



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CIENCIAS MARINAS

Análisis de los factores que promueven la fijación de nitrógeno de *Azospirillum basilense Cd* al crecer en cultivo mixto con *Staphylococcus* sp., bacteria aislada de la rizosfera del mangle

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA LA BIOLOGA MARINA

GINA HOLGUIN ZEHFUSS

La Paz, Baja California Sur, México, Enero de 1996

IN-DICE

AGRADECIMIENTOS..	i
DEDICATORIA.....	ii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vii
GLOSARIO.....	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES..	8
JUSTIFICACION.....	11
OBJETIVO.....	12
METODOLOGIA.....	14
Aislamiento e identificación de cepas no fijadoras de nitrógeno asociadas a raíces de mangle	14
Condiciones de crecimiento de <i>A. brasilense</i> Cd y <i>Staphylococcus sp</i>	16
Cuentas viables de <i>A. brasilense</i> Cd y <i>Staphylococcus sp</i>	17
Determinación de la concentración de oxígeno en los cultivos.....	18
Ensayo de reducción de acetileno.....	19
Ensayo de reducción de acetileno de <i>A. brasilense</i> Cd en cultivos puros y mixtos con <i>Staphylococcus sp</i> . contenida dentro de un tubo de diálisis.....	20
Ensayo de reducción de acetileno de <i>A. brasilense</i> Cd después de	

agregar un dializado libre de células de <i>Staphylococcus sp.</i>	20
Evaluación de la actividad del dializado producido al crecer a <i>Staphylococcus sp.</i> <i>en medio HGB sin</i> fuente de nitrógeno	21
Análisis de aminoácidos y ácidos orgánicos del dializado libre de células de <i>Staphylococcus sp.</i>	21
Efecto de la adición de ácido aspártico y ácido succíuico sobre la reducción de acetileno de <i>A. brasilense</i> Cd.....	23
Efecto del cultivo mixto de <i>A. brasilense</i> Cd con <i>Staphylococcus epiderntidis</i> ó <i>Micrococcus lylae</i> sobre la reducción de acetileno de <i>A. brasilense</i> Cd...	23
Diseño experimental y análisis estadístico.....	24
RESULTADOS,	25
Fijación de nitrógeno de <i>A. brasilense</i> Cd en cultivos puros y mixtos con <i>Staphylococcus sp.</i> a diferentes tiempos de incubación	25
Crecimiento de <i>A. brasilense</i> Cd y <i>Staphylococcus sp.</i> <i>en</i> cultivos puros y mixtos a diferentes tiempos de incubación	26
Concentración de oxígeno disuelto en cultivos puros y mixtos de <i>A. brasilense</i> Cd...27	
Fijación de nitrógeno de <i>A. brasilense</i> Cd en cultivos puros y mixtos con células de <i>Staphylococcus sp.</i> contenidas dentro de un tubo de diálisis..	28
Fijación de nitrógeno del cultivo de <i>A. brasilense</i> Cd al mezclarse con un dializado libre de células de <i>Staphylococcus sp.</i>	30
Fijación de nitrógeno del cultivo de <i>A. brasilense</i> Cd mezclado con un dializado libre de células de <i>Staphylococcus sp.</i> cultivado en medio HGB sin extracto	

de levadura	30
Análisis de aminoácidos, ácidos orgánicos, nitrógeno total y pH del dializado libre de células de <i>Staphylococcus sp.</i>	31
Efecto del ácido aspártico, del ácido succínico y de las bacterias de la rizósfera del mangle <i>Staphylococcus epidermidis</i> ó <i>Micrococcus lylae</i> sobre la fijación de nitrógeno de <i>A. brasilense</i> Cd.....	34
ANALISIS.	35
CONCLUSION	43
RECOMENDACIONES	44
LITERATURA CITADA.....	46
ANEXOS	60
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS..	60
Publicaciones en revistas internacionales con arbitraje	60
Capítulos en libros.....	60
Resúmenes publicados en memorias de congresos internacionales..	62
Distinciones recibidas.....	62

IN-DICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de etileno por cultivo y por célula de *A. brasilense* Cd en cultivo **puro y en** cultivo mixto con *Staphylococcus sp.*

Figura 2. Nivel poblacional de *A. brasilense* y de *Staphylococcus sp.* en cultivo puro, en cultivo mixto, y en medio sin extracto de levadura.

Figura 3. Concentraciones de oxígeno disuelto en cultivos puros de *A. brasilense* y *mixtos con Staphylococcus sp.*

Figura 4. Porcentaje de incremento en relación al cultivo puro, en la producción de etileno de *A. brasilense* Cd sometida a diferentes tratamientos.

Figura 5. **Imagen** rastreada (scanned) por computadora de una placa de TLC bidimensional realizada con estándares de aminoácidos y con el dializado de *Staphylococcus sp.* (A). Imagen rastreada de un cromatograma de ácidos orgánicos separados e identificados por **cromatografía** de gases (B), y muestra del dializado (C). Imagen rastreada por computadora de un cromatograma de aminoácidos separados, identificados y cuantificados por TLC automatizada, muestra del dializado (D) y del control (E).

Figura 6. Porcentaje de incremento en relación al cultivo puro en la producción de etileno de *A. brasilense* sometida a diferentes tratamientos.

GLOSARIO

Bacterias asociativas: bacterias que viven en asociación con las raíces de las plantas sin establecer una interacción obligada con éstas ya que pueden sobrevivir en suelos sin la presencia de plantas. Se adhieren a las raíces a través de un material fibrilar de naturaleza probablemente proteica y se benefician de la planta alimentándose del material exudado por las raíces utilizándolo como fuentes de carbono y energía.

Bacterias simbióticas tipo *Rhizobium*: Bacterias que se desarrollan en el sistema radicular de plantas leguminosas dentro de estructuras especializadas llamadas nódulos, estableciendo con las plantas una asociación obligada, benéfica tanto para las bacterias como para las plantas.

Cocultivo: cultivo mixto de dos o más microorganismos llevado a cabo *in vitro*.

Ensayo de Reducción de Acetileno (ERA): Técnica indirecta para medir la fijación de nitrógeno. La reacción consiste en la reducción de acetileno a etileno, catalizada por la enzima nitrogenasa. El etileno se cuantifica por cromatografía de gases, lo que permite, mediante un factor de conversión, calcular la cantidad de nitrógeno fijado.

Diálisis: Proceso de separar en solución moléculas más pequeñas de moléculas más grandes mediante el uso de una membrana semipermeable que permite el paso de las moléculas pequeñas, pero no de las grandes.

Diazotrófico: Dícese de los organismos que fijan nitrógeno atmosférico.

Fijación de nitrógeno: Llamada también actividad diazotrófica, consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amoníaco, reacción catalizada por la enzima nitrogenasa.

Filosfera: Superficie de cualquier estructura de la planta que se encuentre expuesta al aire (tallo, hojas, flores, espigas etc.)

Hongos micorrízicos vesico-arbusculares: Asociación mutualista entre raíces de plantas superiores y hongos del suelo, la cual genera una estructura en las raíces formada por las hifas que penetran dentro de las células corticales formando una especie de red. Una gran parte de los hongos que viven libres en los suelos son capaces de formar micorrizas.

Inoculante bacteriano: Producto sólido o líquido compuesto de bacterias y algún soporte como turba o alginato, agregado a las plantas con el fin de promover su crecimiento o inhibir algún patógeno.

Mangle: Nombre común que reciben plantas superiores arboriformes o arbustivas (pertenecientes a diferentes familias taxonómicas) las cuales crecen en zonas intermareales y estuarios.

Osmoregulador: Sustancia que mantiene un nivel óptimo y constante de actividad osmótica del fluido dentro y fuera de las células.

Rizosfera: Area que incluye tanto la superficie de la raíz como el suelo adyacente que está bajo la influencia de las raíces de las plantas.

Tensión salina: Condición adversa para las células, provocada cuando la presión osmótica dentro de la célula es menor a la presión osmótica fuera de ésta. Esta condición puede ser inducida por un exceso de sales en el medio.

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I. P. N.
DONATIVO

RESUMEN

La capacidad para fijar **nitrógeno** de *Azospirillum brasilense* Cd se vió significativamente incrementada al crecerse **en** cultivo mixto con *Staphylococcus* sp BALRA90 10, bacteria **no** fijadora de nitrógeno, aislada a partir de raíces de **mangle**. La promoción **en** la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd no se debió a un incremento en el nivel poblacional de la bacteria, **ni** a un **decremento** en la concentración de oxígeno **en** el cultivo mixto sino a la presencia de sustancia(s) inductora(s) liberadas por *Staphylococcus* sp. Bajo las mismas condiciones mixtas de cultivo, el nivel poblacional de *Staphylococcus* sp. disminuyó marcadamente y ésto no se debió a una asimilación más efectiva de *A. brasilense* Cd del nitrógeno disponible en el medio de cultivo.

La incorporación de un dializado de *Staphylococcus* sp. libre de células al cultivo de *A. brasilense* incrementó significativamente la capacidad para fijar nitrógeno de ésta última. Al producir este dializado cultivando *Staphylococcus* sp. **en un** medio sin **fuentes** de nitrógeno y sin extracto de levadura, la actividad promocional del dializado dependió de su concentración al incorporarlo al medio de *A. brasilense* Cd: **diluido** con una solución de fosfatos por volumen a un 50% y 25% de su concentración original, el dializado promovió **significativamente** la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd, mientras que incorporado sin diluir, el dializado no incrementó la fijación de nitrógeno de *A. brasilense*. En el análisis por cromatografía en capa fina del dializado, se identificó **ácido** aspártico, mientras que por cromatografía de gases se **identificó** el ácido succínico como el principal ácido orgánico presente. Al incorporar por separado el ácido succínico y el aspártico al cultivo de *A. brasilense* Cd, se encontró que solamente el ácido aspártico promovió significativamente la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd.

Para determinar si la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd se incrementaba también al creerse en cultivo mixto con otras bacterias no diazotróficas asociadas a la rizosfera del mangle. se evaluó el efecto de *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus lylae* {aisladas a partir de las raíces de *Avicennia germinans* (L.) Stern} sobre la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. La capacidad para fijar nitrógeno de *A. brasilense* Cd se incrementó significativamente al creerse en cultivo mixto con *Staphylococcus epidermidis*, pero no con *Micrococcus lylae*.

Se discute la importancia de este estudio en el desarrollo del concepto de inoculantes mixtos.

ABSTRACT

The nitrogen fixing capacity of *Azospirillum brasilense* Cd was significantly increased when it was grown in a mixed culture with *Staphylococcus* sp., BALRA90 10, a non-nitrogen fixing bacterium isolated from mangrove roots. The promotion in the nitrogen fixation of *A. brasilense* Cd was due neither to an increase in the population of the bacteria nor to a decrease in oxygen concentration in the mixed culture. Under the same mixed culture conditions, the *Staphylococcus* sp population declined sharply but not because *A. brasilense* Cd was more effective in competing for the available nitrogen.

The addition of a cell-free dialyzate of *Staphylococcus* sp. culture medium to the *A. brasilense* culture significantly promoted the nitrogen fixing capacity of the latter. When this dialyzate was produced by culturing *Staphylococcus* in N-free medium without yeast extract, the promotional activity of the dialyzate depended on its concentration. When diluted by volume to 50% and 25% of its original concentration, the nitrogen fixation of *A. brasilense* Cd increased significantly; When undiluted, the dialyzate failed to enhance nitrogen fixation.

Chemical analyses of the dialyzate by thin layer chromatography identified aspartic acid; gas chromatography revealed succinic acid to be the major organic acid component. When artificially added to the *A. brasilense* Cd culture, only aspartic acid significantly promoted the nitrogen fixation of *A. brasilense* Cd.

The nitrogen fixing ability of *A. brasilense* Cd increased significantly when grown in mixed culture with the non-fixing bacteria *Staphylococcus epidermidis*, but not with *Micrococcus lylae*, both isolated from mangrove roots.

The importance of this finding in the context of mixed inoculants is discussed

INTRODUCCION

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP), en general, pueden contribuir al crecimiento y aumento del rendimiento de muchos cultivos agrícolas importantes desde pastos para forraje hasta leguminosas y cereales (Bashan y Levanony, 1990). Estas bacterias pueden encontrarse asociadas a la filosfera ó a las raíces, y pueden ser de dos tipos: i) simbióticas tipo *Rhizobium* y ii) asociativas, como *Azospirillum*, la cual fue propuesta como género por Tarrand et al., (1978) distinguiendo dos especies: *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*, basándose en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y en experimentos sobre homología del ADN (Falk et al., 1986). *Azospirillum* fue aislada por primera vez por Beijerinck (1925) en Dinamarca, a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, y fue originalmente llamada *Spirillum lipoferum*. En 1976 fue aislada por Döbereiner y Day y fueron los primeros en reportar su amplia distribución en la rizosfera de varios pastos tropicales. Desde entonces, *Azospirillum* ha sido aislada a partir de raíces de numerosos pastos silvestres y cultivados, cereales, leguminosas, y a partir de suelos templados, tropicales y subtropicales de todo el mundo (Ladha et al., 1987). Investigadores de la Universidad Autónoma de Puebla lograron aislar *Azospirillum* de la rizosfera y raíces de tres especies de cactáceas (*Opuntia ficus-indica*, *Stenocereus pruinosus*, y *Stenocereus stellatus*) colectadas en el Estado de Puebla (Mascarua-Esparza et al., 1988).

Se ha reportado que *Azospirillum* coloniza, promueve el crecimiento e incrementa el rendimiento de numerosas especies de plantas (Bashan, 1993; Bashan y Holguin, 1995; Bashan y Levanony, 1990; Okon y Labandera-Gonzalez, 1994). También se ha reportado un gran número de respuestas de las plantas a la inoculación artificial con *Azospirillum* como por ejemplo: i)

incremento en el peso seco total, ii) incremento en la cantidad de nitrógeno presente en los granos y brotes, iii) incremento en el número de tallos, mazorcas, espigas y granos por espiga, iv) incremento en el peso del grano, v) en la altura de las plantas. vi) en el tamaño de las hojas, vii) en la tasa de germinación, y viii) floración y aparición temprana de la espiga (Bashan et al., 1992a).

Azospirillum ha sido utilizada como inoculante en plantas para promover su crecimiento e incrementar su productividad (Bashan y Holguin, 1995). En la Universidad de Puebla se han inoculado grandes extensiones de maíz y trigo con diferentes cepas de *Azospirillum* obteniéndose incrementos significativos en el rendimiento de la cosecha de ambos granos. Los estudios demostraron que la inoculación de trigo con una cepa local de *A. brasilense* aislada de la rizosfera de *Brachiaria mutica*, dió mejores resultados que la inoculación con cepas de colecciones aisladas de otras partes del mundo (Okon y Labandera-González, 1994).

Azospirillum actúa **incrementando** el desarrollo de las plantas con valores de crecimiento superiores a los obtenidos por medio de prácticas agrícolas comunes y el costo de la inoculación es relativamente bajo, comparado con el costo de los fertilizantes químicos (Bashan et al., 1992). La inoculación con *Azospirillum* en campos de maíz en los estados de Puebla y Veracruz, ha permitido un ahorro del 50% en gastos de fertilizantes nitrogenados (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994).

Se ha reportado que algunos de **los efectos** benéficos que *Azospirillum* tiene sobre las plantas, aumentan cuando *Azospirillum* es inoculado en combinación con otros microorganismos. En la literatura existen ejemplos que demuestran las ventajas de los **inoculantes** mixtos sobre **inoculantes** compuestos de un solo microorganismo: Singh y Subba Rao (1979) obtuvieron una

mayor producción de soya al utilizar inoculantes mixtos de *Azospirillum* y *Rhizobium* que al utilizar inoculaciones únicas con *Rhizobium*. *Azospirillum*, aplicado en inoculante mixto con *Rhizobium*, promovió la proliferación de pelos radiculares en leguminosas para forraje, incrementando la susceptibilidad de estas plantas para ser infectadas por *Rhizobium* (Yahalom et al., 1987). Una inoculación mixta de *A. brasilense* y hongos micorrízicos vesículoarbusculares (VAM) incrementó la biomasa radicular y la absorción de fósforo en mijo (Subba Rao et al., 1985 a), así como el rendimiento de cebada (Subba Rao et al., 1985 b) y el número de sitios de colonización de hongos VAM en plantas halófitas creciendo sobre dunas (Will y Sylvia, 1990). Uno de los primeros inoculantes mixtos comerciales está actualmente en proceso de desarrollo e involucra a *R. meliloti* y al hongo solubilizador de fosfato *Penicillium bilau* (Rice et al., 1994). Sin embargo, este inoculante enfrenta dificultades técnicas, de regulación y económicas (Polonenko, 1994).

Las inoculaciones mixtas de microorganismos que actúan como agentes de control biológico de enfermedades vegetales también han demostrado ser más eficientes que inoculaciones con un solo tipo de microorganismos. Una inoculación mixta de *Pseudomonas* sp. y *Serratia plymuthica* en plantas de tomate (Frommel et al., 1991) ó una inoculación mixta con una cepa de *Pseudomonas* fluorescente y una cepa no-patógena de *Fusarium oxysporum*, (Lemanceau y Alabouvette, 1991) disminuyó la incidencia de marchitamiento provocado por una cepa patógena de *Fusarium*, al compararse con inoculaciones utilizando uno de los microorganismos. Una mezcla de células de *Enterobacter cloacae* con enzimas del hongo *Trichoderma harzianum* inhibió la germinación de esporas de varios hongos patógenos (Lorito et al., 1993).

Todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico de manera eficiente ya sea como bacterias libres o en asociación con plantas. En un principio se propuso a la fijación de nitrógeno como el principal mecanismo responsable de la promoción de crecimiento en plantas inoculadas con *Azospirillum*. En algunos trabajos, utilizando la técnica con el isótopo $^{15}\text{N}_2$, se encontró que del 5 al 18% del nitrógeno total de plantas de trigo y **maíz** provino de la fijación de nitrógeno por *Azospirillum*, *sin* embargo, en otros casos se demostró que a pesar de haber respuesta positiva de las plantas a la inoculación, la actividad de la **nitrogenasa** era insignificante, contribuyendo en menos del 5% al nitrógeno total asimilado por la planta. Los resultados obtenidos relacionados con la fijación de nitrógeno han sido erráticos y variables (Bashan y Levanony, 1990). En algunos estudios, utilizando mutantes de *Azospirillum* incapaces de fijar nitrógeno, se comprobó que tanto los mutantes como las cepas nativas promovían el crecimiento de las plantas (Barbieri et al., 1986; Bashan et al., 1989).

Recientemente se ha propuesto la hipótesis aditiva para explicar el mecanismo de acción de *Azospirillum* para promover el crecimiento de plantas. Esta hipótesis establece que probablemente más de un mecanismo está involucrado en la asociación y operan simultáneamente o en sucesión (Bashan y Levanony, 1990). Estos mecanismos son: (i) Asimilación más efectiva de minerales por parte de la planta (Bashan et al., 1990), (ii) restricción del crecimiento de patógenos lo que provoca que las plantas crezcan más vigorosamente, (iii) cambio en el equilibrio hormonal de las plantas inoculadas lo cual puede resultar en un mejor crecimiento y desarrollo del sistema radicular. (iv) fijación de nitrógeno, la cual teóricamente provee a la planta una cantidad abundante de nitrógeno esencial para su crecimiento (Cohen et al., 1980; Michiels et al., 1989), y

(v) cambios en las enzimas de vías metabólicas responsables de la acumulación de materia seca en los tejidos vegetales.

Sin considerar la importancia que la fijación de nitrógeno pudiera tener sobre las plantas, se ha ignorado la participación de la actividad diazotrófica en la habilidad de las bacterias para sobrevivir en la rizosfera. Esta sobrevivencia va a estar determinada principalmente por i) la capacidad de la bacteria para competir con otros microorganismos de la rizosfera ii) la versatilidad nutricional de la bacteria, iii) su tiempo de generación y iv) su capacidad de desplazamiento. El éxito de un inoculante bacteriano en promover el crecimiento vegetal, dependerá en gran manera de la sobrevivencia de las bacterias en el ambiente hostil del suelo (Bashan et al., 1995) y en su desplazamiento hacia la planta tanto en suelo como en la rizosfera (Bashan y Holguin, 1994; Bashan y Levanony, 1987). La capacidad de las cepas inoculadas para fijar nitrógeno les ofrecerá mayores oportunidades de sobrevivencia sobre otros grupos no fijadores.

En general, la actividad diazotrófica puede ser promovida o inhibida al interactuar grupos bacterianos entre sí. Es **común** que como resultado de estas interacciones se afecte la nitrogenasa (Drozdowicz y Ferreira Santos, 1987; Lindberg y Granhall, 1984; Holguin et al., 1992; Isopi et al., 1995; Tyler et al., 1979). La fijación de nitrógeno de *Azospirillum* en particular, puede ser promovida al asociarse ésta con otros microorganismos (Drozdowicz y Ferreira Santos, 1987; Halsall y Gibson, 1989; Khammas y Keiser, 1992). Resultados preliminares demostraron que al crecerse en cultivo mixto *A. brasilense* Cd con *Staphylococcus* sp., bacteria aislada a partir de raíces de mangle, incrementó significativamente la fijación de nitrógeno de la primera. Esta asociación entre *A. brasilerae* Cd y *Staphylococcus* sp. se llevó a cabo en un medio diseñado originalmente para el aislamiento de bacterias diazotróficas marinas (2% NaCl, 0.34M) (Bashan et

al., 1993). El hecho de **que A. brasilense** Cd se haya desarrollado en este medio con alto contenido de sales no es inesperado; **Hartmann** (1988) encontró que *Azospirillum brasilense* Sp7 puede crecer en soluciones de **NaCl** hasta de 0.8 M **NaCl**.

La salinización de suelos representa actualmente un serio peligro para el desarrollo de la agricultura ya que disminuye la productividad del suelo conduciendo, en ocasiones, a su degradación total. Estas sales, de las cuales la principal es el cloruro de sodio, incluye también sales de sulfato, bicarbonato de sodio y cloruro de magnesio. El 10% de la superficie total de todos los continentes son suelos afectados por salinización. Se calcula que en México y América Central existe un total de 2.0 millones de hectáreas afectadas por este problema (Szabolcs, 1994).

Incrementos en la salinidad del suelo se asocia comúnmente con **desertificación** (Szabolcs, 1994) ya que el exceso de sales inhibe no solamente el crecimiento de cultivos agrícolas sino de plantas como arbustos, pastos y vegetación nativa que impiden la erosión de suelos provocada por los vientos (Bashan et al., 1992 b; Szabolcs, 1994).

El problema de salinización de suelos, además de asociarse con la **desertificación**, tiene un efecto indirecto sobre la salud pública: La **poblacion** humana en zonas **desertificadas** generalmente presenta altos **índices** de enfermedades respiratorias ya que son **areas** con concentraciones altas de polvo en el aire. En el Estado de Baja California Sur, **Mexico**, mas del 30% de la población sufre de enfermedades respiratorias crónicas (siendo los niños las principales víctimas), presentando este estado, en relación a la población, el mayor porcentaje de este tipo de enfermedades (Bashan et al., 1992).

Una de las causas de la salinización de suelos es la contaminación química por fertilizantes. (Szabolcs, 1994). Aunado a esto, los fertilizantes nitrogenados contaminan los mantos acuíferos

con compuestos **carcinogénicos** como los nitratos (Shaffer y Wylie, 1994) así como la atmósfera por liberación del nitrógeno en forma de gases (Peoples et al., 1994).

El problema de salinización de suelos puede evitarse parcialmente utilizando *Azospirillum* como sustituto parcial o total de fertilizantes nitrogenados. Matsumoto et al., (1994) sugieren que los suelos afectados por salinización sean cultivados con plantas halotolerantes o reforestados con vegetación halófito natural. Hay plantas que toleran hasta 30% de sales, con un contenido de sales en sus hojas de un 57% (Ansari y Flowers, 1994). La **inoculación** de plantas halófitas con un inoculante mixto compuesto por la bacteria halotolerante *A. brasilense* Cd y *Staphylococcus sp.*, podría utilizarse para promover el crecimiento de plantas halotolerantes así como de vegetación halófito nativa.

ANTECEDENTES

Existen varios reportes sobre el aislamiento de bacterias del género *Staphylococcus* en el medio marino. Se han encontrado bacterias de ese género asociadas a hojas y raíces del pasto marino *Hafophila ovalis* (Wahbeb y Mahasneh, 1984) y a camarones (Beckers et al., 1985). Holguin et al. (1992) aislaron una cepa de *Staphylococcus* (*Staphylococcus* sp. BALRA9010) a partir de raíces de mangle y demostraron que incrementó la fijación de nitrógeno de *Listonella anguillarum*, aislada a partir de la misma fuente, al creerse en cultivo mixto (Holguin et al., 1992). Se demostró que la misma cepa (*Staphylococcus* sp. BALRA90 10) incrementó la fijación de nitrógeno de la bacteria terrestre *Azospirillum brasilense* Cd al creerse en cultivo mixto con ésta (Holguin y Bashan, 1993). Esta promoción se obtuvo al desarrollarse ambas cepas en un medio diseñado originalmente para el aislamiento de bacterias diazotróficas marinas (2% NaCl, 0.34M) (Bashan et al., 1993). Según la Literatura consultada, éste es el único trabajo donde se estudia la asociación entre *Azospirillum* y bacterias obtenidas del ambiente de manglar o de algún otro ambiente marino.

Azospirillum es capaz de llevar a cabo interacciones positivas con otras bacterias terrestres al desarrollarse en cultivo mixto. La degradación de celulosa por *Cellulomonas* sp. CS1-17 sp. proveyó a *Azospirillum* DN64 de una fuente de carbono utilizable por medio de la cual obtuvo energía para la fijación de nitrógeno. La contribución de *Azospirillum* a *Cellulomonas* fue nitrógeno fijado (Halsall y Gibson, 1989). El mismo patrón se observó en poblaciones mixtas de diferentes especies de *Azospirillum* con la bacteria fijadora de nitrógeno *Bacillus polymyxa*. Con esta asociación resultó un incremento significativo en la fijación de nitrógeno de los cultivos

mixtos, al compararse con los cultivos puros de *Azospirillum* ó *Bacillus*. *Azospirillum* se benefició de los productos de degradación de la pectina metabolizada por *Bacillus* (Khammas y Keiser, 1992). Se promovió la fijación de nitrógeno de *Azospirillum* al desarrollarse en un medio filtrado donde había crecido la bacteria diazotrófica *Arthrobacter giacomelloi*. También se incrementó la fijación de nitrógeno de ésta última al creerse en un medio filtrado donde se desarrolló *Azospirillum*. Se considera que esta interacción pudo ser regulada por un intercambio de metabolitos (Lippi et al., 1992).

