

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 151-Gon
La verdadera morfología y fisiol
González López, Jesús.
1031770



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Jesús González López

La verdadera morfología
y fisiología de Azotobacter:
células germinales.

151 La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales / Jesús González López

FJM
Uni-
151
Gon
151

Fundación Juan March
Serie Universitaria

151



Jesús González López

La verdadera morfología
y fisiología de Azotobacter:
células germinales.



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de Extranjero, 1979, individual
Departamento de MEDICINA, FARMACIA y VETERINARIA.
Centro de trabajo: Department of Biological Sciences.
North Texas State University. Denton, Texas
(U.S.A.)*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M - 15334 - 1981

I.S.B.N. : 84 - 7075 - 199 - 9

Impresión: Gráficas Ibéricas, Tarragona, 34, Madrid-7

Este trabajo fue realizado en: Department of
Biological Sciences, North Texas State Univer-
sity, Denton, Texas. La supervisión del mismo
fue realizado por el Profesor Dr. G. R. Vela.

I N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMEN	7
INTRODUCCION	9
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	19
DISCUSION	37
BIBLIOGRAFIA	42

RESUMEN

Se estudian las características fisiológicas y morfológicas de Azotobacter en un nuevo medio de cultivo que reproduce las condiciones de habitat natural de estos microorganismos. Morfológicamente Azotobacter en medios de suelo se encuentra generalmente al estado de célula filtrable (células germinales), las cuales se establecen como parte de un ciclo de vida completo, desarrollado por estos microorganismos. Este ciclo de vida solo es realizado en medios de cultivo de suelo y nunca en medios definidos libres de nitrógeno.

Las células germinales de Azotobacter se muestran como una forma de reproducción y muy especialmente de resistencia. Los resultados obtenidos en su carga energética de adenilato, consumo de oxígeno, resistencia a la lisis y alta resistencia a la desecación, prueban que estas células germinales constituyen la verdadera forma de resistencia de Azotobacter en el suelo.

Otros resultados importantes son la incapacidad de fijación de nitrógeno atmosférico por las células germinales y la no presencia de quistes en los cultivos de suelo. Esto parece indicar que estas células diferenciadas (quistes) no poseen en la naturaleza el papel de resistencia anteriormente adjudicado.

INTRODUCCION

La familia Azotobacteraceae fue descrita en 1901 por Beijerinck como bacilos pleomórficos, largos ($2-4\mu$), móviles y Gram negativos (2). No mucho mas tarde Löhnis y Smith (20) realizan las primeras observaciones de un ciclo de vida complejo para estos microorganismos. Este ciclo propuesto, incluye la existencia de numerosas formas morfológicas vegetativas y reproductoras. Dentro de esta gran diversidad, Löhnis y Smith recogen la presencia de formas filtrables de Azotobacter.

Estos trabajos iniciales que muestran la existencia de un ciclo de vida complejo y la presencia de formas filtrables, han sido verificados por algunos autores, especialmente hasta los últimos años de la década de los cincuenta (11, 16, 19, 24). Como autor mas destacado dentro de esta escuela, tenemos que considerar a Bisset, quien establece un ciclo de vida que incluye formas filtrables (gonidias) como forma de reproducción para Azotobacter (3,4).

Pese a los numerosos trabajos publicados que demuestran la existencia de formas filtrables en Azotobacter, la gran mayoría de los científicos que han estudiado este grupo microbiano han aceptado como básicos los conceptos ecológicos de Winogradsky considerando un ciclo de vida sencillo, sin la presencia de ningún tipo de células filtrables. Una de las razones mas importan-

tes que han llevado a la mayoría de los azotobacteriólogos a la aceptación de los conceptos de Winogradsky, ha sido la poca reproductibilidad de los experimentos realizados por Löhnis y Smith, así como por sus seguidores. Las grandes críticas desarrolladas en contra de los grupos que propusieron la existencia de un ciclo de vida complejo y presencia de formas filtrables, se establecieron considerando las mismas como consecuencia de contaminaciones ya que solo resultaban estos ciclos complejos observables en cultivos mantenidos por grandes periodos de tiempo en incubación. Además la existencia de formas filtrables, fue fuertemente criticada considerando los resultados consecuencia de sistemas de filtrado poco fiables en su calidad.

El hecho real, es que pese a la gran polémica desarrollada, tras la incorporación de los quistes como célula diferenciada responsable de la supervivencia de Azotobacter, todos o casi todos los autores han considerado a estos microorganismos poseedores de un sistema de vida sencillo, pleomorficos y bajo determinadas condiciones nutricionales formadores de quistes, pero nunca generadores de un ciclo de vida complejo ni por supuesto formadores de células filtrables. Así, si consultamos la última edición del Manual Bergey's (8), no encontraremos ninguna mención a ciclos de vida complejos ni a formas filtrables.

