

INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS BENEFICOS: III. PROCEDIMIENTOS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE HONGOS MICORRIZICOS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTAS

Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms III. Techniques for isolation and characterization of mycorrhizae fungi and plant growth-promoting bacteria

Gina Holguin¹, Yoav Bashan¹, Ronald Ferrera-Cerrato²

RESUMEN

Se describen a) técnicas de aislamiento para hongos endomicorrizicos, ectomicorrizicos y para bacterias promotoras de crecimiento en plantas BPCP, b) medios de cultivo para los diferentes grupos bacterianos, y c) técnicas tradicionales y modernas de caracterización e identificación de BPCP.

Palabras clave: *Análisis del perfil proteico, bacterias diazotróficas, bacterias halofílicas, espermosfera, fragmentos de restricción, homología, hongos ectomicorrizicos, hongos endomicorrizicos, rizosfera, sideróforos.*

SUMMARY

This review describes the details of: (i) techniques for isolation of endo- and ectomycorrhizae fungi and for Plant Growth-Promotion Bacteria. (ii) Culture media for the different types of bacteria. (iii) Traditional and modern techniques for identification and characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

Index words: *Diazotrophic bacteria, ectomycorrhizic fungi, fingerprinting, halophylic bacteria, homology, restriction fragments, rhizosphere, siderophores, spermosphere.*

¹Departamento de Microbiología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB), Apartado Postal 128, 23000 La Paz, BCS, México.

²Sección de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillo, Edo. de México, México.

Correspondencia. Fax: +52 (682) 54710 ó 53625

Aceptado: Enero de 1996.

INTRODUCCION

La biotecnología ha abierto nuevas posibilidades para la introducción de microorganismos benéficos en suelos con el fin de promover el crecimiento de plantas y llevar a cabo un control biológico de patógenos presentes en suelos (Bashan y Levanony, 1990; Kloepper *et al.*, 1989). Dada la actual posición legislativa del mundo occidental, es poco probable que en un futuro cercano se lleve a cabo la liberación al ambiente de microorganismos producidos por la ingeniería genética. Por lo tanto, el aislamiento y selección de microorganismos (con actividad promotora de crecimiento en plantas, con alta capacidad de sobrevivencia en suelo y de colonización radical, versatilidad metabólica, etc.) presentes de manera natural, continúa interesando a institutos biotecnológicos y a la industria de inoculantes. Además de simbioses del grupo de los rizobios, se ha encontrado que algunos grupos de bacterias asociadas a raíces, llamadas "Bacterias Promotoras de Crecimiento en Plantas, BPCP" (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), también promueven el crecimiento de ciertas plantas. Las BPCP comprenden a los siguientes géneros: (i) *Pseudomonas* y *Bacillus* los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos o deletéreos (control biológico) (Kloepper *et al.*, 1988; Kloepper *et al.*, 1989) y, (ii) bacterias que promueven directamente el crecimiento de plantas, tales como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Bashan y Levanony, 1990; Cavalcante y Döbereiner, 1988; Kole *et al.*, 1988) así como muchos otros aislamientos obtenidos de la rizosfera, los cuales todavía no han sido identificados. La capacidad de los hongos micorrizicos para promover el crecimiento de plantas está bien documentada (Ferrera-Cerrato, 1993).

En general, no hay algún sitio específico para localizar BPCP, ya que todas las raíces vegetales se

asocian con numerosas especies de microorganismos, ya sea patógenos o benéficos. Además, los requerimientos nutricionales y ambientales de estos microorganismos son tan diversos, que no existe un método generalizado que permita aislar cualquier especie de BPCP o de hongos micorrizicos. Por lo tanto, se han desarrollado una variedad de métodos, sobre todo en los últimos veinte años. Para este trabajo se han seleccionado una serie de estrategias útiles y prácticas: (i) El mejor lugar para buscar un agente de control biológico es en el mismo nicho ecológico donde se localiza el patógeno que se quiere combatir (Kloepper *et al.*, 1988; Tipping *et al.*, 1989); (ii) Se pueden aislar BPCP a partir de antecesores silvestres de la planta de interés y utilizar estos aislamientos para inocular plantas cultivadas (M. Feldman, sin publicar); (iii) Cuando se introduce al suelo alguna planta de interés, se puede enriquecer artificialmente la población de BPCP en la rizosfera y así facilitar su recuperación (Y. Bashan, sin publicar); (iv) BPCP con potencial para el control biológico son seleccionadas con base en su producción de sideróforos o antibióticos observada *in vitro* (Kloepper *et al.*, 1988); (v) De las miles de bacterias aisladas al azar de la rizosfera de diversos habitats, muchas son seleccionadas por su capacidad para incrementar el crecimiento de plantas sin tomar en cuenta su posición taxonómica. Este tipo de enfoque es común en programas industriales llamados R&D, investigación y desarrollo, (Research and Development) (Kloepper *et al.*, 1989).

Habitats de hongos micorrizicos

La asociación mutualista que se lleva a cabo entre las raíces de las plantas superiores y los hongos, lo que se conoce como micorriza, posibilita mediante mecanismos bioquímicos, una mayor absorción de nutrimentos, principalmente fósforo, y además magnesio, calcio, potasio, azufre, hierro, cobre, boro y manganeso. La asociación también permite tolerancia al estrés hídrico. Las micorrizas se dividen en ectomicorriza (micorriza en vaina, la que se caracteriza por tener un manto compacto de hifas que cubre las raíces cortas con una red micelial, que crece entre las células corticales llamada Red de Hartig) y endomicorrizas cuyo tipo más común es la vesículo-arbuscular (V-A) la cual forma sus estructuras dentro de las células corticales de la raíz (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

La endomicorriza V-A está ampliamente distribuida en todo el reino vegetal (98%) por lo que es muy difícil encontrar plantas que no estén colonizadas con este tipo de hongos. Propágulos endomicorrizicos pueden colectarse en cualquier época del año en raíces de plantas hospederas anuales, perennes o herbáceas, o leñosas y en todo tipo de suelo (Ferrera *et al.*, 1993).

La asociación micorrizica tiene una amplia distribución por lo que puede hallarse frecuentemente en diversas áreas ecológicas tales como campos cultivados, campos vírgenes, bosques, pantanos, etc. (González-Chávez, 1993).

AISLAMIENTO DE BPCP

Fundamento: Las bacterias que colonizan el interior de las raíces son distintas a las que colonizan la superficie de las raíces (Van Peer *et al.*, 1990). Por esta razón, para el aislamiento de cada grupo se siguen estrategias diferentes.

Aislamiento de bacterias que colonizan la superficie radicular

i) Después de lavar perfectamente las raíces con agua corriente y después con agua destilada estéril varias veces, se embeben las raíces por un periodo de 10 minutos en una solución amortiguadora de fosfatos y sal (PBS, phosphate-buffered saline) K_2HPO_4 - KH_2PO_4 10mM, NaCl 0.14 M, pH 7.2. Después se cortan las raíces en pedazos pequeños (3 cm), se colocan en el medio o medios de enriquecimiento seleccionados (descritos posteriormente) y se incuban a 25-30°C por una o dos semanas hasta que el crecimiento sea evidente (Kremer *et al.*, 1990).

ii) Las bacterias colonizadoras de la superficie radical pueden también ser aisladas agitando los pequeños pedazos de raíz durante 10 minutos, en un agitador girador mecánico o vortex. Las raíces deben estar suspendidas en PBS o en una solución amortiguadora de fosfatos y peptona la cual contiene, por litro: peptona, 1.0 g; K_2HPO_4 , 1.21 g; KH_2PO_4 , 0.34 g (Lalande *et al.*, 1989). Otros diluyentes que se pueden utilizar como alternativa son: PBS mas Tween 20 al 0.025%, Tween 40 al 0.01%, (Kremer *et al.*, 1990) o caldo de soya tripticasa al 0.1% (TSB, tryptic soy broth) (Hagedorn *et al.*, 1989; Lalande *et al.*, 1989). Las muestras diluidas se colocan en el medio apropiado y se incuban a la temperatura seleccionada.

Aislamiento de bacterias que colonizan la parte interna de la raíz

Se esteriliza la superficie radicular embebiendo las raíces en etanol 95% (v/v) durante 1 min y posteriormente en HgCl_2 al 0.1% (p/v) acidificado y después se lavan con agua destilada estéril mínimo diez veces (De Freitas y Germida, 1990). Otros procedimientos de desinfección que se ofrecen como alternativa son: i) Se embeben las raíces en alcohol etílico al 70% durante 5 min, después en hipoclorito de sodio al 6.25% durante 10 min y por último se enjuagan varias veces con agua destilada estéril (Lalande *et al.*, 1989) o ii) se embeben las raíces en H_2O_2 (10%; 15 s) y se enjuagan tres veces con solución acuosa de MgSO_4 (0.1 M) (Van Peer *et al.*, 1990).

Posteriormente se suspende el material vegetal en PBS 0.05 M o solución acuosa de MgSO_4 0.1 M y se muele en un mortero o se homogeneiza con un homogenizador a velocidad alta durante 1-3 min, (100 ml de PBS por cada 5 g de peso fresco de raíces). El homogeneizado se puede filtrar con una tela de algodón estéril (Lindberg y Granhall, 1984). Se preparan alicuotas diluidas o no diluidas para ser colocados en el medio de enriquecimiento previamente seleccionado.

Un método de aislamiento alternativo, es tomar las raíces ya estériles y colocarlas sobre agar nutritivo suplementado con glicerol al 1% para verificar si la superficie radicular está estéril. Se cortan las raíces longitudinalmente y se colocan en el medio de enriquecimiento seleccionado, preferentemente suplementado con glucosa (las bacterias productoras de ácidos que metabolizan la glucosa parecen dominar en la parte interna de la raíz) y se incuban hasta que el crecimiento sea evidente (Lalande *et al.*, 1989). Después del periodo de incubación, 0.1 ml del medio rico en bacterias se dispersa en el medio sólido que ha sido seleccionado y se incuban de nuevo a la misma temperatura. Los cultivos aislados se deben de estriar varias veces en el mismo medio sólido hasta obtener crecimientos bacterianos puros.