El concepto de inoculantes mixtos como práctica agrícola superior a la constituida por inoculantes compuestos por un sólo organismo, **fué** concebido hace décadas. Sin embargo, hasta la fecha, no existe en el mercado un inoculante comercial de este tipo. La industria biotecnológica está tratando de superar las dificultades prácticas que este nuevo producto ha generado (Polonenko, 1994), mientras que los intentos para asociar hongos y bacterias se encuentra en sus primeras etapas (Rice et al., 1994) o desarrollándose bajo el concepto de “bacteria cooperadora” en la inoculación de ectomicorizas en silvicultura (Garbaye 1994; Li et al., 1992; Lindermann y Paulitz, 1990). Según la literatura consultada, ningún inoculante compuesto de dos especies bacterianas diferentes (**fuera de mezclas** de cepas pertenecientes a la misma especie como en el caso de *Rhizobium*) ha logrado pasar la etapa experimental. La inoculación de plantas con bacterias promotoras de crecimiento en plantas, aunque pudiera ocurrir de manera natural, es un procedimiento agrícola artificial. De esta manera, especies de *Azospirillum* originarias del Brazil, Pakistán e Irak están siendo inoculadas a plantas nunca antes expuestas a estas especies bacterianas (Bashan et al., 1993).

La salinización de suelos es un problema reconocido a nivel mundial (Szabolcs, 1994) y representan en México un 40% de la superficie total del país (Zapata y Rodríguez, 1994). Como ejemplo de desertificación en nuestro país provocada por salinización tenemos el municipio de Cuauhtémoc, Edo. de Colima, México, del cual el 40% de la superficie está afectada (Sandoval y Estrada, 1991). Sin embargo, la mayoría de los suelos afectados se encuentran en los estados áridos y semiáridos del Norte de La República (Rios et al., 1994).

La salinización de suelos utilizados para cultivos agrícolas inhibe el **crecimiento** de las plantas, provocando el abandono de las tierras por parte de los agricultores. 10 millones de hectáreas de suelos afectados por salinización son abandonados al año a nivel mundial. En el valle de Santo Domingo, Baja California Sur, es común el abandono de campos agrícolas debido al deterioro total del suelo (comunicación personal con agricultores de la zona).

Existen algunos trabajos que reportan la utilización de plantas para regenerar suelos afectados por salinización (Matsumoto et al. 1994). En la región del mar **Aral**, Rusia, se llevaron a cabo plantaciones con arbustos **halófitos** con el **fin** de regenerar suelos **salinizados**. Las raíces de estas plantas penetraron de 30-40 cm dentro del suelo contribuyendo a desalinizar los suelos (Shevyakova, 1994).

Según la literatura consultada, no existen reportes realizados en México sobre utilización de plantas para regenerar suelos afectados por salinización.

La inoculación de vegetación halófito de la región con *Azospirillum* con el objeto de promover el crecimiento de estas plantas, podría contribuir a solucionar el problema de desertificación de nuestro Estado. Experimentos preliminares demostraron que la inoculación de semillas del Cardon gigante *Pachycereus pringlei* con *A. brasilense Sp-245* incrementó

significativamente la germinación de las plántulas así como su altura, diámetro, volumen y la relación volumen/superficie (Puente y Bashan, 1993).

JUSTIFICACION

Combinaciones inusuales de *Azospirillum con* otras bacterias **obtenidas** de diferentes ambientes (aún aquellas bacterias que no coexisten en el mismo habitat) deben ser evaluadas ya que estas combinaciones pueden tener un potencial de aplicación en el desarrollo de inoculantes mixtos.

Los suelos afectados por salinización requieren de la utilización de inoculantes compuestos de bacterias halotolerantes, como es el caso de *A. brasilense* spp. El hecho de que la actividad diazotrófica de *A. brasilense* Cd se incrementó significativamente al crecerse en cultivo mixto con *Staphylococcus* sp. aislada a partir de raíces de **mangle**, sugiere la posibilidad de utilizar un inoculante mixto para plantas halófitas compuesto de *A. brasilense* Cd y *Staphylococcus* sp.

La utilización de este tipo de inoculante podría beneficiar a la población de B.C.S. de diferentes maneras: ayudaría a controlar el problema de salinización de suelos, contribuiría a disminuir la desertificación, reduciría indirectamente el **índice** de enfermedades respiratorias en la población, reduciría la contaminación de los mantos acuíferos y de la atmósfera y finalmente, como consecuencia indirecta de lo anterior, favorecería la economía de la zona,

La combinación de *Azospirillum con Staphylococcus sp. en* cocultivo fue escogida como un primer paso hacia un modelo para el desarrollo de inoculantes mixtos, especialmente para ser

utilizado bajo condiciones de tensión salina. El conocimiento de los factores responsables de la promoción de la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd por parte de *Staphylococcus sp.* sería el primer paso en el diseño y utilización de este inoculante.

Este trabajo plantea la siguiente hipótesis: **Debido a que la fijación de nitrógeno de *A. brasifense* Cd se incrementa al creerse en cocultivo con *Staphylococcus sp.*, se propone que el incremento podría: deberse a una liberación o producción de metabolito(s) generados por *Staphylococcus sp.***

OBJETIVO

Investigar algunos de los factores que incrementan la fijación de nitrógeno de *Azospirillum brasilense* Cd al creerse en cultivo mixto con *Staphylococcus sp.*, y determinar si éste incremento se produce también entre *A. brasilense* Cd y otras especies bacterianas de la rizosfera del mangle.

El objetivo fue abordado planteando los siguientes objetivos particulares:

- a) Aislamiento a partir de raíces de mangle de bacterias no fijadoras de nitrógeno asociadas a bacterias diazotróficas, e identificación de las cepas.
- b) Realizar el ensayo de reducción de acetileno (ERA) para cultivos puros de *A. brasilense* Cd

y mixtos con *Staphylococcus sp.* a diferentes tiempos de incubación (24,48,72 y 96 hrs). El ensayo de reducción de acetileno se llevó a cabo como medición indirecta de la fijación de nitrógeno.

c) Determinar si el incremento en la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd se debe al incremento poblacional de esta bacteria y evaluar si el aumento en la fijación de nitrógeno se debe a una disminución en la concentración de oxígeno en el cultivo.

d) Determinar si *Staphylococcus sp.* se beneficia al crecerse en cultivo mixto con *A. brasilense* Cd y si la promoción de fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Cd se debe a la presencia de alguna(s) sustancia(s) inductora(s) producida por *Staphylococcus sp.*

e) Determinar si al crecer a *A. brasilense* Cd con otras bacterias no diazotróficas asociadas a la rizosfera del mangle, se incrementa también la fijación de nitrógeno de la primera.

METODOLOGIA

Aislamiento a partir de raíces de mangle de bacterias no fijadoras de nitrógeno asociadas a bacterias diazotróficas, e identificación de las cepas.

Se ha observado que durante el proceso de aislamiento de bacterias diazotróficas se disminuye o se pierde la actividad de reducción de acetileno de las cepas (Lindberg y Granhall, 1984; Eskew et al., 1977; Holguin et al., 1992; Lethbridge et al., 1982). Una explicación a este fenómeno puede ser la necesidad que presentan las bacterias de asociarse para crear condiciones apropiadas para la fijación de nitrógeno. Se especula que las bacterias no diazotróficas estimulan a las fijadoras por medio de actividades físicas y/o bioquímicas recibiendo a cambio compuestos nitrogenados de los organismos diazotróficos (Tyler et al., 1979). Con base en lo anterior, diseñamos condiciones de cultivo (medio sin fuente de nitrógeno) propicias para el aislamiento de bacterias diazotróficas y bacterias asociadas a éstas.

La colecta de plántulas de mangle se llevó a cabo en el manglar de la Bahía de Balandra, Baja California Sur. Su localización geográfica es $24^{\circ}20'N$, $110^{\circ}20'W$. Esta localidad fue descrita por **Pedrín-Avilés** et al., (1990). Se colectaron 3 plantas jóvenes de la especie de mangle [*Avicennia germinans* (L.) Stern], se envolvió el conglomerado raíz-sedimento de cada planta en bolsas de plástico, y se transportaron al laboratorio. Se separaron las raíces de la planta, se desprendió cuidadosamente el sedimento que cubría las raíces y se enjuagaron éstas en seis baños seriados de agua de mar filtrada. Después se cortaron las raíces en segmentos de 3 cm y bajo condiciones estériles, se lavaron de nuevo en seis baños seriados de agua de mar estéril. Se inocularon las raíces en botellas de suero (60 ml) las cuales contenían 15 ml de medio semisólido (0.05% agar)

libre de nitrógeno y se incubaron por 5 días a una temperatura de **30°C**. **Se** utilizó como medio de enriquecimiento y crecimiento el medio Rennie, (Rennie, 198 1) diseñado para bacterias terrestres. Considerando que las bacterias marinas presentan un requerimiento específico del ion Na' y algunas cepas requieren del ion **Mg²⁺** en concentraciones mayores que las bacterias terrestres, el medio Rennie **fue** modificado y consistió en tres soluciones preparadas por separado: i) **K₂HPO₄·3H₂O**, 2.7g; **KH₂PO₄**, 0.2g; **NaCl**, 15g; **Na₂FeEDTA**, 28.0 mg; **Na₂MoO₄·2H₂O**, 25.0 mg; extracto de levadura, 100.0 mg; **manitol**, 5.0 g; sacarosa, 5.0 g; **agua** destilada, 900 ml; ii) 3 ml de una solución de lactato de calcio (**3.52g** en 30 ml de agua); iii) **MgSO₄·7H₂O**, 3.0 g; agua destilada, 100 ml. Las soluciones se esterilizaron con autoclave por separado y se mezclaron después de enfriarlas. La biotina (5 **µg/l**) y el ácido P-aminobenzoico (10 **µg/l**) se esterilizaron por **filtración** y se agregaron a la mezcla anterior. El pH se ajustó a 7.3 con **NaOH**.

Después del periodo de incubación, se les realizó a los cultivos de emiquecimiento el ensayo de reducción de acetileno (ERA). Se sembró en placa sobre el medio sólido la parte turbia de las botellas que mostraron actividad positiva de reducción de acetileno, y se incubaron a 30°C durante tres días. Todos los morfotipos coloniales obtenidos **fueron** sometidos individualmente al ERA. Aquellos morfotipos que mostraron actividad positiva, así como **aquellos** que no mostraron actividad **fueron** almacenados en glicerol al 15% a -40°C para su identificación posterior.

La identificación de las cepas **fue** realizada por **cromatografía** de gases de la composición metil ester de ácidos grasos con longitud de cadena entre 9 y 18 carbonos (Sasser, 1990). El análisis de los metil ésteres de ácidos grasos (**FAME**) **fue** realizado como servicio comercial en el laboratorio del Dr. J.W. Kloepper en la Universidad de Auburn Alabama, EUA. La cepa aislada y denominada BA19302, he **identificada** como *Staphylococcus epidermidis* y la BA29302 como

Enterobacter cancerogenus. La cepa BA19303 identificada como *Micrococcus lylae*, forma parte de la colección del CIBNOR y fue aislada utilizando el medio diseñado por **Sundara Rao** y **Sinha** (1963) para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato. Este medio fue modificado para el aislamiento de bacterias marinas (Vázquez et al., 1994).

Condiciones de crecimiento de *A. brasilense* Cd y *Staphylococcus* sp.

A. brasilense Cd (ATCC) se desarrolló en agitación constante (120 rpm) en 50 ml de caldo nutritivo (**Merck**), complementado con cloruro de sodio (**NaCl**) al 2% durante 18 horas a 30°C. El cultivo se **centrifugó** a 1700 x g por 10 min a 4°C; el paquete celular se lavó tres veces con una solución reguladora de fosfatos (PBS) 0.08M complementada con **NaCl** 0.05M. El pH final de esta solución fue de 7.2. Este procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad. La densidad óptica del cultivo de *A. brasilense* Cd se ajustó a 1.0 a 540 nm con PBS, la cual correspondió a 5 X 10⁷ unidades formadoras de colonia por ml (u.f.c./ml). Un ml de esta suspensión bacteriana fue inoculado en botellas de suero de 60 ml con tapones de algodón las cuales contenían 13 ml de medio semisólido (0.05% agar) HGB (Holguin et al., 1992). Este medio consiste en tres soluciones: (i) (g/890 ml de agua destilada para preparar un litro de medio) **NaCl**, 20.0; **MgSO₄·7H₂O**, 3.0; **CaCl₂**, 0.02; DL-ácido **málico**, 5.0; **NaOH**, 3.0; extracto de levadura, 0.1; (ii) 10 ml de la siguiente solución concentrada fue agregada a la solución (i) y esterilizada por autoclave: (g/500 ml de agua destilada) **FeCl₃**, 0.5; **NaMoO₄·2H₂O**, 0.1; **MnSO₄**, 0.105; **H₃BO₃**, 0.14; **CuCl₂·2H₂O**, 0.0014; **ZnSO₄**, 0.012. (iii) 100 ml de solución reguladora de fosfatos 0.39M, pH 7.6 esterilizada por autoclave y agregada a la mezcla anterior después de enfriarla. El pH final del medio es de 7.2. El medio HGB contiene 0.01% de extracto de levadura,

la cual se agota después de 48 horas ya que es asimilada por *Azospirillum* y utilizada para su crecimiento (Okon et al., 1977). El agotamiento de ésta fuente de nitrógeno es esencial para llevar a cabo los ERA ya que la presencia de nitrógeno en los medios de cultivo inhibe la actividad de la **nitrogenasa**. En algunos experimentos se omitió el extracto de levadura con la finalidad de que no interfiriera en el análisis de la composición química del dializado. Las botellas inoculadas con *A. brasilense* Cd conteniendo un volumen total de 14 ml, se incubaron sin movimiento a 30°C durante 48 h.

La bacteria no-fijadora de nitrógeno *Staphylococcus* sp., BALRA9010 aislada a partir de raíces de **mangle** (Holguin et al., 1992) **fué** cultivada y tratada en la misma forma que *A. brasilense* Cd. La densidad óptica del cultivo de *Staphylococcus* sp. se ajustó a 1.8 a 540 nm lo cual correspondió a 4×10^8 u.f.c./ml. Dos ml de esta suspensión fue inoculada asépticamente a las botellas de suero conteniendo 14 ml del cultivo de *A. brasilense* Cd de 48 horas. Como control se utilizaron botellas de suero conteniendo 16 ml del cultivo puro de *A. brasilense* Cd.

Cuentas viables de *A. brasilense* Cd y *Staphylococcus* sp.

Se contaron las unidades formadoras de colonias (u.f.c) por medio del método convencional de conteo de dilución en placa, en medio sólido HGB para *A. brasilense* Cd y en "Agar para staphylococos No. 110" (Bioxon, México) para *Staphylococcus* sp. (El cultivo mixto se sembró tanto en este medio como en el medio sólido HGB con el objeto de realizar el conteo para ambas cepas). El conteo se realizó en cultivos puros y mixtos después de 24, 48, 72 y 96 horas de haber inoculado *Staphylococcus* sp. al cultivo de *A. brasilense* Cd, reproduciendo las condiciones de crecimiento bajo las cuales se realizó el ERA. Para establecer si la ausencia de extracto de

levadura en el medio de cultivo afectaba el crecimiento de *Staphylococcus* sp., se realizaron **conteos** de *Staphylococcus* sp. cuando **fué** crecida en medio HGB sin extracto de levadura.

Determinación de la concentración de oxígeno en los cultivos

La presencia de oxígeno en el medio de cultivo puede ser determinante en la eficiencia para fijar nitrógeno de los organismos diazotróficos (Okon et al., 1983). Por esta razón, en estudios sobre fijación de nitrógeno se requiere medir la concentración de **oxígeno** disuelto en los cultivos. La concentración de oxígeno disuelto en cultivos puros y mixtos **fué** determinada con un oxímetro, modelo 54 ARC (Yellow Springs **Inst.** USA), equipado con un electrodo para oxígeno, modelo 5775) y por medio del método Winkler modificado (Williams y Jenkinson, 1982) después de 96 horas de haber inoculado *Staphylococcus* sp. al cultivo de *A brasilense* Cd. Este método es más preciso que la medición de oxígeno utilizando un oxímetro ya que detecta diferencias de oxígeno en los cultivos hasta de 1 μM . El método utiliza los mismos reactivos que el método Winkler tradicional, sin embargo, la titulación se realiza con una bureta automática la cual tiene una precisión en el flujo del **tiosulfato** hasta de 1 μl , y se encuentra conectada al tubo que contiene la muestra. El tubo con la muestra está coloca en un dispositivo con una fotocelda integrada la cual registra constantemente la densidad óptica de la muestra al ir agregando el tiosulfato. Esta señal es transformada a través de un microprocesador y registrada en la pantalla de un monitor en forma de una gráfica de pendiente positiva. La gráfica indica el final de la titulación cuando la pendiente alcanza valor de zero y se mantiene así por varios segundos. Con el objeto de lograr mayor precisión en los cálculos, el volumen del tubo donde se colocan las muestras debe ser conocido a un porcentaje de precisión mayor de 0.03%

Ensayo de reducción de acetileno (ERA)

Se reemplazaron los tapones de algodón de las botellas de suero son tapones de goma y se les extrajo a las botellas 1 ml de aire con una jeringa. Se les inyectó 1 ml de acetileno y se incubaron durante **24** horas. Al cromatógrafo de gases se inyectó 1 ml de muestra. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 6000 (Varian Instrument Group, U.S.A.) equipado con detector de ionización de flama de hidrógeno (**FID**). Las condiciones operativas fueron las siguientes: columna de acero inoxidable empacada con Porapak N, 80/100, 150 x 0.2, temperatura de la columna 60°C, temperatura del detector 200°C, temperatura del inyector 50°C, tasa de flujo del H₂ y N₂ de 25 ml/min, y tasa de flujo de aire de 300 ml/min. Para los ERA también se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Ehner propiedad del CICIMAR. Las condiciones operativas fueron igual a las descritas anteriormente.

Como primera evaluación, se estimó la reducción de acetileno de *A. brasilense* Cd en cultivo puro y mixto con *Staphylococcus sp.* a las 24, 48, 72, y 96 horas de haber inoculado *Staphylococcus sp.* al cultivo de *A. brasilense* Cd. Para cada lectura se utilizaron de 5 a 7 réplicas. En los experimentos posteriores, solamente se realizó el ERA a las 96 horas de haber inoculado *Staphylococcus sp.* al cultivo de *A. brasilense* Cd. Se seleccionó este periodo de incubación considerando que si el factor de promoción era una sustancia, ésta podría ser detectada más fácilmente, ya que teóricamente a mayor tiempo de incubación, la sustancia estaría más concentrada. La cantidad de etileno producida por célula se calculó dividiendo la cantidad total de etileno producida por cultivo, entre el numero total de **u.f.c.** presentes en el cultivo (ambas cantidades expresadas en números logarítmicos). La cantidad de etileno producida es expresada como nanomoles de etileno por cultivo o por célula en un periodo de incubación de 24 horas.

Aquellos experimentos en los cuales se evaluó la reducción de acetileno de *A. brasilense* Cd a un solo periodo de incubación, los resultados se expresaron como porcentaje de incremento sobre el control, considerando éste último como el 100%.

ERA de *A. brasilense* Cd en cultivos puros y mixtos con *Staphylococcus* sp. contenida dentro de un tubo de diálisis

La suspensión de *Staphylococcus* sp. **fué** centrifugada a 1700 x g **durante** 10 **min** a 4°C, se descartó el sobrenadante y el botón celular **fué** resuspendido a la mitad de su volumen en medio HGB; 2 ml de esta suspensión de *Staphylococcus* sp. concentrada dos veces, **fué** colocada asépticamente dentro de un tubo de diálisis con un tamaño de poro de 12 000 daltons. Se cerró el tubo que contenía a las bacterias con un hilo de algodón estéril y se colocó dentro de botellas de suero de 60 ml, las cuales contenían 14 ml de cultivos de *A. brasilense* Cd de 48 h. El experimento incluyó tres controles adicionales: i) *A. brasilense* Cd en cultivo puro, ii) *A. brasilense* Cd en cultivo mixto con *Staphylococcus* sp., y iii) *A. brasilense* Cd-y tubo de diálisis vacío. El ERA de los cultivos **fué** realizado después de 96 h de incubación.

ERA de *A. brasilense* Cd después de agregar un dializado libre de células de *Staphylococcus* sp.

Se evaluó la reducción de acetileno de *A. brasilense* Cd en i) cultivo puro **ii)** agregando el dializado de *Staphylococcus* sp. libre de células, y iii) agregando células muertas (por autoclave, durante 15 **min** a 110°C) de *Staphylococcus* sp. al cultivo de *A. brasilense* Cd. El dializado se obtuvo introduciendo la suspensión concentrada de *Staphylococcus* sp. descrita en el inciso

anterior dentro de un tubo de diálisis. El tubo de diálisis con la suspensión bacteriana **fue** sumergido en una probeta estéril con medio HGB la cual **contenía** el mismo **volumen** que el de la suspensión. Después de 96 h de incubación a 30°C en agitación constante (110 rpm) se recuperó el dializado y se agregaron 2 **ml** a las botellas conteniendo 14 ml del cultivo de *A. brasilense* Cd. Después de un periodo de incubación adicional de 24 **h** a 30°C, se realizó el ERA.

Evaluación de la actividad del dializado producido al crecer a *Staphylococcus* sp. en medio HGB sin fuente de nitrógeno.

El análisis de la composición química del dializado requirió la omisión del extracto de levadura del medio de cultivo. Sin embargo, se desconocía si esta omisión **interferiría** con la promoción en la reducción de acetileno de *Azospirillum*. Por esta razón, se evaluó la actividad promocional del dializado producido cultivando *Staphylococcus* sp. en el medio HGB sin extracto de levadura. El dializado obtenido bajo estas condiciones se agregó al cultivo de *A. brasilense* Cd en las siguientes concentraciones: 100% (sin diluir) 50% y 25% (**diluidos** por **volúmen** en PBS).

Análisis de aminoácidos y ácidos orgánicos del dializado libre de células de *Staphylococcus* sp.

La concentración total de aminoácidos del dializado **fue** determinada de acuerdo al método de **Rosen** (1957). La determinación cualitativa de la composición de aminoácidos **fue** realizada por **cromatografía** en capa fina (TLC) en silica gel (Al Sil **G**, capa de 250 μm) i) unidimensional, ii) bidimensional y iii) en TLC automática utilizando el analizador cromatográfico Iatroscan (MK-5 TLC-FID, Laboratorios Iatron, Tokyo, Japan). La separación de aminoácidos en TLC

unidimensional se realizó con el Solvente 1, [**phenol+agua (75:25, v/v)**] ó con el Solvente II [2-propanol + hidróxido de amonio (**55:45, v/v**)]. Ya que con estos solventes se obtuvo buena resolución, la TLC bidimensional se corrió primero con el Solvente I seguido del Solvente II (Robyt y White, 1987). Los solventes utilizados para la TLC automática fueron el Solvente II ó el Solvente III [2-propanol + hidróxido de amonio (**70:30, v/v**)]. El reactivo Pauly se utilizó para la detección de tirosina e **histidina**, el reactivo Sakaguchi para la detección de arginina y el reactivo Ehrlich para la detección de triptofano (Robyt y White, 1987). Medio no inoculado **fué** utilizado como control. El analizador **TLC** automático **fué** utilizado para la determinación cuantitativa de los aminoácidos presentes en el dializado. El nitrógeno total del dializado **fue** cuantificado por el método Kjeldahl utilizando un analizador Kjeltex Auto-1030 (Tecator, Suecia). El análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos orgánicos volátiles (acético, propiónico, **butírico**, isobutírico, valérico, isovalérico, caproico, isocaproico y heptanoico) y los no-volátiles (pirúvico, láctico, oxalacético, oxálico, **malónico**, metihnalónico, **fumárico** y **succínico**) presentes en el dializado, **fué** realizado por **cromatografía** de gases (GC) utilizando reactivos marca Sigma de alto grado de pureza. La extracción se hizo de acuerdo con Smibert y Krieg (1981). Muestras de 0.5-1.0 μl se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian 6000 (Varian **Instrument** Group, USA) equipado con un detector de ionización de flama de hidrógeno (FID) operado bajo las siguientes condiciones: Una columna capilar "**Fused Silica**" (Nukol, USA) (15m, **0.53mm** de diámetro interno y **0.5 μm** de grosor de la **película**), una temperatura inicial de la columna de 70°C sostenida por un periodo de 5 **min**, seguida de una tasa de incremento de la temperatura de **8°C/min** hasta alcanzar un nivel constante de 140°C por un periodo de 5 **min** (este programa para el control de la temperatura se corrió para cada muestra), temperatura del inyector

de 240°C, temperatura del detector de 240°C, el N₂ como gas acarreador y el H₂ para el FID, se utilizaron a tazas de flujo de 2 ml/min y 30 ml/min, respectivamente, y un flujo de aire de 300 ml/min.

Efecto de la adición de ácido aspártico y ácido succínico sobre la reducción de acetileno por *A. brasilense* Cd

Se prepararon por separado soluciones de ácido aspártico y ácido succínico conteniendo la concentración de los compuestos encontrada en el dializado, así como soluciones conteniendo la mitad de la concentración encontrada en el dializado (1.2 mM y 0.6 mM para ácido aspártico, y 15.3 mM y 7.6 mM para el ácido succínico). Dos ml de estas soluciones fueron agregadas por separado a 14 ml de cultivos de *A. brasilense* Cd los cuales fueron incubados durante 96 h a 30°C, para después realizar el ERA. Se consideró como control un tratamiento que incluía la incorporación de dializado diluido a un 50% de su volumen con el objeto de poder comparar el efecto que pudiera tener el dializado diluido a esta concentración, con el efecto de los ácidos succínico y aspártico agregados también a la mitad de su concentración encontrada en el dializado.