Sin embargo, pese a esta aceptación casi general de los conceptos básicos establecidos por Winogradsky, en la mente de todos los científicos que han estudiado la familia Azotobacteraceae, nunca han quedado claras las ideas de supervivencia de estos microorganismos en la naturaleza, termorresistencia, resistencia a agentes físicos en habitat naturales, etc. Así por ejemplo G.R. Vela (31), ha demostrado que suelos conservados en condiciones de este-

rilidad y desecación por 15 años, originan crecimiento de Azotobacter al ser inoculados a medios libres en nitrógeno, hecho que resulta incomprensible si consideramos a estos microorganismos con unas características fisiológicas análogas a las establecidas en laboratorio, tanto a nivel de células vegetativas como en quistes (1). Otras experiencias que han señalado la posibilidad de un Azotobacter distinto al estudiado tradicionalmente en laboratorio son por ejemplo las realizadas por Vela y Wyss (29), sobre la supervivencia de Azotobacter a radiaciones en suelos naturales. Estos autores observaron que los Azotobacter en el suelo presentan una gran resistencia a las radiaciones ionizantes, muy superior a la presentada cuando estos microorganismos son cultivados en laboratorio. En la discusión de este trabajo, los autores especulan con la posibilidad de que no hay que eliminar que Azotobacter en el suelo posea un tamaño mas pequeño que el cultivado en laboratorio.

En general podemos decir, que pese a que casi todos los investigadores han continuado las ideas simplistas, también todos o casi todos han considerado la posibilidad de que Azotobacter en la naturaleza posea un fisiología y morfología distintas a la estudiada en laboratorio.

En este trabajo se presentan resultados que ponen de manifiesto que Azotobacter es un microorganismo que posee un ciclo de vida complejo y que las formas filtrables constituyen parte del mismo. Se estudia la fisiología general de las formas filtrables y se establece a las mismas como estado de resistencia y supervivencia en la naturaleza. Así mismo, se realiza una amplia discusión de los resultados obtenidos con la bibliografía existente y se explican puntos que hasta la fecha resultaban indeterminados o confusos dentro de este grupo de microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos: El microorganismo base en nuestro estudio fue Azotobacter vinelandii ATCC 12837. Otros microorganismos incluidos fueron: A. vinelandii S4, A. vinelandii S5, A. vinelandii S6, A. vinelandii OP, A. chroococcum AC16, Azomonas macrocytogenes ATCC 8702, A. macrocytogenes st.Z, Azotobacter proteus y Beijerinckia indicus.

Medios de cultivo:

Medios de dializado de suelo: Diez gramos de suelo de jardín fueron introducidos en una membrana de diálisis, cerrándose la misma por los extremos. Las membranas de diálisis conteniendo el suelo, fueron introducidas en matraces de 250 ml de capacidad a los que se les adiciono 50 ml de agua destilada. Los medios así preparados se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Estos medios de suelo dializado fueron en ocasiones adicionados de una fuente de carbono (glucosa, sacarosa, n-butanol) al 0.5%.

Medios definidos: Todos los medios definidos usados en nuestros estudios, tenían la composición básica de sales referida por Burk (32). La fuente de carbono generalmente usada fue glucosa al 0.5%. Cuando se deseó construir un medio definido no libre

en nitrogeno, se adiciono 0.3% de NO_3NH_4 .

La preparacion de medios solidos requirio la adicion de 1.5% de agar. Para la induccion de quistes se utilizo el medio - solido con n-butanol como fuente de carbono (9).

Otros medios de cultivo: Como medio de crecimiento para Serratia marcescens se utilizo TSA (Difco).

Obtencion de formas filtrables

Los medios de dializado de suelo, fueron inoculados despues de la esterilizacion con los microorganismos objeto de estudio, procedentes de medios de Burk's. Los medios fueron incubados a 28°C en un agitador rotatorio. Los cultivos despues del tiempo de incubacion conveniente segun la experiencia a realizar, - fueron filtrados por filtros Millipore de 0.45μ de diametro de poro. El filtrado obtenido, es centrifugado a 20.000 rpm por 15 min y las formas filtrables separadas del sobrenadante. Siempre que se realizo la obtencion de formas filtrables se uso como control de la filtracion un cultivo de S. marcescens, el cual se adiciono al cultivo de Azotobacter previo a la filtracion. En los filtrados se realizo la busqueda de Serratia por inoculacion de los mismos a medios enriquecidos (TSA).

El mismo esquema de aislamiento de formas filtrables se utilizo cuando se procedio a la busqueda de formas filtrables en medios definidos.

Estudios morfologicos

Los estudios morfologicos se realizaron por microscopia

optica y electronica.

Microscopia electronica: Celulas vegetativas obtenidas desde medios libres en nitrogeno y medios de dializado de suelo, cultivadas por 24, 48 y 72 horas se fijaron por suspension en 3% de glutaraldehido y 0.15% (P/V) de rutenio rojo, tamponado con - 0.1 M de cacodilato sodico por 1 hora (9). La fijacion se continuo en una solucion de 1% de tetroxido de Osmio y 0.15% de rutenio rojo tamponado con 0.1 M de cacodilato sodico por 1 hora. Las celulas se lavaron en tampom y se deshidrataron por pases en una serie de soluciones de alcohol de distintas graduaciones. La inclusion de las celulas se realizo en Epon 812 (21). Las secciones se realizaron en un ultramicrotomo Porter-Blum MT-2. Las secciones se tiñeron con tartrato de plomo por 45 min y acetato de uranilo 30 min. El microscopio usado para la realizacion de los negativos fue un RCA-EMU-3G.

Conjuntamente con las observaciones de las secciones finas, se realizaron estudios del tamaño celular, utilizando para ello tinciones negativas con 0.2% de acido fosfotungstico obsevas al microscopio electronico.