Aislamiento de BPCP diazotróficas

Modelo espermosfera (Thomas-Bauzon *et al.*, 1982).

Fundamento: El modelo espermosfera consiste en germinar una semilla en la obscuridad la cual libera exudados en un medio sin fuentes de carbono y de nitrógeno. La plántula es después inoculada con diluciones

de suelo e incubada bajo una atmósfera con acetileno. Este sistema es interesante por lo siguiente: i) La plántula provee a las bacterias de fuentes de carbono útiles impidiendo así la presencia de fuentes de alimento indeterminadas y ii) la plántula en crecimiento consume la fuente de nitrógeno disponible a través de la actividad diazotrófica bacteriana, manteniendo un medio altamente selectivo y libre de fuentes de nitrógeno.

Procedimiento:

1. Se muelen 10 g de suelo de la rizosfera (raíces y el suelo que se les adhiere) en un mortero y se afora a 100ml con PBS procurando mantener un margen no mayor de dos horas después del muestreo. Se deben preparar diluciones decimales adicionales del homogeneizado en PBS.
2. Las semillas desinfectadas se colocan en tubos de 35 ml conteniendo 5 ml de medio semi-sólido al 0.3% agar, sin fuentes de nitrógeno y de carbono (el medio se describe en la sección sobre medios de cultivo). Los tubos espermosfera se guardan en la obscuridad a 28°C (o a otra temperatura que se considere conveniente) durante una semana. Los tubos con un brazo adyacente conteniendo 2 ml de NaOH 1 N, se pueden utilizar como trampa de CO_2 cuando sea necesario.
3. Cuando los coleóptilos miden 1 cm o más de altura, los tubos se inoculan con las diluciones obtenidas en el paso #1, utilizando alicuotas de 0.5 ml. Una inoculación más temprana resulta en muerte prematura de las plántulas. Una inoculación oportuna permite percatarse de contaminación ocasionada por una desinfección inadecuada de las semillas.
4. El número de bacterias diazotróficas se determina por el Método del Número Más Probable (MPN) (Postgate, 1969). La estimación se basa en el número de tubos nitrogenasa-positivos (diez réplicas para cada dilución) detectados por el ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968).
5. El contenido de los diez tubos que resultaron ser etileno-positivos en las diluciones más altas, se combina, se homogeneiza, se diluye en series decimales (10^{-5} - 10^{-11}) y se siembra en medio sin fuente de nitrógeno (Omar *et al.*, 1988; Rennie, 1981) en botellas de suero planas (120 ml o más). Se incuban en acetileno al 1% durante 4-8 días (el proceso de combinar todos los tubos y la homogeneización, evitan los problemas que puede ocasionar el transferir un pedazo pequeño de raíz a un tubo de dilución alta). Las colonias que se desarrollen en el medio sólido deben de ser escogidas individualmente, purificadas de manera convencional en medio sin fuente de nitrógeno y

su capacidad para fijar nitrógeno debe ser examinada como arriba se describe. En algunos casos es necesario hidrolizar parcialmente el material capsular utilizando NaOH 0.5 ó 0.1N para la eliminación de contaminantes.

Limitaciones de la técnica: Esta técnica no da un panorama completo de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera y sólo nos proporciona un bosquejo de la concentración y naturaleza de las bacterias diazotróficas más abundantes.

Medios de enriquecimiento semi-sólidos para el aislamiento de bacterias diazotróficas microaerofílicas (Döbereiner, 1988; Döbereiner y Day, 1976).

Fundamento: Los medios semi-sólidos sin fuente de nitrógeno son la clave para el aislamiento de algunas bacterias diazotróficas microaerofílicas asociadas a raíces. Las técnicas que utilizan estos medios son muy sencillas y útiles cuando hay abundancia de bacterias diazotróficas asociadas a raíces. Se pueden obtener cultivos puros con sólo algunos pasos de purificación y sin muchas dificultades. Esta técnica se utilizó en el descubrimiento de cuatro cepas de *Azospirillum*, *Campilobacter nitrofigilis*, *Herbaspirillum seropedicae*, algunas *Pseudomonas* diazotróficas, *Acetobacter diazotrophicus* y *Bacillus azotofixans*.

Procedimiento:

1. Se colocan pedazos de raíz intactos (0.5-1.0cm) en los medios semi-sólidos (agar al 0.05% o menos) NFb, OAB o BL (descritos posteriormente) y se incuban sin agitación durante 2-5 días a 25-35°C. (A temperaturas más bajas se debe prolongar el tiempo de incubación.) Al término del periodo de incubación se podrá observar una película blanca bacteriana formada 2-10 mm abajo de la superficie. Se debe evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno del cultivo de enriquecimiento por medio del ensayo de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968). Hay que tener especial cuidado en mantener intacta la película, ya que de lo contrario se interfiere con la actividad de la nitrogenasa. Se logra obtener cultivos casi puros después de 1-3 subcultivos en el mismo medio, seguidos de la siembra por estría de cultivos de 24 horas sobre el mismo medio sólido (Döbereiner y Day, 1976).
2. (Para el aislamiento de la bacteria diazotrófica *Acetobacter* asociada a la caña de azúcar): Las raíces y tallos de la caña de azúcar se lavan en agua corriente, se maceran en una licuadora y se preparan diluciones seriadas en una solución de sacarosa al 5% y se incuban en medio semi-sólido (descrito después). Continúe como se indica en el procedimiento 1 (Cavalcante y Döbereiner, 1988).

MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE BPCP

Medios no selectivos para el aislamiento de bacterias de la rizosfera

Fundamento: El medio común TSA descrito posteriormente recupera una amplia variedad de bacterias aerobias y anaerobias facultativas Gram-positivas y Gram-negativas (Hagedorn *et al.*, 1989). Sin embargo, se recomienda llevar a cabo el proceso de aislamiento utilizando simultáneamente diferentes medios de cultivo, ya que un solo medio no-selectivo permitirá recuperar sólo una pequeña porción de la población de BPCP presentes.

1. Medio TSA (agar soya tripticasa) diluido diez veces (1/10) para bacterias heterótrofas. Contiene caldo de soya tripticasa, 3 g; y agar, 15 g (Hagedorn *et al.*, 1989). Se puede aislar una población más diversa de bacterias de suelo o de otros sitios utilizando el mismo medio pero diluido 100 veces (1/100; 0.3g TSA) (Tipping *et al.*, 1989).

2. El medio TSA contiene (g/l): extracto de carne 3.0; extracto de levadura 3.0; peptona de caseína 15.0; peptona de carne 5.0; lactosa 10.0; sacarosa 10.0; glucosa 1.0; citrato $\text{NH}_3^+\text{Fe}^{3+}$ 0.5; NaCl 5.0; tiosulfato de sodio 0.5; rojo fenol 0.024; agar 12.0; agua destilada 1000 ml; pH=7.4 (Stolp y Gadkari, 1986). La eliminación de bacterias Gram-positivas en TSA al 1/10 se logra agregando 2 µg/l de cristal violeta (Tipping *et al.*, 1989) ó 1.2 g/l de lauril sarcosinato de sodio (SLS) al medio S1 (descrito en la sección sobre aislamiento de pseudomonas fluorescentes).

Los medios de cultivo siguientes pueden utilizarse simultáneamente para lograr una recuperación de las poblaciones más comunes de BPCP.

1. El medio selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas* (Stolp y Gadkari, 1986) se basa en el medio TSA suplementado con (µg/ml): fucsina básica, 9; nitrofurantoina, 10; ácido nalidixico, 23; y con (mg/ml): ciclohexamida, 0.9; TTC (cloruro de trifeniltetrazolium), 1.4. El medio base TSA es suplementado con fucsina básica y TTC antes de esterilizarse. El ácido nalidixico y la nitrofurantoina se esterilizan por filtración, utilizando filtros de membrana de 0.45 µm y se agregan aseptícamente al medio TSA estéril. La ciclohexamida se puede esterilizar por filtración o agregarse directamente como polvo no estéril.
2. Las bacterias corineformes y otras bacterias Gram-positivas se aíslan en el medio D-2 (Kado y Heskett,

1970) el cual se suplementa con dicromato de potasio (50 mg/l) y ciclohexamida (100 mg/l) para promover la selectividad del medio ó sobre agar rojo de metilo para bacterias Gram-positivas.

3. El medio King B para *Pseudomonas* contiene: (g/l): proteosa peptona no. 3 (Difco), 20; glicerol, 10 ml; asparagina, 2.25; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄.7H₂O, 1.5; agar, 15 (King *et al.*, 1954). La temperatura de incubación es 30°C.

Todos los medios arriba mencionados pueden ser suplementados con benomyl, 20 mg/ml (Benlate, 50% PA Dupont, USA) o Nistatina y actidiona (50 mg de cada uno por litro) para reducir el crecimiento de hongos.

Medios para el aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes

Fundamento: Las *Pseudomonas* fluorescentes (*P. putida* y *P. fluorescens*) son un grupo de bacterias muy amplio que se encuentran en la rizosfera de varias plantas de cultivo. Pueden ser aisladas fácilmente en los siguientes medios de cultivo:

1. Medio B de King modificado, suplementado con los antibióticos (mg/l): cloramfenicol, 5; ciclohexamida, 75; novobiocina, 45; y penicilina G, 75000 unidades (Klopper *et al.*, 1988)

Comentarios: i) La resistencia a los antibióticos recomendados no es únicamente en *Pseudomonas*. ii) El medio B de King original es aceptado como un medio de diagnóstico para la detección de fluorescencia, sin embargo, no es muy apropiado para el aislamiento de estas bacterias ya que no es selectivo.