Efecto del cultivo mixto de *A. brasilense* Cd con *Staphylococcus epidermidis* ó *Micrococcus lylae* sobre la reducción de acetileno por *A. brasilense* Cd

Considerando la experiencia previa en la cual la bacteria Gram positiva y cocoidal *Staphylococcus sp.* logró incrementar la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd, se decidió trabajar con las dos cepas de bacterias cocoidales *S. epidermidis* y *M. lylae*. *Enterobacter*

cancerogenus ha sido reportada como patógena en plantas del género *Populus*, (Brenner, 1986) razón por la que **fué** descartada para este estudio.

Se crecieron *S. epidermidis* y *M. lylae* en cultivos mixtos con *A. brasilense* Cd, de manera similar a los experimentos realizados con *Staphylococcus sp.*, para analizar el efecto de los cultivos mixtos sobre la actividad diazotrófica de *A. brasilense*. El ERA se realizó 96 horas después de haber agregado *S. epidermidis* ó *M. lylae* a los cultivos de *A. brasilense* Cd.

Diseño experimental y análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron de dos a cuatro veces cada uno. Cada tratamiento incluyó un número **mínimo** de tres réplicas. El ERA incluyó por lo menos seis réplicas por tratamiento (cada réplica consistió en un cultivo). Los datos presentados son las medias de todas las réplicas de aquellos experimentos con tendencias similares, y los valores están reportados con el error estandar. La significancia para el análisis de dos muestras se determinó por medio de la prueba t de Student a un valor **de** $P \leq 0.05$. Para aquellos experimentos que incluían varios tratamientos, se determinó la significancia por el análisis de **varianza** de una sola vía (**ANDEVA**) a un valor de $P \leq 0.05$. Los datos presentados como porcentajes **fueron** transformados a arco-seno antes de ser analizados.

RESULTADOS

Fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Cd en cultivos puros y mixtos con *Staphylococcus* sp. a diferentes tiempos de incubación

La fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Cd fue significativamente mayor en cultivo mixto con *Staphylococcus* sp. que en cultivo puro a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación. (Fig. 1A).

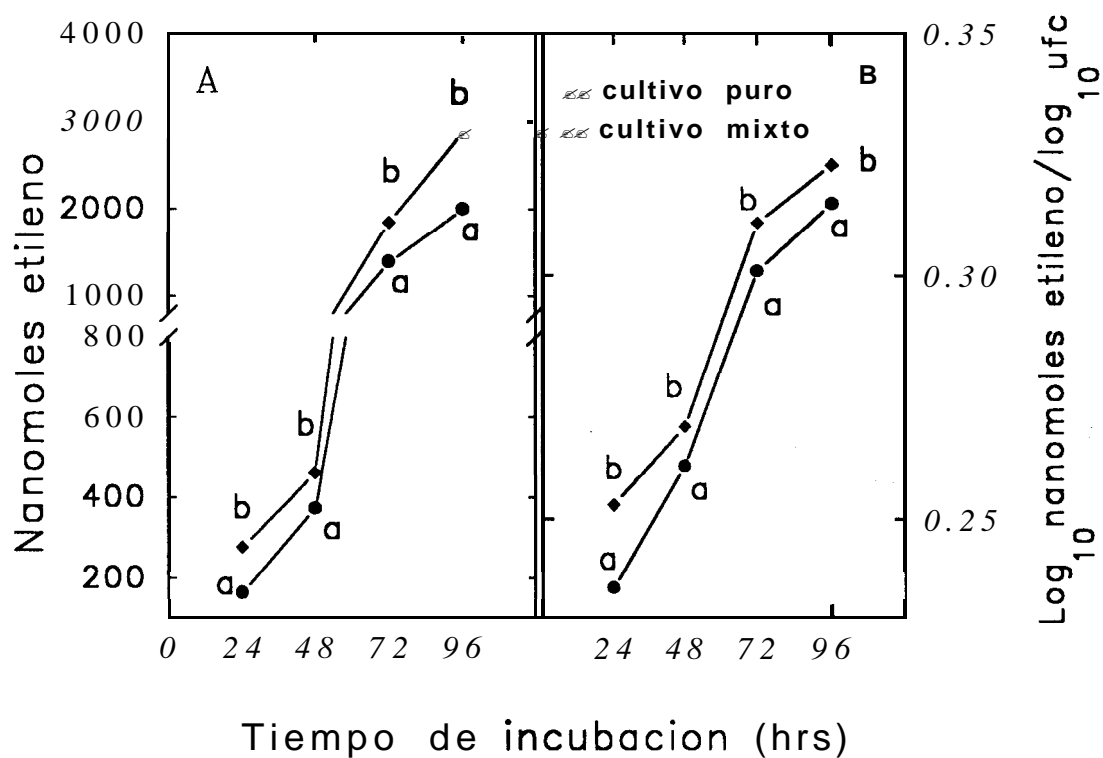


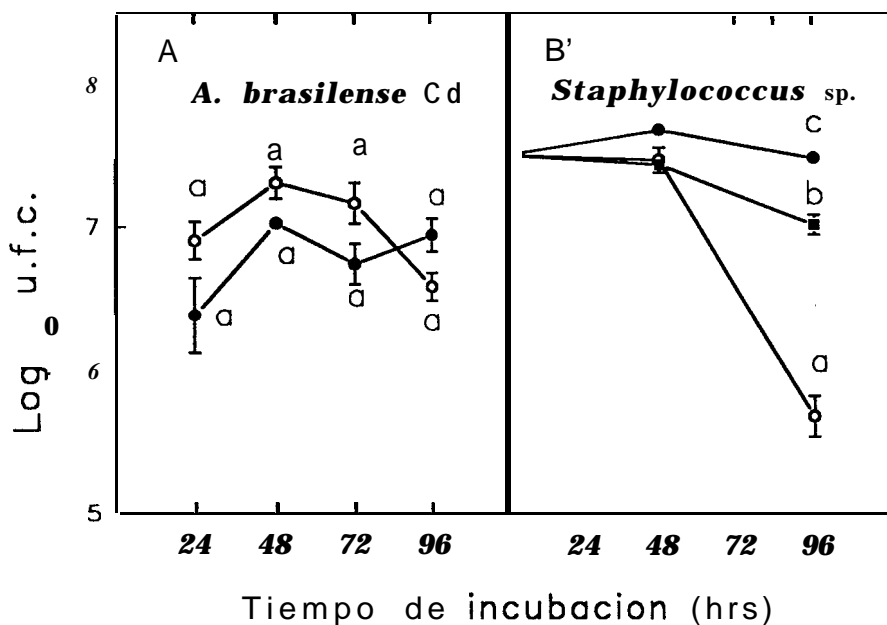
Fig. 1. Producción de etileno por cultivo de 16 ml (A) y por célula (B) de *A. brasilense* Cd en cultivo puro y en cultivo mixto con *Staphylococcus* sp., a diferentes tiempos de incubación.

La fijación de nitrógeno por célula de *A. brasilense* Cd en cultivo mixto también se incrementó significativamente al compararse con los resultados obtenidos en cultivo puro, en todos los tiempos de incubación. (Fig. 1B). Cada par de puntos marcados con una letra diferente a cada tiempo de incubación y en cada sub-figura, difieren significativamente a $P \leq 0.05$ en la prueba t de Student

Crecimiento de *A. brasilense* Cd y *Staphylococcus* sp. en cultivos puros y mixtos a diferentes tiempos de incubación

No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *A. brasilense* Cd, en cultivos puros y mixtos con *Staphylococcus* sp. a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación (Fig.2A). Al crecerse *Staphylococcus* sp. en cultivo puro en el medio HGB con extracto de levadura, el nivel poblacional permaneció estable a través de todo el periodo de incubación, (Fig.2B). Sin embargo, al crecerse sin extracto de levadura, el nivel poblacional (después de 96 h) alcanzó un valor significativamente menor que el obtenido al crecer *Staphylococcus* sp. con extracto de levadura. Al crecer *Staphylococcus* sp. en cultivo mixto con *A. brasilense* Cd, el nivel poblacional del primero alcanzó valores aún menores (Fig. 2B) observándose una disminución drástica de la población. Para el crecimiento de *Staphylococcus* sp. solamente se calcularon los valores obtenidos a las 0, 48 y 96 horas ya que experimentos preliminares demostraron que los valores de crecimiento después de 24 y 72 horas no variaban con respecto a la curva de crecimiento obtenida para las 48 y 96 horas. En la sub-figura A, cada par de puntos marcados con letras iguales a cada tiempo de incubación, no difieren significativamente a $P \leq 0.05$ por la prueba t de Student.

En la sub-figura B, los puntos marcados con una letra diferente difieren significativamente a $P < 0.05$ en el análisis de variancia de una sola vía o ANDEVA.



○ cultivo puro
 ● cultivo mixto
 ■ medio sin extracto de levadura

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
 CIENCIAS MARINAS
 BIBLIOTECA
 I.P.N.
 DONATIVO

Fig. 2. Crecimiento de *A. brasilense* en cultivo puro y en cultivo mixto (A) y crecimiento de *Staphylococcus* sp. en cultivo puro, en cultivo mixto, y en medio sin extracto de levadura (B) a diferentes tiempos de incubación.

Concentración de oxígeno disuelto en cultivos puros y mixtos de *A. brasifense* Cd

La concentración de oxígeno disuelto en cultivos mixtos de *A. brasilense* Cd con *Staphylococcus* sp. fué significativamente mayor que la encontrada en cultivos puros después de 96 h de incubación (Fig.3) utilizando dos métodos diferentes para la determinación de oxígeno

disuelto. Los resultados que se reportan son los obtenidos a través del método Winkler modificado. Las columnas marcadas con una letra diferente, difieren significativamente a $P \leq 0.05$ en la prueba t de student.

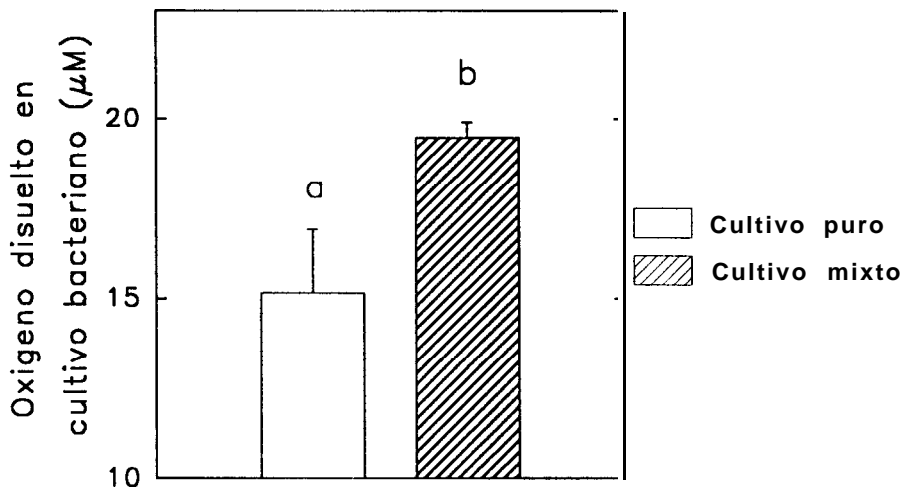


Fig. 3. Concentraciones de oxígeno disuelto en cultivos puros de *A. brasilense* y mixtos con *Staphylococcus sp.* después de 96 horas de incubación, sin agitación.

Fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Cd en cultivos puros y mixtos con células de *Staphylococcus sp.* contenidas dentro de un tubo de diálisis

La fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Cd **fué** significativamente mayor en el cultivo con células de *Staphylococcus sp.* contenidas dentro de un tubo de diálisis, que en el cultivo de *A. brasilense* crecido en asociación libre con *Staphylococcus sp.* Este último tratamiento mostró un incremento significativo en la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* al compararse con los resultados obtenidos en cultivo puro. También se probó que, el tubo de diálisis no causó efecto

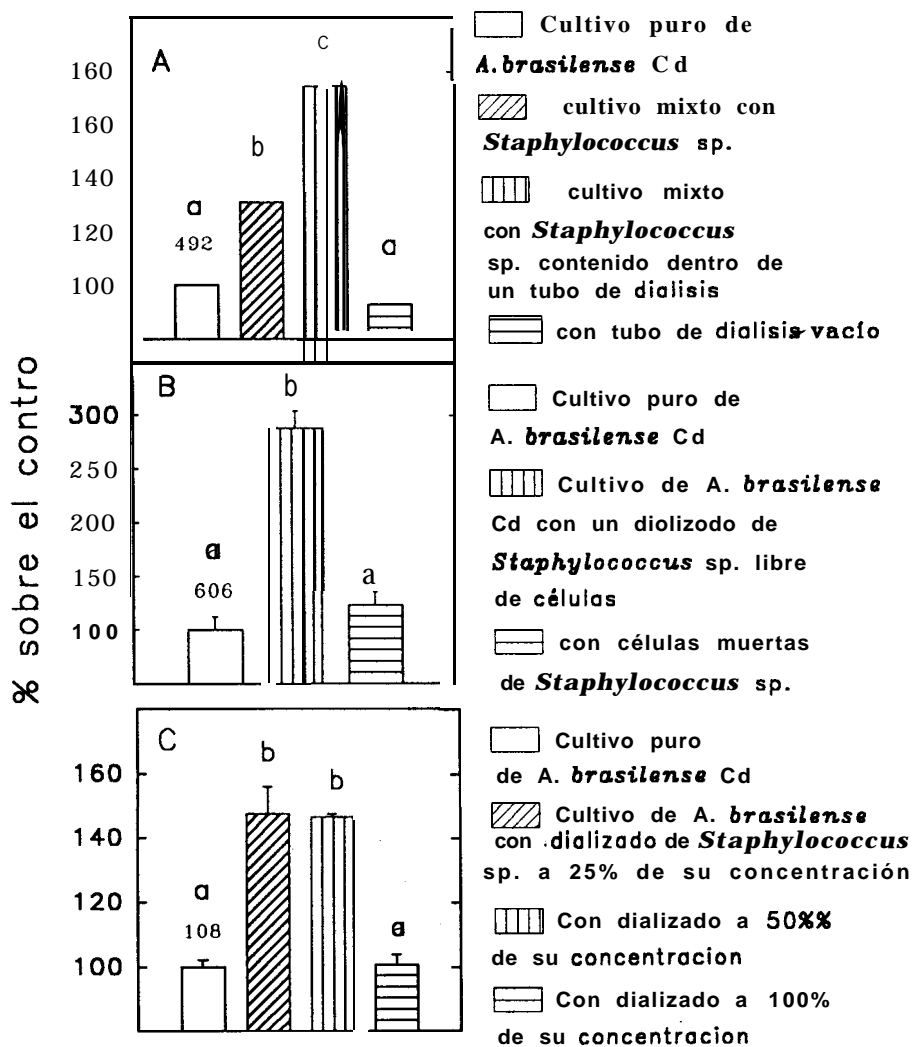


Fig. 4. Incremento en relación al cultivo puro, en la producción de etileno de *A. brasilense* Cd la cual fue sometida a diferentes tratamientos de interacción con células de *Staphylococcus* sp ó productos de *Staphylococcus* sp.

sobre la fijación de nitrógeno de *A. brasiliense* Cd (Fig. 4A). Las columnas de las sub-figuras A, B y C marcadas con una letra diferente, difieren significativamente a $P \leq 0.05$ en ANDEVA. Los números sobre las columnas indican la producción de etileno del cultivo puro expresado en nanomoles de etileno producido en 24 h. Estos números fueron utilizados como base para los cálculos de porcentaje presentados en esta figura.

Fijación de nitrógeno del cultivo de *A. brasiliense* Cd al mezclarse con un dializado libre de células de *Staphylococcus* sp.

La fijación de nitrógeno de *A. brasiliense* Cd fué significativamente mayor al mezclarse con un dializado libre de células de *Staphylococcus* sp. que los resultados obtenidos en cultivos puros de *A. brasiliense* Cd. La incorporación de células muertas de *Staphylococcus* sp. al cultivo de *A. brasiliense* Cd no causó efecto sobre la fijación de nitrógeno (Fig. 4B).

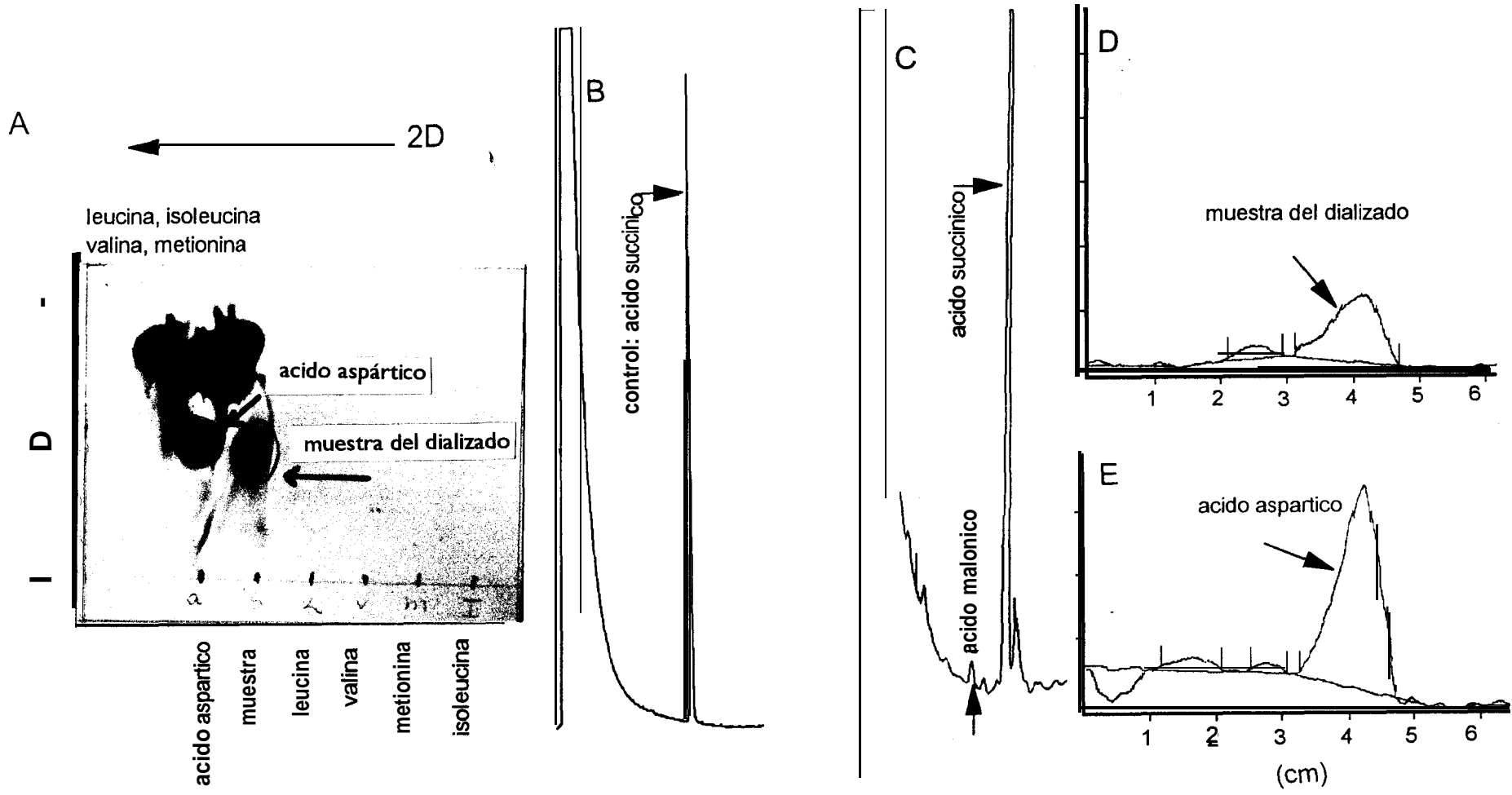
Fijación de nitrógeno del cultivo de *A. brasiliense* Cd mezclado con un dializado libre de células de *Staphylococcus* sp. cultivado en medio HGB sin extracto de levadura.

Cuando el dializado de *Staphylococcus* sp. producido al cultivar *Staphylococcus* sp en medio HGB sin extracto de levadura fue diluído a 50% y 25% de su concentración original, se incrementó significativamente la fijación de nitrógeno de *A. brasiliense* Cd al compararse con los resultados obtenidos en cultivo puro (Fig. 4C). Sin embargo, el dializado no-diluído (concentración 100%) no causó efecto sobre la fijación de nitrógeno de *A. brasiliense* Cd.

Análisis de aminoácidos, ácidos orgánicos, nitrógeno total y pH del dializado libre de células de *Staphylococcus* sp.

La concentración total de aminoácidos en el dializado **fué** de $295.33 \pm 19.55 \mu\text{g/ml}$. Por medio de la separación del dializado en el analizador automático para TLC (Solvente III) y de las pruebas adicionales con los reactivos **Pauly, Sakaguchi** y Ehrlich, **fué** posible descartar la presencia de algunos aminoácidos en el dializado **tales** como tirosina, histidina, arginina y **triptofano**. Sin embargo, la utilización del analizador automático para **TLC** llevado a cabo en varillas y la TLC **unidimensional** sobre placas de sílica gel no nos permitió diferenciar entre los aminoácidos ácido aspártico, leucina, **valina**, metionina e isoleucina los cuales mostraron valores de **Rf** similares. Los resultados obtenidos con la TLC bidimensional sobre sílica gel (Solvente II seguido del Solvente 1) sugirieron que el **único** aminoácido presente en el dializado de *Staphylococcus* sp. era ácido aspártico (Fig. 5A). Estos resultados se confirmaron a través del uso de TLC automática utilizando el Solvente II. La corrida solamente se realizó para el ácido aspártico y para la muestra de dializado (Fig 5D). La concentración de ácido aspártico en el dializado fue de $160 \mu\text{g/ml}$ (1.2 mM). El análisis de ácidos orgánicos en el dializado por **GC** detectó ácido succínico a una concentración de $1806 \pm 53 \mu\text{g/ml}$ (15.3 mM) (Figs. 5B y C). También se detectó ácido **malónico** a una concentración de $97 \mu\text{g/ml}$. (Fig. 5C) El análisis no detectó ácidos orgánicos no-volátiles. La concentración de nitrógeno total en el dializado **fué** de $33 \pm 5 \mu\text{g/ml}$. El **pH** mostró un promedio de 0. **11** unidades sobre el pH del medio de cultivo no inoculado. En el medio sin extracto de levadura no inoculado, el cual **fué** utilizado como control, no se detectaron aminoácidos, ácidos orgánicos ó nitrógeno.

Fig. 5. Imagen rastreada por computadora de **una** placa de TLC bidimensional realizada con estándares de aminoácidos y con el dializado de *Staphylococcus* sp. en placas de **silica** gel (A). **Imagen** rastreada por computadora de **un** cromatograma del control con ácidos orgánicos separados e identificados por cromatografía de gases **(B)**, y muestra del dializado (C). Imagen rastreada por computadora de **un** cromatograma de aminoácidos separados, identificados y cuantificados por TLC automatizada, muestra del dializado (D) y del control **(E)**.



Tiempo de retención
del ácido succínico: 8' 11"

Fig. 5

Efecto del ácido aspártico, del ácido succínico y de las bacterias de la rizosfera del mangle *Staphylococcus epidermidis* ó *Micrococcus lylae* sobre la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd.

La incorporación de ácido aspártico (0.6 mM) a los cultivos de *A. brasilense* Cd incrementó **significativamente** la fijación de nitrógeno de esta cepa, comparado con los resultados obtenidos para el cultivo puro (Fig. 6). La incorporación de ácido aspártico a una concentración de 1.2 mM no afectó la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. Sin embargo, la **fijación** de nitrógeno del

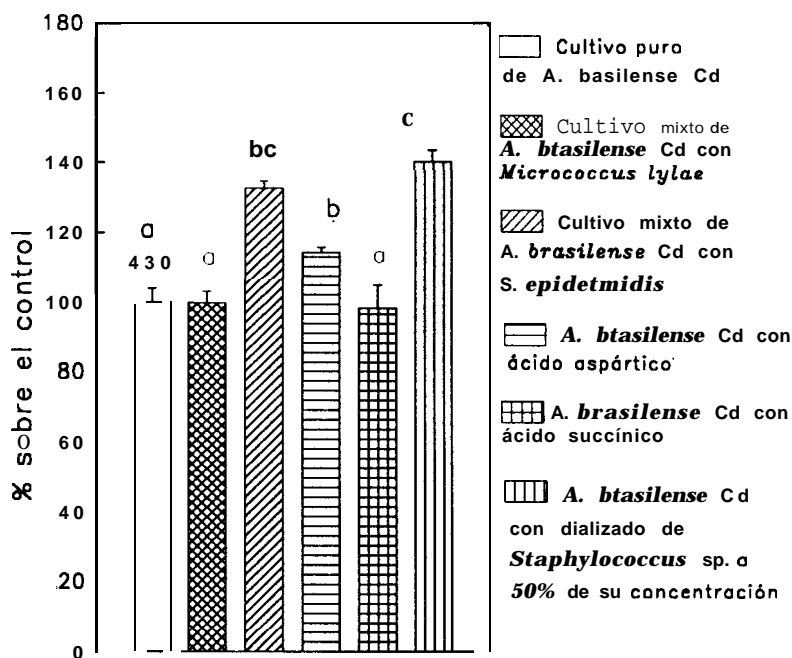


Fig. 6. Incremento en relación al cultivo puro en la producción de etileno por *A. brasilense* Cd sometida a diferentes tratamientos

cultivo de *A. brasilense* Cd mezclado con el dializado **diluido** al 50% **fué** significativamente mayor que el tratamiento en el cual sólo se adicionó ácido aspártico. La adición de ácido **succínico** (7.6 **mM**) no causó efecto sobre la **fijación** de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. La fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd se incrementó al crecerse en cultivo mixto con *Staphylococcus epidermidis*, *sin embargo*, no se observó ningún efecto al crecerse en cultivo mixto con *Micrococcus lylae*. Las columnas marcadas con **letras diferentes** difieren significativamente a $P \leq 0.05$ en ANDEVA. Las barras representan el error estándar. Los números colocados sobre la primera columna indican la producción de etileno del cultivo puro expresada en **nanomoles** de etileno producidos en 24 h. Estos números **fueron** utilizados como base para los cálculos de porcentaje presentados en ésta figura.

