

# EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO Y LA CAPACIDAD DE REDUCIR ACETILENO DE CEPAS DE *Azospirillum* AISLADAS DE ZONAS TEMPLADAS

R. Alvarez (1)

Recibido: 22/8/83

Aceptado: 22/12/83

Las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico pertenecientes al género *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978) han sido consideradas como habitantes de suelos tropicales, siendo su frecuencia de aislamiento en zonas templadas menor del 10 por ciento (Döbereiner *et al.*, 1976).

La temperatura óptima de desarrollo de estos organismos en medios con nitrógeno se ha establecido en 37°C (Tarrand *et al.*, 1978) mientras que, cuando el crecimiento se produce en función de su capacidad de fijar nitrógeno del aire, ésta puede variar entre 32 y 40°C (Day y Döbereiner, 1975). Estos datos han sido obtenidos trabajando fundamentalmente con cepas aisladas de zonas tropicales y por ello se ha creído de interés probar cepas de *Azospirillum* aisladas de zonas templadas en cuanto a su capacidad de desarrollar y fijar nitrógeno a distintas temperaturas.

Los organismos utilizados fueron aislados de raíces de distintas plantas cultivadas y silvestres de la Provincia de Buenos Aires (Alvarez, 1983) por un procedimiento semejante al descrito por Day y Döbereiner (1975) con la excepción de que malato de potasio fue usado como única fuente energética y rojo congo se adicionó al medio de cultivo para facilitar el reconocimiento de las colonias (Rodríguez Caceres, 1981). La diferencia-

ción en especies se realizó según el criterio de Tarrand *et al.* (1978).

De un total de 110 cultivos realizados, en el 36 por ciento se observó la presencia de estas bacterias, pudiéndose aislar al estado puro 19 de ellas. Cuatro de los organismos pertenecían a la especie *A. lipoferum*, 13 a *A. brasilense* y 2 no pudieron ser clasificados. Para realizar las pruebas se emplearon 4 cepas de cada una de dichas especies.

A diferencia de lo observado en organismos aislados de zonas tropicales, todas las cepas desarrollaron mejor a 28°C que a 37°C en medio de peptona-succinato-sales (Hylemon *et al.*, 1973).

Para determinar el efecto de la temperatura cuando las bacterias dependían de su capacidad de fijar el nitrógeno del aire para crecer, se usó el siguiente medio de cultivo, que ha sido desarrollado en nuestro laboratorio para sustituir al medio NFb (Döbereiner *et al.*, 1976) y con el que se logra un mejor desarrollo de *Azospirillum*:

Acido málico . . . . .	0,5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,05 %
Extracto de levadura . . . . .	0,005%
PH ajustado a 7 con KOH	

1) Centro de Radiobiología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.

Las pruebas se realizaron en tubo de ensayo, haciéndose la siembra por gota (0,05 ml) usando para ello cultivos jóvenes. A las 24, 48 y 72 horas de la siembra se determinó la densidad óptica de los cultivos incubados a diferentes temperaturas, a 400 nm.

La misma distribución de curvas de crecimiento se observó en *A. lipoferum* y *A. brasilense*, pudiéndose ver éstas, bajo distintos sistemas de representación en las Figuras 1 y 2. La óptima temperatura de desarrollo fue de 30°C en ambos casos, no observándose crecimiento a 4°C ni a 42°C.

La influencia de la temperatura sobre la capacidad de fijar nitrógeno se evaluó por su efecto sobre la reducción de acetileno. Para ello, frascos tipo antibiótico de 27 ml de capacidad, con 10 ml del medio de malato descrito, al cual se le agregó 0,2 por ciento de agar fueron sembrados en forma similar a la antedicha. Luego de 48 horas de incubación

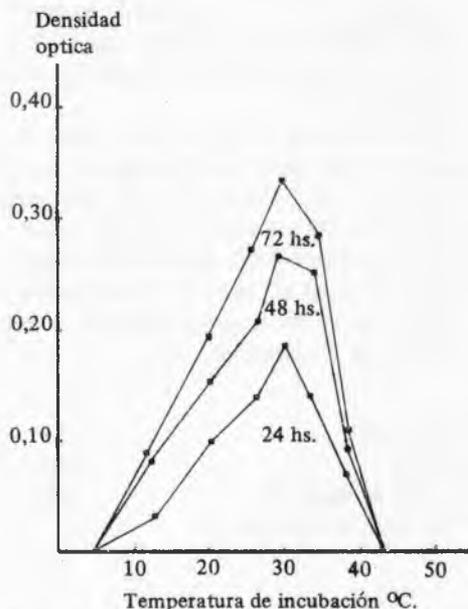


Figura 1. Influencia de la temperatura sobre el desarrollo de *A. lipoferum*. Cada punto representa el promedio de 4 cepas.

