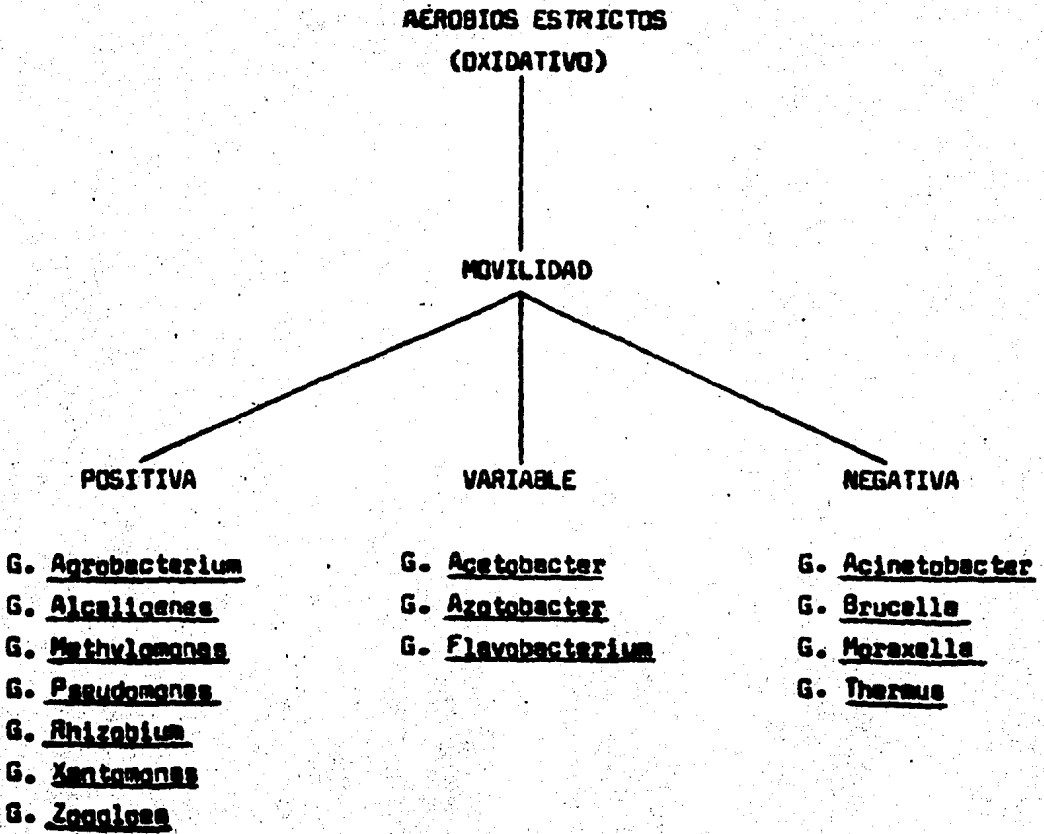
ANAEROBIOS FACULTATIVOS
(Fermentativo-Oxidativo)

- G. Actinobacillus
- G. Aeromonas
- G. Azotomonas
- G. Beijerinckia
- G. Citrobacter
- G. Dexia
- G. Edwardsiella
- G. Enterobacter
- G. Erwinia
- G. Escherichia
- G. Flavobacterium
- G. Hafnia
- G. Klebsiella
- G. Lucibacterium
- G. Pasteurella
- G. Photobacterium
- G. Plesiomonas
- G. Proteus
- G. Serratia
- G. Yersinia
- G. Salmonella
- G. Shigella
- G. = Género

AEROBIOS ESTRICTOS.
(Oxidativo)

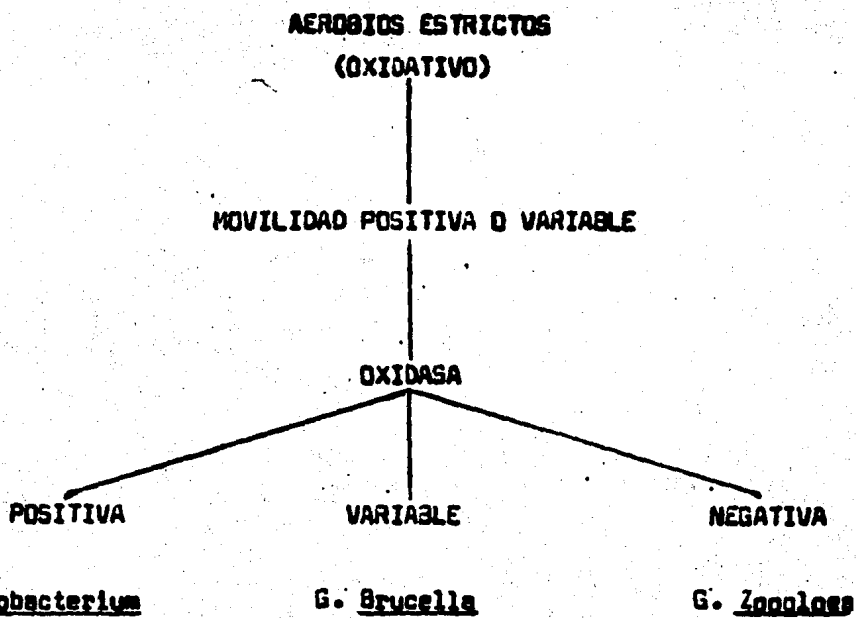
- G. Acetobacter
- G. Acinetobacter
- G. Agrobacterium
- G. Alcaligenes
- G. Azotobacter
- G. Brucella
- G. Flavobacterium
- G. Francisella
- G. Gluconobacter
- G. Methylomonas
- G. Moraxella
- G. Nitrobacter
- G. Nitrospira
- G. Pseudomonas
- G. Rhizobium
- G. Thermus
- G. Xantomonas
- G. Zoogloea

TABLA 3



G. = Género

TABLA 4



G. = Género

TABLA 5

ANAEROBIOS FACULTATIVOS
(OXIDATIVO-FERMENTATIVO)