Busqueda de formas filtrables de AZOTOBACTER en suelos naturale

Un gramo del suelo problema se mezclo con nueve mililitros de agua destilada esteril. Se agito vigorosamente por diez minutos o se ultrasonico por treinta segundos. Inmediatamente - despues se realizo el filtrado por filtros Millipore de 0.45 de diametro de poro. Los filtrados se inocularon a medios de dializado de suelo y libres de nitrogeno. Los controles de calidad en

la filtración se realizaron como anteriormente se reseñó.

Curvas de crecimiento y recuento de formas filtrables

Las curvas de crecimiento en los distintos medios se establecieron mediante recuentos en placa de células viables, usando para la formación de colonias medios sólidos de Burk's y dializado de suelo. El recuento de formas filtrables se realizó mediante recuento en cámara y observación al microscopio óptico.

Determinaciones químicas

El contenido de poli-beta-hidroxibutírico (18), proteínas solubles (6), carbohidratos (18) y ácidos nucleicos (14).

Determinaciones analíticas

Consumo de oxígeno: El consumo de oxígeno se estableció mediante un Oxígrafo Gilson modelo K1C acoplado a un electrodo de platino tipo Clark.

Carga energética de adenilato: Se siguió la técnica de Johnson et al. (15) para la extracción de nucleótidos. La medida de los nucleótidos se realizó según el método de Strehler's (27) y la carga energética de adenilato calculada de acuerdo con Chapman et al. (10). Las células filtrables fueron obtenidas desde medios de dializado de suelo como se reseña anteriormente y las células vegetativas desde medios libres en nitrógeno.

Estudio de proteínas mediante gel de poliacrilamida

Se utilizó la metodología de Vandenberghe y Pattin (28). La lectura de las bandas de proteínas se realizó en un microdensitómetro Quick-Scan, Helene laboratories.

Fijacion de nitrogeno atmosferico

La fijacion de nitrogeno fue demostrada indirectamente mediante la tecnica de reduccion de acetileno (26).

Electroforesis de DNA

Se utilizo en este estudio la tecnica de Meyer et al. (23), realizandose las determinaciones en los microorganismos cultivados en medios de dializado de suelo y definidos.

Estudio de la composicion citocromica

Se utilizo para este estudio la metodologia descrita por Jurtschuk et al. (17), tanto para las celulas filtrables como para las vegetativas.

Resistencia a las radiaciones ultravioletas

Las celulas de A. vinelandii ATCC 12837 cultivadas en medios de Burk's con 0.5% de glucosa y las celulas germinales (celulas filtrables) obtenidas desde medios de dializado de suelo, fueron lavadas tres veces en agua destilada esteril, mediante centrifugaciones a 20.000 rpm y posteriores resuspensiones. Un mililitro de estas suspensiones celulares se sometieron a radiaciones ultravioletas, con una lampara emisora que les aporto $185.4 \times 10^3 \mu\text{J}/\text{cm}^2$. Los tiempos de exposicion de las muestras fueron de 1, 3, 6, 7.5, 9, 12 y 15 segundos. Antes y despues del tratamiento las muestras fueron contadas en su numero de celulas viables mediante recuento en placa.

Tratamientos termicos

Celulas de A. vinelandii se inocularon a medios de cultivo libres en nitrogeno y de dializados de suelo. A los 2, 4,

y 14 días de incubación, las células (vegetativas o germinales) fueron separadas y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Dos mililitros de las suspensiones se introdujeron en ampollas de vidrio capilar y se sumergieron en baños de agua a 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, y 90°C de temperatura. El tiempo de calentamiento fue de 5 y 10 minutos. Transcurridos estos periodos de tiempo las ampollas se enfriaron rápidamente por introducción de las mismas en hielo. Las suspensiones celulares después del enfriamiento fueron inoculadas a nuevos medios frescos de Burk's y dializado de suelo. Se consideró que las suspensiones soportaron el tratamiento térmico cuando estas originaron turbidez apreciable por el operador hasta después de 7 días de incubación a 28°C.

Resistencia al Cloruro Sódico

Suspensiones de células vegetativas y filtrables fueron inoculadas a tubos de ensayo conteniendo diferentes concentraciones de ClNa (0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 22,5%) en agua destilada estéril. A las 1, 2, 3, 4, 8, 24, y 48 horas se tomaron muestras de los tubos y se inocularon a nuevos medios frescos de Burk's y dializado de suelo. Se consideró que las células sobrevivieron - al tratamiento cuando en los nuevos medios se observó crecimiento hasta un máximo de siete días de incubación.

Tratamientos ultrasonicos

Las células fueron lavadas por centrifugación a 20.000 rpm y resuspensión en agua destilada estéril (dos veces). Cinco mililitros de estas suspensiones celulares fueron sometidas a sonicación a 4°C en un Sonifier Cell Disruptor, situado en el set 6 por tiempos de 3, 15 y 30 segundos, 1, 5 y 10 minutos. Los recuentos del número de células viables se realizaron antes y des-

pues del tratamiento en medios de Burk's y dializado de suelo.

Resistencia a la lisis enzimática

La lisis enzimática se realizó aplicando la metodología descrita por Marmur (22).