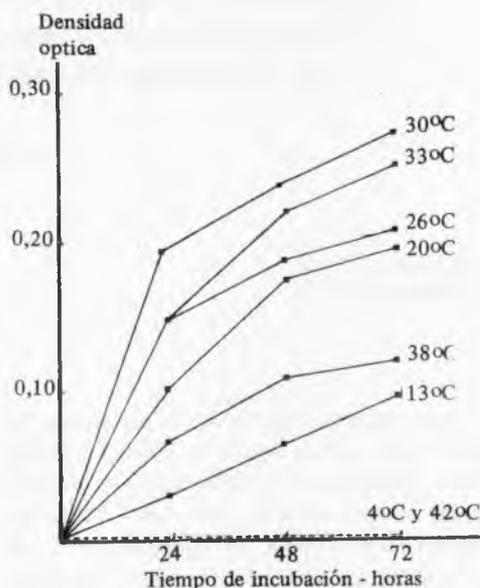


Figura 2. Influencia de la temperatura sobre el desarrollo de *A. brasilense*. Cada punto representa el promedio de 4 cepas.

a 30°C, lotes de los mismos fueron traspasados a distintas temperaturas y tras dejarlos una hora para que se equilibrase su temperatura con la del medio, se los selló, se les inyectó acetileno para obtener una presión de 0,1 atmósferas y se los mantuvo 3 horas más en estufa, haciéndose la determinación del etileno producido por colorimetría (LaRue y Kurz, 1973).

En *A. lipoferum* la máxima actividad nitrogenásica se observó entre 30 y 33°C, decreciendo rápidamente a mayores o menores temperaturas (Figura 3). Por el contrario, en *A. brasilense* alta actividad se registró entre 30 y 42°C, aunque los mayores valores también se observaron entre 30 y 33°C (Figura 3)

Llama la atención el que no se registrase actividad nitrogenásica en *A. lipoferum* a 20 y 38°C. Ello puede deberse a la imposibilidad de captar cantidades menores de 2 nmols de etileno por mililitro de medio de cultivo y por hora, bajo las condiciones del ensayo, por la técnica utilizada.

Los resultados obtenidos indican la posibilidad de que las especies del género *Azospirillum* pueden contribuir en una forma más importante de lo que se ha supuesto (Döbereiner *et al.*, 1976) a la fertilidad nitrogenada de las zonas templadas.

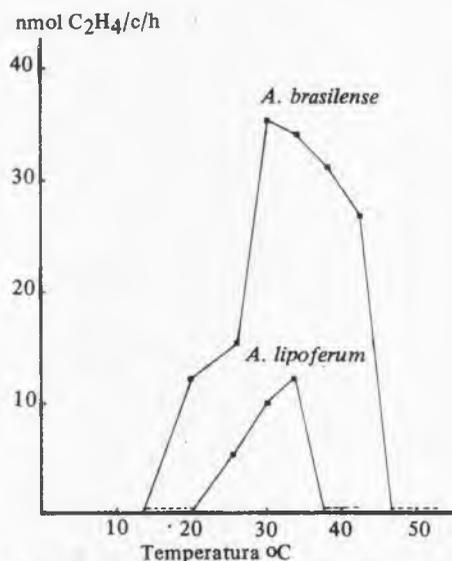


Figura 3: Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrogenásica de *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Cada punto representa el promedio de 4 cepas.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Alvarez, R., 1983. Diferenciación de las especies del género *Azospirillum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 16 (1): 39-44.
- 2) Day, J. M. and J. Döbereiner, 1975. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.* 8, 45-50.
- 3) Döbereiner, J. I. E. Marriei and M. Nery, 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiology* 22, 1464-1473.
- 4) Hylemon, P. B.; J. S. Wells, N. R. Krieg and H. W. Jannasch, 1973. The genus *Spirillum*: a taxonomic study. *Inter. J. Sist. Bacteriol.* 23, 340-380.
- 5) LaRue, T. A. and W. G. W. Kurz, 1973. Estimation of nitrogenase using a colorimetric determination for Ethylene. *Plant Physiol.* 51, 1074-1075.
- 6) Tarrand, J. J., N. R. Krieg and J. Döbereiner, 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24, 967-980.
- 7) Rodríguez Cáceres, E. A. Nuevo medio para aislar *Azospirillum* sp. Primera Reunión Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. La Plata, Arg. 11-13 Nov. de 1981. Pág. 172-173. CINDEFI