MOVILIDAD

POSITIVA

VARIABLE

NEGATIVA

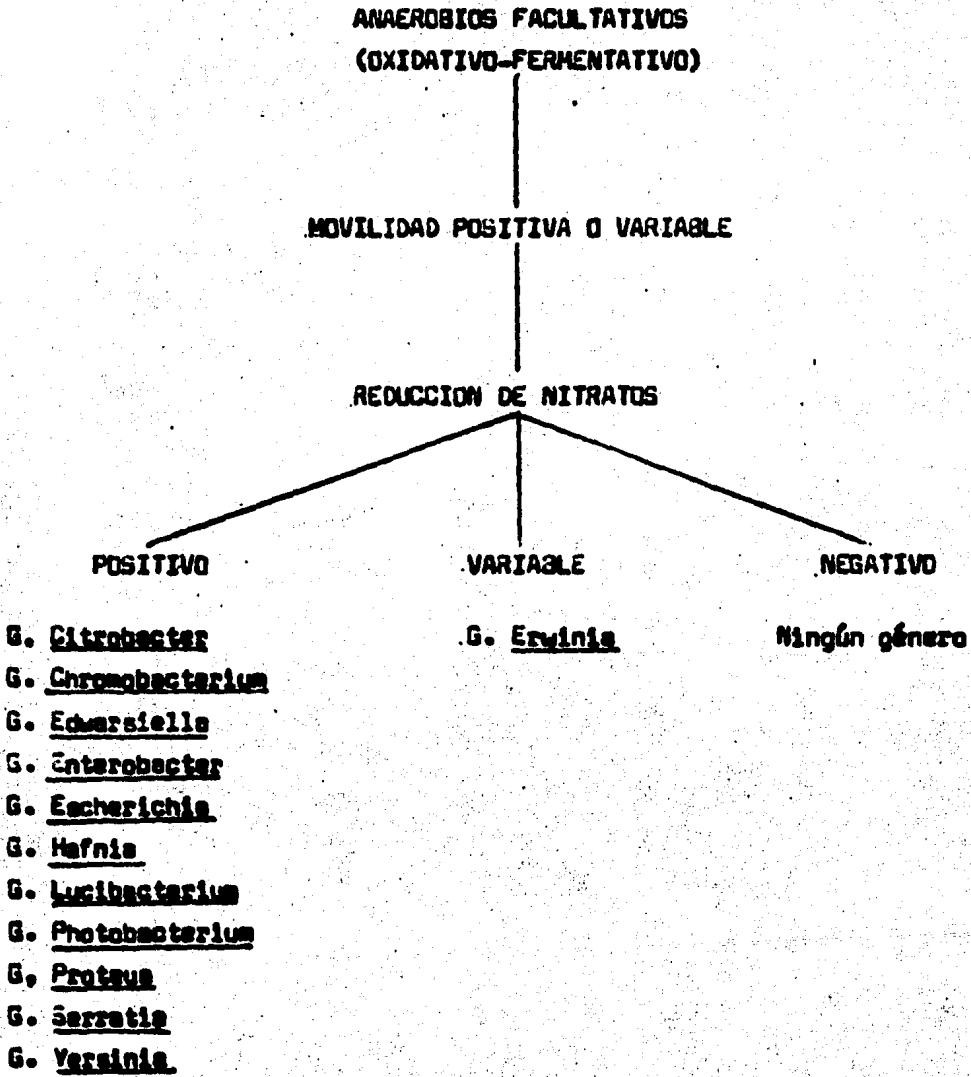
- G. Azotomonas
- G. Citrobacter
- G. Chromobacterium
- G. Edwardsiella
- G. Enterobacter
- G. Erwinia
- G. Hafnia
- G. Lucibacterium
- G. Plesiomonas
- G. Proteus
- G. Serratia

- G. Aeromonas
- G. Beijerinckia
- G. Escherichia
- G. Photobacterium
- G. Salmonella
- G. Vibrio
- G. Yersinia

- G. Actinobacillus
- G. Klebsiella
- G. Pasteurella
- G. Shigella

G. = Género

TABLA 6



G. = Género

TABLA 7

MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO

(De M. Alexander, Introduction to Soil Microbiology
John Wiley, and Sons New York)

BACTERIAS AEROBIAS	{ G. <u>Azotomonas</u> G. <u>Azotobacter</u> G. <u>Beijerinckia</u> G. <u>Dexia</u> G. <u>Methylomonas</u> G. <u>Mycobacterium</u> G. <u>Spirillum</u>
BACTERIAS ANAEROBIAS FACULTATIVAS	{ G. <u>Bacillus</u> G. <u>Enterobacter</u> G. <u>Klebsiella</u>
BACTERIAS ANAEROBIAS	{ G. <u>Clostridium</u> G. <u>Desulfotomaculum</u> G. <u>Desulfovibrio</u>

G. = Género

RESULTADOS Y DISCUSION

A) SELECCION DE CEPAS: EN las tablas 8 y 9 se observan los resultados de solubilización y mineralización de fósforo orgánico de las 26 cepas con las que se inició el trabajo. Por su efecto solubilizador se seleccionaron las cepas $T_{1t}3$, $T_{2m}17$ y $T_{2m}27$, en base a su efecto mineralizador las cepas $T_{1t}13$ y $T_{3a}33$ y aquellas que presentan ambos procesos metabólicos corresponden a las cepas $T_{2m}23$, $T_{3a}37$, $T_{3a}39$, $P_{4m}45$ y $P_{4m}55$.

B) IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS: En las tablas 10 a 14 se observa que las cepas estudiadas presentan las mismas características en cuanto a forma, reacción al Gram y la no producción de pigmentos, en tanto que su reacción en el medio de Hugh-Lefson permitió separar a las cepas $T_{1t}3$, $T_{1t}13$, $T_{3a}33$ y $P_{4m}55$ que son oxidativas de las otras que resultaron oxidativas-fermentativas (Tabla 2).

Al correlacionar otros criterios primarios con el fin de separar las cepas estudiadas, se pudo agrupar a las cepas $T_{1t}13$ y $T_{3a}33$ cuyas características primarias resultaron semejantes a los géneros pertenecientes a las familias Pseudomonadaceae y Vibrionaceae y a otros géneros de afiliación incierta según la 8a. edición del Manual de Bergey's que corresponden a Flavobacterium y Alcaligenes (Tabla 3).

Posteriormente se descartaron los géneros de afiliación incierta y los pertenecientes a la familia Vibrionaceae, mediante pruebas como oxidasa, fermentación de azúcares, producción de pigmento etc. identificándose a éstas cepas como pertenecientes al género Pseudomonas.

Entre los microorganismos no móviles y de metabolismo oxidativo tenemos géneros como: Brucella, Thermus, Acinetobacter y Moraxella (Tabla 3) coincidiendo con las cepas T_{1t}^3 y P_{4m}^{55} .

Al comparar los resultados de fermentación de azúcares y otras pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, producción de indol etc.

Se logró la identificación de éstas cepas como posibles Acinetobacter sp. ya que el 95% de los resultados obtenidos coinciden con éste género.

La cepa T_{2m}^{17} por ser fijadora de Nitrógeno (Tabla 7) y por su morfología colonial, se clasificó como posible Azotobacter chroococcum o Azotomonas macrocítico-genes, en base a la fermentación de almidón, manitol y ramnosa pero por no formar quistes se optó por clasificarlo como Azotomonas macrocítico-genes.

Otra de las cepas fijadora de nitrógeno (Tabla 7) fue la T_{3a}^{39} y de acuerdo a su morfología colonial, a su tamaño celular, su desarrollo lento en sacarosa (Medio Burk's), desarrollo abundante y mucilaginoso en el medio de Wakeman se pensó en Beijerinckia indica. Confirmandose ésto por medio de pruebas de fermentación de carbohidratos, ya que la mayoría de las especies del género Beijerinckia dan resultados positivos a éstas reacciones (arabinosa, galactosa, xilosa y manitol).

Las cepas restantes (T_{2m} 23, T_{2m} 27, T_{3m} 37 y P_{4m} 65) de metabolismo oxidativo-fermentativo y movilidad positiva comparten estas características con géneros de la familia Enterobacteriaceae (Tabla 5). Después comparando resultados de otras pruebas como reducción de nitratos (Tabla 6), desaminación de la fenilalanina, utilización de carbohidratos como fuentes de carbono, descarboxilación de aminoácidos y otras, observamos que las cepas antes mencionadas pertenecen al género Erwinia.