2. El medio D4 (Kado y Heskett, 1970) contiene (g/l): glicerol, 10.0 ml; sacarosa, 10.0; hidrolizado de caseína, 1 g; NH₄Cl, 5.0 g; dodecil sulfato sódico (SDS), 0.6 g (para eliminar no-pseudomonas); Na₂HPO₄ (anhidro); agar, 15g. Este medio es el más ampliamente utilizado, sin embargo, muchas otras bacterias Gram-negativas pueden crecer en él y no se puede observar fluorescencia.

3. El medio S1 (Gould *et al.*, 1985) contiene (g/l): agar, 18; sacarosa, 10; glicerol, 10 ml; casamino ácidos (Difco), 5.0; NaHCO₃, 1.0; MgSO₄.7H₂O, 1.0; K₂HPO₄, 2.3; lauril sarcosinato de sodio (SLS), 1.2; y 20 mg de trimetropima. (5-[3,4,5-trimetoxifenil] metil]-2,4- pirimidina-diamina)(Sigma). El pH final del medio es entre 7.4 y 7.6.

Comentarios: i) Se agrega la trimetropima después de esterilizar por autoclave y dejar enfriar el medio. ii) Este medio tiene varias ventajas sobre otros medios utilizados

para el aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes ya que provee consistentemente de una alta selectividad y buen porcentaje de recuperación al procesar muestras obtenidas de diferentes habitats. Se puede observar fluorescencia al inicio del aislamiento.

Medio para el modelo espermosfera (Omar *et al.*, 1988).

Solución A (mg/l): H₃BO₃, 750; ZnSO₄.7H₂O, 550; CoSO₄.7H₂O, 350; CuSO₄.4H₂O, 22; MnCl₂.4H₂O, 10; agua destilada 1000 ml.

Solución B (g/l): FeSO₄.7H₂O, 0.8; MgSO₄.7H₂O, 4.0; Na₂MoO₄.2H₂O, 0.118; CaCl₂.2H₂O, 4.0; EDTA, 0.8; solución A, 4 ml; agua destilada 996 ml.

Solución final (g/l): KH₂PO₄, 1.8; K₂HPO₄, 2.7; solución B, 50 ml; Agar nobel, 5; agua destilada, 950 ml; pH ajustado a 6.8 con KOH; esterilizar en el autoclave.

El medio sin fuente de nitrógeno utilizado para el modelo espermosfera contiene: (g/l): extracto de levadura como iniciador de crecimiento, 0.1; almidón, 5; glucosa, 5; manitol, 5; ácido málico, 3.5; más el medio basal descrito anteriormente (Berge *et al.*, 1991) o el medio descrito a continuación, el cual contiene varias fuentes de carbono.

Medio para el aislamiento de bacterias diazotróficas (Rennie, 1981)

Fundamento: Este medio combinado fue diseñado para incorporar los componentes químicos comunes de los medios sin fuente de nitrógeno más utilizados, ya que la composición básica de estos medios es muy similar. Se incluyó manitol para favorecer el crecimiento de *Azotobacter* sp., biotina y ácido p-aminobenzoico para *Bacillus* sp. Se agregó el extracto de levadura para proveer a las bacterias de una fuente de nitrógeno con factores de crecimiento orgánicos misceláneos iniciadores del crecimiento sin llegar a inhibir la reducción de acetileno.

Solución A: K₂HPO₄, 0.8 g; KH₂PO₄, 0.2 g; NaCl, 0.1 g; Na₂FeEDTA, 28 mg; Na₂MoO₄.2H₂O, 25 mg; extracto de levadura, 100 mg; manitol, 5 g; sacarosa, 5 g; lactato de sodio, 0.5 ml (60%, v/v) agua destilada, 900 ml.

Solución B (g): MgSO₄.7H₂O, 0.2; CaCl₂, 0.06; agua destilada 100 ml. Las soluciones se esterilizan por separado, se dejan enfriar y se mezclan. A esta nueva solución se agrega biotina (5µ/l) y ácido p-aminobenzoico (10µ/l) esterilizados por filtración y el pH final se ajusta a 7.0.

Medios para el aislamiento de *Azospirillum*

Fundamento: El medio más comúnmente utilizado para el aislamiento de *Azospirillum* es el medio NFb semi-sólido (Döbereiner y Day, 1976; Döbereiner *et al.*, 1976). Se han desarrollado varias modificaciones útiles y se mencionan a continuación.

1. Medio NFb

(g/l): DL-ácido málico, 5; KOH, 4; K_2HPO_4 , 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $CaCl_2$, 0.02; NaCl, 0.1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; (mg/l): $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 2; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10; solución de azul de bromotimol al 0.5% (disolver en etanol o en solución acuosa de KOH 0.2N); utilizar 2 ml por litro de medio de cultivo; agar, 0.0175-0.5%; 1000 ml agua destilada, pH 6.8 (Döbereiner y Day, 1976). Aún suplementado con extracto de levadura a bajas concentraciones (0.002-0.005%), este medio previene el crecimiento de contaminantes y permite la formación de colonias bajo condiciones aerobias (Döbereiner, 1988). En algunos casos donde el ácido málico-KOH inhibe el crecimiento de las bacterias, éste puede reemplazarse con 10 g/l de succinato de sodio o sacarosa al 0.5% (Tyler *et al.*, 1979). El azul de bromotimol se puede sustituir con púrpura de bromocresol al 0.001% (New y Kennedy, 1989).

2. Medio OAB (Okon *et al.*, 1977)

Fundamento: Este medio modificado es más apropiado para el crecimiento de *Azospirillum* que para su aislamiento. No es muy selectivo para este género, pero provee mayor capacidad amortiguadora que el medio original. Incluye en su composición química microelementos, una concentración limitada de NH_4 para iniciar el crecimiento en condiciones aerobias y una pequeña cantidad de extracto de levadura para acortar la fase de latencia (lag phase) del crecimiento y contribuir a un crecimiento vigoroso. Se puede utilizar en forma líquida, semi-sólida (0.05% agar) o sólida. Para el crecimiento óptimo de *Azospirillum* (esto no es estrictamente necesario) en medio líquido, se debe mantener el cultivo a una presión de oxígeno constante de 0.005-0.007 atm bajo una atmósfera de N_2 mezclada con aire.

Solución A: (g/l) DL-ácido málico, 5; NaOH, 3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $CaCl_2$, 0.02; NaCl, 0.1; NH_4Cl , 1; extracto de levadura, 0.1; $FeCl_3$, 0.01; (mg/l) $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 2; $MnSO_4$, 2.1; H_3BO_3 , 2.8; $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, 0.04; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.24; disolver en 900 ml agua destilada.

Solución B: (g/l) K_2HPO_4 , 6; KH_2PO_4 , 4; agua destilada, 100 ml.

Después de esterilizar y enfriar, se mezclan las dos soluciones. El pH del medio es 6.8.

Comentarios: El $FeCl_3$ puede ser reemplazado por 10 ml de Fe(III)-EDTA (0.66%, P/V, en agua). Este medio puede ser suplementado con 10 ml de una solución de vitaminas para mejorar su capacidad para aislar bacterias microaerofílicas heterótrofas fijadoras de nitrógeno. La solución de vitaminas contiene por litro: D- biotina (200 mg), pantotenato de calcio (40 mg), mioinositol (200 mg), niacinamida (40 mg), ácido p-aminobenzoico (20 mg), hidrocloreuro de piridoxina (40 mg), riboflavina (20 mg), dicloruro de tiamina (4 mg) y son esterilizados por filtración (Reinhold *et al.*, 1986).

3. Medio semi selectivo NFb-rojo congo (Rodríguez Cáceres, 1982)

Este medio es básicamente el medio NFb suplementado con 15 ml/l de solución acuosa de rojo congo (1:400) esterilizada por separado.

Comentarios: Este medio permite reconocer las colonias de *Azospirillum* facilitando el aislamiento, ya que las colonias se tiñen de rojo oscuro o escarlata, con características coloniales típicas; otras bacterias de suelo no absorben el rojo congo.

4. Medios BL y BLCR (Bashan y Levanony, 1985)

Estos dos medios semiselectivos se basan en el medio OAB. El medio BL es medio OAB suplementado con (mg/l) de sulfato de estreptomina, 200; ciclohexamida, 250; deoxicolato de sodio, 200, y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, 15. El medio BLCR es medio BL suplementado con una solución acuosa de rojo congo (1-4 g/l).

Comentarios: Estos medios son apropiados para el aislamiento de *Azospirillum* a partir de la rizosfera, ya que las colonias son fáciles de reconocer, especialmente en el medio BLCR. Sin embargo, algunas cepas de *A. brasilense* no pudieron crecer en este medio (Horemans *et al.*, 1987) y, en general, el crecimiento de *Azospirillum* en el medio BLCR, es significativamente más lento que en el medio OAB original (aproximadamente 10 días de incubación).

Medio para el aislamiento de bacterias diazotróficas halofílicas (Reinhold *et al.*, 1986; 1987)

(g/l) ácido DL-málico, 5; KOH, 4.8; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25; $CaCl_2$, 0.22; NaCl, 1.2; Na_2SO_4 , 2.4; $NaHCO_3$, 0.5; K_2SO_4 , 0.17; Na_2CO_3 , 0.09; Fe(III)-EDTA, 0.077; K_2HPO_4 , 0.13; extracto de levadura, 0.02; (mg/l) biotina,

0.1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2; H_3BO_3 , 0.2; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02; ZnCl_2 , 0.15; agar 2-8 g; 1000 ml de agua destilada. El pH del medio es 8.5. El ácido málico, KOH y el agar se disuelven en la mitad del volumen total y se esterilizan. La solución de sales se esteriliza por filtración después de disolver los ingredientes en la mitad del volumen total. Después de centrifugar el medio, se descarta el precipitado. La fórmula permite pequeñas alteraciones en las concentraciones de los reactivos (Reinhold *et al.*, 1987).