Resistencia a la desecación

A los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 30, 40, 50, 60, y 70 días de incubación, las células germinales se depositaron en filtros estériles y estos se conservaron en esterilidad y en continuo proceso de desecación a 28°C. En periodos de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 60, 90 y 180 días, los filtros se inocularon a medios frescos de dializado de suelo. La misma metodología se aplicó para las células cultivadas en medios de Burk's.

Estudio de los componentes I y II de la nitrogenasa

En este estudio se utilizó la metodología establecida por Brill et al. (7).

RESULTADOS

Los medios de dializado de suelo fueron inoculados con A. vinelandii ATCC 12837. A las 24 horas de incubacion se aprecio crecimiento. Por observacion al microscopio optico, se determino la existencia de dos tipos morfologicos, uno correspondiente a los bacilos Gram negativos tipicos de Azotobacter y un segundo tipo formado por celulas como particulas de un tamaño comprendido entre 0.2-0.4 μ . Comparando la morfologia de A. vinelandii en medios de dializado con libres en nitrogeno, se pudo comprobar que la aparicion de estas celulas como particulas solo tenia lugar en los medios que contenian suelo como unica fuente de nutrientes. Estas formas resultaron ser filtrables por 0.45 μ pudiendose separar del resto de las celulas de mayor tamaño con gran facilidad.

Cuando los filtrados procedentes de medios de dializado (conteniendo formas filtrables), se inocularon a medios de Burk's o dializados de suelo originaron crecimiento nuevamente aunque con diferentes características. Asi en medios libres en nitrogeno se generaron solamente celulas pleomorficas de gran tamaño y no filtrables, mientras que en los medios de suelo primeramente se formaron celulas analogas en morfologia a las de medios definidos, pero posteriormente se volvieron a formar las celulas filtrables. Es decir, mientras que en medios libres en nitrogeno no

se obtienen formas filtrables, en medios de suelo estas formas constituyen un estado normal de Azotobacter.

Los mismos resultados han sido obtenidos con los siguientes microorganismos: A. vinelandii S4, A. vinelandii S5, A. vinelandii S6, A. chroococcum AC16, A. proteus, Azomonas macrocytogenes ATCC 8702, A. macrocytogenes st.M, A. macrocytogenes ZAM, y Beijerinckia indicus.

Estos resultados sugieren que la familia Azotobacteraceae en condiciones de cultivo en medios similares a su habitat natural presenta una morfología marcadamente diferente a la tradicionalmente aceptada.

Todos los cultivos de dializado de suelo incubados por mas de siete dias a 28°C mostraron como unica morfología la correspondiente a la de formas filtrables, manteniendo estas la capacidad de generacion de formas no filtrables, al ser inoculadas a nuevos medios de cultivo.

En cinco suelos conservados en NTSU (North Texas State University), en condiciones de esterilidad y desecacion por mas de quince años (31), se determino la presencia de formas filtrables. Tambien se encontraron formas filtrables de Azotobacter en diez suelos y tres agus tomados de Denton (area de Denton, Texas) y examinados inmediatamente despues de la toma.

En medios de suelo, se determinaron las curvas de crecimiento de A. vinelandii ATCC 12837. Asi mismo se determino de una forma cuantitativa la transformacion morfologica: celula filtrable - no filtrable - celula filtrable. Estos resultados quedan reseñados de forma grafica en la Fig.1. En esta figura se obser-

va como al inocular un medio de dializado de suelo con formas filtrables de Azotobacter, se produce una pérdida de las mismas y un incremento de las no filtrables para volver a incrementar el número de filtrables con el envejecimiento del cultivo, hasta valores del casi 100%.

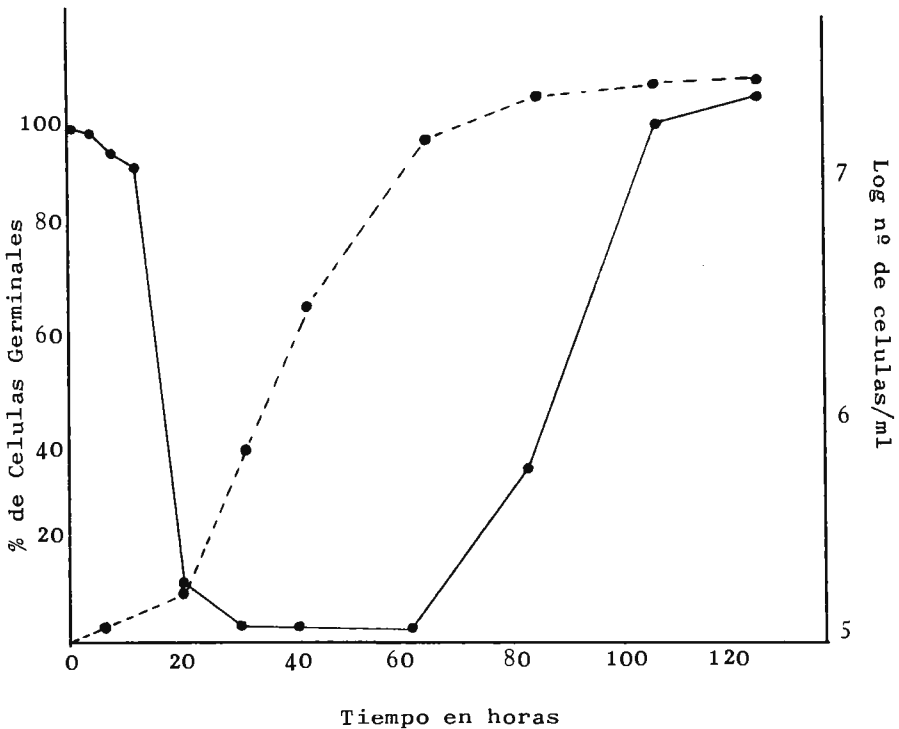


Fig.1.- Muestra la curva de crecimiento y cinética morfológica de Azotobacter vinelandii ATCC 12837 en medio de dializado de suelo.