TABLA 8

EVALUACION DEL EFECTO SOLUBILIZADOR Y MINERALIZADOR
DEL FOSFORO POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS

24 Hr.

CLAVE	SOLUBILIZACION DE FOSFORO INORGANICO		MINERALIZACION DE FOSFATO ORGANICO	
	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE SOLUBILIZACION	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE ACCION
T _{1t} 3	0.9	—	1.1	1.5
T _{1t} 8	0.9	—	1.0	1.1
T _{1t} 13	1.5	1.8	1.5	—
T _{1t} 14	0.3	0.5	0.4	0.4
T _{2m} 17	1.1	—	1.2	1.3
T _{2m} 19	0.2	0.5	0.4	0.42
T _{2m} 20	0.5	1.3	1.2	1.2
T _{2m} 22	0.3	0.9	0.4	0.41
T _{2m} 23	1.1	1.9	1.2	1.25
T _{2m} 26	0.6	—	0.5	0.55
T _{2m} 27	0.9	—	0.8	0.85
T _{2m} 29	0.1	—	0.2	—
T _{3o} 32	0.6	1.7	0.6	—
T _{3o} 33	1.3	2.5	0.5	0.6
T _{3o} 37	0.2	1.1	0.8	1.1

CONTINUACION TABLA 8

CLAVE	SOLUBILIZACION DE FOSFORO INORGANICO		MINERALIZACION DE FOSFATO ORGANICO	
	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE SOLUBILIZACION	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE ACCION
T _{3B} 39	0.5	2.1	0.6	0.7
T _{3B} 40	0.5	1.7	0.8	0.9
T _{3B} 42	0.8	1.1	0.9	0.95
P _{4B} 44	0.1	—	0.1	—
P _{4B} 45	0.8	3.2	1.0	1.1
P _{4B} 55	0.5	2.8	1.0	1.1
P _{4B} 56	0.1	0.3	0.1	—
P _{4B} 57	0.3	1.4	0.8	0.9
P _{4B} 59	0.4	1.3	0.9	—
P _{4B} 60	0.9	—	1.2	1.3
P _{4B} 61	0.5	—	0.9	1.0

El tamaño de la colonia y el tamaño del halo están dados en cm.

Solubilización de fósforo inorgánico: Medio Bunt-Rovira modificado por Taha.


Mineralización de fosfato orgánico: Medio Ramos-Callao más lecitina sin glucosa.

Incubación a 28°C.

TABLA 9

EVALUACION DEL EFECTO SOLUBILIZADOR Y MINERALIZADOR
DEL FOSFORO POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS

48 Hr.

CLAVE	SOLUBILIZACION DE FOSFORO INORGANICO		MINERALIZACION DE FOSFATO ORGANICO	
	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE SOLUBILIZACION	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE ACCION
T _{1t} 3	1.3		1.3	1.4
T _{1t} 8	1.1	—	1.2	1.2
T _{1t} 13	1.6	2.0	1.6	—
T _{1t} 14	0.5	0.7	0.6	0.65
T _{2m} 17	1.4	—	1.4	1.5
T _{2m} 19	0.4	1.0	1.0	1.1
T _{2m} 20	0.7	1.4	1.3	1.33
T _{2m} 22	0.6	0.8	0.6	0.63
T _{2m} 23	1.3	2.1	1.5	1.7
T _{2m} 26	0.7	—	0.6	0.65
T _{2m} 27	1.1	—	1.1	1.4
T _{2m} 29	0.2	—	0.3	—
T _{3o} 32	0.7	1.9	0.8	—
T _{3o} 33	1.5	3.1	0.7	0.8
T _{3o} 37	0.5	1.5	1.0	1.4

CONTINUACION TABLA 9

CLAVE	SOLUBILIZACION DE FOSFORO INORGANICO		MINERALIZACION DE FOSFATO ORGANICO	
	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE SOLUBILIZACION	TAMAÑO DE LA COLONIA	HALO DE ACCION
T _{3m} 39	0.6	2.2	0.8	1.0
T _{3m} 40	0.7	1.8	1.0	1.1
T _{3m} 42	0.9	1.2	1.05	1.1
P _{4m} 44	0.2	—	0.2	—
P _{4m} 45	0.9	3.4	1.3	1.5
P _{4m} 55	0.7	2.9	1.2	1.4
P _{4m} 56	0.2	0.4	0.2	—
P _{4m} 57	0.4	1.5	1.0	1.1
P _{4m} 59	0.6	1.3	1.1	—
P _{4m} 60	1.0	—	1.4	1.5
P _{4m} 61	0.7	—	1.0	1.1

El tamaño de la colonia y el tamaño del halo están dados en cm.

Solubilización de fósforo inorgánico: Medio Bunt-Rovira modificado por Taha.

Mineralización de fosfato orgánico: Medio Ramos-Calleo con lecitina sin glucosa.

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	T _{1t} 3	P _{4m} 55
<p>Forma</p> <p>Tamaño</p> <p>Agrupación</p> <p>Tinción de Gram</p> <p>Cápsula</p> <p>Esporas</p>	<p>Bacilos cortos</p> <p>1.0-1.2 X 2.3-2.5 μ</p> <p>Cadena corta</p> <p>Negativa</p> <p>Positiva</p> <p>Negativa</p>	<p>Bacilos cortos</p> <p>1.2-1.5 X 2.5 μ</p> <p>Pares y cadena corta</p> <p>Negativa</p> <p>Positiva</p> <p>Negativa</p>
<p>CARACTERISTICAS DE CULTIVO (Agar nutritivo)</p> <p>Movilidad a 37°C</p> <p> a 22°C</p> <p>Tiempo</p> <p>Temperatura</p>	<p>-</p> <p>-</p> <p>24 Hr</p> <p>28°C</p>	<p>-</p> <p>-</p> <p>24 Hr</p> <p>28°C</p>
<p>MORFOLOGIA COLONIAL</p> <p>Forma</p> <p>Tamaño</p> <p>Superficie</p> <p>Color</p> <p>Consistencia</p> <p>Opacidad</p>	<p>Redonda</p> <p>Pequeñas</p> <p>Extendida</p> <p>Blanco</p> <p>Mucoida</p> <p>Brillante</p>	<p>Redonda</p> <p>Pequeñas</p> <p>Extendida</p> <p>Blanco</p> <p>Mucoida</p> <p>Brillante</p>

	T _{1t} 3	P ₄₀ 55
Crecimiento en KCN	-	-
Crecimiento en Wakeman 77	-	-
Fenilalanina desaminasa	-	+
Hidrólisis de arginina	-	-
Hidrólisis de urea	-	-
Leche torneolada	Alc. y pept.	Alc. y pept.
Licuefacción de gelatina	-	+
Lisín descarboxilasa	-	-
Metabolismo	Oxidativo	Oxidativo
Ornitín descarboxilasa	-	-
Oxidasa	-	-
Producción de catalasa	+	+
Producción de H ₂ S	-	-
Producción de indol	-	-
Reducción de nitratos	+	-
Rojo de metilo	-	-
Voges-Proskauer	-	-

	T _{1t} ³	P _{4m} ⁵⁵
FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS		
Adonitol	-	-
Almidón	-	(A)
Arabinosa	(A)	-
Dextrina	(A)	(A)
Fructosa	(A)	(A)
Galactosa	(A)	(A)
Glucosa	(A)	(A)
Inositol	-	-
Inulina	-	-
Lactosa	(A)	(A)
Manitol	-	-
Manosa	(A)	(A)
Rafinosa	-	-
Ramnosa	-	-
Sacarosa	-	-
Sorbitol	-	(A)
Sorbose	-	-
Xilosa	-	-

	T _{1h} J	P _{4m} 55
UTILIZACION DE:		
Acetato	-	-
Citrato	-	-
Malonato	-	-
Tartrato	-	-

Alc. = alcalinidad

Pept. = peptonización

(A) = positivo con producción de ácido

- = negativo

♦ = positivo

TABLA 11

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	T _{1t} 13	T _{3a} 33
Forma	Bacilos	Bacilos
Tamaño	1.0 - 3.0 μ	0.8-1.0 X 2.8 μ
Agrupación	Aislados	Aislados
Tinción de Gram	Negativa	Negativa
Cápsula	Negativa	Negativa
Espores	Negativa	Negativa
CARACTERISTICAS DE CULTIVO (Agar Nutritivo)		
Movilidad a 37°C	+	+
a 22°C	+	+
Tiempo	24 Hr	24 Hr
Temperatura	28°C	28°C
MORFOLOGIA COLONIAL		
Forma	Lobada	Lobada
Tamaño	Grande	Grande
Superficie	Extendida	Extendida
Color	Bianco	Bianco
Consistencia	Seca	Seca
Opacidad	Opaca	Opaca