Medio para el aislamiento de bacterias halofílicas (Quesada *et al.*, 1982)

Fundamento: Las bacterias de la rizosfera de plantas xerófitas en suelos hipersalinos (5.0-10.7% NaCl) pueden ser aisladas alterando la concentración total de sales del medio a 9, 50, 100, 200 y 250 g/l.

El medio base contiene 200 g/l de sales totales y se compone de (g/l): NaCl 158.9; MgCl_2 13.8; MgSO_4 20.9; CaCl_2 1.5; KCl 4.2; NaHCO_3 0.2; NaBr 0.5.

Estas mezclas básicas de sales pueden ser suplementadas con alguno de los tres medios descritos a continuación (g/l): i) Peptona P (Oxoid), 10. ii) Extracto de levadura, 10; Proteosa Peptona (Difco), 5; glucosa, 1. iii) Extracto de levadura, 5; glucosa, 1; y extracto de suelo. El extracto de suelo se prepara esterilizando volúmenes iguales de suelo de jardín con su correspondiente mezcla de sales; después de decantar, se filtra a través de papel de filtro y se agrega al filtrado el resto de los nutrientes. Los valores de pH se ajustan a 7.5 con KOH.

Medio para el aislamiento de *Acetobacter* (Cavalcante y Döbereiner, 1988)

Fundamento: Este medio semi-sólido está basado principalmente en el medio NFb al cual se le hicieron algunas modificaciones para crecer *Acetobacter* la cual tolera condiciones ácidas en el medio.

Solución A: (g/l) caña de azúcar (o sacarosa o glucosa), 100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01; agar, 2.2 (mg/l) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2; solución al 0.5% (disuelta en 0.2 N KOH) de azul bromotimol, 5 ml; agua destilada, 900 ml.

Solución B: (g/l) K_2HPO_4 , 0.2; KH_2PO_4 , 0.6; agua destilada, 100 ml.

Comentarios: Se recomienda esterilizar las dos soluciones por separado y mezclarlas después de enfriarse. Después

se acidifica el medio con ácido acético a un pH de 4.5. Para la purificación de los aislamientos, se suplementa el medio con 0.02 g de extracto de levadura y 15 g de agar. El proceso de aislamiento puede ser más eficiente adicionando jugo de caña al 1%. Las colonias presentan un color anaranjado oscuro.

Medio para el aislamiento de bacterias diazotróficas marinas (HGB)

Fundamento: El medio HGB se basa en el medio OAB (Okon *et al.*, 1977) modificado para el aislamiento de bacterias marinas. Se considera útil para el aislamiento de vibrios diazotróficos (Holguin *et al.*, 1992).

Solución A: (g/890 ml de agua destilada) ácido DL-málico, 5; NaOH, 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; CaCl_2 , 0.02; NaCl, 20; extracto de levadura, 0.1.

Solución B: (solución concentrada o "stock", g/500 ml agua destilada) FeCl_3 , 0.5; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1; MnSO_4 , 0.105; H_3BO_3 , 0.14; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0014; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.012.

Solución C: 100 ml PBS 0.39 M, pH 7.6.

10 ml de la solución (B) se agregan a la solución (A) y se esterilizan. Después de enfriarse, se mezcla esta solución con la solución amortiguadora (C), la cual debe esterilizarse por separado.

Medios para el aislamiento de *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* se seleccionan sometiendo las diluciones bacterianas a tratamientos de calor (100°C) por periodos de 15 minutos antes de proceder con la siembra sobre medio TSA sólido diluido diez veces (Tipping *et al.*, 1989).

Medio para el aislamiento de *Azotobacter* (Kole *et al.*, 1988).

Fundamento: El medio no contiene fuente de nitrógeno y se basa en la utilización de extracto de suelo y de manitol como fuente de carbono.

Composición (g/l): KH_2PO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; NaCl, 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; extracto de suelo, 100 ml; agua destilada, 900 ml; agar, 15; y manitol, 20. El pH se ajusta a 7.6 con NaOH antes de esterilizar. El manitol y el FeSO_4 se esterilizan por separado y se agregan al resto del medio al enfriarse. El extracto de suelo se prepara de la siguiente manera (Page, 1986): El material que no es suelo se descarta mediante tamizado y el suelo se

pulveriza asépticamente. El suelo pulverizado (10g) se agita con 90 ml de agua destilada estéril durante 15 min. Un mililitro de esta suspensión se diluye en 9 ml de NaCl al 0.85% y un mililitro de ella se siembra en medio libre de nitrógeno. Las placas se incuban durante 4-5 días a 26°C.

AISLAMIENTO DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS

Fundamento: Las esporas producidas por los hongos endomicorrizicos V-A y localizadas en el suelo son de gran importancia ya que al no poder crecer éstos en cultivos axénicos, es necesario inocularlos a una planta hospedero. Para lograr este fin, se requiere la separación de esporas del suelo, tratando de obtener una muestra que contenga la máxima cantidad de ellas (98-100% de extracción). Previo a la inoculación es necesaria llevar a cabo la identificación del hongo, la cual también sólo es posible mediante sus esporas o esporocarpos. La colonización producida también puede identificarse por medio de la observación microscópica, por ejemplo, unas especies producen sólo colonización arbuscular, otras vesículas lobuladas y otros rasgos anatómicos de un hospedero específico. Sin embargo, la identificación de las distintas especies en cada género está basada en la caracterización morfológica de las esporas, en donde se considera tamaño, color, forma, estructura citoplasmática, estructura superficial, número de paredes, grosor de éstas, entre otros caracteres.

Para describir las especies de los hongos endomicorrizicos o probar su efectividad, se deben de propagar las esporas aisladas con el fin de obtener cultivos puros en cantidades masivas de una sola cepa. La inoculación de plantas hospederas es la única forma de asegurarse que se aislaron esporas de hongos que forman la endomicorriza vesículo-arbuscular.

Muestreo

Para determinar la población de esporas en el suelo se toman muestras de la rizosfera de la planta o de la capa de material orgánico. Se puede utilizar un tubo de metal de 3 cm de diámetro interno, el cual se introduce en forma vertical al suelo. La muestra está integrada por la zona correspondiente a 4-8 cm de profundidad, aunque en especies vegetales con raíces profundas pueden ser más de 20 cm. Dicha muestra se conserva en bolsas de plástico almacenada a 4-10°C hasta su procesamiento.

Extracción de esporas

El método de tamizado y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) permite la extracción de esporas en un buen porcentaje y es un método muy utilizado. La desventaja es que no ofrece una buena separación de esporas del material orgánico.

El método de centrifugación en sacarosa (Jenkins, 1964) tiene como objetivo la mejor separación de las esporas del suelo y del material orgánico, ya que facilita el aislamiento y la identificación. Su desventaja es que el decantado, agua y material orgánico puede contener muchas esporas que se pierden, y la solución de sacarosa puede dañar a las esporas si no se elimina rápidamente.

Identificación de esporas

La identificación de las esporas se basa en: extracción de esporas, examen de las esporas al microscopio estereoscópico, preparación de laminillas, observación microscópica y el uso de guías tentativas y finales.

Preparación de laminillas.- En cada preparación se colocan de 20 a 25 esporas intactas y otro tanto de esporas rotas sutilmente, para observar su tipo de pared. El medio de montaje que se recomienda es la mezcla de alcohol polivinilo-ácido láctico (PVL) compuesta por alcohol Polivinilo, 56 ml; ácido láctico, 22 ml; glicerol, 22 ml, ya que es el que menos afecta la morfología de las esporas. El medio de montaje utilizado puede provocar cambios trascendentales en las esporas y en su identificación final, lo que afecta notablemente la observación de la morfología de la pared.

Observación microscópica.- Se caracteriza la superficie de la espора, la presencia de sáculo esporífero, la forma de la hifa sustentora, color y forma de la espора. Los diferentes tipos de pared que existen en una espора han sido esquematizados por Morton (1986).

Uso de guías tentativas y finales.- Schenck y Pérez (1990) publicaron información acerca de la identificación de especies de hongos formadores de endomicorriza V-A, conjuntando todas las especies identificadas y un resumen con características recién incluidas de cada una de ellas.

Técnicas de propagación

Para la propagación del inoculante se recomiendan plantas de crecimiento rápido (ciclo vegetativo corto), que desarrollen un sistema radical amplio con un peso fresco de más de 50 g, que el follaje tenga cobertura mínima para

que la densidad de plantas por unidad de área sea mayor, exigencia moderada en el riego y que sea altamente susceptible a la colonización micorrízica. En la Sección de Microbiología de Suelos del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, México, se utilizan plantas como cebolla (*Allium cepa*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), alfalfa (*Medicago sativa*) y maíz (*Zea mays*).

Todas las técnicas para la propagación de cepas micorrízicas se basan en la inoculación de esporas, raíces colonizadas o mezclas de ambas:

1.- Método de embudo (Gerdemann, 1955). Se hace un embudo de aluminio y se coloca algodón en la parte terminal de un embudo de vidrio. Se llena el embudo con arena de cuarzo y se colocan de 20 a 50 esporas iguales. Se siembran semillas desinfectadas superficialmente y se agrega agua destilada y esterilizada. Cuando germina la semilla en el embudo, se coloca en un matraz Erlenmeyer con agua destilada. 15 días después, el embudo se sumerge en una solución nutritiva (Long Ashton) por un periodo de 24 horas la cual contiene los siguientes ingredientes: NaNO_3 , 0.808g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.944g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.184g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.368g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0022g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00025g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00029g; H_3BO_3 , 0.00310g; NaCl , 0.00590g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.000088 g; citrato férrico al 1%, 2ml; agua destilada, 1000 ml. Después de 24 horas se vuelve a colocar el embudo en agua destilada. Al mes de crecimiento, se evalúa la colonización.

2.- Método de inoculación en invernadero. El suelo fumigado se coloca en una maceta desinfectada con formaldehído al 0.1% y posteriormente con alcohol. La maceta se llena hasta tres cuartas partes de su capacidad total. El inóculo endomicorrízico se coloca en una capa homogénea, en la parte superior de la maceta debajo de una capa pequeña de suelo fumigado. Las macetas se llenan hasta su capacidad total con suelo fumigado. Se procede a la siembra con semillas desinfectadas. Se mantiene bajo condiciones de invernadero de tres a cinco meses.