ANALISIS

Reportes anteriores demostraron que *Staphylococcus sp.*, además de presentar la capacidad de incrementar la fijación de nitrógeno de *Listonella anguillarum* {bacteria fijadora de nitrógeno aislada también de la rizosfera del mangle, (Holguin et al., 1992)}, incrementó también, y en mayor magnitud, la actividad diazotrófica de **la** bacteria terrestre *A. brasilense* Cd (Holguin y Bashan, 1993). En este trabajo se encontró que en cultivo mixto *Staphylococcus sp.* promovió la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd a diferentes tiempos de incubación, obteniéndose incrementos en su actividad diazotrófica hasta de un 90% en relación al cultivo puro. Al realizar el conteo de unidades formadoras de colonia de *A. brasilense* Cd a través del periodo de incubación,

se observó que el nivel poblacional no varió a través del tiempo. Este último resultado así como el observar que la fijación de nitrógeno por célula **fué** también mayor en cultivo mixto que en cultivo puro nos permitió concluir que la promoción en la actividad de la nitrogenasa no se debió a un incremento poblacional de *A. brasilense* Cd al creerse en cultivo mixto con *Staphylococcus sp.* Algunos trabajos han obtenido resultados semejantes en la fijación de nitrógeno de bacterias diazotróficas al creerse en cultivo mixto con otras cepas bacterianas. Drosdowicz y Ferreira-Santos (1987) midieron los efectos de 50 cepas de **bacterias Gram-negativas** y de 29 **Gram-positivas** sobre la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd ó de *A. lipoferum* Br17, y encontraron que seis cepas afectaron significativamente la actividad diazotrófica de *A. brasilense* Cd ó de *A. lipoferum* Br17. Los autores concluyeron que la promoción en la actividad de la nitrogenasa no se debió a un incremento poblacional de las cepas diazotróficas ya que el nivel poblacional de las cepas no se incrementó paralelamente con la fijación de nitrógeno.

Al desarrollarse *Staphylococcus sp.* y *A. brasilense* Cd en cultivo mixto, el crecimiento de la primera disminuye drásticamente sobre todo después de 96 horas de incubación. Sin embargo,, se observa que al crecer *Staphylococcus sp.* bajo las mismas condiciones de crecimiento pero en cultivo puro, el nivel poblacional permanece estable a través del tiempo. Una explicación a este descenso podría ser que al crecer las dos cepas en cultivo mixto se establece una competencia por la fuente de nitrógeno (0.01% de extracto de levadura) mostrando *A. brasilense* Cd mayor capacidad para buscar y consumir el poco nitrógeno disponible en el medio de cultivo. Se ha reconocido la capacidad de *Azospirillum* para competir eficazmente por nutrientes en la **rizosfera** (Bashan y **Levanony**, 1990). Sin embargo, se descartó esta posibilidad ya que *Staphylococcus sp.* logró mantener su nivel poblacional relativamente estable aun en un medio sin fuente alguna de

nitrógeno. Un fenómeno similar ocurrió al asociar *A. brasilense* Cd y *Arthrobacter giacomelloi* en cultivo mixto: Un filtrado libre de células de *A. brasilense* Cd inhibió el crecimiento de *A. giacomelloi* (Lippi et al., 1992). Estos son los únicos trabajos donde se reporta que *Azospirillum* tenga actividad antagónica sobre el crecimiento de bacterias y son de interés porque este fenómeno podría ser uno de los mecanismos de *Azospirillum* para promover el crecimiento de las plantas: la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas en plantas.

Se intentó relacionar el incremento en la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd con una reducida concentración de oxígeno disuelto en el cultivo mixto, lo cual resultaría favorable para *A. brasilense* Cd por ser ésta una bacteria que fija nitrógeno bajo condiciones microaerofilicas, sin embargo, se encontró que la concentración de oxígeno en los cultivos mixtos era mayor (15-20 μM) que la concentración considerada óptima para la fijación de nitrógeno de *Azospirillum* (0.6-8 μM) (Hurek et al., 1988). Hurek et al. (1987) encontraron que *A. halopraeferens* y *A. lipoferum* cultivadas bajo presiones de oxígeno electrónicamente reguladas y en agitación, no fijaron cantidades **detectables** de nitrógeno al ser incubados a concentraciones de oxígeno disuelto de 10 y 12 μM respectivamente (Hurek et al., 1987). Estos resultados **difieren** con los resultados obtenidos para *A. brasilense* Cd en nuestros experimentos ya que se obtuvo actividad diazotrófica aún a concentraciones de oxígeno consideradas inhibitorias. Esta diferencia puede explicarse **ya** que en el estudio realizado por Hurek et al., (1987) las condiciones de cultivo eran de agitación, lo cual no permitió la formación de gradientes de oxígeno y agregados celulares, (ambos eventos comunes en cultivos sin agitación) los cuales permiten la formación de microambientes apropiados para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno (Okon et al., 1983). Ya que la concentración de oxígeno disuelto era más alta en el cultivo mixto que en el cultivo puro, deducimos que el oxígeno

no era un parámetro predominantemente responsable en la promoción de la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. Esto no excluye la posibilidad de que el cultivo mixto proporcionó las condiciones de cultivo que indirectamente incrementaron la tolerancia de la nitrogenasa a concentraciones más altas de oxígeno. Cultivos mixtos de *A. brasilense* y *Arthrobacter giacomelloi* mostraron fijación de nitrógeno alta aún bajo concentraciones de oxígeno reportadas como inhibitorias de la nitrogenasa (10 μM). Estos resultados no estuvieron relacionados con un incremento en la asimilación de oxígeno en los cultivos mixtos y **por** lo tanto no apoyan la hipótesis de que en éste cultivo mixto existe protección a la nitrogenasa por medio de una alta tasa de actividad respiratoria, como ocurre en el caso de *Azotobacter* (Cacciari et al., 1989).

El separar a *A. brasilense* Cd de *Staphylococcus* sp. utilizando un tubo de diálisis, así como la incorporación del dializado libre de células de *Staphylococcus* sp. al cultivo de *A. brasilense*, nos permitió suponer que sustancia(s) que se estaban filtrando del tubo de diálisis, estaban promoviendo la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. El hecho de que la fijación de nitrógeno fue mayor en aquellos cultivos con *Staphylococcus* sp. contenida dentro de un tubo de diálisis, que en los cultivos donde el estafilococo se encontraba en asociación libre con *A. brasilense* Cd, sugiere que esta promoción es probablemente debida a que alguna(s) sustancia de alto peso molecular producidas por *Staphylococcus* sp. no pasaron a través de la membrana y no reprimieron parcialmente la fijación de nitrógeno. Los experimentos realizados con células muertas por autoclave de *Staphylococcus* sp. sugieren que se requiere de **células** vivas para que se promueva la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. Sin embargo, para concluir lo anterior es necesario probar el efecto de células muertas de *Staphylococcus* sp. *sin* el uso de la autoclave, ya que es posible que la autoclave haya alterado la(s) sustancia(s) promotoras de la actividad

diazotrófica de *A. brasilense* Cd y que éstas sustancias sean producto de la descomposición de células muertas de *Staphylococcus sp.*

La actividad del dializado (obtenido en medio de cultivo sin extracto de levadura) de *Staphylococcus sp.* sobre la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd, dependió de la concentración en la que era incorporado. La actividad de la nitrogenasa puede ser inhibida por altas concentraciones de nitrógeno total en el medio de cultivo (Hartmann, 1989). Concentraciones mayores a 50 mg N/l reprimió en un 50% la reducción de acetileno por *A. bradense* (Das and Mishra, 1982a). La concentración de nitrógeno total encontrada en el dializado de *Staphylococcus sp* (33 mg/l) fue menor al valor reportado como represor para la actividad de la nitrogenasa. Por esta razón deducimos que la concentración de nitrógeno total encontrada en el dializado no fue el factor que provocó que el dializado agregado a un 100% de su concentración no incrementara la actividad diazotrófica de *A. brasilense* Cd al compararse con el incremento provocado por el dializado agregado a un 25% o a un 50% de su concentración. De manera similar a nuestros resultados, filtrados diluidos libres de células de *Arthrobacter giacomelloi* estimularon significativamente la fijación de nitrógeno y el crecimiento celular de *A. brasilense* Cd, mientras que el filtrado sin diluir inhibió tanto a la nitrogenasa como al crecimiento (Lippi et al., 1992). Los autores no lograron identificar la naturaleza de la(s) sustancia(s) promotora(s).

Se logró detectar ácido aspártico en el dializado de *Staphylococcus sp.* y se demostró que al agregar este aminoácido al cultivo de *A. brasilense* Cd en una concentración equivalente a la encontrada en el dializado (0.6 mM), se incrementó la fijación de nitrógeno de la bacteria diazotrófica. Está bien documentado que en organismos diazotróficos, diferentes a *Azospirillum*,

los aminoácidos pueden aumentar o inhibir la actividad de fijación de nitrógeno (Hartmann et al., 1988); Das y Mishra (1982 b) encontraron que el ácido aspártico estimula a la nitrogenasa de *A. brasilense* Sp7 a una concentración 2 mM, mientras que concentraciones mayores de ácido aspártico (10 mM) no lograron promover la fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Sp7 (Hartmann et al., 1988). La incorporación de ácido aspártico al cultivo de *A. brasilense* Cd, promovió la fijación de nitrógeno de ésta ultima de manera similar a reportes anteriores al incorporar histidina, la cual promovió la actividad diazotrófica de **varias** cepas de *A. brasilense* (Hartmann et al., 1988).

Bajo condiciones de tensión osmótica, los aminoácidos y sus derivados son los solutos compatibles dominantes en organismos tan filogenéticamente diversos como bacterias halotolerantes, plantas halófitas, invertebrados marinos y lampreas (Yancey et al., 1982). Existen en la literatura estudios que discuten la participación de los aminoácidos en la fijación de nitrógeno bajo estas condiciones. Adicionalmente se ha encontrado que la incorporación de los osmoreguladores glicina-betaína y N-dimetilglicina estimularon la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Sp7, **sin** embargo, no lograron incrementar el crecimiento de la cepa (Hartmann, 1988). Así mismo, se reportó una alta correlación entre la escasa asimilación de estos compuestos por parte de la cepa, con el potencial de estas sustancias como osmoreguladores: las propiedades osmoreguladoras de *A. brasilense* sp7 fueron promovidas debido a la acumulación intracelular de estos compuestos durante condiciones de tensión osmótica (Hartmann et al., 1991). Según los resultados de este trabajo, es posible que bajo las condiciones de tensión osmótica provocadas al crecer *A. brasilense* Cd en el medio HGB con alto contenido de sales, el ácido aspártico haya participado como osmoregulador, promoviendo de esta manera la fijación de

nitrógeno bajo las condiciones descritas las cuales normalmente inhiben esta actividad. Es necesario explorar más ampliamente la posibilidad de la participación del ácido aspártico como osmoregulador en la asociación entre *Staphylococcus sp.* y *A. brasilense* Cd.

El incremento en la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd causado por la adición de ácido aspártico (0.6 mM) fue menor que el tratamiento en el cual se agregó al cultivo de *A. brasilense* el dializado de *Staphylococcus sp.* diluído a un 50% de su concentración. Estos resultados sugieren que el ácido aspártico es probablemente sólo uno de los metabolitos presentes en el dializado con la habilidad de promover la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. También es posible que la promoción sea un resultado de la suma de los efectos de varios metabolitos todavía indefinidos producidos por *Staphylococcus sp.*, los cuales se encuentran presentes en el dializado. La adición de la fracción proteica del dializado de *Staphylococcus sp.* (obtenida al pasar el dializado por una columna de Sephadex G25 equilibrada con agua destilada) al cultivo puro de *A. brasilense* Cd, logró incrementar ligeramente y sin significancia estadística la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. Este experimento debe repetirse ya que el método de separación utilizado pudo haber reducido la actividad promotora de la fracción proteica, al disminuir su concentración original a través del proceso de elución.

El pH del dializado fue ligeramente mayor que el medio de cultivo sin inocular (6.94 para el medio de cultivo y 7.04 para el dializado), sin embargo, no se analizó el efecto del pH sobre la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd.

Se encontró que de manera similar a *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus epidermidis* promueve la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. Sin embargo, *Micrococcus lylae*, aunque aislada de la misma fuente, no logró incrementar la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. El

haber encontrado que otra especie del género *Staphylococcus* (*S. epidermidis*), **fue** también capaz de promover la actividad diazotrófica de *A. brasilense* Cd señalan el potencial de interacciones positivas para la fijación de nitrógeno entre los géneros *Azospirillum* y *Staphylococcus*, potencial que hasta el momento no ha sido evaluado. Drosdowicz y Ferreira Santos (1987) probaron el efecto de 79 especies bacterianas sobre la actividad de la nitrogenasa de *Azospirillum* en cocultivos y no encontraron correlación entre la posición taxonómica de las bacterias y su efecto positivo o negativo sobre la actividad diazotrófica de *Azospirillum*, **sin embargo** sus experimentos no incluyeron cepas del género *Staphylococcus*.

Es claro que los resultados obtenidos *in vitro* no pueden ser transferidos directamente a lo que ocurre *in situ*, **sin embargo**, éste y otros estudios realizados en el laboratorio nos indican el potencial y capacidad fisiológica de los microorganismos que nos interesa estudiar.

La promoción de la actividad diazotrófica de *A. brasilense* inducida en un medio con alto contenido de sales, sugieren la inoculación mixta de *Staphylococcus sp.* y *A. brasilense* Cd en plantas bajo condiciones de tensión salina. La liberación de ácido succínico por *Staphylococcus sp.* proveería a *A. brasilense* de una fuente de carbono contribuyendo así a la sobrevivencia de *A. brasilense* en la rizosfera. Los ácidos orgánicos son la fuente principal de carbono de *Azospirillum* (Hartmann et al., 1988). La liberación de ácido aspárico proporcionaría a *A. brasilense* Cd una sustancia promotora de su actividad diazotrófica. Es probable que una inoculación combinada de estas cepas promueva el crecimiento de plantas en mayor grado que una inoculación utilizando únicamente a *A. brasilense* Cd.

Una de las metas a largo plazo que este tipo de trabajo de investigación pretende lograr es la reforestación de suelos afectados por salinización en nuestro Estado y este trabajo representa un primer paso hacia el logro de esta meta.

CONCLUSION

Concluimos que en cultivos mixtos de *A. brasilense* Cd con *Staphylococcus* sp. la fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Cd se incrementa significativamente. Esta promoción no se relaciona con un incremento en el nivel poblacional de *A. brasilense* Cd ni tampoco con una baja concentración de oxígeno disuelto en los cultivos mixtos. Los resultados sugieren que la promoción en la actividad diazotrófica de *A. brasilense* Cd puede ser debida parcialmente a la liberación de ácido aspártico por células de *Staphylococcus* sp. El hecho de que *S. epidermidis* también haya promovido la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd, señalan la **posibilidad** de interacciones positivas relacionadas con la actividad diazotrófica, entre *A. brasilense* Cd y bacterias del género *Staphylococcus* aisladas del medio marino.

La combinación inusual de **la** bacteria terrestre *A. brasilense* Cd **con** la bacteria marina *Staphylococcus* sp., bacteria no fijadora de nitrógeno aislada de las raíces del **mangle**, puede tener un potencial de aplicación en el desarrollo de inoculantes mixtos sobre todo en suelos afectados por salinización.

Este tipo de trabajos tienen relevancia en México y en el estado de B.C.S. ya que son trabajos pioneros que tienen como metas a largo plazo contribuir a solucionar el problema de

desertificación provocado por la salinización y nace de la preocupación por el deterioro del medio ambiente, el cual además de ocasionar problemas de salud, incide sobre la economía del Estado.

RECOMENDACIONES

Los experimentos realizados en esta tesis no **fueron** suficientes para explicar por qué el nivel poblacional de *Staphylococcus* sp. decae al crecer en cocultivo con *A. brasilense* Cd. Hasta ahora no se han reportado efectos inhibitorios por parte de *Azospirillum* spp hacia el crecimiento o metabolismo de otras bacterias, por lo que este fenómeno requiere una investigación más amplia.

Se requiere determinar si es esencial la presencia de **células** vivas de *Staphylococcus* sp. para lograr promover la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd. Esta duda logrará aclararse al incluir en el experimento células muertas por calor, sin el uso de la autoclave.

Los resultados obtenidos en ésta tesis sugieren investigar los efectos que un inoculante mixto de *Staphylococcus* sp. y *A. brasilense* Cd pudiera tener sobre plantas halotolerantes

Se requiere analizar los factores que incrementaron la fijación de nitrógeno de *A. brasilense* Cd, al creerse en cocultivo con *S. epidermidis*, además de investigar si bacterias del género *Staphylococcus* en general, presentan la capacidad de promover la fijación de nitrógeno por *A. brasilense* Cd, y si esta actividad promotora se extiende también para otras especies de *Azospirillum*.

Para aquellas **areas** de nuestro estado de Baja California **Sur** afectados por salinización, recomendamos su reforestación con plantas del desierto, por ser éstas excelentes estabilizadores del suelo superficial. Algunas de estas plantas halotolerantes podrían ser utilizadas como forraje convirtiéndose así en una fuente de ingresos para la región.

LITERATURA CITADA

Ansari R y Flowers T. J. (**1994**) Factors governing salt tolerance in a wide spectrum of grasses. En **Transactions** of the 15th World **Congress** of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.) **3b**, 364-365. Ed. International Society of Soil Science.

Barbieri P., Zanelli T., Galli E., y Zanetti G. (1986) Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. FEMS Microbiology Letters 36, 87-90.

Bashan Y. (1993) Potential use of *Azospirillum* as biofertilizer. Turrialba 43, 286-291.

Bashan Y., Harrison S.K., y Whitmoyer RE. (1990) Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. Applied and Environmental Microbiology 56, 769-775.

Bashan Y. y Holguin G. (1994) **Root-to-root** travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2 120-2 13 1.

Bashan Y. y Holguin G. (1995) **Inter-root** movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of **crop** and weed seedlings **growing in soil**. Microbial Ecology.29, 269-281.

Bashan Y., Holguin G. y Lifshitz R. (1993) Isolation and characterization of plant-growth promoting **rhizobacteria**. En Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology (B.R Glick y J.E. Thompson Eds.), pp. 331-342. CRC Press, Florida.

Bashan Y., Holguin G. y Puente M.E. (1992 a) Alternativa Agrícola regional por fertilizantes bacterianos. En Uso y Manejo de Los Recursos Naturales en La Sierra de La Laguna Baja California Sur (A. Ortega , Ed). Editorial del Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur. pp. 47-67

Bashan Y., Holguin G., Puente M.E., Carrillo A., Lopez-Cortes A., Li Ch., y Vega de Rojas R (1992 b) Synergism between mycorrhizae and **nitrogen** fixing bacteria **on** desert plant growth to prevent soil **erosion** and respiratory **illnesses**. Biological **Nitrogen** Fixation Networking Workshop **Cancún**, México, Diciembre 2-5. Resumen #40, sección 13.

Bashan Y., y Levanony H. (1987) Horizontal and vertical movement of *Azospirillum_brasilense* Cd **in** the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds **in controlled** and field environments. Journal of General Microbiology 133, 3473-3480.

Bashan Y. y Levanony H. (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for **agriculture**. Canadian Journal of Microbiology 36, 591-608.

Bashan Y., Puente M.E., Rodriguez-Mendoza M.N., Toledo G., **Holguin** G., Ferrera-Cerrato R. y **Pedrin** S. (1995) Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Applied Environmental Microbiology 61, 1938-1945.

Bashan Y., Singh M. y Levanony H. (1989) Contribution of *Azospirillum brasifense* Cd to growth of tomato seedlings **is not through nitrogen** fixation. Canadian Journal of Botany 67, 2429-2434.

Beckers H.J., Van Leusden F.M., y Tips P.D. (1985) Growth and enterotoxiu production of *Staphylococcus aureus* in shrimp. Journal of Hidrology 95, 685-693.

Beijeriuck M.W. (1925) Uber **ein Spirillum**, welches freien Stickstoff **binden kann?** Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, **Infektionskrankheiten** und hygiene. Naturwissenschaftliche Abteilonq 2, 63, 353-359.

Brenner D.J. (1986) Facultatively **anaerobic** Gram negative rods; Family 1, Enterobacteriaceae. En Bergey's Manual of Svstematic Bacteriology (N.R Krieg y J.G. Holt Eds.), Ed. Williams and Wilkins, 1,475.

Cacciari I., Lippi D., **Ippoliti** S., Pietrosanti T. y Pietrosanti W. (1989) Response to oxygen of diazotrophic *Azospirillum brasíense* - *Arthrobacter giacomelloi* mixed batch culture. Archives of Microbiology 152, 111- 114.

Cohen E., Okon Y, Kigel J., Nur I. y Henis Y. (1980) **Increase in** dry weight and total **nitrogen content** in *Zea Mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. Plant Physiology 66, 746-749

Das A. y Mishra A.K. (1982 a) Effect of inorganic **nitrogen** sources **on** growth and acetylene reduction **in** *Azospirillum brasilense*. Indian Journal of Experimental Biology 20, 590-594.

Das A. y Mishra A.K. (1982 b). Effect of yeast **extract**, **casamino** acids, peptone and various **l-aminoacids on** growth **and** acetylene reduction **in** *Azospirillum brasilense*. Indian Journal of Experimental Biology 20, 751-755.

Döbereiner J. y Day J.M. (1976) First international symposium **on nitrogen** fixation, Pullman, WA. (W.E. Newton y C.J. Nyman, Eds.) Washington State University Press, Pullman, WA. pp. 518-538.

Drozdowicz A. y Ferreira Santos G.M. (1987) Nitrogenase **activity in mixed cultures** of *Azospirillum* with other bacteria. Zentralblatt für Mikrobiologie 142, 487-493.

Eskew D.L., Focht D.D. y Ting LP. 1977. **Nitrogen fixation, denitrification,** and pleomorphic growth **in** a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. Applied and Environmental Microbiology. 34, 582-585.

Falk E.C., Johnson J.L., **Baldani** V.L.D., Dobereiner J. y Krieg **N.R.** (1986). Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomerans*. International Journal of Systematics and Bacteriology 36, 80-95.

Frommel **M.I.**, Pazos G.S., y Nowak J. (1991) Plant-growth stimulation and biocontrol of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. Fitopatologia 26, 66-73. ↵

Garbaye, J. (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytologist 128, 197-210.

Halsall D.M., y Gibson A.H. (1989) Nitrogenase activity of a range of diazotrophic bacteria on straw, straw breakdown products and related compounds. Soil Biology and Biochemistry 21, 291-298.

Hartmann A. (1988) Osmoregulatory properties of *Azospirillum* spp. En *Azospirillum IV. Genetics, Physiology Ecology* (WeKlingmüller Ed.), B e r l i n .
pp. 122-130

Hartmann A. (1989) Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. En Nitrogen fixation with non-legumes (F.A. Skinner, Ed.). **Kluwer Academic** Publishers
pp. 123-136

Hartmann A., Fu H. y **Burris R.H.** (1988). Influence of **amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum spp.*** Applied and Environmental Microbiology 54, 87-93.

Hartmann A., Prabhu S.R y **Galinski E.A.** (199 1) Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. Plant and Soil137, 105-109.

Holguin G. y **Bashan Y.** (1993) Increasing the nitrogen-fixing **activity_of *Azospirillum*** by mixed culturing with ***Staphylococcus sp.*** En New horizons in nitrogen fixation (R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton, Eds.). Kluwer Academic Publishers, London, p. 726.

Holguin G., Guzmán **M.A.**, y Bashan, Y. (1992) Two new nitrogen-fixing bacteria **from** the rhizosphere of **mangrove** trees; their isolation, identification **and in vitro** interactions with rhizosphere ***Staphylococcus sp.*** FEMS Microbiology Ecology **101**, 207-216.

Hurek T., Reinhold B., Fendrik I., y **Niemann E. G.** (1987) Root-zone **specific oxygen** tolerance of ***Azospirillum spp.*** **and** diazotrophic rods closely associated with **kallar grass.** Applied and Environmental Microbiology 53, 163- 169.

Hurek T., Reinhold B., **Niemann E.G.** y Fendrik I. (1988) **N₂-dependent** growth of ***Azospirillum spp.*** **in batch cultures** at low concentrations of **oxygen.** En *Azospirillum IV: Genetics. Physiology, Ecology.* (W. Klingmüller, Ed.) **Springer-Verlag, Germany** pp. 115- 121.

Isopi R, Fabbri P., Del Gallo M. y Puppi G. (1995) Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. bicolor with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter* diazotrophicus.

Symbiosis 18, 43-55

Khammas KM. y Kaiser P. (1992) **Pectin** decomposition and associated **nitrogen** fixation by **mixed cultures** of *Azospirillum* and *Bacillus* species. Canadian Journal of Microbiology 38, 794-797.

Ladha J.K., So R.B., y Watanabe I. (1987) Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown **in different** soils. Plant soil 102, 127- 129.

Lemanceau P. y Alabouvette C. (1991) Biological control of **fusarium** diseases by **fluorescent** *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. Crop protection 10, 279-286.

Lethbridge G., **Davidson** M.S., y Sparling G.P. 1982. Critical evaluation of the acetylene reduction test for estimating the activity of **nitrogen-fixing** bacteria associated with the roots of wheat **and** bar-ley. Soil Biology and Biochemistry 14, 27-35.

Li C.Y., Massicotte H.B., y Moore L.V.H. (1992) Nitrogen-fixing *Bacillus* **sp.** associated with **Douglas-fir** tuberculate ectomycorrhizae. Plant and Soil 140, 35-40.