	T _{1t} ¹³	T _{3a} ³³
Crecimiento en KCN	-	-
Crecimiento en Wakeman 77	-	-
Fenilalanina desaminasa	-	-
Hidrólisis de arginina	-	-
Hidrólisis de almidón	+	+
Hidrólisis de urea	-	-
Leche tornasolada	Alc. y pept.	Alc. y pept.
Licuefacción de gelatina	+	+
Lisín descarboxilasa	+	-
Metabolismo	Oxidativo	Oxidativo
Ornitín descarboxilasa	-	-
Oxidasa	+	+
Producción de catalasa	+	+
Producción de H ₂ S	-	-
Producción de indol	-	-
Reducción de nitratos	+	+
Rojo de metilo	-	-
Voges-Proskauer	-	+

	T _{1t} ¹³	T _{3t} ³³
FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS		
Adonitol	-	-
Almidón	-	-
Arabinosa	(A)	-
Dextrina	(A)	(A)
Fructosa	(A)	(A)
Galactosa	(A)	(A)
Glucosa	(A)	(A)
Inositol	-	-
Inulina	-	-
Lactosa	-	-
Manitol	(A)	(A)
Manosa	(A)	(A)
Rafinosa	-	-
Ramnosa	-	-
Sacarosa	(A)	(A)
Sorbitol	-	(A)
Sorbose	-	-
Xilosa	-	-

	T ₁₈ ¹³	T ₃₀ ³³
UTILIZACION DE:		
Acetato	-	-
Citrato	-	-
Malonato	-	-
Tartrato	-	-

Alc. = alcalinidad

Pept. = peptonización

(A) = positivo con producción de ácido

- = negativo

+ = positivo

TABLA 12

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	T _{2m} 17
<p>Forma Tamaño Agrupación Tinción de Gram Cápsula Esporas</p>	<p>Bacilos pleomórficos 0.75-1.0 X 2.0-2.5 μ Pares o aislados Negativa Negativa Negativa</p>
<p>CARACTERISTICAS DE CULTIVO (Burk's y Waksman 77 sólidos)</p>	
<p>Movilidad a 37°C a 22°C</p>	<p>+ +</p>
<p>Tiempo Temperatura</p>	<p>24 Hr 28°C</p>
<p>MORFOLOGIA COLONIAL</p>	
<p>Forma Tamaño Superficie Color Consistencia Opacidad</p>	<p>Redonda Pequeño Elevada Blando Mucoida Brillante</p>
<p>Crecimiento en Waksman 77 liq.</p>	<p>Positivo</p>
<p>Crecimiento en Burk's líquido</p>	<p>Positivo</p>
<p>Licuefacción de gelatina</p>	<p>-</p>
<p>Metabolismo</p>	<p>Oxidativo-fermentativo</p>
<p>Producción de catalasa</p>	<p>+</p>

CONTINUACION TABLA 12

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS	T _{2m} ¹⁷
Adonitol	-
Almidón	-
Arabinosa	(AG)
Dextrina	(AG)
Fructosa	(AG)
Galactosa	(AG)
Glucosa	(AG)
Inositol	(AG)
Inulina	-
Lactosa	-
Manitol	(A)
Manosa	(A)
Rafinosa	(A)
Ranosa	-
Sacarosa	(A)
Sorbitol	(A)
Sorbosa	(AG)
Xilosa	(AG)

(A) = positiva con producción de ácido

(AG) = positiva con producción de ácido y gas

- = negativo

+ = positivo

TABLA 13

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	T ₃₉
<p>Forma</p> <p>Tamaño</p> <p>Agrupación</p> <p>Tinción de Gram</p> <p>Cápsula</p> <p>Esporas</p>	<p>Bacilos</p> <p>1.05-1.5 X 3.0 4</p> <p>Aislados</p> <p>Negativa</p> <p>Positiva</p> <p>Negativa</p>
<p>CARACTERISTICAS DE CULTIVO (Burk's y Waksman 77 sólidos)</p> <p> Movilidad a 37°C</p> <p> a 22°C</p> <p> Tiempo</p> <p> Temperatura</p>	<p>Positiva</p> <p>Positiva</p> <p>24 Hr</p> <p>28°C</p>
<p>MORFOLOGIA COLONIAL</p> <p>Forma</p> <p>Tamaño</p> <p>Superficie</p> <p>Color</p> <p>Consistencia</p> <p>Opacidad</p> <p>Crecimiento en Waksman 77 liq.</p> <p>Crecimiento en Burk's líquido</p> <p>Licuefacción de gelatina</p> <p>Metabolismo</p> <p>Producción de catalasa</p>	<p>Redonda</p> <p>Grande</p> <p>Elevada</p> <p>Transparente</p> <p>Mucoides</p> <p>Brillante</p> <p>Abundante y mucilaginoso</p> <p>Lento</p> <p>+</p> <p>Oxidativo-fermentativo</p> <p>+</p>

CONTINUACION TABLA 13

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS	T ₃₀ 39
Adonitol	-
Almidón	(A)
Arabinosa	(AG)
Dextrina	(AG)
Fructosa	(AG)
Galactosa	(A)
Glucose	(A)
Inositol	-
Inulina	-
Lactosa	(AG)
Manitol	(A)
Manosa	(A)
Rafinosa	(A)
Ramnosa	(A)
Sacarosa	(A)
Sorbitol	(A)
Sorbosa	-
Xilosa	(A)
UTILIZACION DE:	
Acetato	-
Citrato	-
Malonato	-
Tartrato	+

Alc. = alcalinidad; Pept. = peptonización; (A) = positivo con producción de ácido; (AG) = positivo con producción de ácido y gas; - = negativo; + = positivo.

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	T _{2m} 23	T _{2m} 27	T _{3m} 37	P _{4m} 45
Forma	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Tamaño	0.7 X 1.0-3.0 μ	0.8X1.5-3.0 μ	1.0 X 3.25 μ	0.6 X 2.5-3.0 μ
Agrupación	Aislados	Aislados	Aislados	Aislados
Tinción de Gram	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Cápsula	Negativa	Negativa	Positive	Positive
Esporas	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
CARACTERISTICAS DE CULTIVO (Agar Nutritivo)				
Movilidad a 37°C	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
a 22°C	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Tiempo	24 Hr	24 Hr	24 Hr	24 Hr
Temperature	28°C	28°C	28°C	28°C
MORFOLOGIA COLONIAL				
Forma	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda
Tamaño	Mediano	Mediano	Mediano	Mediano
Superficie	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Consistencia	Mucoides	Mucoides	Mucoides	Mucoides
Opacidad	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante

CONTINUACION TABLA 14

	T _{2m} 23	T _{2m} 27	T _{3m} 37	P _{4m} 45
Crecimiento en KCN	-	-	-	-
Crecimiento en Wakeman 77	-	-	-	-
Fenilalanina desaminasa	+	+	+	+
Hidrólisis de arginina	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	-	-	-
Leche tornasolada	Alc. y pept.	Alc. y pept.	Alc. y pept.	Alc. y pept.
Licuefacción de gelatina	+	-	+	-
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-
Metabolismo	O/F	O/F	O/F	O/F
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-
Producción de catalasa	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	-
Rojo de metilo	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-