3.- Método utilizado en el CIAT-proyecto Micorriza (Sieverding, 1991). Este método se utiliza para propagar cepas aisladas. Se usan vasos con capacidad de 200 g que contienen suelo, cuyas condiciones químicas correspondan en forma aproximada con las del sitio original de donde proviene la cepa. Dicho suelo se esteriliza en autoclave. Se hace un hoyo de 2 a 3 cm de profundidad en el suelo y se colocan en él de 25 a 50 esporas. Se tapa el hueco y se siembra la semilla desinfectada de *Pueraria phaseoloides*.

Posteriormente se agrega el equivalente a 12.5 kg P, 40 kg N y 25 kg Mg ha^{-1} . La solución de fertilizante utilizada tiene además un inóculo de *Rhizobium*. Las plantas se dejan crecer seis semanas y después se transplantan a macetas de 3 kg de capacidad que contienen el mismo suelo al puesto en los primeros vasos.

Evaluación de la colonización micorrízica

La evaluación de la colonización puede ser una simple observación de la presencia de hongos endomicorrízicos que colonizan las raíces de las plantas. A menudo se requiere una cuantificación para correlacionar el efecto de los tratamientos con los niveles de colonización. En ocasiones se requiere la evaluación de la colonización micorrízica simplemente para observar un inóculo establecido en suelo esterilizado.

Metodología. Se considera aceptable tomar al azar como muestra representativa las raíces de cinco plantas en una superficie de 12m^2 . Las muestras radicales pueden procesarse inmediatamente o fijarse en FAA (90 ml de alcohol al 50%, 5 ml de ácido acético y 5 ml de formaldehído) para su examen posterior.

Tinción de raíces.- Involucra los pasos de a) clarco, b) blanqueo, c) acidificación, d) tinción, e) decoloración.

a) Las raíces libres de suelo se colocan en cápsulas esterilizables, en un vaso de precipitados al que se agrega suficiente KOH al 10% para cubrirlas. Después se calientan 10 minutos bajo 10 libras de presión en el autoclave. Se retira el KOH y las cápsulas con las raíces se enjuagan con agua destilada.

b) Se agrega H_2O_2 al 10% para cubrir las raíces durante tres minutos y se enjuaga con agua destilada.

c) Las raíces se cubren con HCl al 10% por tres minutos, se elimina el ácido y sin enjuagar se procede a la tinción.

d) Las cápsulas con raíces se cubren con una solución de azul tripano al 0.05% en lactoglicerol (ácido láctico-glicerol) y se calientan por 10 minutos a 10 libras de presión en el autoclave.

e) Se elimina el colorante y se decoloran las raíces con lactoglicerol limpio.

Después de la tinción se procede a la determinación del porcentaje de colonización micorrízica V-A en raíces lo cual se realiza por microscopía óptica por varios métodos. Uno de ellos es el método de Phillips y Hayman (1970), el cual requiere el montaje de raíces teñidas en portaobjetos. La desventaja de este método es, que no se toma en consideración la longitud del sistema radica o volumen de suelo, los cuales intervienen en el valor real de

la colonización. Marsh (1971) utiliza el método de intersección de cuadrantes. Por este método se evalúa porcentaje de raíces colonizadas. Es útil cuando se cuenta con un número grande de muestras, sin embargo, por medio de este método sólo es posible cuantificar colonización total.

AISLAMIENTO DE HONGOS ECTOMICORRIZICOS (Ferrera-Cerrato, 1993)

Fundamento: Estos hongos pueden aislarse de tejido del cuerpo fructífero (esporóforo, esclerocios, rizomorfos y esporas). Una vez aislados y estudiados desde el punto de vista morfológico a nivel macroscópico y microscópico, se propagan para que sirvan de inóculo en las pruebas de micorrización *in vitro* en los medios escogidos.

Aislamiento de los hongos ectomicorrizicos a partir de los cuerpos fructíferos. a) Una vez localizado el espécimen, se escarba el suelo para sacarlo totalmente y se envuelve cuidadosamente en papel encerado. b) Se limpia el cuerpo fructífero con lavados abundantes con agua destilada y esterilizada. c) Se parten a la mitad y se toman fragmentos de la parte carnosa para sembrar en los medios de Hagem (Palmer, 1969), PDA (papa dextrosa agar) y el medio Melin-Norkrans modificado (MNM) (Marx, 1969).

Medio Hagem: KH_2PO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; NH_4Cl , 0.5 g; FeCl_3 (solución acuosa al 1%), 10 gotas; glucosa, 5 g; extracto de malta, 1000 g; pH, 5.

Medio Melin-Norkrans modificado: Extracto de malta, 0.3 g; glucosa, 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.25 g; KH_2PO_4 0.5 g; MgSO_4 0.15 g; CaCl_2 , 0.05 g; FeCl_3 (solución acuosa al 1%), 10 gotas; NaCl , 0.025 g; clorhidrato de tiamina, 1000 mg; agua destilada 1000 ml; pH después de esterilizar, 5.5 a 5.7. Los medios inoculados se incubarán a 28°C a temperatura ambiente.

Aislamiento a partir de las estructuras micorrizicas. Las raíces se lavan y se selecciona la micorriza más sencilla. Se corta la raíz con micorriza en fragmentos de 1 a 2 cm y se colocan en un vial o tubo de centrifuga con perforaciones. Después se toman los viales con la muestra y se colocan en un recipiente conteniendo 1 litro de agua destilada más 2-3 gotas de Tween 20 y se agita uno o dos minutos con fuerza.

Se ponen los viales con las muestras a un recipiente de 1 litro que contenga una solución acuosa de HgCl_2 (100 ppm) durante 1-4 minutos.

En condiciones estériles se pasan los viales con las muestras:

- 1) A agua destilada estéril (1 minuto).
- 2) A nueva agua destilada y estéril (5 minutos).
- 3) A nueva agua destilada y estéril (10 minutos).

Se separa la micorriza y se transfiere a medio de Melin y Norkrans, Hagem o PDA. Se recomienda poner sólo una estructura por tubo de ensayo. Las colonias que se forman se siembran a cajas individuales.

Pruebas de micorrización *in vitro*

Se usan para estas pruebas las semillas de pino. Este método es el utilizado por el Servicio Forestal de los Estados Unidos.

a) Semillas de buena calidad se colocan en viales de plástico perforados y el vial con las semillas se lava durante una hora con agua de la llave.

b) El vial con las semillas se pasa a una solución de Tween 20 con agitación durante hora y media y después se lava abundantemente con agua durante el mismo tiempo.

c) Se sumerge el vial a una solución de H_2O_2 al 30% con agitación durante una hora y después se lava con dos litros de agua destilada en condiciones asépticas.

d) Se escurre el agua destilada y se pasa la semilla a una caja de Petri estéril y vacía.

e) Se colocan las semillas sobre PDA (papa dextrosa agar al 1%) o agua-agar, cuidando que la tercera parte de la semilla quede clavada en el medio y se ponen a germinar.

f) De acuerdo al método implementado por Zak (1976), en un matraz de dos litros se mezclan 840 ml de vermiculita en 60 ml de turba molida, se humedece con 550 ml en solución mineral de medio de MNM. Se esteriliza una hora a 120°C con un pH final entre 5 y 5.5.

g) Se propaga el hongo en tubo inclinado. Cuando éste ha crecido, se suspende homogéneamente y se inoculan 5-10 ml en el sustrato donde crece la planta que se transplantó.

h) Las plantas inoculadas se colocan en una cámara de crecimiento con luz incandescente y fluorescente a una temperatura de 22-25°C con un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

La micorriza puede tardar en formarse de cuatro, seis a ocho meses. Después se puede proceder a la evaluación de la micorriza, lo que incluye evaluar forma, color, formación de rizomorfos y porcentaje de colonización.

Para más información sobre producción de inóculo con hongos ectomicorrizicos y su manejo en la

inoculación a nivel de vivero forestal, consultar a Ferrera-Cerrato (1993).

CARACTERIZACION DE BPCP

Pruebas *in vitro* de actividad antimicrobiana

Fundamento: La selección de BPCP en ocasiones se fundamenta en el antagonismo bacteriano hacia patógenos vegetales. Las principales dificultades a las que se enfrenta el investigador al identificar aislamientos microbianos útiles como agentes de control biológico, es el gran número de cepas que hay que examinar para encontrar candidatos potenciales. No existen reportes que identifiquen con éxito características útiles asociadas con la inhibición de patógenos que ayuden a desechar a aquellos aislamientos prometedores dentro de cualquier colección (Hagedorn *et al.*, 1989).

1. Ensayos en agar. i) Las cepas bacterianas aisladas se inoculan en el centro de una placa con papa-dextrosa-agar y se incuban a 28°C. El crecimiento bacteriano concluye después de cuatro días si se exponen las cajas a vapores de cloroformo. Las esporas de los patógenos fúngicos se suspenden en agua destilada estéril y se rocían en aspersiones sobre las placas que contienen los crecimientos bacterianos. Las zonas de inhibición se miden después de 36 horas de crecimiento a 28°C (Juhnke *et al.*, 1987). ii) Las esporas en suspensión se obtienen cubriendo por completo o "inundando" el cultivo de la placa con Tween 40 estéril. Las suspensiones de esporas (0.5 ml) se plaquian sobre el mismo medio que se utilizó para el aislamiento y se dejan secar por dos o tres horas. Los aislamientos bacterianos se inoculan (a través de picaduras en cuadrantes) en las placas con agar conteniendo el hongo patógeno y se incuban (en el caso de *Fusarium oxysporum* la incubación es por siete días a 27°C). La producción de antibióticos se observa como una zona de inhibición de crecimiento alrededor del lugar donde se inoculó la rizobacteria (Kremer *et al.*, 1990).