Por adición de glucosa, sacarosa o butanol a los medios de cultivo de suelo, pudimos observar la formación de un menor número de formas filtrables y la aparición de grandes células esféricas de una estructura similar a la de quistes gigantes inducidos en n-butanol.

Estudiando el consumo de oxígeno de los cultivos de A. vinelandii en medios de suelo, pudimos observar que en la fase estacionaria del cultivo (coincidiendo con el casi 100% de células germinales), no es detectable el consumo de oxígeno. Así mismo separando las células germinales, estas no mostraron consumo de oxígeno. Estos resultados son muy distintos en medios definidos libres en nitrógeno, pues si bien en estos medios al envejecer el cultivo disminuye el consumo de oxígeno, nunca llega a un valor de cero como el observado en los cultivos de suelo.

En el análisis químico cuantitativo de las formas filtrables (células germinales), se determinó el contenido proteico ($40 \mu\text{g}/10^7$ células), carbohidratos ($25 \mu\text{g}/10^7$ células: método de la Anthrona, $62 \mu\text{g}/10^7$ células: método del fenol), DNA ($9.1 \mu\text{g}/10^7$ células), RNA ($7.9 \mu\text{g}/10^7$ células) y ausencia de PHB. En la tabla 1, se pueden apreciar las características químicas y tintoriales más importantes de las células germinales, comparándolas con las células vegetativas cultivadas en medios libres de nitrógeno.

La carga energética de adenilato correspondiente a las células germinales y a las cultivadas en medios libres en nitrógeno, en distintos periodos de incubación, pueden ser observados en las tablas 2 y 3. En estas tablas se expresa además, las concentraciones de nucleótidos y otros coeficientes de interés fisiológico bacteriano como es el ATP/ADP. Comparando ambas tablas se

Tabla 1.- Se muestran las características tintoriales y la composición química de las células filtrables de Azotobacter vinelandii ATCC12837, obtenidas en medios de dializado de suelo. Se comparan los resultados con células del mismo microorganismo cultivado en medio de Burk's con 0.5% de glucosa.

Estudio de tinción o químico	Células Germinales	Células vegetativas
Gram	-	-
Espora	-	-
Capsula	-	+
Acido-alcohol	-	-
Quiste	-	-
Flagelo	-	+
Proteínas	40 ^a	80
Polisacaridos	25-62 ^b	43-74
DNA	9.1	4.2
RNA	7.9	12.9
PHB	-	50

a.- Concentraciones en $\mu\text{g}/10^7$ células. b.- Método de la Anthrona - método del fenol.

puede apreciar como la carga energética de adenilato es significativamente menor en las células germinales, que en las células cultivadas en medios libres en nitrógeno (no filtrables).

Tabla 2.- Muestra las concentraciones de nucleotidos y carga energetica de adenilato en Azotobacter vinelandii ATCC 12837, cultivado en medios de dializado de suelo.

t	% c.g.	nº microorg.	ATP	ADP	AMP	ATP/ADP	total	c.e.a
24 h	5	7×10^6	1.9	0.91	5.0	2.0	6.81	0.34
48 h	50	2×10^8	0.09	1.91	5.5	0.04	7.5	0.10
5 d	97	6.9×10^8	0.09	2.90	4.5	0.03	7.5	0.20
10 d	97	3×10^7	0.08	0.92	2.5	0.08	3.5	0.16
60 d	100	3.3×10^7	0.08	0.92	2.5	0.08	3.5	0.16

Tabla 3.- Muestra las concentraciones de nucleotidos y carga energetica de adenilato de Azotobacter vinelandii ATCC 12837, cultivado en medios libres en nitrogeno.

t	% c.g.	nº microorg.	ATP	ADP	AMP	ATP/ADP	total	c.e.a.
24 h	-	2×10^7	7.6	6.0	0.18	1.3	13.70	0.76
48 h	-	2×10^8	6.4	5.5	0.11	1.1	12.01	0.75
5 d	-	2×10^8	1.1	2.2	2.00	0.55	5.30	0.40
10 d	-	5×10^8	0.7	5.0	4.50	0.14	10.20	0.30
60 d	100	3×10^7	0.09	2.0	1.10	0.04	3.10	0.30

t.- tiempo (h=horas, d=dias). c.g..-Celulas germinales.

c.e.a.- Carga energetica de adenilato.

Todos los valores son media de tres determinaciones realizadas en tres cultivos distintos. La desviacion standard esta comprendida entre 0.03-0.07. Las concentraciones de los nucleotidos son expresadas en nonagramos/ 10^8 celulas.