	T _{2m} 23	T _{2m} 27	T _{3a} 37	P _{4m} 45
FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS				
Adonitol	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	(A)
Arabinosa	-	(AG)	-	-
Dextrina	(A)	(AG)	(A)	(A)
Fructosa	(A)	(AG)	(A)	(A)
Galactosa	(A)	(A)	(A)	(A)
Glucosa	(A)	(A)	(A)	(A)
Inositol	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-
Manosa	(A)	(A)	(A)	(A)
Rafinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Sacarosa	(A)	(A)	(A)	(A)
Sorbitol	-	-	(A)	(A)
Sorbose	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

	T _{2m} 23	T _{2m} 27	T _{3a} 37	P _{4m} 45
UTILIZACION DE:				
Acetato	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-
Tartrato	-	-	-	-

Alc. = alcalinidad

Pept. = peptonización

(A) = positiva con producción de ácido

(AG) = positiva con producción de ácido y gas

O/F = oxidativo-fermentativo

- = negativo

+ = positivo

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

De las 26 cepas aisladas y seleccionadas en trabajo previo, 10 mostraron mantener su acción solubilizadora y mineralizadora en condiciones "in vitro" que es uno de los criterios básicos para seleccionar éste tipo de bacterias.

Por medio de las pruebas que se realizaron para poder clasificar las 10 cepas estudiadas pudimos llegar a la conclusión de que dos cepas pertenecen al género Pseudomonas, dos cepas se clasificaron como Acinetobacter sp., una de las cepas como Azotomonas macrocitógenas, cuatro cepas como pertenecientes al género Erwinia y por último una de las cepas como Beijerinckia indica.

Es importante mencionar que con la cepa P_{4m}45 identificada como Erwinia sp. se realizó un experimento paralelo en el que se comparó el efecto de un fertilizante mineral y el efecto de ésta bacteria sobre el desarrollo de la cebolla, obteniéndose mejores resultados con el uso del microorganismo, por lo que se sugiere efectuar experimentos similares con las otras cepas identificadas que mostraron mantener su acción solubilizadora y mineralizadora después de un año de almacenamiento.

APENDICE I

FUNDAMENTO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS EMPLEADAS

1.- UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS (PRUEBA DE FERMENTACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO).

Determinar la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas visible.

El tipo de productos finales producidos por la fermentación de los hidratos de carbono depende de varios factores: 1) el tipo de organismo que lleva a cabo el proceso de fermentación; 2) la naturaleza del sustrato que debe ser fermentado, y 3) a veces, los factores ambientales como la temperatura y la acidez. Los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono y los alcoholes, denominados colectivamente "azúcares", son pocos: dos gases, hidrógeno y anhídrido carbónico; algunos ácidos; algunos alcoholes y una cetona.

2.- UTILIZACION DE ACETATO, CITRATO, MALONATO Y TARTRATO.

Algunas bacterias son capaces de usar ácidos orgánicos o las sales de esos ácidos como única fuente de carbono y otras no.

Cuando las bacterias usan el carbono de ácidos orgánicos para crecer, los productos finales de éste proceso metabólico son carbonatos, bicarbonatos e hidrógeno o hidroxido de sodio. La formación de productos alcalinos puede ser detectada por un indicador tal como el azul de bromotimol que contiene el medio. La detección del cambio de pH es significativa sólo si el medio no contiene azúcares porque su presencia conduce a resultados falsos positivos.

3.- CRECIMIENTO EN KCN

El papel del sistema citocromooxidasa en la respiración aeróbica es importante puesto que es sabido que en la mayoría de los organismos que contienen alguna parte del sistema citocromo, el ión cianuro (CN) inhibe la respiración. Esta inhibición se produce bloqueando la actividad del sistema citocromo. El cianuro es un inhibidor de la citocromooxidasa.

Muchas de las enzimas que se encuentran en una célula bacteriana requieren para su actividad un ión metálico formando un complejo. Las enzimas que contienen hierro son inhibidas por el cianuro; éste encierra el hierro inactivando a la enzima. La citocromooxidasa es un pigmento de metal pesado; la citocromooxidasa ferrosa, con la cual se combina el cianuro, interrumpe el sistema de transporte de electrones y provoca el cese de la respiración.

4.- HIDROLISIS DE ALMIDÓN

La prueba se basa primeramente en la ruptura del almidón en dextrinas y maltosa convirtiéndose finalmente la maltosa en dextrosa. La detección de hidrólisis de almidón en bacteriología generalmente se hace adicionando lugol ya que éste al reaccionar con la fracción amilosa da una coloración azul. El mecanismo de acción de la alfa-amilasa no se conoce completamente.

5.- HIDROLISIS DE ARGININA

La descomposición de la L-arginina según lo han demostrado Knivet, Slade y Slomp, y Oginsky y Gehring se produce en dos etapas: primero una descomposición de la L-arginina en L-citrulina, seguido por un sistema de desdoblamiento de la citrulina. La reacción general produce la formación de la L-ornitina, CO_2 y NH_3 . El

cambio de pH debido a la formación de NH_3 , nos indica la hidrólisis de arginina.

6.- HIDROLISIS DE UREA

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, todas las aminas (RCO-NH_2) son rápidamente hidrolizadas.

La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En la solución la urea es hidrolizada, dando carbonato de amonio como producto final.

7.- PRODUCCION DE ACIDO SULFHIDRICO

El gas H_2S es producido por bacterias que contienen la enzima cisteinasa.

El gas H_2S puede ser producido por la reducción de una fuente de azufre orgánico proporcionada por el grupo funcional $\text{R}_1\text{-SH}$ del aminoácido cisteína que se encuentra en la peptona o la reducción de azufre inorgánico como el tiosulfato ($-\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$).

El ácido sulfhídrico es un gas incoloro, y por lo tanto hace falta un segundo indicador para detectar visiblemente su producción, con éste fin se utiliza una sal pesada de citrato férrico de amonio para producir un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso.

La producción de ácido sulfhídrico también se determina por la adición de otros metales al medio de cultivo tales como: plomo; o bismuto, con lo que se forman los sulfuros correspondientes.

8.- PRODUCCION DE CATALASA

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacte-

rias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.

Por lo general, los organismos que no contienen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno.

9.- PRUEBA DE LAS DESCARBOXILASAS

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo ($-\text{COOH}$), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico.

Las enzimas carboxilasas son numerosas y cada una es específica para un sustrato determinado.

10.- FENILALANINA DESAMINASA

El aminoácido aromático fenilalanina, sufre la desaminación oxidativa catalizada por una aminoácido oxidasa, una flavo-proteína para producir el ácido fenilpirúvico.

El cloruro férrico actúa como agente quelante del ácido fenilpirúvico para formar un color verde.

11.- PRODUCCION DE INDOOL

El triptófano presente en la peptona del medio de cultivo es degradado por la acción de la enzima específica "triptofanasa" liberando indol el que es detectado por la adición del reactivo de Ehrlich que contiene un aldehído que al combinarse con la estructura pirrolica del indol forma una quinona o una estructura de tipo quinoides que es un importante compuesto que produce color.

12.- LECHE TORNASOLADA

La leche tornasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias funciones metabólicas de un organismo: 1) fermentación de la lactosa; 2) reducción del tornasol; 3) formación de coágulo; 4) peptonización (digestión); 5) formación de gas.

1) Fermentación de lactosa: el tornasol como indicador del pH es rojo en solución ácida (pH: 4.5) y azul en condiciones alcalinas (pH: 8.3). La leche tornasolada presenta un color azul púrpuro (pH: 6.8) cuando no está inoculada, pero si un organismo es capaz de fermentar la lactosa, produciendo principalmente ácido láctico, hay un cambio en el pH del medio dando un color rojo rosado. Ciertas bacterias que forman álcalis no fermentan lactosa, pero actúan sobre las sustancias nitrogenadas que se encuentran en la leche liberando amoníaco, y dando en consecuencia un pH alcalino que se manifiesta por un color púrpura azulado.