Desventajas: A pesar de que muchos estudios han utilizado los ensayos en agar para determinar la inhibición a patógenos inducida por aislamientos de BPCP, esta práctica es controversial. El ensayo en agar, aunque sencillo de realizar, presenta la desventaja de no contar con la presencia de la planta, la cual puede ser determinante para la supervivencia, colonización, y actividad inhibidora de la bacteria hacia el hongo patógeno.

2. El ensayo en plantas. El ensayo "en planta" es representativo de las condiciones a las cuales se exponen las bacterias, una vez que se inician las pruebas de campo (Hagedorn *et al.*, 1989). El siguiente es sólo un ejemplo de los numerosos ensayos "en plantas" utilizados para identificar aislamientos para control biológico de enfermedades.

El patógeno fúngico se hace crecer en papa-dextrosa-agar por 72 horas; después, una de las placas se macera con 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.8. El homogeneizado se utiliza como inóculo para 4 kg de una mezcla estéril de arena y vermiculita estéril (1:1, v/v), suplementada con carbonato de calcio (10 g/kg), y empacada en tubos de ensayo de vidrio estériles (200 mm x 25 mm). Los tubos se llenan hasta los 15 cm de altura y se humedecen con 18 ml de solución nutritiva de Hoagland al 50%. Se colocan las semillas, las cuales ya han sido esterilizadas, sobre la superficie del suelo y se inoculan con aproximadamente 50 µl de 10⁷ ufc/ml de la suspensión bacteriana deseada. Después se cubren las semillas con una capa de 2 cm de mezcla de suelo infestada, y se agregan 3 ml de solución nutritiva. Como controles positivos se utilizan cepas de referencia de BPCP, así como semillas no tratadas en mezclas de arena y vermiculita inoculadas y no inoculadas con el patógeno. Si alguna de las cepas de prueba indica tan buenos resultados como la cepa de referencia, se le considera un agente de control biológico prometedor.

3. Capacidad antagonica de BPCP regulada por sideróforos. Un gran número de bacterias tales como *Vibrio cholerae*, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas fluorescens*, y muchos hongos ascomicetos y basidiomicetos son productores de sideróforos, las cuales son moléculas muy diversas con receptores para hierro que participan en el transporte de hierro a la célula bacteriana. Estos sideróforos agotan de manera eficiente el hierro del ambiente, convirtiéndose en un elemento limitante para ciertos microorganismos, incluyendo los patógenos vegetales (Glick, 1995; Kremer *et al.*, 1990). La actividad antagonica de *Pseudomonas* promotoras de crecimiento vegetal puede ser determinada de acuerdo a su habilidad para inhibir el crecimiento de *Erwinia agricola* y *F. oxysporum* en medios pobres en hierro tales como el medio SR y el medio SR-Fe³⁺ (20 g de FeCl₃/ml). Supuestamente, las rizobacterias capaces de inhibir microorganismos patógenos en medio SR pero no en medio SR-Fe³⁺, producen sideróforos quelantes de hierro extracelulares. Cuando la inhibición de la enferme-

dad es duplicada por el sideróforo purificado y la inhibición es revertida al agregar el hierro, se puede inferir la participación del sideróforo en el control de la enfermedad (Hamdan *et al.*, 1991).

Caracterización de BPCP a nivel de especie

La detección de BPCP nuevas se puede abordar de dos maneras: (i) a través del aislamiento de cepas diferentes de especies conocidas y (ii) aislando especies nuevas, proceso que requiere de tiempo y esfuerzo considerable. En algunos casos es difícil saber cual abordar, debido a que no se puede saber de antemano qué especies encontraremos. Sin embargo, es importante considerar las dos posibilidades, ya que en el caso de que el investigador solamente desee encontrar cepas mejores que las que tiene, pero de la misma especie, el tiempo y dinero invertido en el proceso se ve sustancialmente reducido.

Sondeo inicial (screening)

Este sondeo debe realizarse de acuerdo con características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales de los aislamientos, considerando que mientras más pruebas se realicen, es mejor. Muchas de estas pruebas, listas y tablas existen en las referencias bibliográficas. Debido a la falta de espacio, sólo se citarán aquellos trabajos que estén disponibles en la literatura. Aunque obsoleto para algunas especies, debe consultarse el manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Bergey's Manual for Systematic Bacteriology, 1984), por lo menos para la descripción a nivel género. Las fuentes de información para la descripción de especies son: para *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 1989; Bashan *et al.*, 1991; Döbereiner *et al.*, 1976; Magalhães y Döbereiner, 1984; Reinhold *et al.*, 1987; Tarrand *et al.*, 1978); para *Herbaspirillum* (Baldani *et al.*, 1986), y para *Acetobacter* (Cavalcante y Döbereiner, 1988). En cuanto a *Pseudomonas*, muchas especies aisladas del campo son muy heterogéneas, están vagamente definidas y no encajan de manera precisa dentro de las subdivisiones taxonómicas establecidas (Lifshitz *et al.*, 1986). Miembros del género *Pseudomonas* pueden clasificarse dentro de diferentes grupos con base en i) características fenotípicas (Stanier *et al.*, 1966); ii) características bioquímicas y de cultivo (Holding y Collee, 1971; Hugh y Gilardi, 1974); iii) homología rRNA-DNA (Palleroni *et al.*, 1973); iv) composición de ácidos grasos celulares con énfasis en

ácidos grasos hidroxilados (Ikimoto *et al.*, 1978; Oyaizu y Komagata, 1983; Watanabe *et al.*, 1987).

Homología de DNA y RNA

Para relacionar taxonómicamente alguna cepa con alguna especie conocida después de haber completado los primeros pasos de identificación, se cuenta con las pruebas de homología del RNA y DNA, las cuales constituyen herramientas muy útiles para estos propósitos. Estas pruebas no son específicas para BPCP. Por lo tanto, cualquier metodología general sobre homología del DNA y RNA puede ser utilizada para caracterizar nuevas especies tales como los métodos de Johnson (Johnson, 1981) empleados para caracterizar cepas de *Azospirillum* (Falk *et al.*, 1985; 1986). El principal inconveniente que encierran estos métodos es que para llevar a cabo la comparación de los nucleótidos, se requieren cepas de referencia provenientes de una colección.

Análisis del perfil proteico en una o dos dimensiones (fingerprinting)

Fundamento: Estos métodos tan fidedignos utilizan un gel de poliacrilamida para electroforesis con dodecil sulfato sódico en una o dos dimensiones (SDS-PAGE). En ellos se emplean las proteínas solubles o totales de las cepas de prueba para compararlas con las proteínas respectivas de las cepas de referencia. Estas técnicas permiten diferenciar con exactitud las cepas de referencia y en muchos casos son sensibles a nivel especie. De esta manera se pueden caracterizar y comparar un gran número de cepas problema en periodos relativamente cortos. El análisis de proteínas totales en dos dimensiones es adecuado para la caracterización de cepas, diferenciando aún aquellas estrechamente relacionadas; aquellas cepas que produzcan una imagen "fingerprinting" idéntica en dos dimensiones, están estrechamente relacionadas, si no es que son idénticas (De Mot y Vanderleyden, 1989; Lambert *et al.*, 1990). Estas técnicas son útiles para procedimientos de patente.

Cada uno de estos métodos consta de dos etapas: la etapa que comprende la extracción de proteínas es crucial. **Extracción de proteínas solubles** (Bally *et al.*, 1990; Kersters y De Ley, 1975). Las proteínas solubles pueden obtenerse sometiendo la suspensión bacteriana a sonicación fuerte. Las proteínas presentes en la mezcla se concentran mezclando con acetona a una proporción de 1:5 (v/v). Después de centrifugar a 15 000 x g, se descarta

el sobrenadante y la acetona remanente se evapora del aglomerado o "pellet" bajo condiciones de vacío. El aglomerado que se obtuvo se suspende en solución amortiguadora Tris-HCl 62 mM, pH 6.8 suplementada con 2.3% de SDS (dodecil sulfato sódico) (p/v) y 5% de β -mercaptoetanol (v/v). Se hierven las muestras por tres minutos antes de realizar la electroforesis. Otros métodos de extracción de proteínas solubles descritos en un principio para *Bradyrhizobium* (Kamicker y Brill, 1986) y *Bacillus* (Shivakumar *et al.*, 1986) han sido utilizados con éxito para la caracterización de *Azospirillum* (Bilal *et al.*, 1990; Sundaram *et al.*, 1988).

Extracción de proteínas totales.

Método # 1 (De Mot y Vanderleyden, 1989).

Los aglomerados de células en fase estacionaria son lavadas en solución salina de fosfato, pH 7.2, se suspenden en 0.75 ml de solución amortiguadora de extracción que está compuesta por: sacarosa 0.7 M; Tris 0.5 M, HCl 30 mM, EDTA 50 mM, KCl 0.1 M y dithiothreitol 40 mM e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se agrega un volumen equivalente de fenol (saturado con solución Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). La mezcla se mantiene en agitación continua. Después de obtener separación de fases por centrifugación, la fase que contiene el fenol se recupera y se vuelve a extraer por dos ocasiones con un volumen equivalente de la solución amortiguadora de extracción. Las proteínas se precipitan de la fase fenólica adicionando cinco volúmenes de acetato de amonio 0.1 M disuelto en metanol. Se incuba la mezcla durante varias horas a -20°C . El precipitado se lava dos veces con solución fría de acetato de amonio y finalmente con acetona fría al 80%. El aglomerado se seca al aire y se disuelve en 75 μl de la siguiente solución lítica (que provoca lisis), compuesta de urea 9.8 M, 2% (v/v) Nonidet P-40 (LKB), dithiothreitol 100 mM y 2% (v/v) de una mezcla de anfólicas (ampholytes) de pH 5-7 y de pH 3.5-10 (LKB) a una proporción de 5:1. Las muestras se almacenan a -80°C .