Lindberg T. y **Granhall** U. (1984) Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. Applied and Environmental Microbiology 48, 683-689

Lindermann RG. y Paulitz T.C. (1990) Mycorrhizal-rhizobacterial interactions. En Biological control of soil-borne plant pathogens (D. Homby, Ed.), pp. 261-283. CAB International, Wallington.

Lippi D., Cacciari I., Pietrosanti T., y Pietrosanti W. (1992) Interactions between *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed culture. Symbiosis 13, 107- 114.

López J.M., y Ortega M. (1994) Germination of four plant species irrigated with saline solutions. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.) . Ed. International Society of Soil Science. **3b**, 376-377

Lorito M., Di Pietro A., Hayes C.K., Woo S.L. y Harman G.E. (1993) Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. Phytopathology 83, 721-728.

Mascarua-Esparza M.A., Villa-Gonzalez R., y Caballero-Mellado J. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. Plant and Soil 106, 91-95.

Matsumoto S., Zhao Q., Yang J., Zhu S., y Li L. (1994) Salinization and its environmental hazard **on** sustainable **agriculture in** East Asia and its neighboring regions. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.). Ed. International Society of Soil Science, **3a**, 236-255

Michiels K., Vanderleyden J. y Van Gool A. 1989. *Azospirillum-plant* root associations: a **review**. **Biology and Fertility of Soils** 8, 356-368.

Okon Y., Albrecht S.L., y Burris RH 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it **in pure culture** and **in** association with plants. **Applied and Environmental Microbiology** 33, 85-88.

Okon Y., Nur I., y Henis Y. (1983) Effect of oxygen concentration **on electron** transport **components** and microaerobic properties of *Azospirillum brasilense*. En *Azospirillum II. Genetics. Physiology, Ecology* (W. Klingmüller, Ed.). Birkhäuser Verlag, **Basel**, pp. 115-126.

Okon Y. y Labandera-González C. (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry** 26, 1591-1601.

Pedrin-Avilés S., Padilla-Arredondo G., Díaz-Rivera E., Sirkin L. y Stuckenrath R. (1990) Estratigrafía del pleistoceno superior-holoceno en el **area** de la laguna costera de Balandra, estado de Baja California Sur. Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología 9, 170-176.

Peoples M.B., Henidge D.F. y Ladha J.K. 1994. Biological **nitrogen** fixation: **An efficient source of nitrogen** for sustainable agricultural production. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.) Ed. **International Society of Soil Science**, **4a**, 241-262.

Polonenko D.R. (1994) **Commercial opportunities** for multi-organism inoculants. In Proceedings of the BIOREM 4th Annual General Meeting (J.J. Germida, Ed.), pp. 12-14.

Puente M.E. y Bashan Y. (1993) Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant **columnar cardon** cactus (*Pachycereus pringlei*). Symbiosis 15, 49-60.

Rennie R.J. (1981) A single medium for the isolation of acetylene-reducing (**dinitrogen-fixing**) bacteria from soils. Canadian Journal of Microbiology 27, **8-14**.

Rice W.A., Olsen P.E. y Leggett M.E. (1994) Development of a multi-organism **inoculant**. En Proceedings of the BIOREM 4th Annual General Meeting, (J. J. Germida, Ed.), pp. **16-18**.

Ríos G., Ortega M., Velazquez J., y **Rodriguez** O. 1994. Effects of salinity on **corn** and beans germination. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.). Ed. **International Society of Soil Science**. **3b**, 330-331

Robyt J.F. y White B.J. (1987) Biochemical techniques. Theory and Practice. Press Inc. Illinois, USA. pp. 227,228.

Rosen H. (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for **amino acid**. Archives of Biochemistry and Biophysics 67, 10- 15.

Sandoval-Villa M., y Estrada J.W. (1991) Desertificación en el municipio de **Cuauhtemoc**, Colima. Terra 9, 104- 113.

Sasser M. (1990) Identifikation of bacteria through fatty **acid** analysis. En Methods in Phytobacteriology (Z. Clement, K. Rudolph y D.C. **Sands**, Eds.). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 199-204.

Shaffer M.J. y Wylie B.K. (1994) Identifikation **and** mitigation of **nitrate leaching** hot spots using **NLEAP/GIS** technology. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.). Ed. International Society of Soil Science. **5a**, 151- 164

Shevyakova N.I. (1994) Halophytic **shrub** plantations and their role **in salt** cycling of the Aral Sea former bottom. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.) Ed. Intemational Society of Soil Science. **3a**, 357

Singh C.S., y Subba **Rao** N.S. (1979) Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* **on** nodulation and yield of soybean (*Glycine max*). Plant Soil 53, 387-392.

Smibert R.M y Krieg N.R (1981) General characterization. En Manual of Methods for General Americanogy (P. Gerhardt Ed.). Microbiology, USA, pp. 409 - 443.

Subba **Rao** N.S., Tilak **K.V.B.R.**, y Singh C.S. (1985 a) Effect of **combined** inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza **on pearl** millet (*Pennisetum americanum*). Plant and Soil **84**, 283-286.

Subba **Rao** N.S., Tilak K.V.B.R, y Singh C.S. (1985 b) Synergistic effect of -vesicular-arbuscular mycorrhizas and *Azospirillum brasilense* **on the** growth of **barley** in pots. Soil Biology and Biochemistry 17, 119- **121**.

Sundara Rao W.V.B., y **Sinha** M.K. (1963) Phosphate dissolving **microorganisms** in the soil and rhizosphere. Indian Journal of Agricultural Sciences **4**, 272-278.

Szabolcs I. (1994) **Prospects** of soil salinity for the 21st century. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science. (J.D. Etchevers, Ed.). Ed. International Society of Soil Science. **1**, 123-141

Tarrand J.J., Krieg **N.R.**, y Dobereiner J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) **comb. nov.** and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology 24, 967-980.

Tyler M.E., Milam J.R., Smith R.L., **Schank** S.C. y Zuberer D.A. (1979) Isolation of *Azospirillum* **from diverse** geographic regions. Canadian Journal of Microbiology 25, 693-697.

Vazquez-Correa P., Holguin G., Lopez-Cortes A. y Bashan Y. 1994. Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociadas a la rizosfera de los mangles: *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*. X Simposium Internacional de Biología Marina 13-17 Junio 1994, Ensenada, Baja California. p. 86.

Wahbeh M.I. y Mahasneh A.M. (1984) Heterotrophic bacteria attached to **leaves**, rhizomes and roots of three seagrass species **from** Aqaba (Jordan). Aquatic Botany, 20, 87-96.

Will M.E. y Sylvia D.M. (1990) Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer, and vesicular-arbuscular mycorrhizal **fungi** with sea oats. Applied and Environmental Microbiology **56**, 2073-2079.

Williams P.J.L., y **Jenkinson** N.W. (1982) A transportable **microprocessor-controlled** precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. Limnology and Oceanography **3** , 576-584.

Yahalom E., Okon Y., y Dovrat A. (1987) *Azospirillum* effects **on** susceptibility to *Rhizobium* nodulation and **on nitrogen** fixation of several forage legumes. Canadian Journal of Microbiology **35**, 510-514.

Yancey P.H., Clark M.E., **Hand** S.C., Bowlus R.D., y Somero G.N. (1982) Living with water stress: Evolution of **osmolyte** systems. Science **217**, 1214-1222.

Zapata R.R. y **Rodriguez** F.C. 1994. Study of the salinity for **the** Nextlalpan Municipio, **State** of **Mexico**. En Transactions of the 15th World Congress of Soil Science, (J.D. Etchevers, Ed.). Ed. International Society of Soil Science. **3b**, 318, 319.

ANEXOS

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS.

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTIFICAS INTERNACIONALES CON ARBITRAJE

Holguin G. Y Bashan Y. (1995) Co-culturing of *Azospirillum brasilense* Cd with the mangrove rhizosphere bacteria *Staphylococcus sp.* promotes its nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry (Enviado)

Bashan Y., Holguin, G y Carrillo A. (1995) Bacterial inoculants: current status and future challenges. Microbiological Reviews (Enviado).

CAPITULOS EN LIBROS

Holguin G. Y Bashan Y. (1993) Increasing the nitrogen-fixing activity of *Azospirillum* by mixed culturing with *Staphylococcus sp.* En New horizons in nitrogen fixation. Series: Current plant science and biotechnology in Agriculture, vol. 17. (R. Palacios, J. Mora y W.E. Newton, Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 726.

Holguin G., Bashan Y., Toledo G. y Vazquez P. (1995) Microbiology of a mangrove community **in** the **desert** of Baja California Sur, Mexico. En Pacific Fisheries Technologies. (R Pacheco Aguilar, Ed.) The **Center** for Food Research and Development, Hermosillo, Sonora, Mexico. (Aceptado).

Bashan Y., **Holguin G.**, Alcaraz-Melendez L., Castellanos T. y Carrillo A. (1995) *Azospirillum* and other non-biocontrol PGPR: do they **have** a place **in** the **agricultural** future of developing countries? En Bioem. (C. Chanway, Ed.) Vancouver, Carrada. (en prensa)

Bashan Y., Carrillo A., y **Holguin G.** (1995) New synthetic and multi-species bacterial inoculants. En Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation. (I. Tikhonovich, Ed.) St. Petersburg, Russia. (Aceptado).

Bashan Y., **Holguin G.** y Carrillo A. (1995). Mixed bacterial inoculants and micro-encapsulated synthetic inoculants: present status and **future prospects**. En: International Workshop on Associative Interactions of Nitrogen-Fixing Bacteria with Plants. Saratov, Russia. pp. 42-44.

RESUMENES PUBLICADOS EN MEMORIAS DE CONGRESOS

Holguin G. y Bashan Y. (1992) Increasing the nitrogen-fixing activity of *Azospirillum* by mixed culturing with *Staphylococcus* sp. 9th International Congress on Nitrogen Fixation. 6-12.12.1992. Cancun, Mexico. Resumen # 857.

Holguin G. y Bashan Y. (1993) *Azospirillum fixes* more nitrogen when interacting with the mangrove rhizosphere bacteria *Staphylococcus* sp. 6th International Symposium on Nitrogen Fixation with non-Legumes. 6-10.9.93, Ismailia, Egipto p. 9.

Holguin G., Bashan Y., Toledo G., Vazquez-Correa P. and Lopez-Cortes A. (1995) Microbiology of mangrove communities. 46th annual Congress of the Pacific Fisheries Technologies, 6-8.2.1995, Mazatlan, Mexico. p. 8.

Bashan Y., Carrillo A., y Holguin G. 1995. New synthetic and multi-species bacterial inoculants for plant growth-promoting rhizobacteria. 10th International Congress on Nitrogen Fixation. 28.5-3.6.1995. St. Petersburg, Russia. Resumen # 653.

DISTINCIONES RECIBIDAS

Primer premio por presentación de poster en el congreso: 9th International Congress on Nitrogen Fixation. 6-12.12.1992. Cancun, Mexico, con el trabajo titulado: Increasing the nitrogen-fixing activity of *Azospirillum* by mixed culturing with *Staphylococcus* sp.

1 CO-CULTURING OF *Azospirillum brasilense* CD WITH THE MANGROVE
2 RHIZOSPHERE BACTERIA *Staphylococcus* SP. **PROMOTES ITS NITROGEN**
3 **FIXATION**

4 Gina Holguin and Yoav **Bashan***

5 Department of Microbiology, Division of Experimental Biology, The **Center** for Biological
6 Research of the Northwest (**CIB**), La Paz, **A.P.** 128, B.C.S., 23000, **Mexico**.

7 No. of pages: 29

8 No. of figures: 6

9 Keywords: *Azospirillum*, beneficial bacteria, co-culture, mangrove, mixed **culture**, mixed
10 inoculant, **nitrogen fixation**, plant-growth promoting rhizobacteria, rhizosphere,
11 *Staphylococcus*.

12 **Running headlines: Increased nitrogen-fixation in *Azospirillum***

13 ***Corresponding author**

14 FAX: 52(112)5-47-10 or 5-36-25

15 E-mail: **Gholguin@cibnor.conacyt.mx** or **Bashan@cibnor.conacyt.mx**

1 Summary- *Azospirillum brasilense* Cd **fixed** more **nitrogen** when grown **in** a mixed culture
2 with *Staphylococcus sp.*, a non-nitrogen fixing bacterium isolated **from** mangrove roots. This
3 was not the result of **an increase in** the bacterial population nor of decreased **oxygen**
4 concentration **in** the mixed culture. Under these conditions, the *Staphylococcus* population
5 **declined** sharply, but not **because** *A. brasilense* Cd was more effective **in competing** for the
6 available nitrogen. . . .

7 The addition of a **cell-free** dialyzate of *Staphylococcus sp.* **culture** medium to the *A.*
8 *brasilense* **culture** significantly promoted the **nitrogen** fixing **capacity** of the latter. When **this**
9 dialyzate was **produced by** culturing *Staphylococcus* **in N-free** medium without yeast **extract**,
10 the increased dialyzate activity depended **on the** concentration. When diluted by volume to 50%
11 and 25% of its original concentration, the **nitrogen fixation** of *A. brasilense* Cd increased
12 significantly; when undiluted, the dialyzate failed to enhance **nitrogen** fixation.

13 Chemical analyses of the dialyzate by thin layer chromatography identified **aspartic acid**; gas
14 chromatography revealed succinic **acid** to be the major **organic acid component**. When
15 **artificially** added to the *A. brasilense* Cd culture, only **aspartic acid** significantly promoted the
16 **nitrogen** fixation of *A. brasilense* Cd.

17 The **nitrogen** fixing ability of *A. brasilense* Cd increased **significantly** when grown **in** mixed
18 culture with the **non-fixing** bacteria *Staphylococcus epidermidis*, but not with *Micrococcus*
19 *lylae*, both isolated **from** mangrove roots.

20 The importance of this finding **in the context** of mixed **inoculants** is discussed.

21

INTRODUCTION

2 *Azospirillum* has **been found** to **colonize, promote** growth and **increase** the y-ield of
3 numerous plant **species** (Bashan, 1993; Bashan and Holguin, 1995; Bashan and Levanony,
4 1990; Okon and Labandera-Gonzales, 1994). However, **some** of these effects can be enhanced
5 when *Azospirillum* **is co-inoculated** with other **microorganisms**. A higher **soybean** yield was
6 obtained when **using** mixed inoculants of *Azospirillum* and *Rhizobium* as compared to
7 inoculations of *Rhizobium* alone (**Singh** and Subba **Rao**, 1979). *Azospirillum*, by enhancing the
8 **proliferation** of root hairs, increased the susceptibility. of forage **legumes** to *Rhizobium* **infection**
9 (Yahalom et al. 1987). A dual **inoculation** of *A. brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhizal
10 **fungi** (VAM) increased the root biomass and the absorption of phosphorus **in pearl** millet
11 (Subba **Rao** et al. 1985a), **barley** yield (Subba **Rao** et al. 1985b) and the **number** of colonization
12 sites of VAM **fungi in** halophytic **plants** growing **in** dunes (Will and **Sylvia**, 1990).

13 Mixed inoculations with **Plant-Growth** Promoting Rhizobacteria (PGPR) can **also** be more
14 beneficial than single ones. A double **inoculation** of *Pseudomonas* **sp.** and *Serratia**plymuthica*
15 **in** tomato **plants** (Frommel et al. 1991), or a mixed **inoculant** of **fluorescent** *Pseudomonas* and a
16 non pathogenic strain of *Fusarium* **oxysporum** (Lemanceau and Alabouvette, 1991) **significantly**
17 decreased the incidence of *Fusarium* **wilt** as compared to single **inoculations**. The **inhibitory**
18 effects of several **fungi on** spore germination was increased by mixing enzymes **from** the
19 biocontrol **fungi** *Trichoderma* *harzianum* and cells of *Enterobacter* *cloacae* (Lorito et al.
20 **1993**).

1 **One** of the **first commercial** mixed inoculants currently under development involves *R.*
2 *meliloti* and the phosphate **solubilizing fungi** *Penicillium bilaii* (Rice et al. 1994); however, this
3 approach **is** facing technical, business and regulatory **difficulties** (Polonenko, 1994).

4 Nitrogen-fixation may be one of the minor mechanisms **involved in** plant growth promotion
5 by *Azospirillum* (Bashan and Levanony, 1990; Michiels et al. 1989). **Despite** the small
6 importance of this mechanism to **plants**, the role of **nitrogen-fixation in** rhizocompetence,
7 survival **in** soil and interactions of *Azospirillum* with other rhizosphere bacteria has **been**
8 overlooked. The success of a *Azospirillum* inoculant **in promoting** plant growth will largely
9 depend **on** its **survival in** the **hostile** soil environment (Bashan et al. 1995) and **on** its movement
10 towards the host plant both **in** bulk soil and **in** the rhizosphere (Bashan and Holguin, 1994;
11 Bashan and Levanony, 1987). The **capacity** of a bacterium to **fix nitrogen** may improve its
12 survival as **compared** to **non-fixing** strains.

13 The interaction of **nitrogen-fixing** bacteria with other bacteria can inhibit or **promote** their
14 diazotrophic activity. This ability to affect nitrogenase **is** quite **common** among bacteria
15 (Drozdowicz and Ferreira Santos, 1987; Isopi et al. 1995). The **nitrogen fixing** activity of
16 *Azospirillum* can be enhanced when associated with other **microorganisms**. The degradation of
17 cellulose by *Cellulomonas* sp. CS1- 17 provided *Azospirillum* sp. DN64 with a **usable carbon**
18 source to obtain **energy** for **nitrogen fixation**. The contribution of *Azospirillum* to *Cellulomonas*
19 **is fixed nitrogen** (Halsall and Gibson, 1989). The association between different *Azospirillum*
20 **species** and the **nitrogen fixer** *Bacillus polymyxa*, enhanced the **nitrogen** fixing activity of the
21 co-cultures as **compared** to **pure** cultures of either *Azospirillum* or *Bacillus*. *Azospirillum* is

1 benefited by the **products** which are **released from** the degradation of **pectin** by *Bacillus*
2 (*Khammas and Keiser, 1992*).

3 **In** preliminary observations, the **nitrogen fixing** activity of *A. brasilense* Cd increased
4 **significantly** when grown **in mixed culture** with the mangrove **rhizosphere** bacteria
5 *Staphylococcus sp.* (*Holguin and Bashan, 1993*), similar to when *Staphylococcus sp.* was
6 grown with the marine **nitrogen-fixer** *Listonella anguillarum* (*Holguin et al. 1992*). This
7 occurred **in** a medium **originally** devised for the isolation of marine **diazotrophic** bacteria (2%
8 **NaCl**) (*Bashan et al. 1993*). This **finding** looks promising for the **future** application of mixed
9 inoculants of *Azospirillum* **in salt-affected** soils.

10 The ongoing **objective** of this work **is** to explore **factors** responsible for enhanced **nitrogen**
11 fixation **caused** by the interaction between these bacteria. This should **serve** as the **first step in**
12 devising a mixed inoculant of *Azospirillum* designed for **salt-affected** soils. A preliminary-
13 account of this study has **been** published elsewhere (*Holguin and Bashan, 1993*).

14 MATERIALS AND METHODS

15 *Bacteria*

16 *Azospirillum brasilense* Cd ATCCand *Staphylococcus sp. BARA90 10* (*Holguin et al.*
17 *1992*) isolated **from** mangrove roots were **used in all** experiments.

1 *Isolation and identification of other non-fixing mangrove rhizosphere bacteria*

2 The isolation site in Balandra lagoon, Baja California Sur, Mexico was described by
3 Pedrín-Avilés et al. (1990) and Holguin et al. (1992). The sampling of mangrove seedlings
4 [*Avicennia germinara* (L.) Stern], preparation of roots, bacterial enrichment and isolation
5 procedure, were as previously described (Holguin et al. 1992). Rennie's medium (Rennie et al.
6 1981) was used as enrichment and growth medium. Rennie's medium was modified and
7 consisted of three components: i) $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 2.7g; KH_2PO_4 , 0.2g; NaCl, 15g; $Na_2FeEDTA$,
8 28.0 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 25.0 mg; yeast extract, 100.0 mg; mannitol, 5.0 g; sucrose, 5.0 g;
9 distilled water, 900 ml; ii) 3 ml of a calcium lactate solution (3.52g dissolved in 30 ml of water);
10 iii) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.0 g; distilled water, 100 ml. The solutions were autoclaved separately and
11 mixed after cooling. Biotine ($5 \mu g l^{-1}$) and p-aminobenzoic acid ($10 \mu g l^{-1}$), sterilized by
12 filtration, were added to the previous mixture. The pH was adjusted to 7.3 with NaOH.

13 Species identification was done by FAME analysis through gas chromatography of cell fatty
14 acid methyl esters that have a chain length between 9 and 18 carbons long (Sasser, 1990).
15 FAME analysis was carried out as a commercial service by Dr. J.W. Kloeppe's laboratory,
16 Auburn University, Alabama, USA. Strain BA9302 was identified as *Staphylococcus*
17 *epidermidis* and BA9303 as *Micrococcus lylae*, the later was isolated by a modified medium
18 devised for the isolation of phosphate solubilizing bacteria (Sundara Rao and Sinha, 1963).

19 *Growth conditions of A. brasilense Cd and Staphylococcus sp.*

20 *A. brasilense* Cd was grown in 50 ml of Nutrient Broth (Merck) supplemented with 2% NaCl
21 under rotar-y agitation (120 rev min^{-1}) for 18 hours at $30^\circ C$ in 250 ml Erlenmeyer flasks. The

1 culture was washed three times at 4°C under sterile conditions at 1700 x g for 10 min with
2 phosphate-buffer-saline (PBS) 0.08M supplemented with NaCl 0.05M, final pH 7.2. The optical
3 density of the bacterial culture was adjusted to 1.0 at 540 nm with PBS, corresponding to 5 X 10⁸
4 cfu ml⁻¹. One ml of this bacterial suspension was inoculated into 60 ml serum bottles sealed with
5 cotton stoppers and containing 13 ml of semi-solid (0.05% agar), N-free HGB medium (Holguin
6 et al. 1992) (although this medium contains 2% NaCl and 0.01% of yeast-extract which was
7 added as a starter for growth) and incubated without movement- at 30C for 48 h. The
8 non-nitrogen fixing bacterium, *Staphylococcus* sp. (Holguin et al. 1992) was grown and washed
9 similarly to *A. brasilense* Cd. The optical density of the culture was adjusted to 1.8 at 540 nm
10 corresponding to 4 X 10⁸ cfu ml⁻¹. Two ml of this suspension was aseptically added to the bottles
11 containing 14 ml of the 48-hour-old culture of *A. brasilense* Cd. Bottles containing 16 ml of pure
12 culture of *Azospirillum* or *Staphylococcus* sp. were used as control.

13 Acetylene reduction assay (ARA)

14 The ARA was performed as previously described (Holguin et al. 1992). As a first
15 evaluation, the acetylene reduction of *A. brasilense* Cd in pure and mixed culture with
16 *Staphylococcus* sp., was evaluated 24, 48, 72, and 96 h after inoculating *Staphylococcus* sp.
17 into the *A. brasilense* Cd culture. A different set of bottles was used for each reading. In
18 subsequent experiments, acetylene reduction was evaluated after only 96 h. The amount of
19 ethylene produced is expressed as nanomoles ethylene per culture or per cell in a 24 hour
20 period. To calculate the total amount of ethylene produced per cell, we divided the total
21 amount of ethylene produced per culture, by the total number of living bacteria present in the

1 culture both values expressed in log numbers. In some experiments the results are expressed as
2 percentage of increase over the control, considering the control as 100%.

3 *Bacterial counts of A. brasilense Cd and Staphylococcus sp.*

4 Bacteria were counted by the conventional plate count method on solid HGB medium for *A.*
5 *brasilense* Cd and on “Agar for staphylococci No. 110” (Bioxon, Mexico) for *Staphylococcus*
6 *sp.* The counting was performed in pure and mixed cultures of both bacteria after 24, 48, 72,
7 and 96 h of inoculating *Staphylococcus sp.* into the *Azospirillum* culture. Bacterial counts of
8 *Staphylococcus sp.* grown in HGB medium without yeast-extract were also determined.

9

10 *Determination of oxygen concentration in the cultures*

11 The oxygen concentration was measured in pure and mixed cultures using an oxygen meter,
12 model 54 ARC (Yellow Springs Instruments, USA) as previously described (Holguin et al.
13 1992) and by a modification of the Winkler method (Williams and Jenkinson, 1981) after 96
14 hours of inoculating *Staphylococcus sp.* into the *Azospirillum* culture.

15 *ARA of A. brasilense Cd in pure and mixed cultures with Staphylococcus sp. contained inside*
16 *a dialysis tubing*

17 *Staphylococcus sp.* suspension was centrifuged at 1700 x g for 10 min at 4C, the supernatant
18 was discarded and the cells were resuspended in half of its original volume in fresh HGB
19 medium. Two ml of this two fold concentrated suspension was aseptically put inside a dialysis
20 tubing (Sigma, pore size of 12 000 daltons). The tubing containing the bacteria was tightly

1 **closed** with a sterile thread and immersed into 14 ml of 48 h old cultures of *A. brasilense* Cd
2 **contained in** 60 ml serum bottles. The **three controls** were: i) **pure** culture of *A. brasilense* Cd,
3 **ii)** a mixed culture of *A. brasilense* Cd and *Staphylococcus sp.*, **and iii) an** empty dialysis tubing
4 immersed **in an** *A. brasilense* Cd culture. ARA of the cultures was **performed after** 96 h.