2) Reducción del tornasol: el tornasol es un indicador del pH y un indicador de oxidación-reducción. Algunos organismos son capaces de reducir el tornasol a una leucobase (blanca).

3) Formación de coágulo y digestión (peptonización): las enzimas proteolíticas provocan la hidrólisis de las proteínas de la leche de lo que resulta su coagulación; la principal enzima responsable de la formación de coágulo es la renina. La formación de coágulo en un medio de leche tornasolada es causada por una precipitación de la caseína por la formación de ácidos, o por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina.

La precipitación de la caseína provocada por los ácidos orgánicos a partir de la lactosa en condiciones ácidas, produce un coágulo firme, gelatinoso que no se separa de las paredes del tubo y es fácilmente disuelto cuando es sometido a condiciones alcalinas.

4) La hidrólisis de la caseína por la actividad enzimática produce una conversión final del precipitado caseinógeno en un lí

quido claro; el proceso denominado peptonización se manifiesta por una aclaración escuosa del medio causada por la digestión (coágulo) y las proteínas de la leche por las enzimas proteolíticas. Sin embargo, sólo se produce la peptonización cuando las bacterias que se desarrollan en la leche torneolada contienen la enzima proteolítica caseasa. Comúnmente la peptonización se denomina digestión.

5) Formación de gases: los gases (CO_2 y H_2) pueden formarse como resultado final de la fermentación de la lactosa. Se produce una fermentación turbulenta cuando hay abundancia de gases que descomponen un coágulo ácido.

13.- LICUEFACCION DE LA GELATINA

La gelatina contenida en el medio sirve para determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico que, a su vez, son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina presente. Estas enzimas, que son capaces de hidrolizar la gelatina se denominan geletinasas.

14.- PRUEBA DE OXIDACION-FERMENTACION

La utilización que una bacteria hace de los hidratos de carbono tiene lugar por alguno de dos procesos, de fermentación o de oxidación. Algunas bacterias son capaces de metabolizar un hidrato de carbono (manifestado por la producción de ácido) sólo en condiciones aeróbicas, mientras que otras producen ácido tanto aeróbicas como anaeróbicamente. Las bacterias que pueden crecer, metabolizarse y reproducirse en condiciones aeróbicas (presencia de oxígeno atmosférico) o anaeróbicas (ausencia de oxígeno atmosférico) se denominan anaeróbicos facultativos.

15.- PRUEBA DE LA OXIDASA

La prueba de la oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima del tipo de la oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que active la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa final del sistema de transferencia de electrones.

Un resultado oxidasa positivo está formado por una serie de reacciones en las cuales un componente autooxidable del sistema citocromo es el catalizador final. Pueden sustituirse los aceptores electrónicos naturales por sustratos artificiales, en cualquier sitio de la cadena de transporte de electrones, donde actúan como reductantes del sistema citocromo c-citocromooxidasa. Los diversos colorantes para la prueba de la oxidasa son aceptores de electrones artificiales; el reactivo fenilendiamina y el indofenol son a la vez aceptores y dadores de electrones. Estos sustratos artificiales son incoloros o coloreados según el estado en que se encuentren; la reacción oxidasa final muestra un producto coloreado.

16.- REDUCCION DE NITRATOS

La reducción del nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) y en gas nitrógeno (N_2) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas en las cuales los organismos utilizan el NO_3^- como aceptor final de electrones. La mayoría de las bacterias desnitrificantes son anaerobios facultativos y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaeróbica es un proceso de oxidación por el cual las sustancias inorgánicas, especialmente nitrato y sulfato, o raramente hidratos de carbono actúan como aceptores de electrones para suministrar energía. En la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas.

17.- ROJO DE METILO

La prueba del rojo de metilo (RM) se basa en el empleo de un indicador del pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno (pH) presentes cuando un organismo fermenta la glucosa.

Los organismos rojo de metilo positivos producen ácidos estables, manteniendo una alta concentración de iones hidrógeno hasta alcanzar cierta concentración y entonces cesa toda actividad.

Los organismos rojo de metilo negativos metabolizan los productos iniciales de la fermentación por descarboxilación, produciendo acetilmetilcarbinol neutro, lo que origina un pH elevado terminal que disminuye la acidez del medio, elevando el pH hacia un valor de 6 o más.

18.- VOGES-PROSKAUER

La reacción de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoina), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis; a partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías.

La producción de acetoina es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias.

APENDICE II

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

1.- FERMENTACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

CALDO NUTRITIVO

Extracto de carne	1.0	g
Peptona	10.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Rojo de fenol	0.018	g
Azúcar	1.0	g
Agua destilada	1000	ml

INTERPRETACION

a) Positivo ácido: color amarillo

b) Positivo ácido y gas: color del medio amarillo y se observan burbujas de gas en el tubo de Durham.

c) Negativo: no hay variación en el color del medio ni en el tubo de Durham.

2.- UTILIZACION DE ACETATO, CITRATO, MALONATO, TARTRATO

Sulfato de magnesio	0.2	g
Monofosfato de amonio	1.0	g
Fosfato dipotásico	1.0	g
Cloruro de sodio	2.0	g
Agar	15.0	g
Azul de bromotimol (sol. alcohólica al 1.5%)	0.08	g
Agua destilada	1000	ml
Sal del ácido orgánico	2.0	g

pH: 6.9

INTERPRETACION

- a) Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el medio inclinado.
- b) Prueba negativa: no se observe crecimiento ni cambio de color.

3.- CALDO KCN

Peptona	3.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Fosfato de potasio monobásico	0.225	g
Agua destilada	1000	ml

Agregar 1.5 ml/100 ml de una sol. de KCN al 0.5% después de esterilizar y hasta que el medio esté completamente frío.

INTERPRETACION

- a) Prueba positiva: crecimiento (turbiedad)
- b) Prueba negativa: sin crecimiento (claro)

4.- MEDIO WAKSMAN 77 (MANITOL-AGAR LIBRE DE NITROGENO)

Manitol	10.0	g
Fosfato dipotásico	0.5	g
Sulfato de magnesio hidratado	0.2	g
NaCl	0.2	g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.005	g
Cloruro férrico	0.005	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000	ml

INTERPRETACION

Bacterias fijadoras de nitrógeno: desarrollo positivo

5.- AGAR ALMIDON

Almidón de papa	10.0	g
Agua destilada	50	ml
Agar nutritivo	1000	ml

AGAR NUTRITIVO

Peptone de gelatina	5.0	g
Extracto de carne de res	3.0	g
Agar	15.0	g
pH final 6.8 ±		

Triturar el almidón en agua hasta formar una pasta fina y agregarla al agar fundido, mezclar y esterilizar a 115°C durante

10 min. Distribuir en cajas de Petri.

El sobrecalentamiento puede hidrolizar el almidón.

Inocular las cajas e incubar a 30°C durante 5 días.

Cubrir la placa con una solución de lugol, el medio toma un color azul cuando el almidón no ha sido hidrolizado; en tanto que la hidrólisis está indicada por zonas claras incoloras.

6.- AGAR ARGININA (THORNLEY 1960)

Peptona	1.0	g
NaCl	5.0	g
K ₂ HPO ₄	0.3	g
Agar	3.0	g
Rojo de fenol	0.01	g
L-arginina	10.0	g
Agua destilada	1000	ml

Ajustar a pH 7.7; esterilizar a 121°C durante 15 min.