Método # 2 (Lambert *et al.*, 1987).

Cada una de las cepas de prueba se transfiere a cada uno de los pozos colocados en dos placas de cultivo de tejidos que contienen 48 pozos (Costar Europe). Los pozos deben contener 500 μl de caldo de soya triptica (TSB). Las bacterias se incuban en los pozos por un periodo de exactamente 48 horas a 28°C . Después se agrega glicerol (concentración final, 25% [v/v]) a los cultivos bacterianos ya desarrollados. Una placa se almacena a -70°C y la otra se utiliza para caracterización posterior de la célula.

Las placas de cultivo de tejidos conteniendo las cepas completamente desarrolladas se centrifugan durante 30 min a 300 X g (ángulo fijo) utilizando un adaptador especial. Se descartan los sobrenadantes. Se preincuba cada aglomerado durante 15 min a 37°C en una solución de lisozima conteniendo 2 mg de lisozima por ml de polietilenglicol al 12%. Las proteínas celulares totales se extraen hirviendo cada aglomerado a 95°C durante 10 min en 50 μl de una mezcla de solución amortiguadora compuesta de 2.5% dodecil sulfato sódico, 0.125 M β -mercaptoetanol, 150 mM Tris a pH 8.8, 4 mM EDTA, 0.75 M sacarosa, 0.075% azul de bromofenol) y se sonica por 10 segundos. Después de enfriarse en hielo, se le agregan 7 μl de una solución de yodoacetamida, 0.5 M.

Análisis monodimensional del perfil de proteínas solubles (Kamicker y Brill, 1986; Sundaram *et al.*, 1988).

Las muestras se someten a la técnica de electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) en una dimensión utilizando gel de resolución al 12% y gel concentrador al 5%. Se ponen 10 μl de muestra en geles conteniendo 50-100 g de proteína por pozo, una vez que se llevó a cabo la estimación de proteína por medio de la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Después de una electroforesis estándar, se tiñen con azul de Coomassie R-250, 0.2% (p/v) durante una hora. Se enjuagan durante toda la noche en ácido acético al 7% y se decoloran en una solución de metanol absoluto, ácido acético glacial y agua (9:2:9, v/v/v). Después de fotografiar los geles, se detectan las bandas por medio de un densitómetro o "scanner" en su hendidura más angosta para lograr una resolución máxima.

Se comparan las fotografías de las huellas proteicas de las cepas microbianas, marcando con un mismo número aquellas huellas que sean correspondientes o iguales y marcando con diferente número aquellas que no coincidan. La numeración de los tipos de huella se realiza secuencialmente. Se logra la identificación de la composición química de los tipos de huella por medio de pruebas bioquímicas clásicas en combinación con estuches o "kits" comerciales para identificación (Lambert *et al.*, 1987). Este tipo de caracterización puede también utilizarse para comparar proteínas de envolturas celulares así como para el análisis de lipopolisacáridos (Van Peer *et al.*, 1990).

Análisis bidimensional del perfil proteico total (De Mot y Vanderleyden, 1989).

La resolución de todas las proteínas presentes en la célula pueden conseguirse en un gel bidimensional que separa las proteínas primero por carga y después por tamaño. La separación por carga se logra mediante enfoque

isoelectrico (IEF), la cual se lleva a cabo con geles dentro de un tubo IEF (8 X 0.1 cm) conteniendo urea 9.8 M, Nonidet P-40 2% (v/v), anfólinas 6.4% (v/v) pH 5-7, anfólinas 1.3% (v/v) pH 3.5-10, N,N'-methylenebisacrilamida 0.23%, y acrilamida 4%. Posterior al pre-enfoque (15 min a 200 V, 30 min a 300 V y 60 min a 400 V) se cargan 10 µl de muestra en el extremo básico de los geles y se cubren con 10 µl de una solución conteniendo: urea 8 M, anfólinas 1% (v/v), Nonidet P-40 5% (v/v) y dithiothreitol 100 mM. La solución amortiguadora de la parte superior (cátodo) consiste en NaOH 20 mM; la solución de la parte inferior (ánodo) consiste en H₃PO₄ 10 mM. El enfoque hacia el equilibrio se lleva a cabo durante 20 h a 400 V.

La segunda dimensión (SDS-PAGE) se lleva a cabo en geles en placa (5% del gel concentrador, 15% del gel de separación, 0.1% SDS). Los geles IEF se extraen del tubo, se corta la parte correspondiente a cada banda y se coloca cada banda por separado en el gel concentrador. Se cubren con una solución amortiguadora de equilibrio (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, SDS 2%, dithiothreitol 100 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.002%). Se deben utilizar estándares de intervalos bajos. Después de equilibrar por un periodo de 10 min, se corren los geles a 15 mA. Se tiñen con azul de Coomassie R-250 y se deshidratan en un secador de geles en placa. Los resultados se analizan a partir de las fotografías de los geles.

Identificación de cepas por medio del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism) (RFLPs) (Brown *et al.*, 1990)

Fundamento: Esta técnica es particularmente útil para la identificación de cepas específicas. Por medio de este procedimiento se aísla todo el genoma y se divide con una o varias endonucleasas. Los fragmentos de DNA resultantes se separan por tamaño por electroforesis en gel de agarosa y se prueban o sondan (probe) con un fragmento de DNA clonado. Se determina la especificidad por medio de la secuencia de la sonda y de los patrones de digestión de las endonucleasas de restricción. Las secuencias de la sonda son muchas veces repetitivas, lo que incrementa la sensibilidad de la detección. Las enzimas de restricción utilizadas con mayor frecuencia

tienen sitios de reconocimiento a seis pares de bases. Estos dos factores, (i) secuencias repetitivas y (ii) sitios cortos de reconocimiento de la enzima, eliminan factores de variación debidos a pérdida de secuencias o rearrreglos. También generan un perfil de RFLP, que al compararse con el perfil estándar RFLP de alguna cepa, confirma o anula la identidad de la cepa.

Procedimiento:

1. Extracción del genoma. Los aglomerados celulares obtenidos de 20 ml de una suspensión de células bacterianas en fase estacionaria se suspenden en solución Tris 50 mM, pH 8.0, con 20% de sacarosa. Se tratan con 1 mg/ml de lisozima después de haber agregado 100 ml de EDTA 25 mM, y de haberse lisado en SDS al 0.5% (agregado al 10%). Después del proceso de digestión con RNasa A (40g/ml) y proteinasa K (20 g/ml), se separa el DNA en gradientes de CsCl₂ con la presencia de bromuro de etidio, precipitado con isopropanol, lavado con etanol al 70%, y liofilizado. Los aglomerados se suspenden en agua destilada. La concentración de DNA se determina a 260 nm.

2. Obtención de los fragmentos de digestión y sondeo. Se incuban 3 µg de DNA genómico con 15 unidades de la enzima de restricción apropiada (e.g. *EcoRI*, *PstI* or *PvuII*) en un volumen total de 28 µl durante 2 horas. Se marca un plásmido sonda (pAM141) utilizando ya sea el estuche "Oligo Labelling Kit" (no. 27-9250-01, Pharmacia) o el estuche de marcaje y detección de DNA (no-radioactivo, No. 1093-625, Boehringer Mannheim).

3. Electroforesis y "blots" (se denomina blot a lo que resulta de transferir el DNA de los geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa). Las muestras del DNA genómico digeridas se someten a electroforesis en agarosa al 1% (Maniatis *et al.*, 1982) y se blotan al vacío a GeneScreen Plus (NEN Research Products), de acuerdo con el fabricante (Pharmacia). Los marcadores de tamaño se producen al cortar el fago lambda DNA (BRL) con *HindIII* y con *BglII*. La pre-hibridación y la hibridación se realizan en una mezcla de 50% de formamida, 5% de sulfato de dextrano, 5% de agente bloqueador (Boehringer Mannheim), 5X_{SSC} (1X:0.15 M NaCl más 0.015 M citrato de sodio), N-laurilsarcosina al 0.1%, y SDS al 0.02%, a 42°C. Los blots son hibridados por lo menos durante 6 h a 42°C y se lavan a temperatura ambiente durante 2 X 5 min en 2 X _{SSC}, SDS al 0.1%, y a 68°C durante 2 X 15 min en _{SSC} al 0.1%, SDS al 0.1%.

Identificación de bacterias por medio del análisis de ácidos grasos celulares por cromatografía de gases (Sasser, 1990)

Este método es muy útil y preciso y puede identificar cepas a nivel de especie. Sin embargo, para realizar un trabajo manual apropiado, el investigador debe tener acceso a una colección de cepas ya identificadas. Además, el análisis manual de patrones obtenidos a través de cromatografía de gases es extremadamente laborioso, especialmente cuando no contamos con ningún indicio sobre la identidad de la cepa aislada en cuestión. El programa para computadoras que relaciona la cepa aún no identificada con los ceparios de bacterias clínicas y no clínicas están disponibles en el mercado. Si no se cuenta con la infraestructura apropiada, se recomienda el utilizar servicios de identificación comerciales. Por esta razón los detalles técnicos para la identificación de BPCP por medio de este método, no se incluyen en este trabajo.

ALMACENAMIENTO

Las cepas aisladas pueden ser almacenadas por periodos de tiempo cortos, en tubos de agar inclinado con TSBA al 1/10. Para bacterias diazotróficas se recomienda el medio OAB (Okon *et al.*, 1977) o este medio en combinación con varias fuentes de carbono (Rennie, 1981) a 2°C. Para periodos prolongados, las cepas pueden ser almacenadas en soluciones de glicerol al 30% a -15 y -70°C. Para almacenamiento indefinido, se recomienda liofilizarlas utilizando cualquier técnica de liofilización convencional.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. Yoav Bashan participó en este trabajo en memoria del Sr. Avner Bashan de Israel. Parte de este manuscrito fue originalmente publicado en inglés en: "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" y es presentado aquí con permiso de CRC Press, USA.