Las diferencias cuantitativas en proteínas entre las células germinales y vegetativas (ver tabla 1), fueron también encontradas al estudiar cualitativamente las mismas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los resultados de este estudio han mostrado la existencia de un mayor número de bandas de proteínas en los geles correspondientes a las células no filtrables desarrolladas en medios libres en nitrógeno en relación a los geles que se utilizaron para las formas filtrables. En otras palabras podemos decir que si bien en ambos medios Azotobacter presenta proteínas comunes, en la zona correspondiente a bandas de proteínas de bajo peso molecular las diferencias entre ambos tipos celulares fueron muy grandes. En las células germinales estas bandas de proteínas se encontraron ausentes.

El estudio de la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, se realizó mediante el test de reducción de acetileno. Mediante esta técnica hemos podido determinar las diferencias en la fijación de nitrógeno de A. vinelandii, de acuerdo con los distintos estados morfológicos y en distintos medios de cultivo. La tabla 4, muestra los resultados obtenidos en estos estudios.

Como puede verse en la tabla 4, los resultados de fijación de nitrógeno solo resultaron positivos en el caso de medios libres en nitrógeno. Al ser esta determinación realizada a las 24 horas de incubación, quedaba por demostrar, si las células germinales poseen la capacidad de fijación de nitrógeno. Para ello repetimos los experimentos anteriores inoculando a medios libres en nitrógeno suspensiones muy concentradas de A. vinelandii tanto al estado morfológico de forma filtrable como al de bacilo pleomorfo típico de medios de laboratorio. Cada hora estos culti-

Tabla 4.- Mostrando la capacidad de fijacion de nitrogeno atmosferico para Azotobacter vinelandii ATCC 12837, dependiendo del estado morfologico y el medio de cultivo en el cual se realiza la determinacion.

Tipo morfologico inoculado	Medio de cultivo para el test	Fijacion de ^a nitrogeno
No filtrables ^b	Burk's	+
Celulas germinales ^c	Burk's	+
No filtrables	Burk's+NH ₄	-
Celulas germinales	Burk's+NH ₄	-
No filtrables	Dializado ^d	-
Celulas germinales	Dializado	-
No filtrables	Suelo ^e	-
Celulas germinales	Suelo	-

a.- Lectura a las 24 horas de incubacion a 28°C.

b.- Azotobacter cultivado en medios de Burk's por 48 horas.

c.- Azotobacter cultivado en medios de dializado de suelo por cinco dias y filtrado por membranas de 0.45 μ , para eliminar celulas no filtrables.

d.- Medios de dializado de suelo (ver material y metodos).

e.- Suelo esterilizado.

vos fueron examinados en su capacidad de fijacion de nitrogeno y en su morfologia. En el caso de los medios inoculados con celulas no filtrables (procedentes de medios de Burk's), la fijacion se pudo dar como positiva a las dos horas de incubacion, manteniendose la morfologia celular con las mismas caracteristicas de las inoculadas. En los medios inoculados con celulas germinales la fijacion de nitrogeno no fue detectada en el cromatografo hasta

las veinte horas de incubación, momento en el que la morfología celular correspondía a la de células no filtrables análogas estructuralmente a las cultivadas en medios libres en nitrógeno. Resulta pues necesario el cambio morfológico desde célula germinal a célula no filtrable para que tenga lugar la fijación de nitrógeno en medida al menos detectable por la técnica utilizada.

Analizando las características del cromosoma de las células germinales en relación con las células cultivadas en medios libres en nitrógeno, hemos podido observar que ambos cromosomas presentan el mismo peso molecular, sin encontrar en ningún caso fragmentos de DNA extracromosómico. En estos estudios de electroforesis de DNA, se usó como control Escherichia coli K 12.

El estudio anatómico se realizó mediante observaciones seriadas de cultivos de dializado, utilizando microscopía de contraste de fases y electrónica. Mediante microscopía óptica hemos podido observar el ciclo de vida de Azotobacter en medios de dializado de suelo. Este ciclo de vida queda esquematizado en la figura 2, en la que junto con el ciclo de vida complejo desarrollado por Azotobacter en el suelo, se muestran otros ciclos anteriormente establecidos.

El establecimiento de este ciclo de vida complejo para Azotobacter, cambia sustancialmente los conceptos anteriormente establecidos, eliminando a los quistes como parte del ciclo de vida en la naturaleza. Consideramos a Azotobacter en el suelo como un microorganismo pleomorfo y a las células filtrables como parte del ciclo normal de vida. Estas observaciones han sido confirmadas mediante microscopía electrónica.