5 *ARA of A. brasilense Cd after adding a cell-free dialyzate of Staphylococcus sp.*

6 *The acetylene reduction of A. brasilense Cd was evaluated in pure culture compared to the*
7 *addition of either a cell-free dialyzate of Staphylococcus sp., or dead cells (autoclaved) of*
8 *Staphylococcus sp. to the Azospirillum culture. The dialyzate was obtained by introducing the*
9 *previously described two fold- concentrated suspension of Staphylococcus sp. inside a dialysis*
10 *tubing immersed in the same volume of HGB medium. After 96 h of incubation at 30°C under*
11 *stirring conditions, the tubing was discarded, the dialyzate was recovered and 2 ml were added*
12 *to the bottles containing 14 ml of Azospirillum culture. After additional incubation of 24 h at*
13 *30°C, acetylene reduction was determined.*

14 *Evaluation of the activity of the dialyzate produced by growing Staphylococcus sp. in HGB*
15 *medium without yeast-extract.*

16 **The** analysis of the chemical composition of the dialyzate required the **removal** of the
17 yeast-extract **from** the medium. However, it was not known if its **exclusion interfered** with the
18 promotion of the acetylene reduction of *Azospirillum*. *Thus, we* evaluated the promotional
19 activity of the dialyzate **produced** by culturing *Staphylococcus sp.* **in** HGB medium without

1 yeast **extract**. The obtained dialyzate was added to the *A. brasiliense* Cd **cultures** at the
2 following concentrations: 100% (non-diluted) 50% and 25% (diluted by volume **in** PBS).

3 *Amino acid and organic acid analyses of the cell-free dialyzate of Staphylococcus sp.*

4 Total concentration of **amino** acids **in** the dialyzate was determined according to Rosen's
5 method (1957). The qualitative determination of the **amino acid** composition of the dialyzate
6 was done by i) one dimensional, **ii**) two dimensional thin layer **chromatography** (TLC) on silica
7 gel, (Al Sil G, 250 μm layer) and **iii**) **in** automatic TLC **using** the Iatroscan chromatographic
8 analyzer (MK-5 **TLC-FID**, Iatron Laboratories **Inc.**, Tokyo, Japan). Separation of **amino** acids
9 **on** one dimensional TLC was done either with Solvent 1, [**phenol+water (75:25, v/v)**] and
10 Solvent II [**2-propanol** + ammonium hydroxide (**55:45, v/v**)]. **Since** these two solvents gave
11 good resolution, two dimensional TLC was **run first** with solvent 1, followed by solvent II. The
12 **solvents used** for automatic TLC were either Solvent II or Solvent III [2-propanol +
13 Ammonium hydroxide (**70:30, v/v**)]. The Pauly's reagent was **used to detect tyrosine** and
14 **histidine**, the Sakaguchi's reagent for the detection of arginine, and the Ehrlich's reagent for the
15 detection of tryptophan (Robyt and White, 1987). Non-inoculated medium was **used as**
16 control. **Automatic** TLC analyzer was **used** for the quantitative determination of the **amino**
17 acids found **in** the dialyzate. A **common amino acid** analyzer could not be **used since** the
18 dialyzate contained **high** concentrations of salts which interfere **in** the analysis. The **removal** of
19 the **salts** required a **column** not available **in** our laboratories. Total **nitrogen in** the dialyzate was
20 quantified by the Kjeldahl method using a Kjeltac Auto-1030 analyzer (Tecator, Sweden).

1 The qualitative and quantitative analysis of volatile (acetic, **propionic**, butyric, isobutyric,
2 valeric, isovaleric, caproic, isocaproic and heptanoic) and non-volatile **organic** acids (pyruvic,
3 lactic, oxalacetic, oxalic, malonic, **methylmalonic**, **fumaric** and succinic) possibly present **in** the
4 dialyzate was performed by gas chromatography (**GC**) **using** highly graded Sigma chemicals as
5 standards. The extraction was done according to Smibert and **Krieg** (1981). 0.5- 1.0 μl samples
6 were injected **in a** Varian 6000 gas, chromatograph (Varian **Instrument** Group, USA) equipped
7 with a hydrogen flame ionization detector (FID) operated **under** the **following** conditions: A
8 "**Fused Silica**" capillary **column** (Nukol, USA) (**15m, 0.53mm** internal diameter **and 0.5 μm film**
9 **thickness**), **an** initial **column** temperature of 70°C for a period of 5 **min**, followed by **an**
10 increasing **rate in** temperature of 8°C min^{-1} to **reach a constant** level of 140°C for a period of 5
11 **min** (this program **in** temperature control was **run** for every injection), **an injector** temperature
12 of 240°C, a detector temperature of 240°C, **N₂ carrier** gas and **H₂** for the FID were used at a
13 flow **rate** of 2 ml min^{-1} and 30 ml min^{-1} , respectively, and **an air** flow **rate** of 300 ml min^{-1} .

14 *Effect of the **addition of aspartic and succinic acid on the acetylene reduction of A. brasilense***
15 *Cd*

16 **Separate** solutions were prepared containing **full** and half concentrations of aspartic and
17 succinic **acid** found **in** the dialyzate (1.2 **mM** and 0.6 **mM** for **aspartic acid**, and 15.3 **mM** and
18 7.6 **mM** for succinic **acid**), and added (two ml) separately to 14 ml of A. brasilense Cd **cultures**
19 and incubated for 24 h at 30C after which the ARA was performed. Addition of a diluted
20 dialyzate (50% by volume) to *A. brasilense* Cd **culture** was included as a control.

1 *The effect of co-culture with Staphylococcus epidermidis and Micrococcus lylae on the*
2 *acetylene reduction of A. brasilense Cd*

3 *S. epidermidis* and *M. lylae* were both grown and tested in co-cultures with *A. brasilense*
4 Cd, similarly to *Staphylococcus* sp., to analyze their effect on the diazotrophic activity of
5 *Azospirillum*. An ARA was performed after 96 hours of incubation.

6 *Experimental design and statistical analysis*

7 All experiments were repeated at least twice and commonly two to four times each. Each
8 treatment included a minimum of three replicates. The ARA included at least six replicates per
9 treatment where a replicate consisted of one culture. Data presented are the means of all
10 replicates from all experiments showing similar trends accompanied by standard error values.
11 Significance for two sample analyses was determined by Student's t-test at $P \leq 0.05$. For
12 experiments which included several treatments, significance was determined by One-Way
13 Analysis of Variance (ANOVA) at $P \leq 0.05$. Data in percentages was transformed to arc-sin
14 before analysis.

15

RESULTS

16 *Nitrogen fixation of A. brasilense Cd in pure and mixed cultures with Staphylococcus sp. at*
17 *different incubation times*

18 Nitrogen fixation of *A. brasilense* Cd was significantly increased in mixed culture with
19 *Staphylococcus* sp. as compared to pure culture after 24, 48, 72 and 96 h of incubation.
20 (Fig. 1A).

1 **Nitrogen fixation per cell** of *A. brasilense* Cd showed a similar significant **increase** as
2 compared to **pure** culture, at **all** incubation times (Fig. 1 B).

3 *Population levels of A. brasilense Cd and Staphylococcus sp. in pure and mixed cultures at*
4 *different times of incubation*

5 No **significant differences** were **found on** the population levels of *A. brasilense* Cd in **pure**
6 and mixed cultures with *Staphylococcus sp.* after 24, 48, 72 and 96 h of incubation (Fig. 2A).

7 The population level of *Staphylococcus sp.* when grown **in pure** culture with yeast-extract
8 remained **stable** through the whole incubation period (Fig. 2B). However, when grown without
9 yeast extract, the population level **after** 96 h was **significantly** lower than when grown with
10 yeast extract. When grown **in mixed culture** with *A. brasilense* Cd, the bacterial counts of
11 *Staphylococcus sp.* were **even lower**, showing a drastic **decrease in** the population (Fig. 2.B).

12 *Dissolved oxygen concentration in pure and mixed cultures of A. brasilense Cd*

13 The concentration of oxygen **in** mixed cultures of *A. brasilense* Cd was found to be
14 significantly higher than **in pure** cultures **after** 96 h of incubation (Fig. 3) **using** the two different
15 oxygen determination methods.

16 *Nitrogen fixation of A. brasilense Cd in pure and mixed cultures with Staphylococcus sp. cells*
17 *contained inside a dialysis tubing*

18 **Nitrogen** fixation of *A. brasilense* Cd culture was **significantly** higher when associated with
19 *Staphylococcus sp.* contained inside a dialysis tubing as compared to the treatment which

1 included *A. brasilense* mixed with *Staphylococcus* **sp. in free** association. **The** latter mixture
2 showed **also a significant increase in the nitrogen** fixation of *A. brasilense* as compared to **pure**
3 culture. The dialysis tubing had no effect **on the nitrogen** fixation of *A. brasilense* Cd (Fig. 4A).

4 *Nitrogen fixation of A. brasilense Cd culture when mixed with a cell-free dialyzate of*
5 *Staphylococcus sp.*

6 **Nitrogen** fixation of *A. brasilense* Cd was significantly higher **when-mixed** with a cell-free
7 dialyzate of *Staphylococcus* **sp.** as compared to **pure** culture. The addition of dead cells of
8 *Staphylococcus* **sp.** to the *Azospirillum* culture had no effect **on the nitrogen** fixation of the
9 latter (Fig. 4B)

10 *Nitrogen fixation of A. brasilense Cd culture mixed with a cell-free dialyzate of*
11 *Staphylococcus sp. cultured without yeast extract.*

12 A 50% and 25% diluted dialyzate of *Staphylococcus* *sp.* significantly and similarly promoted
13 **nitrogen** fixation of *A. brasilense* Cd as compared to **pure** culture (**Fig.4C**). However, a
14 non-diluted dialyzate (100%) had no effect **on the nitrogen** fixing **capacity** of *A. brasilense* Cd.

15 *Amino acid, organic acid* analyses, *total nitrogen* and *pH* of the cell-free dialyzate of
16 *Staphylococcus sp.*

17 The total **amino acid** concentration of the dialyzate was **found** to be $295.33 \pm 19.55 \mu\text{g ml}^{-1}$.
18 By separating the samples **in an automatic** TLC analyzer (Solvent III) and by the additional use
19 of the **Pauly**, Sakaguchi and Ehrlich reagents, we were **able** to discard the **presence** of several

1 amino acids in the dialyzate such as tyrosine, histidine, arginine and tryptophan. However, the
 2 automatic TLC performed in rods and one dimensional TLC performed on silica gel plates were
 3 not able to distinguish between aspartic acid, leucin, valin, methionine and isoleucine which
 4 gave similar Rf values. Two dimensional TLC on silica gel plates (Solvent II followed by
 5 Solvent I) established that only aspartic acid was present in the *Staphylococcus* dialyzate (Fig.
 6 5A). This results were further confirmed by automatic TLC in solvent II (Fig 5D,E). The
 7 concentration of aspartic acid in the dialyzate was found to be $160 \mu\text{g ml}^{-1}$ (1.2 mM).

8 The determination of possible organic acids in the dialyzate by GC detected mainly succinic
 9 acid in the dialyzate at a concentration of $1806 \pm 53 \mu\text{g ml}^{-1}$ (15.3 mM) (Fig. 5B,C). Malonic
 10 acid was also detected at a concentration of $97 \mu\text{g ml}^{-1}$. The analysis did not detect any
 11 non-volatile organic acids in the dialyzate.

12 The concentration of total nitrogen in the dialyzate was $33 \pm 5 \mu\text{g ml}^{-1}$. The pH of the
 13 dialyzate showed a slight but significant increase averaging 0.11 units above the pH in
 14 non-inoculated medium. No amino acids or organic acids were found in the non-inoculated
 15 medium.

16 *Effect of aspartic, succinic acid and the mangrove rhizosphere bacteria Staphylococcus*
 17 *epidermidis or Micrococcus lylae ott the nitrogen fixation of A. brasilense Cd*

18 The addition of aspartic acid (0.0 mM) to the *A. brasilense* Cd cultures significantly
 19 increased the nitrogen fixation of *Azospirillum* as compared to pure culture (Fig. 6). The
 20 addition of 0.2 mM did not affect the nitrogen fixing activity of *Azospirillum* tlowever. the
 21 nitrogen fixation of *A. brasilense* Cd mixed with the diluted dialyzate was significantly higher

1 than the treatment which included only the addition of aspartic acid. The addition of succinic
2 acid in both concentrations had no effect on the nitrogen fixation of *Azospirillum* (data not
3 shown).

4 Nitrogen fixation of *A. brasilense Cd* was significantly increased when grown in mixed
5 culture with *Staphylococcus epidermidis* (Fig.6). but was unaffected when co-cultured with
6 *Micrococcus lylae* (data not shown).

7 DISCUSSION

8 The concept of multi-organism inoculants as an agricultural practice superior to
9 single-organism inoculation is decades old. Yet, to date, no commercial inoculant of this type
10 exists on the market. The biotechnology industry is still struggling with the practical aspects of
11 the concept (Polonenko, 1994), while attempts at combining fungi and bacteria are in their
12 initial stages (Rice et al. 1994) or being developed into the concept of "helper bacteria" in
13 ectomycorrhizae inoculation for forestry (Garbaye 1994; Li et al. 1992; Lindermann and
14 Paulitz, 1990). As far as we know, no inoculant composed of two bacterial species (apart from
15 a mixture of strains from the same species) passed the experimental stage.

16 Although the inoculation of plants with PGPR may occur naturally, it is mainly an artificial
17 agricultural procedure. As such, *Azospirillum* species originated from Brazil, Pakistan and Iraq
18 are inoculated onto plants that were probably never exposed to these species before like the
19 inoculation of the giant cardon cactus in Mexico (Puente and Bashan, 1993) or weeds in Israel
20 (Bashan and Holguin, 1995). Thus, novel combinations of *Azospirillum* with other bacteria
21 from diverse sources (even with bacteria that do not co-exist in the same ecological niches in

1 nature) should be evaluated since they may have a potential as future inoculants. As an
 2 example for such an approach, *Staphylococcus* sp., a marine non-N₂ fixing mangrove
 3 rhizosphere bacteria was found to increase the nitrogen fixation of the mangrove rhizosphere
 4 nitrogen fixer *Listonella anguillarum* (Holguin et al. 1992). Preliminary experiments showed
 5 that it can exert this capacity over the terrestrial *Azospirillum* as well and even in a greater
 6 magnitude.

7 Nitrogen fixation is one of the main characteristics of *Azospirillum* cells although it is
 8 probably a minor mechanism in plant growth enhancement (Bashan, 1993). The combination of
 9 *Azospirillum* and *Staphylococcus* sp. in co-culture was chosen as a first step and as possible
 10 model for the further development of mixed inoculants, especially to be used under the
 11 salt-stressed conditions found in many semi-arid soils.

12 We found that in mixed culture, *Staphylococcus* sp. is capable of promoting the nitrogen
 13 fixation of *A. brasilense* Cd. This promotion was not accompanied by a parallel growth of
 14 *Azospirillum* populations. Likewise, Drosdowicz and Ferreira Santos (1987) found that out of
 15 50 Gram-negative and 29 Gram-positive bacteria, only six affected the growth and nitrogen
 16 fixation of either *A. brasilense* Cd or *A. lipoferum* Br17. They concluded that the stimulation or
 17 inhibition of nitrogenase activity resulted from the direct action of the "factor(s)" on the
 18 enzyme's activity or synthesis, but not from its effect on the growth of *Azospirillum* cells.

19 The association of *A. brasilense* Cd and *Staphylococcus* sp. is beneficial for *Azospirillum*,
 20 but harmful for the survival of *Staphylococcus* sp. No explanation has yet been found for this
 21 phenomenon. We discarded the notion that *Azospirillum* was more competitive at scavenging
 22 the small amount of nitrogen available in the growth medium, since the survival of

1 *Staphylococcus* was good in pure culture, even in a completely nitrogen-free medium. A
2 Similar phenomenon was detected in the association between *A. brasilense* Cd and
3 *Arthrobacter giacomelloi*: a cell-free filtrate of *A. brasilense* Cd was found to inhibit the
4 growth of the former (Lippi et al. 1992).

5 Our attempt to relate the increased nitrogen fixation to reduced oxygen concentration in the
6 mixed culture (which would be favorable to the microaerophilic *Azospirillum*), revealed that
7 the oxygen concentration in mixed cultures was higher than the optimal concentration for
8 nitrogen fixation of *Azospirillum* (0.6-8 μ M) (Hurek et al. 1988). Batch cultures of *A.*
9 *hnlopraeferens* and *A. lipoferum* grown under stirring conditions in electronically regulated
10 oxygen pressure, did not fix any detectable amount of nitrogen when incubated at 10 and 12
11 μ M dissolved oxygen, respectively (Hurek et al. 1987) unlike *A. brasilense* Cd in our
12 experiments. This difference can probably be explained by the non-static culture conditions in
13 the study of Hurek et al. (1987) which did not allow the formation of self created oxygen
14 gradients and cell aggregates which permit the formation of microenvironments suitable for
15 nitrogen fixation (Okon et al. 1983).

16 Since the concentration of dissolved oxygen was higher in mixed culture than in pure
17 culture, we concluded that oxygen was not a major parameter responsible for the promotion in
18 nitrogen fixation. This does not exclude the possibility that the mixed culture provided culture
19 conditions which indirectly increased the tolerance of nitrogenase to higher concentrations of
20 oxygen. Mixed culture samples of *A. brasilense* and *Arthrobacter giacomelloi* showed high
21 nitrogenase activities under otherwise inhibiting oxygen concentrations. These results were not

1 related to an increase in the oxygen uptake of the mixed cultures and thus do not support the
2 hypothesis of a respiratory protection in this mixed culture (Cacciari et al. 1989).

3 Separating *A. brasilense* Cd from *Staphylococcus* sp. by dialysis tubing in the mixed culture
4 and using cell free dialyzates of *Staphylococcus* sp. helped us to conclude that low molecular
5 weight substance(s) leaking out of the dialysis tubing was responsible for the promotion in the
6 nitrogen fixation of *Azospirillum*. The enhancement in ethylene production of *Azospirillum*
7 when associated with *Staphylococcus* contained inside a dialysis tubing as compared to the
8 ethylene production of *Azospirillum* mixed freely with the cocci in the culture, suggests that this
9 promotion might be due to the removal of high molecular weight inhibitory product(s) that did
10 not pass through the membranes.

11 The activity of the *Staphylococcus* sp. dialyrate on nitrogen-fixation (obtained under
12 yeast-extract-free medium) was found to depend on its concentration. The concentration of
13 total nitrogen found in the dialyrate (33 mg l^{-1}) did not repress nitrogenase. Only concentrations
14 above 50 mg N l^{-1} repressed acetylene reduction in *A. brasilense* (Das and Mishra, 1982a).
15 Similar to our results, diluted cell-free filtrates of *Arthrobacter giacomelloi* significantly
16 stimulated *A. brasilense* nitrogenase activity and cell growth, whereas the whole filtrate
17 inhibited both the activity and growth (Lippi et al. 1992).

18 It has been well documented with other diazotrophic microorganisms that amino acids
19 influence nitrogen fixation activity (Hartmann et al., 1988). Das and Mishra (1982b) found
20 aspartic acid to stimulate nitrogenase activity of *A. brasilense* Sp7 at 2 mM concentration,
21 while higher levels of aspartic acid (10 mM) did not promote nitrogen fixation of *A. brasilense*
22 Sp7 (Hartmann et al., 1988), a strain closely related to strain Cd used in this study. The

1 incorporation of **aspartic acid**, which was the **sole amino acid** found in the *Staphylococcus* sp.
2 dialyzate, into the *A. brasilense* Cd cultures promoted its nitrogen-fixation similarly to histidine,
3 which promoted **nitrogen** fixation in several strains of *A. brasilerae*.

4 The addition of the osmoregulators glycine-betaine and N-dimethylglycine stimulated
5 nitrogen-fixation in *A. brasilense* Sp7 at osmotic stress, but not bacterial growth (Hartmann,
6 1988). The low **utilization** of these compounds for growth correlated well with their potential
7 as osmoregulators: the osmoregulatory properties of *A. brasilense* Sp7 were enhanced by
8 allowing the **intracellular** accumulation of these compounds during osmotic stress (*A. brasilense*
9 spp. are known to be halotolerant strains) (Hartmann et al. 1991). It is possible that under the
10 osmotic stress provoked by growing *A. brasilense* Cd in HGB medium with high salt content,
11 aspartic acid played the role of osmoregulator promoting nitrogen-fixation under otherwise
12 stressful conditions. **Amino** acids and their derivatives are the **dominant solutes** in such
13 phylogenetically **diverse** organisms as **salt-tolerant** bacteria, halophytes, marine invertebrates
14 and hagfishes (Yancey et al. 1989). This question needs to be **further** explored.

15 The enhancement in nitrogen fixation of *A. brasilense* Cd by the addition of aspartic acid
16 alone was lower **than** by adding the diluted dialyzate. This **suggests** that aspartic acid is
17 probably only one of the metabolites in the dialyzate which **have** the ability to **promote**
18 nitrogenase activity. It is also possible that this promotion **results from** the interaction between
19 several undetected metabolites produced by *Staphylococcus* sp. which may be present in the
20 dialyzate.

21 When Drosdowicz and Ferreira Santos (1987) tested the effect of 79 bacterial species on the
22 nitrogenase activity of *Azospirillum* in co-cultures, they found no correlation between bacterial

1 taxonomy and its positive or negative effect on the diazotrophic activity of *Azospirillum*.
2 However, the fact that another staphylococcus isolated from the mangrove rhizosphere
3 *Staphylococcus epidermidis* was also capable of promoting the diazotrophic activity of *A.*
4 *brasilense* Cd point out the potential of positive interactions between the genera *Azospirillum*
5 and *Staphylococcus*, which to the best of our knowledge was not evaluated before.

6 In conclusion, mixed cultures of *A. brasilense* Cd with either the non-N₂-fixing bacteria
7 *Staphylococcus* sp. or *Staphylococcus epidermidis* significantly enhanced its nitrogen fixation.
8 The enhancement was probably partly due to the release of aspartic acid from *Staphylococcus*
9 sp. cells.

10 *Acknowledgements*-This paper is dedicated to the late physician Dr. Gerardo Vazquez Fritz. Without his help
11 and the moral support of all my family, especially my mother, Ma. de La Luz Zehfuss de Holguin and Jaime
12 Gonzalez Cordova, this study would never have been produced. We specially thank Mr. Ariel Cruz for his
13 valuable technical help with gas chromatography and automatic TLC, M Sc. Barbara Gonzalez Acosta for her
14 advice and academic support. Mrs Sonia Rocha for the total nitrogen analysis, Mr. Angel Carrillo for computer
15 enhancing images, Dr. Roy Bowers for his constructive English corrections. Miss Patricia Vazquez for donating
16 the strain of *Micrococcus lylae*, and Dr. Alfonso Maeda and Mrs. Teresa Sicard for helping with the oxygen
17 determinations. Y. Bashan participated in this study for the memory of the late Mr. Avner Bashan from
18 Israel. This paper was partially supported by grants #83917 and #3541-A from Consejo Nacional de Ciencia y
19 Tecnologia (CONACyT) Mexico

20

REFERENCES

21 Bashan, Y. (1993) Potential use of *Azospirillum* as biofertilizer. *Turrialba* 43, 286-291.

- 1 Bashan Y. and Levanony H. (1990) **Current** status of *Azospirillum* inoculation technology:
2 *Azospirillum* as a challenge for **agriculture**. *Canadian Journal of Microbiology* 36,
3 591-608.
- 4 Bashan Y., Holguin G. and Lifshitz R. (1993) Isolation and characterization of plant-growth
5 promoting rhizobacteria. In *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*
6 (B.R. Glick and J.E. Thompson Eds.), pp. 331-342. CRC Press, Florida.
- 7 Bashan Y. and Holguin G. (1994) Root-to-root travel of the **beneficial** bacterium *Azospirillum*
8 *brasiliense*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2120-2131.
- 9 Bashan Y. **and** Holguin G. (1995) Inter-root movement of *Azospirillum brasiliense* and
10 subsequent root colonization of **crop** and weed seedlings growing **in soil**. *Microbial*
11 *Ecology* 29, 269-281.
- 12 Bashan Y., and Levanony H. (1987) Horizontal and vertical movement of *Azospirillum*
13 *brasiliense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds **in** controlled and
14 field environments. *Journal of General Microbiology* 133. 3473-3480.
- 15 Bashan Y., Puente **M.E.**, Rodriguez-Mendoza M.N., Toledo G., Holguin G., **Ferrera-Cerrato**
16 R. and Pedrin S. (1995) Survival of *Azospirillum brasiliense* **in** the bulk **soil** and
17 rhizosphere of 23 soil types. *Applied Environmental Microbiology* 61, 1938-1945.
- 18 Cacciari I., Lippi D., Ippoliti S., Pietrosanti T. and Pietrosanti W. (**1989**) Response to oxygen
19 of diazotrophic *Azospirillum brasiliense* - *Arthrobacter giacomelloi* mixed **batch culture**.
20 *Archives of Microbiology* 152, 111-114.

- 1 Das A. and Mishra A.K. (1982a) Effect of inorganic **nitrogen** sources **on** growth and acetylene
2 reduction in *Azospirillum brasilense*. *Indian Journal of Experimental Biology* 20,
3 590-594.
- 4 Das A. and Mishra A.K. (1982b). Effect of yeast **extract**, **casamino** acids, peptone and various
5 l-aminoacids **on** growth and acetylene reduction **in** *Azospirillum brasilense*. *Indian*
6 *Journal of Experimental Biology* 20, 751-755.
- 7 Drozdowicz A. and Ferreira Santos G.M. (1987) Nitrogenase **activity in** mixed cultures of
8 *Azospirillum* with other bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 142, 487-493.
- 9 Frommel M.I., Pazos G.S., and Nowak J. (1991) Plant-growth stimulation and biocontrol of
10 **Fusarium wilt** (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds
11 with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. *Fitopatologia* 26, 66-73.
- 12 Garbaye, J. (1994) Helper bacteria: a new dimension to the **mycorrhizal symbiosis**. *New*
13 *Phytologist* 128, 197-210.
- 14 **Halsall** D.M., and Gibson A.H. (1989) Nitrogenase activity of a range of diazotrophic bacteria
15 **on** straw. straw breakdown **products** and related compounds. *Soil Biology and*
16 *Biochemistry* 21, 291-298.
- 17 Hartmann A. (1988) **Osmoregulatory** properties of *Azospirillum* spp. In *Azospirillum IV*,
18 *Genetics, Physiology, Ecology* (W. Klingmüller, Ed.), pp. 122-130. Springer-Verlag.
19 Berlin.
- 20 **Hartmann** A., Fu H. and Burris R.H. (1988). Influence of amino acids **on** nitrogen fixation
21 ability and growth of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 54,
22 87-93.