LITERATURA CITADA

- Baldani, J.I., V.L.D. Baldani, L. Seldin y J. Döbereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 86-93.
- Bally, R., A. Givaudan, J. Bernillon, T. Heulin, J. Balandreau y R. Bardin. 1990. Numerical taxonomic study of three N₂-fixing yellow-pigmented bacteria related to *Pseudomonas paucimobilis*. *Can. J. Microbiol.* 36: 850-855.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1985. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 31: 947-952.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R.E. Whitmoyer y H. Levanony. 1991. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant Soil* 132: 73-83.
- Bashan, Y., M. Singh y H. Levanony. 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.* 67: 2429-2434.
- Berge, O., T. Heulin y J. Balandreau. 1991. Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. *Biol. Fertil. Soils* 11: 210-215.
- Bergey's Manual for Systematic Bacteriology. 1984. Williams and Wilkins, USA.
- Bilal, R., G. Rasul, J.A. Qureshi y K.A. Malik. 1990. Characterization of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 46-52.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, G., Z. Khan y R. Lifshitz. 1990. Plant growth promoting rhizobacteria: strain identification by restriction fragment length polymorphisms. *Can. J. Microbiol.* 36: 242-248.
- Cavalcante, V.A. y J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- De Freitas, J.R. y J.J. Germida. 1990. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Can. J. Microbiol.* 36: 265-272.
- De Mot, R. y J. Vanderleyden. 1989. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 35: 960-967.
- Döbereiner, J. 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110: 207-212.
- Döbereiner, J. y J.M. Day. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *In: Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen Fixation*. W.E. Newton y C.J. Nynan (Eds). Washington State University Press, Pullman, USA. 518-538.
- Döbereiner, J., I.E. Marriel y M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
- Falk, E.C., J. Döbereiner, J.L. Johnson y N.R. Krieg. 1985. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 117-118.
- Falk, E.C., J.L. Johnson, V.L.D., Baldani, J. Döbereiner, y N.R. Krieg. 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 80-95.
- Ferrera-Cerrato, R. 1993. Ectomicorriza. *In: Manual de Agromicrobiología*. R. Ferrera Cerrato (Ed.). Editorial Trillas, México D.F. 53-91.
- Ferrera-Cerrato, R., M.C. González-Chávez, y M.N. Rodríguez-Mendoza. 1993. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas, Mexico D.F.

- Gerdemann, J.W. 1955. Relation of large soil-borne spore to *Phycomyces* mycorrhizal infections. *Mycologia* 47: 619-632.
- Gerdemann, J.W. y T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- González-Chávez, M.C. 1993. La endomicorriza vesículo arbuscular. *In: Manual de Agromicrobiología*. R. Ferrera Cerrato (Ed.). Editorial Trillas, México D.F. 93-120.
- Gould, W.D., C. Hagedorn, T.R. Bardinelli y R.M. Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 28-32.
- Hagedorn, C., W.D. Gould y T.R. Bardinelli. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2793-2797.
- Hamdan, H., D.M. Weller y L.S. Thomashow. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces-graminis* var *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3270-3277.
- Hardy, R.W., R.D. Holsten, E.K. Jackson y R.C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43: 1185-1207.
- Holding, A.J. y J.G. Collee. 1971. Routine biochemical tests. *In: Methods in microbiology*. Vol 6A. J.R. Norris and D.W. Ribbons (Eds). Academic Press Inc. New York. 1.
- Holguin, G., M.A. Guzman y Y. Bashan. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and *in vitro* interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 101: 207-216.
- Horemans, S., S. Demarsin, J. Neuray y K. Vlassak. 1987. Suitability of the BLCR medium for isolating *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 33: 806-808.
- Hugh, R. y G.L. Gilardi. 1974. *Pseudomonas*. *In: Manual of clinical microbiology*. 2nd ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 250.
- Ikimoto, S., H. Kuraishi, K. Komagata, M. Azuma, T. Suto y H. Murooka. 1978. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24: 199-205.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease* 48: 692-694.
- Johnson, J.L. 1981. Genetic characterization. *In: Manual of methods for general bacteriology*. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.B. Phillips (Eds). American Society for Microbiology, Washington. 450.
- Juhnke, M.E., D.E. Mathre y D.C. Sands. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2793-2799.
- Kado, C.I. y M.G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-972.
- Kamicker, B.J. y W.J. Brill. 1986. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 487-492.
- Kerstens, K. y J. De Ley. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 87: 333-340.
- King, E.D., M.K. Ward y D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Klopper, J.W., R. Lifshitz y M.N. Schroth. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *In: ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences* 60-64.
- Klopper, J.W., R. Lifshitz y R.M. Zablotowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
- Kole, M.M., W.J. Page y I. Altosaar. 1988. Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. *Can. J. Microbiol.* 34: 815-817.
- Kremer, R.J., M.F. Begonia, L. Stanley y E.T. Lanham. 1990. Characterization of rhizobacteria associated with weed seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1649-1655.
- Lalande, R., N. Bissonnette, D. Coutlee y H. Antoun. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil* 115: 7-11.
- Lambert, B., F. Leyns, F. Van Rooyen, F. Gossele, Y. Papon y J. Swings. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1866-1871.
- Lambert, B., P. Meire, H. Joos, P. Lens y J. Swings. 1990. Fast-growing, aerobic, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3375-3381.
- Lifshitz, R., J.W. Klopper, F.M. Scher, E.M. Tipping y M. Laliberte. 1986. Nitrogen-fixing pseudomonads isolated from roots of plants grown in the Canadian high arctic. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 251-255.
- Lindberg, T. y U. Granhall. 1984. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 683-689.
- Magalhães, F.M.M. y J. Döbereiner. 1984. [Occurrence of *Azospirillum amazonense* in some amazonian ecosystems]. *Rev. Microbiol. São Paulo* 15: 246-248 (en Portugués).
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marsh, B.A. 1971. Measurement of length in random arrangement of lines. *J. Appl. Ecol.* 8: 265.
- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-165.
- Morton, J.B. 1986. Effects of mountants and fixatives on wall structure and Melzer's reaction in spores of two *Acaulospora* species (Endogonaceae). *Micologia* 78: 787-794.
- New, P.B. y I.R. Kennedy. 1989. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in eastern Australia. *Microb. Ecol.* 17: 299-309.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4011.
- Omar, A.M.N., C. Richard, P. Weinhard y J. Balandreau. 1988. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. *Biol. Fertil. Soils* 7: 158-159.
- Okon, Y., S.L. Albrecht y R.H. Burris. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 85-88.

- Oyaizu, H. y K. Komagata. 1983. Grouping of *Pseudomonas* species in the basis of cellular fatty acid composition and their quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29: 17-26.
- Page, W.J. 1986. Sodium-dependent growth of *Azotobacter chroococcum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 510-514.
- Palleroni, N., J.R. Kunisawa y R. Contopoulou. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333-346.
- Palmer, J.G. 1969. Technique and procedures for culturing ectomycorrhizal fungi in mycorrhizae. In: E. HacsKaylo (Ed.). *Musc. Pub.* 1189. US Department of Agriculture. Forest Service, Beltsville, Maryland.
- Phillips, J.M. y D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Postgate, J.R. 1969. Viable counts and viability. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 1. Norris, F.N. y Ribbons, D.W. (Eds). Academic Press, New York. 610-628.
- Quesada, E., A. Ventosa, F. Rodriguez-Valera y A. Ramos-Cormenzana. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 155-161.
- Reinhold, B., T. Hurek, E.G. Niemann y I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520-526.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans y J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14.
- Rodriguez Caceres, E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: *Methods in Phytobacteriology*. Klement, Z., K. Rudolph y D.C. Sands (Eds). Akademiai Kiado, Budapest, 199.
- Schenck, N.C. y I. Perez. 1990. Manual for the identification of VA Mycorrhizal fungi. Gainesville, Florida. Tercera edición.
- Shivakumar, A.G., G.J. Gundling, T.A. Benson, D. Casuto, M.F. Miller y B.B. Spear. 1986. Vegetative expression of the delta-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis*, sub-species Kurstaki in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 166: 194-204.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation Federal Republic of Germany. Eschborn, Alemania. pp. 192-196.
- Stanier, R.Y., N.J. Palleroni y M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiology* 43: 159-173.
- Stolp, H. y D. Gadkari. 1986. Nonpathogenic members of the Genus *Pseudomonas*. In: *The Prokaryotes*. Vol. I, 2nd ed. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (Eds). Springer Verlag, New York. 722
- Sundaram, S., A. Arunakumari y R.V. Klucas. 1988. Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.* 34: 212-217.
- Tarrand, J.J., N.R. Krieg y J. Döbereiner. 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 brasiliense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- Thomas-Bauzon, D., P. Weinhard, P. Villecourt y J. Balandreau. 1982. The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 28: 922-928.
- Tipping, E.M., E.E. Onofriechuk, R.M. Zablutowicz, J.W. Kloepper y R. Lifshitz. 1989. Screening of bacteria isolated from peat for biocontrol of *Pythium ultimum*. In: *Proceedings Symposium Peat and Peatlands*, Vol. II. Overend R.P. y J.K. Juglum (Eds). Canadian Society of Peat and Peatlands, St. Foy Quebec.
- Tyler, M.E., J.R. Milam, R.L. Smith, S.C. Schank y D.A. Zuberer. 1979. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. *Can. J. Microbiol.* 25: 693-697.
- Van Peer, R., H.L. Punte, L.A. De Weger y B. Schippers. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere *Pseudomonads* in relation to their colonization of roots, *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2462-2470.
- Watanabe I., So. Rolando, J.K. Ladha, Y. Katayama-Fujimura y H. Kuraishi. 1987. A new nitrogen-fixing pseudomonad: *Pseudomonas diazotrophicus* sp. nov. isolated from the root of wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 33: 670-678.
- Zak, B. 1976. Pure culture synthesis of pacific madrone ectomycorrhizae. *Mycologia* 68: 362-369.