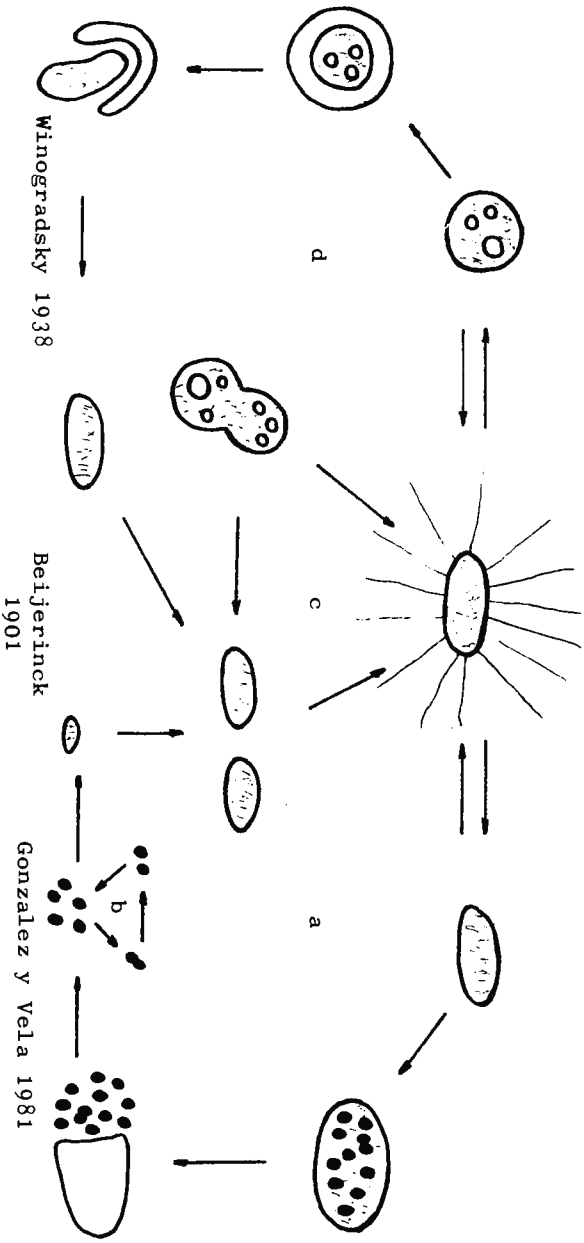


Fig. 2.- Mostrando el ciclo complejo de vida de Azotobacter en medios de suelo (a), el cual incluye la existencia de formas filtrables como parte del mismo (b). Se adjuntan ciclos (c y d) establecidos con anterioridad en medios definidos de laboratorio.

El consumo de oxígeno de las células germinales, puso de manifiesto el interés de conocer la constitución citocromica de estas células en comparación con las desarrolladas en medios libres en nitrógeno. Los resultados de este estudio han puesto de manifiesto importantes diferencias entre ambos tipos celulares. Así la fracción R_3 de las células vegetativas, mostraron cambios oxidoreductivos (tras la adición de Ditionato Sódico) a 629, 600, 561, 553, 531, 524, y 457, correspondientes a fracciones alfa y beta de los citocromos a_2 , a_1 , b_1 , c_4 , c_5 y flavoproteínas. Por el contrario al estudiar la fracción R_3 aislada desde las células germinales, cambios oxidoreductivos solo se observaron en los puntos correspondientes a citocromos a_2 , a_1 y flavoproteínas.

Todo un amplio estudio de las características de resistencia a los agentes físicos han sido realizadas, comparando células germinales y vegetativas. Estas pruebas han incluido: Resistencia a las radiaciones ultravioletas y capacidad de fotorreactivación, resistencia al calor, resistencia al ClNa, resistencia a la lisis enzimática, resistencia a la desecación y resistencia a los tratamientos ultrasónicos.

A las radiaciones ultravioletas, las células germinales resultaron ligeramente más sensibles que las células cultivadas en medios definidos. En la Fig. 3, se recoge gráficamente el resultado de este estudio. Como se puede apreciar en esta figura, la curva de muerte de las células germinales de A. vinelandii, es más acentuada que la resultante para las células control. Esta mayor sensibilidad, es compensada por una mayor capacidad de fotorreactivación por parte de las células germinales. Estos resultados quedan reseñados en la Fig. 4.

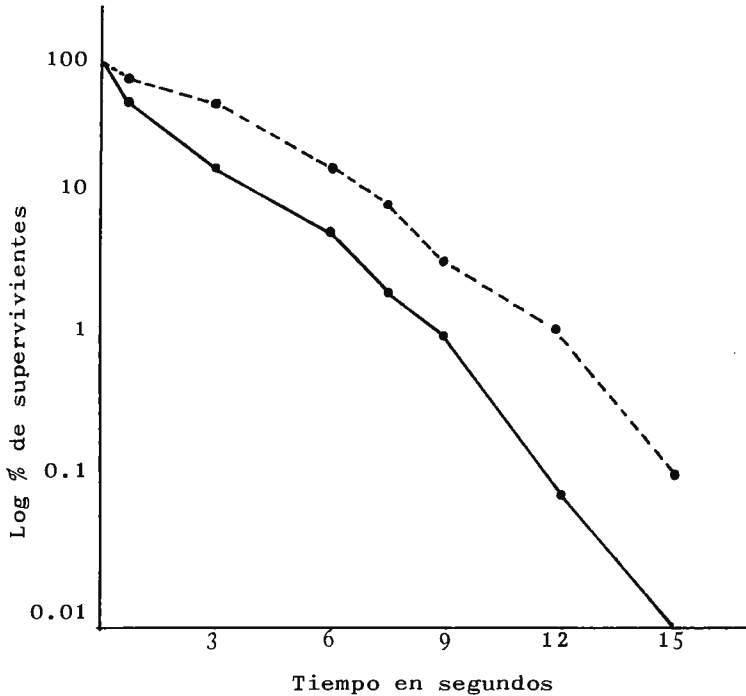


Fig.3.- Muestra las curvas de muerte de Azotobacter vinelandii ATCC 12837, alas radiaciones ultravioletas. La curva discontinua representa a las células vegetativas cultivadas en medios libres en nitrógeno. La curva continua, corresponde a las células germinales. Cada punto de la figura, es media aritmética de cinco determinaciones. Puede observarse mayor sensibilidad a las radiaciones ultravioletas por parte de las células germinales.