- 1 Hartmann A., Prabhu S.R. and Galinski E.A. (1991) Osmotolerance of diazotrophic
2 rhizosphere bacteria. *Plant and Soil* 137, 105-109.
- 3 Holguin G., Guzmán M.A., and Bashan, Y. (1992) Two new nitrogen-fixing bacteria from the
4 rhizosphere of mangrove trees; their isolation, identification and *in vitro* interactions with
5 rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 101, 207-216.
- 6 Holguin G. and Bashan Y. (1993) Increasing the nitrogen-fixing activity of *Azospirillum* by
7 mixed culturing with *Staphylococcus* sp. In *New horizons in nitrogen fixation* (R.
8 Palacios, J. Mora and W.E. Newton, Eds.). p. 726. Kluwer Academic Publishers, London.
- 9 Hurek T., Reinhold B., Fendrik I., and Niemann E.G. (1987) Root-zone specific oxygen
10 tolerance of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with kallar grass.
11 *Applied and Environmental Microbiology* 53, 163-169.
- 12 Hurek T., Reinhold B., Niemann E.G. and Fendrik I. (1988) N₂-dependent growth of
13 *Azospirillum* spp. in batch cultures at low concentrations of oxygen. In *Azospirillum IV:*
14 *Genetics, Physiology, Ecology*. (W. Klingmüller, Ed.). Springer-Verlag. Germany.
- 15 Isopi R., Fabbri P., Del Gallo M. and Puppi G. (1995) Dual inoculation of *Sorghum bicolor*
16 (L.) Moench ssp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter*
17 *diazotrophicus*. *Symbiosis* 18, 43-55
- 18 Khammas K.M. and Kaiser P. (1992) Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by
19 mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Canadian Journal of Microbiology*
20 38, 794-797.
- 21 Lemanceau P. and Alabouvette C. (1991) Biological control of fusarium diseases by fluorescent
22 *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop protection* 10, 279-286.

- 1 Li C.Y., Massicotte H.B., and Moore L.V.H. (1992) Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated
2 with Douglass-fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil* 140. 35-40.
- 3 Lindermann R.G. and Paulitz T.C. (1990) Mycorrhizal-rhizobacterial interactions. In *Biological*
4 *control of soil-borne plant pathogens* (D. Hornby, Ed.), pp. 261-283. CAB International,
5 Wallington.
- 6 Lippi D., Cacciari I., Pietrosanti T., and Pietrosanti W. (1992) Interactions between
7 *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed culture. *Symbiosis* 13, 107- 114.
- 8 Lorito M., Di Pietro A., Hayes C.K., Woo S.L. and Harman G.E. (1993) Antifungal,
9 synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and
10 *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83, 721-728.
- 11 Michiels K., Vanderleyden J. and Van Gool A. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: a
12 review. *Biology and Fertility of Soils* 8, 356-368.
- 13 Okon Y., Nur I., and Henis Y. (1983) Effect of oxygen concentration on electron transport
14 components and microaerobic properties of *Azospirillum brasilense*. In *Azospirillum II,*
15 *Genetics, Physiology, Ecology* (W. Klingmüller, Ed.). pp.115- 126. Birkhäuser Verlag,
16 Basel.
- 17 Okon Y. and Labandera-Gonzalez C. (1994) Agronomic applications of *Asospirillum*: an
18 evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26,
19 1591-1601.
- 20 Pedrin-Avilés S., Padilla-Arredondo G., Diaz-Rivera E., Sirkin L. and Stuckenrath R. (1990)
21 Estadigrafía del pleistoceno superior-holoceno en el área de la laguna costera de Balandra,

- 1 estado de Baja California Sur. *Revista de la Universidad Nacional Autonoma de Mexico.*
 2 *Instituto de Geologia* 9, 170-176. (In Spanish).
- 3 Polonenko D.R. (1994) **Commercial** opportunities for multi-organism inoculants. In
 4 *Proceedings of the BIOREM 4th Annual General Meeting* (J. J. Germida, Ed.), pp. 12-14.
- 5 Puente M.E. and Bashan Y. (1993) Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains
 6 **on the germination and** seedlings growth of the giant **columnar cardon** cactus
 7 (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15, 49-60.
- 8 Rennie R.J. (198 1) A single medium for the isolation of acetykne-reducing (**dinitrogen-fixing**)
 9 **bacteria from soils.** *Canadian Journal of Microbiology* 27, 8-14.
- 10 Rice W.A., Olsen P.E. and Leggett M.E. (1994) Development of a multi-organism **inoculant.** In
 11 *Proceedings of the BIOREM 4th Annual General Meeting.* (J. J. Germida, Ed.). pp. 16-18.
- 12 Robyt J.F. and White B.J. (1987) Biochemical techniques. Theory and **Practice.** pp. 227,228.
 13 Press **Inc.** Illinois, USA.
- 14 **Rosen** H. (1957) A modified **ninhydrin** colorimetric analysis for **amino acid.** *Archives of*
 15 *Biochemistry and Biophysics* 67, 10- 15.
- 16 Sasser M. (1990) **Identification** of bacteria through fatty **acid** analysis. **In** *Methods in*
 17 *Phytobacteriology* (Z. Clement, K. Rudolph and D.C. **Sands**, Eds.). pp. 199-204.
 18 Akademiai Kiado, Budapest.
- 19 **Singh** C.S., and Subba **Rao** N.S. (1979) Associative effect of *Azospirillum brasilense* with
 20 *Rhizobium japonicum* **on** nodulation and yield of soybean (*Glycine max*). *Plant and Soil*
 21 53, 387-392.

- 1 **Smibert R.M and Krieg N.R (1981) General characterization. In *Manual of Methods for***
2 ***General Bacteriology* (P. Gerhardt, Ed.). pp. 409-443. American Society for**
3 **Microbiology, USA.**
- 4 **Subba Rao N.S., Tilak K.V.B.R, and Singh C.S. (1985a) Effect of combined inoculation of**
5 ***Asospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum***
6 ***americanum*). *Plant and Soil* **84**, 283-286.**
- 7 **Subba Rao N.S., Tilak K.V.B.R., and Singh C.S. (1985b) Synergistic effect of**
8 **vesicular-arbuscular mycorrhizas and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in**
9 **pots. *Soil Biology and Biochemistry* **17**, 119- 121.**
- 10 **Sundara Rao W.V.B., and Sinha M.K. (1963) Phosphate dissolving microorganisms in the soil**
11 **and rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural Sciences* **4**, 272-278.**
- 12 **Yahalom, E., Okon Y., and Dovrat A. (1987) *Azospirillum* effects on susceptibility to**
13 ***Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. *Canadian***
14 ***Journal of Microbiology* **35**, 510-514.**
- 15 **Will M.E., and Sylvia D.M. (1990) Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer, and**
16 **vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. *Applied and Environmental***
17 ***Microbiology* **56**, 2073-2079.**
- 18 **Williams P. J.L., and Jenkinson N.W. (1982) A transportable microprocessor-controlled precise**
19 **Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnology and***
20 ***Oceanography* **3**, 576-584.**
- 21 **Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus RD., and Somero G.N. (1982) Living with**
22 **water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.**

LEGENDS TO FIGURES

1

2 Fig. 1. Nitrogen-fixation Ethylene production per culture (A) and per **cell** (B) of *A. brasilense*
 3 Cd **in pure** culture and **in** mixed culture with *Staphylococcus sp.*, at **different** incubation times.
 4 Every pair of points at **each** incubation time **and in each** sub-figure, denoted by a **different** letter,
 5 **differ** significantly at $P \leq 0.05$ by Student's **t-test**.

6

7 Fig. 2. Population level of *A. brmilense* (A) and of *Staphylococcus sp.* (B) **in pure** culture, **in**
 8 mixed culture, and **in** medium without yeast **extract** at different incubation times. **Bars** represent
 9 SE. In sub-figure A, every pair of points at **each** incubation time denoted by a **different** letter,
 10 differ significantly at $P \leq 0.05$ by Student's **t-test**. In sub-figure B, points denoted by a different
 11 letter **differ** significantly at $P \leq 0.05$ **in** one-way **ANOVA**.

11

12 Fig. 3. Dissolved oxygen concentrations **in pure** cultures of *A. brasilense* **and in** mixed cultures
 13 **with** *Staphylococcus sp.* **after** 96 hours of incubation. **Bars** represent SE. **Columns** denoted by a
 14 different letter differ significantly at $P \leq 0.05$ by Student's **t-test**. **Data presented** was obtained by
 15 the method of Williams and Jenkinson (1982).

15

16 Fig. 4. Percentage of **increase in the nitrogen-fixation** production **from pure** culture of *A.*
 17 *brasilense* under **different** treatments involving interactions with *Staphylococcus* **cells** or
 18 *Staphylococcus* **products**. **Columns in each subfigure** denoted by a **different** letter **differ**
 19 **significantly** at $P \leq 0.05$ **in** one-way **ANOVA**. **Bars** represent SE. Numbers **above pure** culture
 20 **columns indicate** the actual ethylene emission **from** that culture expressed as nanomoles of

1 ethylene produced in 24 h. These numbers serve as the base lines of the calculations presented
2 in this figure.

3 Fig. 5. Computer enhancing image of two dimensional TLC of amino acid standards and a
4 dialyze sample run on silica gel plate (A). Computer enhancing image of organic acids
5 separation obtained by GC, control (B), and dialyze sample (C). Computer enhancing image
6 of amino acids separation obtained by automatic TLC, dialyze sample (D) and standard (E).

7 Fig. 6. Percentage of increase from pure culture in nitrogen fixation of *A. brasilense* under
8 different treatments: in pure culture, in mixed culture with *S. epidermidis*, with aspartic acid,
9 with dialyze of *Staphylococcus* at 50% concentration. Columns denoted by different letters
10 differ significantly at $P \leq 0.05$ in one-way ANOVA. Bars represent SE. Numbers above pure
11 culture columns indicate the actual ethylene emission from that culture expressed as nanomoles
12 of ethylene produced in 24 h. These numbers serve as the base lines of the calculations
13 presented in this figure.

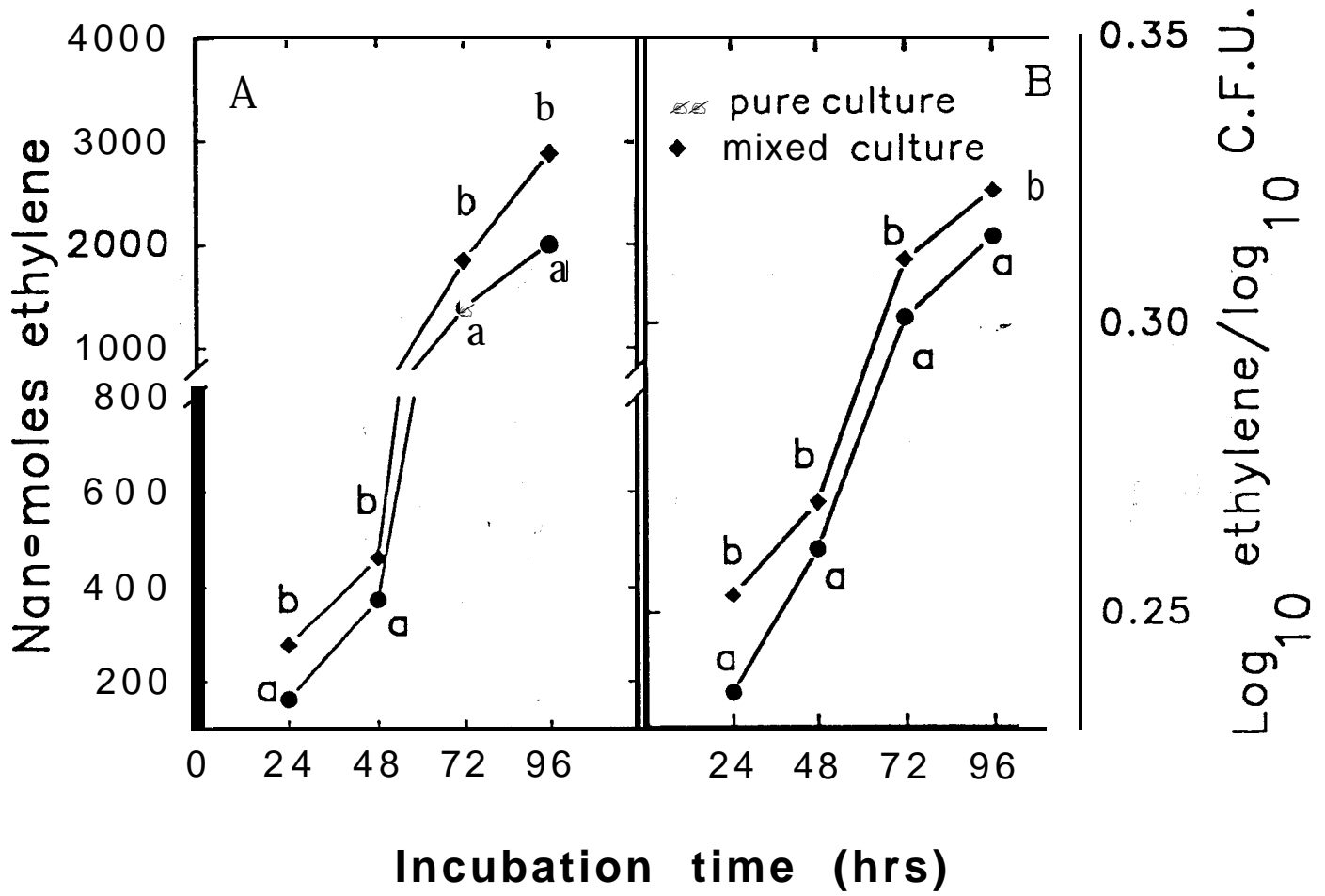


fig. 1

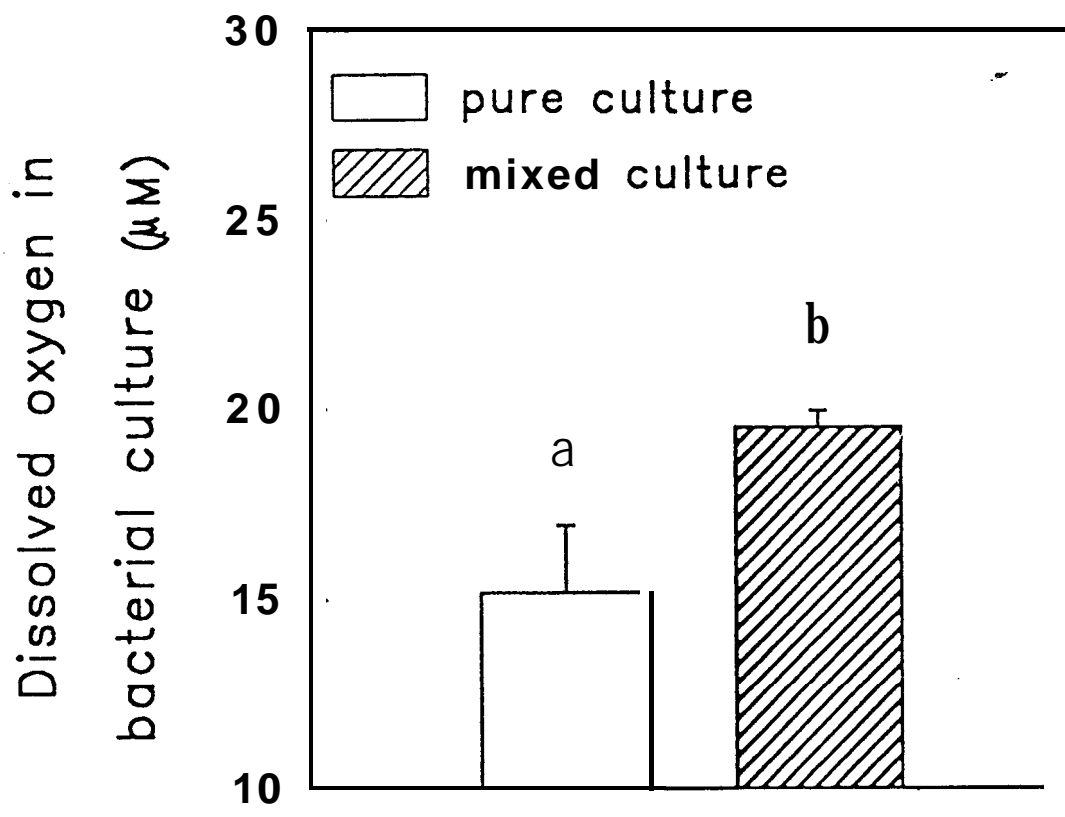


fig. 3

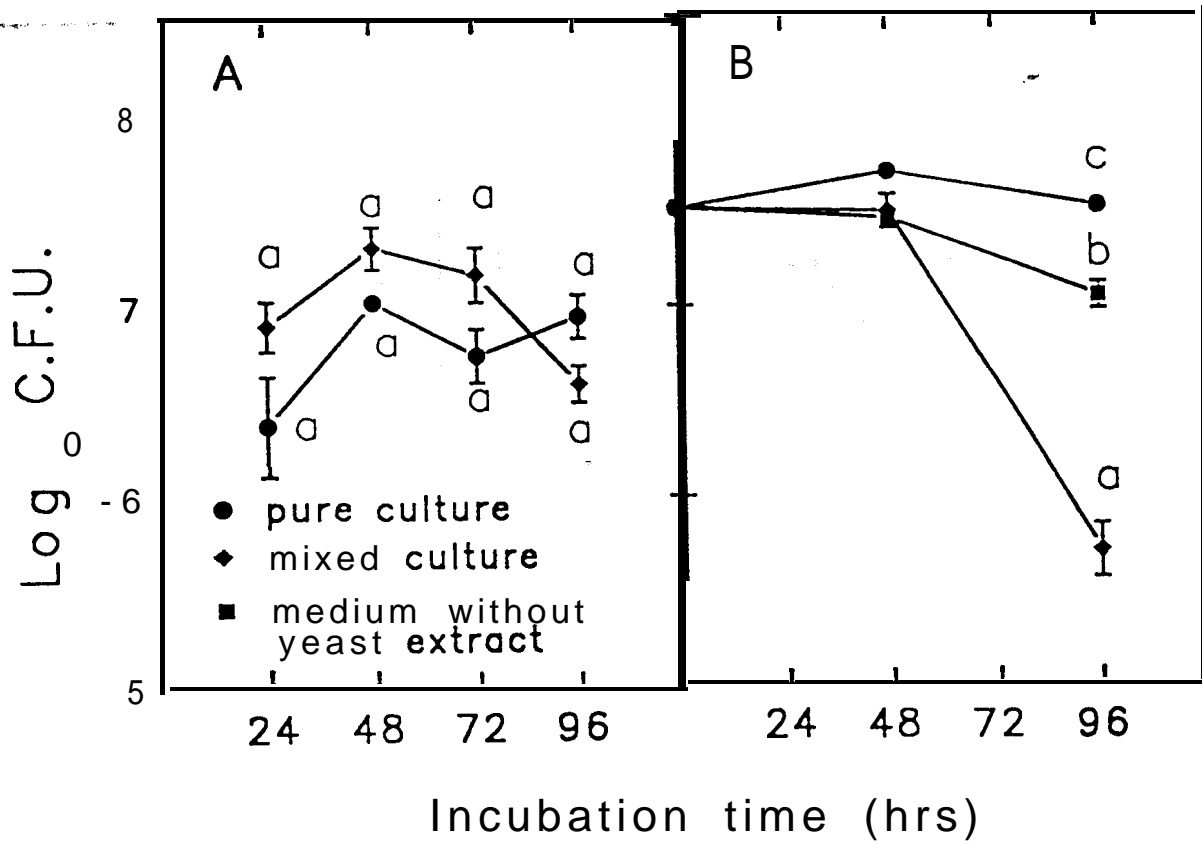


fig. 2

% of centre

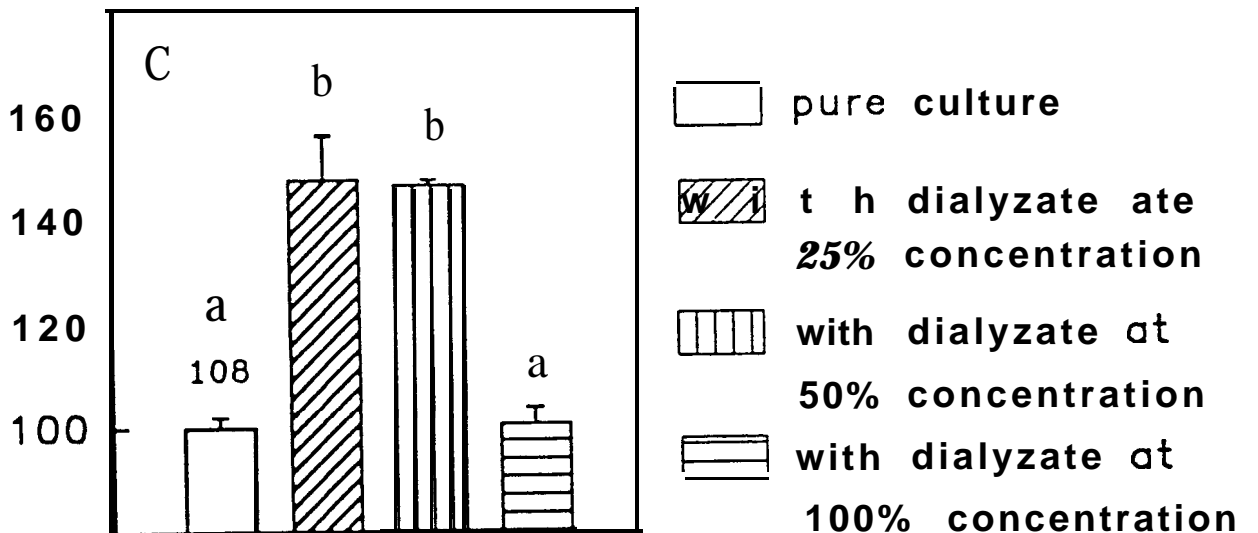
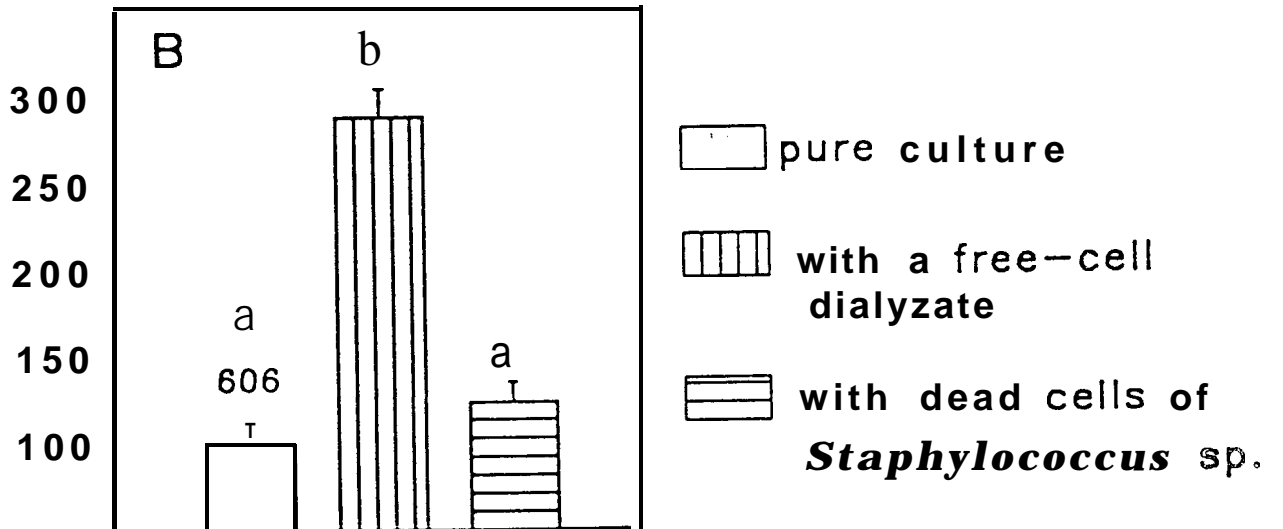
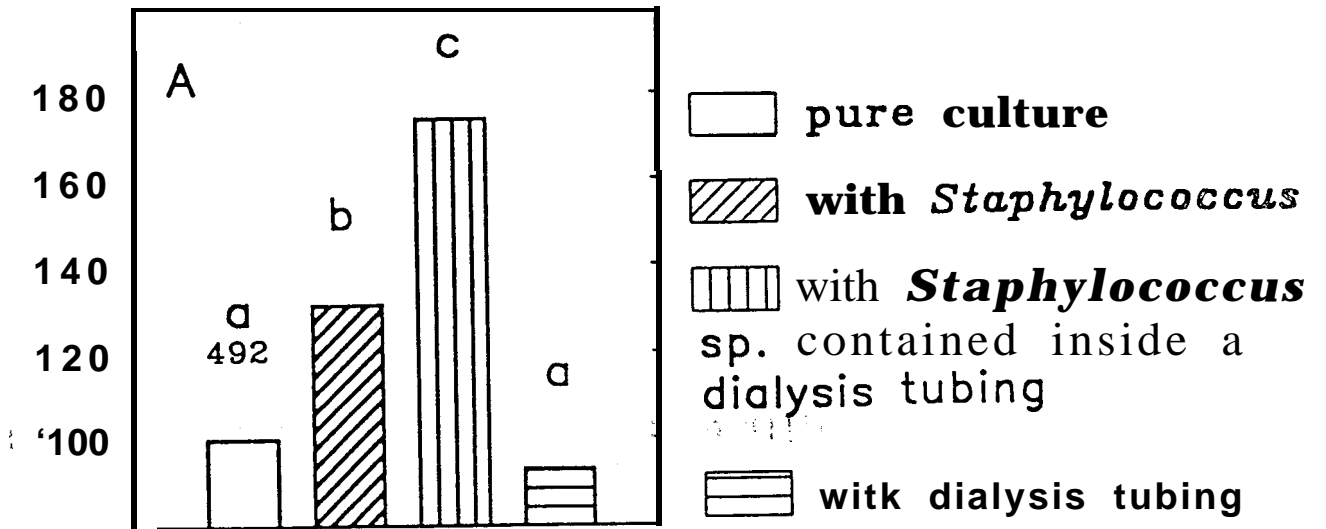