Inocular por picadura, añadir una capa de 5 mm de vaselina, incubar a 30°C - 37°C; una reacción positiva está indicada por un cambio de color (a rojo) después de incubar de 3 a 7 días.

7.- SACAROSA-UREA (SURRECO)

Azul de bromotimol	0.5%	(1 ó 2 gotas)
Urea	1.0%	
Peptona de caseína	10.0	g
NaCl	5.0	g
Rojo de fenol	0.18	g

Sacarosa 5.0 g
 Agua destilada 1000 ml
 pH final 7.4

INTERPRETACION

- a) Urea positiva: color rojo violáceo
- b) Sacarosa positiva: color amarillo
- c) Prueba negativa: no hay cambio de color del medio de cultivo.

B.- AGAR HIERRO DE KLIGLER

Extracto de carne 3.0 g
 Extracto de levadura 3.0 g
 Peptona 15.0 g
 Proteosa peptona 5.0 g
 Lactosa 10.0 g
 Dextrosa (glucosa) 1.0 g
 Sulfato ferroso 0.2 g
 Cloruro de sodio 5.8 g
 Tiosulfato de sodio 0.3 g
 Rojo de fenol 0.024 g
 Agar 12.0 g
 Agua destilada 1000 ml

INTERPRETACION

- a) Positivo H_2S : ennegrecimiento en el medio
- b) H_2S negativo: no se observa ennegrecimiento.

9.- MEDIO DE BURK'S

Sucrosa	20.0	g
K_2HPO_4	0.64	g
KH_2PO_4	0.16	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20	g
NaCl	0.20	g
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.05	g
Na_2MoO_4	0.002	g
$FeSO_4$	0.14	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000	ml

INTERPRETACION

Bacterias fijadoras de nitrógeno: desarrollo positivo.

10.- AGAR SULFURO-INDOL-MOVILIDAD (SIM): MEDIO SEMISOLIDO

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	30.0	g
Hierro peptonizado*	0.2	g
Tiosulfato de sodio*	0.025	g
Agar	3.0	g
Agua destilada	1000	ml
pH 7.3		

*Indicador de H_2S

INTERPRETACION

a) Producción de H_2S : ennegrecimiento del medio.

b) Producción de indol: agregar unas gotas de reactivo de Ehrlich directamente al tubo incubado de 24 a 48 hr:

Prueba positiva: un anillo rojo en la superficie del medio.

Prueba negativa: no se produce color.

La prueba de movilidad fue efectuada en el medio de caldo nutritivo a diferentes temperaturas.

11.- MEDIO DE RAMOS CALLAO CON LECITINA, SIN GLUCOSA

Extracto de levadura	2.0	g
Agar	22.0	g
Agua destilada	1000	ml

EMULSION DE YEMA DE HUEVO

Mezclar una yema de huevo en 100 ml de una solución de NaCl al 0.9%. Esta mezcla se coloca en refrigeración toda la noche, para permitir sedimentación de la membrana y de las partículas pesadas.

INTERPRETACION

Mineralización de fosfato orgánico: zonas claras en el medio.

12.- MEDIO BUNT-ROVIRA MODIFICADO POR TAHA

K_2HPO_4	0.4	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	g
$H_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	g
$MgCl_2$	0.1	g
$FeCl_3$	0.01	g
$CaCl_2$	0.1	g

Peptona	1.0	g
Extracto de levadura	1.0	g
Glucosa	5.0	g
Agar	15.0	g
Extracto de suelo	250	ml
Agua	750	ml

Sustituir en la composición del medio dado el K_2HPO_4 por KCl , en la misma proporción y adicionar una suspensión de $Ca_3(PO_4)_2$ al 1% en goma arábica al 0,5%.

INTERPRETACION

La producción de ácido es detectada por la formación de zonas claras.

13.- PARA LA PRUEBA DE CATALASA SE EMPLEO EL MEDIO DE RAMOS-CALLAO CON GLUCOSA AL 2%.

Agregar directamente a un cultivo de 24 hr unas gotas de peróxido de hidrógeno al 30%.

INTERPRETACION

a) Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de O_2).

b) Prueba negativa: no hay formación de burbujas (no se forma O_2).

14.- MEDIO DE FALKOW PARA DESCARBOXILASAS

Peptona	5.0	g
Extracto de levadura	3.0	g
Glucosa	1.0	g
Púrpura de bromocresol	0.02	g
Agua destilada	1000	ml

pH 6.8

Agregar el aminoácido deseado:

Hidrocloruro de L-lisina 0.5%

Hidrocloruro de L-ornitina 0.5%

Incubar durante 4 días y examinar diariamente

INTERPRETACION

a) Prueba positiva: púrpura turbio

b) prueba negativa: color amarillo claro y brillante

15.- FENILALANINA AGAR

DL-fenilalanina	2.0	g
Extracto de levadura	3.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Fosfato de sodio	1.0	g
Agar	12.0	g
Agua destilada	1000	ml

pH 7.3

Inocular el medio de cultivo, incubar 24 hr, agregar 3 a 4 gotas de cloruro férrico al 10% directamente al tubo y hacer que

el reactivo se desliza suavemente sobre la superficie inclinada.

INTERPRETACION

a) Prueba positiva: en el término de 1 a 5 minutos formación de un color verde al principio del medio de cultivo inclinado.

b) Prueba negativa: no se produce cambio de color; se mantiene amarillo por el color del reactivo cloruro férrico.

16.- LECHE TORNASOLADA

Leche descremada deshidratada	100.0	g
Polvo de tornasol	0.75	g
Agua destilada	1000	ml

INTERPRETACION

a) Rojo rosado (ácido)

1. Reacción ácida
2. Fermentación de la lactosa

b) Azul purpúreo (sin cambio)

1. No hay fermentación de la lactosa
2. No hay cambio en el indicador del pH tornasol; igual que el tubo no inoculado.

c) Azul (alcalino)

1. Reacción alcalina
2. No hay fermentación de la lactosa
3. El organismo ataca las sustancias nitrogenadas que se encuentran en el medio.

d) Blanco (Red.): reducción del tornasol a una leucobase

e) Formación de coágulo a cuajo: coagulación de la proteína de la leche.

f) Digestión (peptonización)

1. Se ha digerido la proteína de la leche

2. Aclaración del medio

g) Gas (CO_2 y H_2)

1. Burbujas en el medio

2. El coágulo puede desintegrarse

h) Fermentación turbulenta: el coágulo ácido es fragmentado por la abundante producción de gas.

17.- GELATINA NUTRITIVA

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Gelatina	120.0	g
Agua destilada	1000	ml
pH 6.8		

INTERPRETACION

Precaución: enfriar el medio si se incuba a 37°C antes de interpretar los resultados.

a) Positivo: medio licuado

b) Negativo: el medio se mantiene sólido

18.- MEDIO BASICO OF DE HUGH Y LEIFSON

Peptone	2.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Fosfato de potasio	0.3	g
Azul de bromotimol 1% (sol. escuosa) ...	3.0	ml
Agar	3.0	g
Agua destilada	1000	ml

pH 7.1

Se siembran dos tubos por cepa, uno de ellos se cubre con una capa de vaselina estéril para asegurar la anaerobiosis. Incubar de 3 a 4 días.

INTERPRETACION

a) Acción oxidativa: viraje al amarillo solamente en el tubo sin vaselina.

b) Acción fermentativa: viraje al amarillo en ambos tubos.

19.- PARA LA PRUEBA DE LA OXIDASA SE EMPLEO EL MEDIO RAMOS-CALLAG SIN GLUCOSA

Agregar directamente varias gotas de N-dimetil-p-fenilendiami-
na al 1% a las colonias desarrolladas.

INTERPRETACION

a) Colonias oxidasa positivas: la colonia toma un color rosa-
do, después marrón y finalmente negro.

b) Colonias oxidasa negativas: no se produce cambio de color
en las colonias.

20.- GLUCOSA NITRATO

Peptona	10.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Extracto de carne	3.0	g
Glucosa	10.0	g
Agar	4.0	g
Azul de bromotimol	0.01	g
Nitrato de potasio	1.0	g
Agua destilada	1000	ml

pH 7.4

Agregar unas gotas de reactivo A y B sobre la superficie de desarrollada en el medio de cultivo (ver apéndice III, punto 4).

INTERPRETACION

- a) Reacción positiva: aparición de un color rojo púrpura
- b) Reacción negativa: no hay aparición de color.

Nota: algunos microorganismos reducen los nitratos más allá del estado de nitritos, en nitrógeno o amoníaco. Por lo que la prueba negativa de nitritos no debe interpretarse por fuerza como una reacción negativa de reducción de nitrato, sin comprobar primero la presencia de nitrato no reducido.

Para ello agregar una cantidad muy pequeña de zinc en polvo al medio que dio reacción negativa con los reactivos anteriores. La presencia de nitrato no reducido se indica por la aparición de un color rojo. Se confirma así la reacción negativa de reducción del nitrato.

21.- ROJO DE METILO-VOGES-PROSKAUER (CLARK Y LUBS)

Polipeptone	7.0	g
Glucose	5.0	g
Fosfato potásico	5.0	g
Agua destilada	1000	ml

ROJO DE METILO: Inocular el medio e incubar de 3 a 5 días.

Asépticamente, con pipeta estéril, retirar una alícuota de 2.5 ml para la determinación.

Agregar 5 gotas del indicador rojo de metilo a la alícuota (ver apéndice III - punto 5).

INTERPRETACION

a) Prueba del RM positiva: El cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un definido color rojo (pH 4.4) en la superficie del medio.

b) Prueba del RM negativa: color amarillo (pH 6.0) en la superficie del medio.

c) Reacción retardada: color anaranjado.

VOGES-PROSKAUER: Inocular el medio de cultivo e incubar de 24 a 48 hr.

Asépticamente con una pipeta estéril, retirar una alícuota de 2.5 ml para la reacción.

Agregar primero 0.6 ml de una solución de alfa-naftol al 5%, después 0.2 ml de la solución de KOH al 40%, agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoina y obtener una reacción de color (ver apéndice III - punto 6).

El acetilmetilcarbinol en presencia de KOH y aire es oxidado a diacetil. Este diacetil en presencia de alfa-naftol y el aminoácido

cido arginina de la peptona da una coloración roja.

INTERPRETACION

a) Reacción VP positiva: color rojo rosado en la superficie del medio.

b) Reacción VP negativa: color amarillo en la superficie del medio.

22.- AGAR NUTRITIVO

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000	ml
pH 7.0 - 7.2		

23.- MEDIO RAMOS CALLAO CON GLUCOSA

Extracto de levadura	2.0	g
Glucosa	20.0	g
Agar	22.0	g
Agua destilada	1000	ml
pH 7.0		

APENDICE III

1.- LUGOL

Yodo	5.0	g
Yoduro de potasio	10.0	g
Agua destilada	100	ml

Disolver el KI y el yodo en 10 ml de agua, ajustar el volumen con agua destilada.

Para su empleo diluir 1/5 con agua destilada.

2.- REACTIVO DE EHRLICH

Para-dimetilamino-benzaldehído	2.0	g
Alcohol etílico (absoluta)	190.0	ml
HCl (concentrado)	40.0	ml

3.- EXTRACTO DE SUELO

Suelo	1000.0	g
Agua destilada	1000.0	ml

Esterilizar durante 30 min

Se filtra, agregar trazas de CaSO_4 . El filtrado obtenido aforarlo a un litro.

4.- REDUCCION DE NITRATOS

a) AC. SULFANILICO AL 0.8%

Ac. sulfanilico	2.8	g
Agua destilada	250	ml
Ac. acético glacial	100	ml

b) ALFA-NAFTILAMINA AL 0.6%

Alfa-naftilamina	2.1	g
Agua destilada	250	ml
Ac. acético glacial	100	ml

5.- INDICADOR ROJO DE METILO

Rojo de metilo	0.1	g
Alcohol etílico de 95 ^o	300	ml
Agua destilada	200	ml

Disolver el rojo de metilo en el alcohol, agregar el agua destilada a la mezcla alcohol-indicador.

6.- SOLUCION DE ALFA-NAFTOL

Alfa-naftol	5.0	g
Alcohol (95%) cbp	100	ml

7.- KOH al 40%

KOH	40.0	g
Agua destilada cbp	100	ml

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander M. (1977) Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, New York.
- 2.- Allen M. F., Moore, Jr. T. S., and Christensen M. (1981) Phytohormone changes in Bouteloua gracilis infected by vesicular arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. Can J. Bot. (60): 468-471.
- 3.- Alvarez E. V. (1980) Eficiencia agronómica de rocas fosfóricas crudas y parcialmente aciduladas por métodos químicos y biológicos. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- 4.- Barea J. M., Navarro E. and Montoya E. (1976) Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. Journal of Applied Bacteriology (40): 129-134.
- 5.- Baya A. M., Boethling R. S. and Ramos-Cormenzana A. (1981) Vitamin Production in relation to phosphate solubilization by soil bacteria. Soil Biol. Biochem. (13): 527-531.
- 6.- Bergey's D. H., (1974) Bergey's Manual of determinative bacteriology. Ed. Board, 8a. edition.

7.- Blazevic D. J. and Ederer G. M. (1975) Principles of big chemical test in diagnostic microbiology. A Wiley Biomedical Publication New York.

8.- Collins C. H. (1969) Métodos Microbiológicos. Ed. Acribia, Zaragoza (España).

9.- Cowan y Steels (1979) Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Ed. C.E.C.S.A. 2a edición.

10.- Davidsohn I. y Henry J. B. (1979) Diagnóstico clínico por el laboratorio. Salvat editores S.A. Barcelona (España).

11.- Galeana A. P. (1981) Aislamiento y selección de microorganismos movilizados del fósforo en el suelo. Tesis Fac. de Química, U.N.A.M., México.

12.- Gutierrez N. V. M. (1980) La importancia de las fosfobacterias en la agricultura. Tesis Fac. de Química, U.N.A.M., México.

13.- Harrigan W. F., and Mc Cance M. E., (1974) Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London and New York.

14.- Lóvina E., Selva A. A. (1981) Metodología analítica, fisiopatología e interpretación analítica. Ed. Panamericana, 2a edición.

15.- Mac Faddin J. F., (1980) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, Buenos Aires.

16.- Madan M. (1974) Microbial dissolution of phosphates. Indian Journal of Microbiology (14): 167-171.

17.- Mitchell J. W., y Marth P. C. Fitohormonas y otros reguladores del crecimiento. Aguilar, S. A. de Ediciones Madrid.

18.- Saber M. S. M., Youary M. and Kabesh M. O. (1977) Effect of manganese application on the activity of phosphate-dissolving bacteria in a calcareous soil cultivated with pea plants. Plant and soil (47): 335-339.

19.- Subba Rao N. S. (1962) Phosphate solubilizing microorganisms. Bifertilizers in agriculture. Oxford and IBH, Nueva Delhi Bombay Calcuta.

20.- Weaner R. J. (1976) Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas, México.