fig. 4

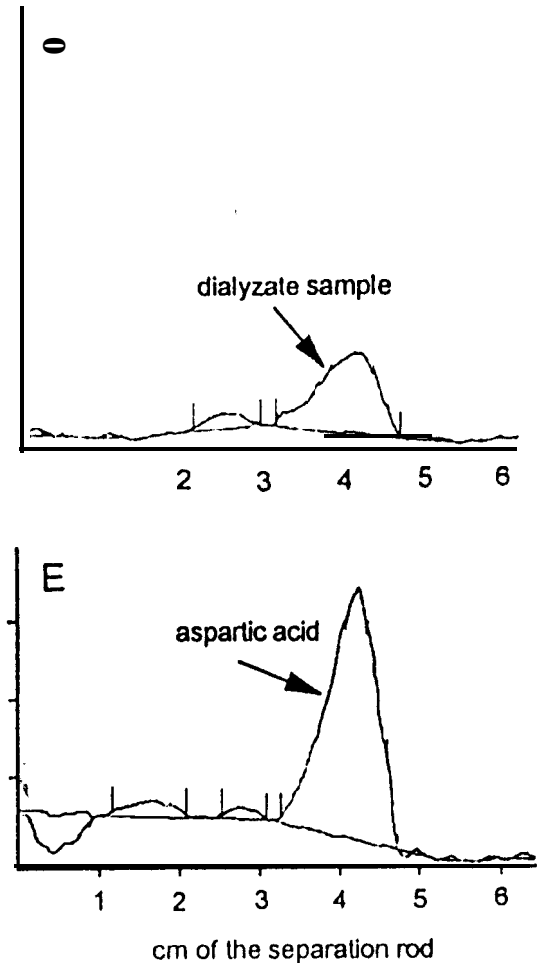
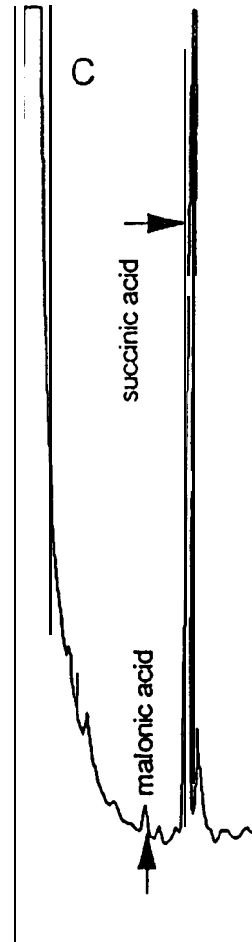
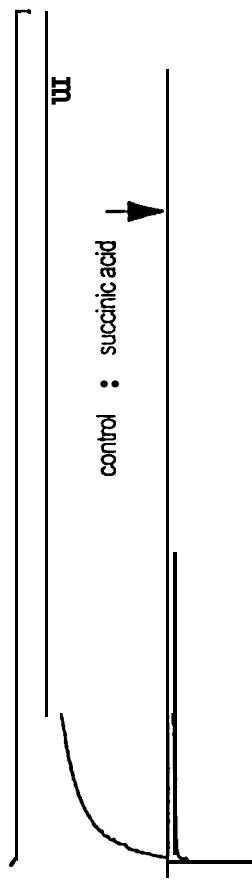
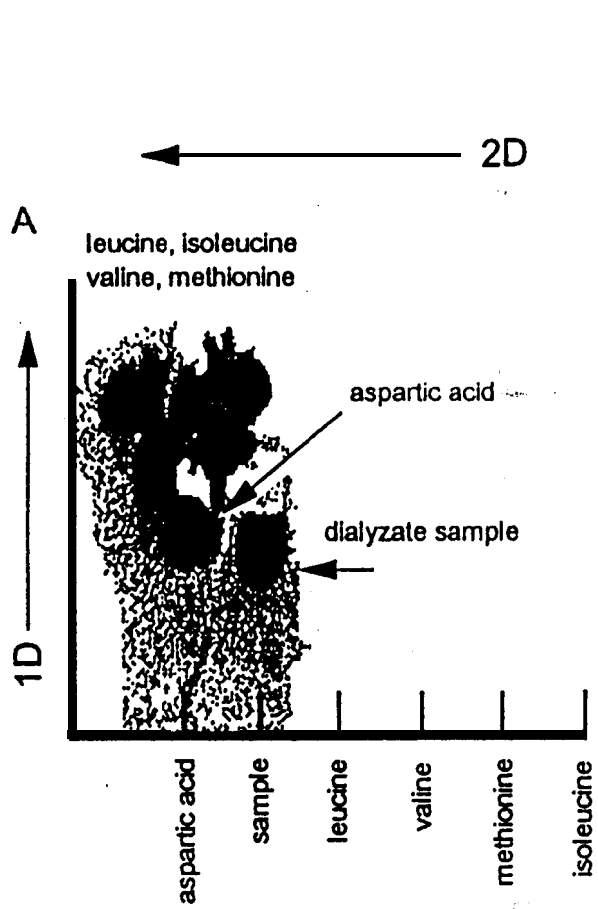


fig. 5

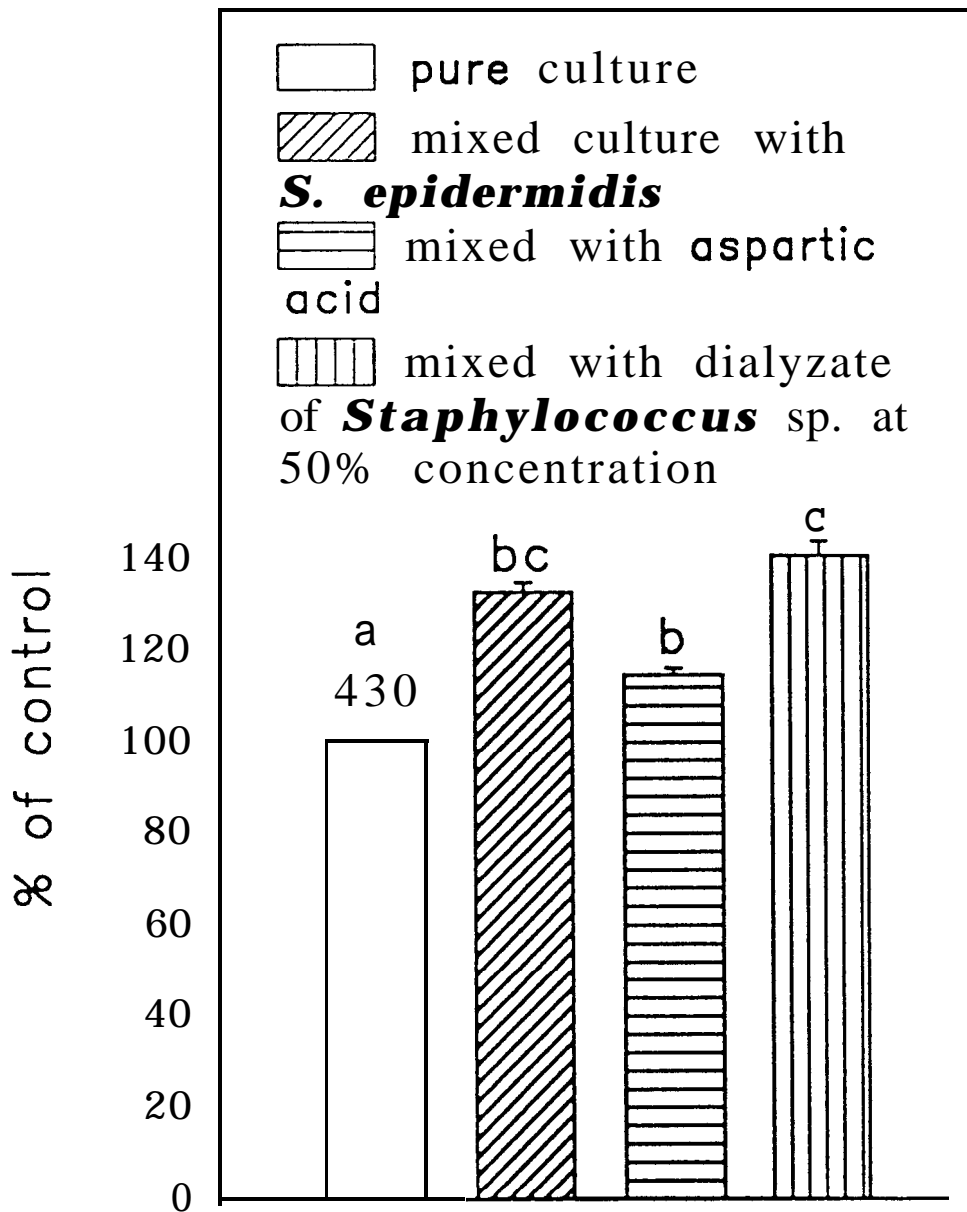


fig. 6



January 25, 1993

Dr. Yoav Bashan, Head
Department of Microbiology
National Researcher of Mexico
Centro de Investigaciones **Biologicas**
Division. de Biología Experimental
Apdo. 128, **La Paz**, Baja California Sur,
Mexico 23000

Dear Dr. Bashan:

Thank you for your letter -- **yes, indeed**, the poster **presented** by Gina Holguin did **win** a prize! We are **sorry** your group could not be **present** at the Gala dinner **and** accept the prize **in** person. I did not bring the prize home with me but I will **contact** Dr. Rafael Palacios' office and **ask** his assistant to forward this award **on** to Ms. Holguin.

Thanks for **coming** to the meeting **and** I **shall** look forward to seeing **you** again one day! **Please** give our congratulations to Gina as well.

Sincerely ,

Vicki Newton

New Horizons in Nitrogen Fixation

*Proceedings of the 9th International Congress on Nitrogen Fixation,
Cancún, México, December 6-12, 1992*

Edited by

RAFAEL PALACIOS and JAIME MORA

*Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno,
CINVA, Cuernavaca,
Morelos, Mexico*

and

WILLIAM E. NEWTON

*Department of Biochemistry and Nutrition,
Virginia Polytechnic Institute and State University,
Blacksburg, Virginia, U.S.A.*



KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS

DORDRECHT / BOSTON / LONDON

INCREASING THE NITROGEN-FIXING ACTIVITY OF AZOSPIRILLUM BY MIXED CULTURING WITH STAPHYLOCOCCUS SP.

GINA HOLGUIN AND YOAV BASHAN

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, THE CENTER FOR BIOLOGICAL RESEARCH (CIB)
LAPAZ, P.O. BOX 128. B.C.S., MEXICO 23000

It is generally assumed that the enhancement of plant growth by inoculation with Azospirillum is not the result of nitrogen fixation (Bashan ~~et al~~ 1989). Nevertheless, the importance of N₂-fixation to the metabolism of the bacteria itself should not be overlooked. N₂-fixation may contribute to rhizocompetence and/or interactions with other rhizobacteria (Bashan ~~and~~ Levanony, 1990). In this project, we ~~study~~ ~~the~~ effect of Staphylococcus sp., a mangrove rhizosphere bacteria, affects the N₂-fixation of A. brasilense.

In our study, the mangrove-rhizosphere Staphylococcus sp. significantly enhanced N₂-fixation of A. brasilense Cd when grown in mixed culture (Fig.1). These substances may be products of the degradation of Staphylococcus cells (as implied by the decrease in population observed when this bacteria was grown with the Azospirillum culture) or may be by-products of Staphylococcus metabolism. Further enhancement of N₂-fixation by Azospirillum when Staphylococcus sp. was contained inside the dialysis tubing, physically separated from Azospirillum, suggests the effect of the releasing of low molecular weight substances by Staphylococcus.

The enhancement of N₂-fixation was not due to any increase in the Azospirillum population, as observed by the non-significant difference in the population levels (Fig.2). The low population level of Staphylococcus suggests that Azospirillum was not providing the full requirements of nitrogen to the non-fixing bacteria.

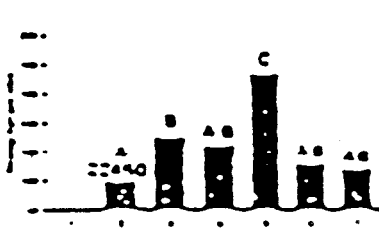


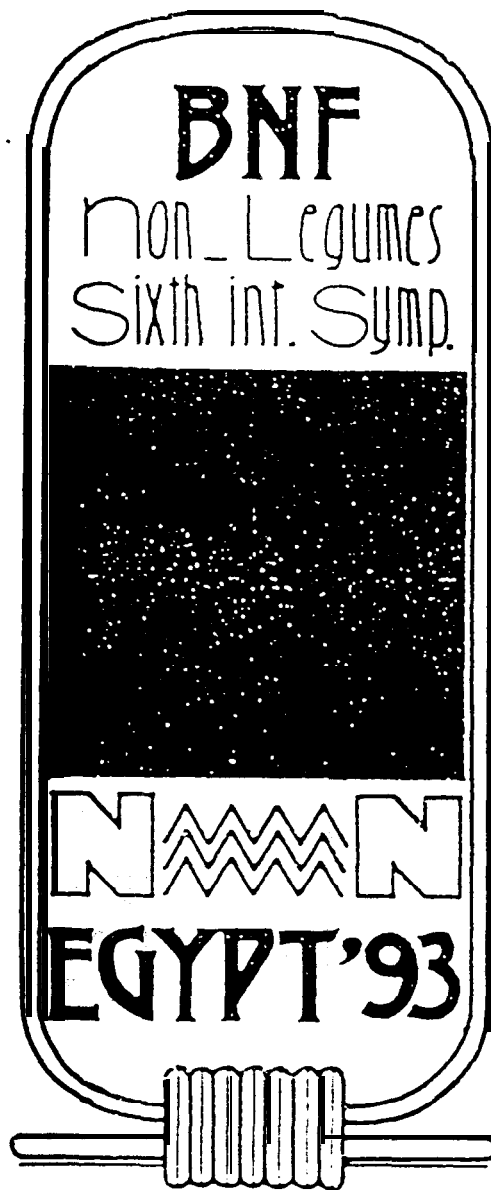
Fig. 1. N₂-fixation production of A. brasilense Cd in mixed cultures with Staphylococcus expressed as percentage from pure culture. Numbers above first column represents culture quantity in milligrams. Columns denoted by a different letter differ significantly ($P < 0.05$ by ANOVA).



Fig. 2. Number of bacteria of Azospirillum brasilense Cd and Staphylococcus in mixed cultures. The column denoted by 'B' is the Azospirillum pure culture. Columns denoted by a different letter differ significantly ($P < 0.05$ by ANOVA).

- 1. Inoculation of bacteria
- 2. Azospirillum pure culture
- 3. Staphylococcus added as first bacteria
- 4. Azospirillum added as second bacteria
- 5. Staphylococcus added as first bacteria
- 6. Azospirillum added as second bacteria
- 7. Staphylococcus added as first bacteria
- 8. Azospirillum added as second bacteria
- 9. Staphylococcus added as first bacteria
- 10. Azospirillum added as second bacteria
- 11. Staphylococcus added as first bacteria
- 12. Azospirillum added as second bacteria
- 13. Staphylococcus added as first bacteria
- 14. Azospirillum added as second bacteria
- 15. Staphylococcus added as first bacteria
- 16. Azospirillum added as second bacteria
- 17. Staphylococcus added as first bacteria
- 18. Azospirillum added as second bacteria
- 19. Staphylococcus added as first bacteria
- 20. Azospirillum added as second bacteria
- 21. Staphylococcus added as first bacteria
- 22. Azospirillum added as second bacteria
- 23. Staphylococcus added as first bacteria
- 24. Azospirillum added as second bacteria
- 25. Staphylococcus added as first bacteria
- 26. Azospirillum added as second bacteria
- 27. Staphylococcus added as first bacteria
- 28. Azospirillum added as second bacteria
- 29. Staphylococcus added as first bacteria
- 30. Azospirillum added as second bacteria

Bashan Y and Levanony H (1990) Can.J. Microbiol. 36. 591-608.
Bashan et (1989) Can.J. Bot. 67, 2429-2434.



PROGRAMME
ABSTRACTS
PARTICIPANTS

ABSTRACT BOOK

Ismailia - Egypt, September 6 - 10, 1993



AZOSPIRILLUM FIXES MORE NITROGEN WHEN INTERACTING WITH THE MANGROVE RHIZOSPHERE BACTERIA STAPHYLOCOCCUS SP.

Gina Holquin' and Yoav Bashan. Department of Microbiology, Division of Experimental Biology, The Center for Biological Research (CIB), P.O. Box 128, La Paz, B.C.S., Mexico 23000

Enhancement of plant growth by Azospirillum may not be the result of nitrogen-fixation (Bashan and Levanony, 1990; Bashan ~~et~~ al. 1989). Further investigation is required to understand the role of nitrogen-fixation in rhizocompttttence and its influence on interactions between Azospirillum and other rhizosphere bacteria.

The rhizosphere beneficial bacteria Azospirillum is capable of sustaining mutually beneficial interactions with other bacteria when grown in mixed culture. Cellulose breakdown by Cellulomonas (Halsall and Gibson, 1989) and pectin degradation by Bacillus (Khammas and Keiser, 1992) were enhanced in the presence of Azospirillum. In both cases, Azospirillum probably fixed enough surplus nitrogen to enhance these processes.

In this study, the mangrove-rhizosphere Staphylococcus sp. (Holquin et al. 1992) significantly enhanced N_2 fixation of A. brasilense Cd when grown in mixed culture. Low molecular weight substances originating from Staphylococcus sp. appear to be responsible for this enhancement. These low molecular weight substances are probably by-products of Staphylococcus metabolism. The increased nitrogen fixation detected here was not due to any increase in Azospirillum population. The decreased population of Staphylococcus suggests that Azospirillum was not providing all the nitrogen requirements to the non-fixing bacteria.

PROPOSALS

- (i) low molecular weight substances released from Staphylococcus sp. enhanced N_2 -fixation of Azospirillum.
- (ii) Azospirillum can benefit from interactions with other rhizosphere bacteria, regardless their environmental origin.
- (iii) Azospirillum can not fulfill the entire nitrogen requirements of Staphylococcus.

Bashan, Y. and Levanony, H. (1990) *Can. J. Microbiol.* 36:591-608.
Bashan et al (1989) *Can. J. Bot.* 67:2429-2434.
Halsall, D.M. and Gibson, A.H. (1989) *Soil Biol. Biochem.* 21:1037-1043.
Holquin et al (1992). *FEMS Microbiol. Ecol.* 110:207-216.
Khammas, K.M. and Kaiser, P. (1992). *Can. J. Microbiol.* 38:794-797.

INTERNATIONAL WORKSHOP ON
ASSOCIATIVE INTERACTIONS OF
NITROGEN-FIXING BACTERIA
WITH PLANTS

Saratov, Russia, June 5-8, 1995



Book of Abstracts

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

Saratov, Russia, 1995

MIXED BACTERIAL INOCULANTS AND MICRO - ENCAPSULATED SYNTHETIC INOCULANTS: PRESENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS

Y. Bashan, G. Holguin, & A. Carrillo

Department of Microbiology, The Center for Biological Research (CIB), La Paz, P.O. Box 128, B.C.S., 23000 Mexico

The immediate outcome of plant inoculation with beneficial bacteria is that shortly after the bacteria are introduced in the soil, the bacterial numbers usually decline progressively [1]. Thus, the major role of the inoculant is to provide a temporary and dependable environment to help the bacteria avoid destruction in the soil [2].

OPTIMAL CHARACTERISTICS OF A CARRIER FOR INOCULANTS

Ideally, a good carrier should: 1. deliver the right number of viable cells which are in good physiological shape at the appropriate time. 2. have a high water-holding capacity (for wet carriers). 3. be nearly sterile or easily sterilized. 4. be as chemically and physically uniform as possible. 5. be non-toxic, biodegradable and non-polluting. 6. the pH be easy to adjust. 7. be consistent in quality, yet allows the addition of nutrients. 8. provide rapid and/or controlled release of bacteria into the soil. 9. be easily mixable both in the factory and on the farm. 10. be easily manufactured by the existing biotechnology industry. 11. be suitable for as many bacterial species and/or strains as possible. 12. be made of a raw material that is in adequate supply and reasonably priced. 13. have a sufficient shelf-life. 14. be easy to use and apply with standard agrotechnical machinery. 15. and finally, a good carrier should not pose any environmental risks such as dispersal of cells to the atmosphere or to the ground water [3,4,5]. Naturally, no carrier has all these qualities, but it should have as many as possible. A "super-inoculant" such as the one described above is theoretically possible. However, to date, no known effort has been made to synthesize a carrier with superior characteristics, probably because of the cost involved. Most raw materials for commercial carriers are cheap and abundant (peat and vermiculite).

Although peat formulations are the carrier of choice, new trends in formulations using unconventional synthetic materials are being slowly introduced, using polymers (like alginate) which offer substantial advantages over peat. The encapsulation of microorganisms is only experimental in the field of inoculation technology. To the best of our knowledge, there is no

commercial product that uses this technology. These formulations encapsulate the living cells, protect the microorganisms against many environmental stresses and release them to the soil gradually when the polymers are degraded by soil microorganisms. They can be stored dried at ambient temperatures for prolonged periods, offer a consistent batch quality and a better defined environment for the bacteria, and can be manipulated easily according to the needs of the specific bacteria. These inoculants can be amended with nutrients to improve the short-term survival of the bacteria upon inoculation. However, they are rather expensive relative to peat-based inoculants and require more bio-technical handling by the industry [2].

ENCAPSULATED FORMULATIONS: MACRO AND MICRO FORMULATIONS OF ALGINATE

Alginate is the most common material for encapsulation. The preparation of macro-beads (1-3 mm in diameter) containing bacteria is fairly easy and involves a multi-step procedure [3]. The main advantages of alginate preparations are their non-toxic nature, degradability in the soil, and their slow release of microorganisms into the soil. This technology was used to encapsulate the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* [3] which were later successfully used to inoculate wheat plants under field conditions. The bacteria survived long enough in the field and their populations were comparable to the survival of bacteria originating from peat-based inoculants [6].

It appears that alginate preparations have solved many of the disadvantages of traditional peat inoculants. However, the use of macro alginate beads has one major disadvantage, the need for an additional treatment during sowing which is not always feasible.

To overcome these problems, the micro-bead concept was conceived. If the beads are small enough, yet still able to encapsulate a sufficient number of bacteria it would be possible to produce an almost powder-like formulation. This "bead-dust" would be coated on the seeds at the factory and sold to the farmer as "improved seeds". The production of micro-beads can be achieved by several simple procedures. This technology produced alginate beads in sizes of 100-200 μm which entrapped a significant number of *A. brasilense* (approx. 10^4 - 10^7 c.f.u/g), similar to the level contained in alginate macro-beads [3]. Application of this novel formulation to the soil is still pending.

MIXED BACTERIAL INOCULANTS

Several PGPR like *Azospirillum*, have an erratic and unpredictable behavior under field conditions making them unlikely candidates for commercialization [7]. However, the potencial of these beneficial bacteria can be economically substancial. To better exploit their potencial, we are proposing a new applicative concept: mixed inoculation of more than one microorganism in a single carrier, inoculated simultaneously. The beneficial effect on plants is che synergistic effect of both (or several) microorganisms. In this inoculation type *Azospirillum* may take che role of a "helper" bacteria or be "helped" by other bacteria to overcome its own unpredictability. In this regard, several synergistic combinations of *Azospirillum* with other microorganisms are known. Cellulose breakdown by *Cellulomonas* [8] and pectin degradation by *Bacillus* [9] were enhanced when co-cultured with *Azospirillum*. Synergism in nitrogen fixation occurred when cultures of *Azospirillum* were mixed with *Arthrobacter* [10] or *Staphylococcus* [11]. Nodulation of legume [12,13] or synergistic effects with V.AN fungi were increased [14.] when mixed or co-inoculated with *Azospirillum*. However, to date, mixed inoculation is at the far end of contemporary inoculation research and development.

In sum, it is clear that future research should focus on the development of better and agronomically feasible, synthetic inoculant carriers as well as further developing of the concept of mixed inoculation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was written in memory of the late Mr. Avner Bashan from Israel. It was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT), Mexico, contracts # 0174-N9 107 and #3541-A. We thank Dr. Roy Bowers for the constructive English corrections.

REFERENCES

1. Bashan, Y., and H. Levanony. 1988. *J. Gen. Microbiol.* 134:1811-1830.
2. Fages, J. 1992. *Symbiosis* 13:15-26.
3. Bashan, Y. 1986. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1089-1098.
4. Fages, J. 1990. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:473-478.
5. Smith, R.S. 1992. *Can. J. Microbiol.* 38:485-492.
6. Bashan, Y., H. Levanony, and O. Ziv-Vecht. 1987. *Can. J. Microbiol.* 33:1074-1079.
7. Bashan, Y., and H. Levanony. 1990. *Can. J. Microbiol.* 36:591-608.
8. Halsall, D.M., and A.H. Gibson. 1989. *Soil Biol. Biochem.* 21:291-198.
9. Khammas, K.M. and Kaiser, P. 1991. *Can. J. Microbiol.* 38:794-797.
10. Lippi, D., I. Cacciari, T. Pietrosanti, and W. Pietrosanti. 1992. *Symbiosis* 13: 107-114.
11. Holguin, G. Bashan, Y. 1993. *New Horizons in Nitrogen Fixation* p. 726 (Ed) R. Palacios, J. Mora, W.E. Newton, Kluwer Academic Pub. The Netherlands.
12. Singh, C.S., and Suba Rao, N.S. 1979. *Plant Soil* 53:387-392.
13. Yahalom, E., Y. Okon, and A. Dovrat. 1987. *Can. J. Microbiol.* 35:510-514.
14. Subba Rao, N.S., K.V.B.R. Tilak, and C.S. Singh. 1985. *Soil Biol. Biochem.* 17: 119-121.