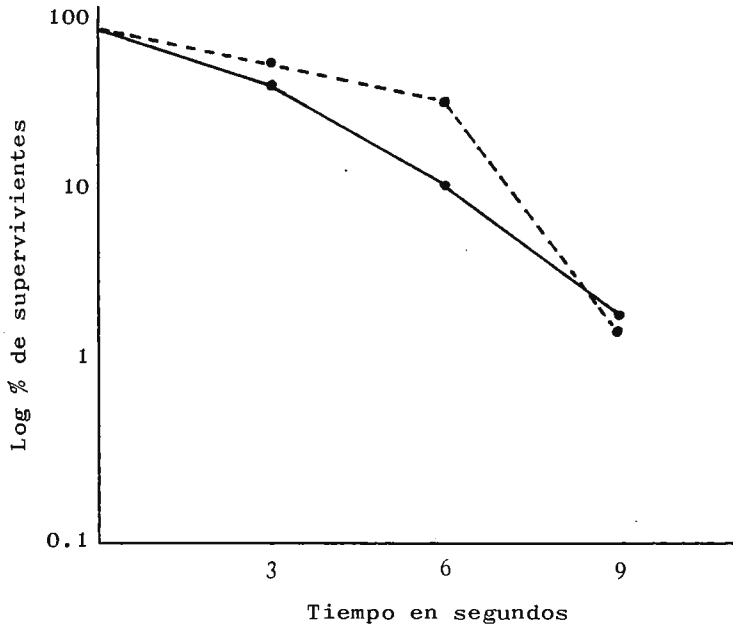


Fig. 4.- Muestra las curvas de muerte correspondientes a Azotobacter vinelandii ATCC 12837, después de un tratamiento con radiaciones ultravioletas y posterior fotorreactivación. La curva discontinua indica la dinámica seguida por las células cultivadas en medios libres en nitrógeno. La curva continua, representa a las células germinales. Como se observa, considerando el proceso de fotorreactivación, la sensibilidad a las radiaciones es prácticamente la misma para ambos tipos morfológicos.

Los estudios de termorresistencia, nos mostraron tanto a las células vegetativas como a las germinales con una marcada sensibilidad al calor. Las células estudiadas se obtuvieron desde cultivos de 2, 4, y 14 días, pero en ninguno de los casos se encontró supervivencia después de un tratamiento a 55°C por 5 minutos.

El ClNa resultó un elemento muy tóxico para las formas filtrables de Azotobacter. Esta toxicidad fue menos elevada para las células vegetativas cultivadas en medios definidos. Estos resultados quedan patentes en la tabla 5, en la que podemos ver como a las concentraciones de 10% de ClNa, las células obtenidas desde medios de Burk's sobreviven hasta 24 horas. Por el contrario las células germinales pierden su viabilidad a esta concentración antes de 1 hora.

La resistencia a los ultrasonidos, se realizó en células cultivadas en medios de Burk's con 0.5% de glucosa y en células germinales. Después del tratamiento, los resultados (ver Fig. 5) nos mostraron como las células germinales presentan una casi absoluta insensibilidad a los tratamientos sónicos utilizados en la prueba. Para las células cultivadas en medios definidos, los resultados fueron marcadamente diferentes, como queda patente en la Fig. 5.

La lisis celular mediante tratamientos enzimáticos con Lisozima - EDTA y posterior choque osmótico con Lauril Sulfato Sódico, se realizó para ambos tipos morfológicos de Azotobacter. Con independencia de la edad del cultivo, las células germinales se mostraron totalmente resistentes a este tratamiento. Por el contrario las células vegetativas cultivadas en medios definidos se mostraron como muy sensibles. Esto pone de manifiesto las

Tabla 5.- Supervivencia de Azotobacter vinelandii ATCC 12837 a la concentración de ClNa. Este estudio se realiza en células vegetativas cultivadas en medios libres en nitrógeno, así como en células germinales obtenidas desde medios de dializado de suelo.

% ClNa		Tiempo en horas						
		1	2	3	4	8	24	48
Células germinales	0	+ ^a	+	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	+	+	+	+
	1.0	+	+	+	+	+	+	-
	2.0	+	+	+	+	+	+	-
	5.0	+	+	+	+	+	-	-
	10,15,22.5	-	-	-	-	-	-	-
Células vegetativas		0	+	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	+	+	+	+
	1.0	+	+	+	+	+	+	+
	2.0	+	+	+	+	+	+	+
	5.0	+	+	+	+	+	+	-
	10.0	+	+	+	+	+	+	-
	15.0	+	+	+	+	+	-	-
	22.5	+	+	+	+	+	-	-

a.- Crecimiento positivo, al ser inoculadas nuevamente las células a medios frescos, después del tratamiento salino.

profundas diferencias en las envolturas de ambos tipos celulares.

Los resultados en el estudio morfológico de Azotobacter, nos ha mostrado que las formas de supervivencia en hábitat naturales son las células germinales (formas filtrables). Era pues

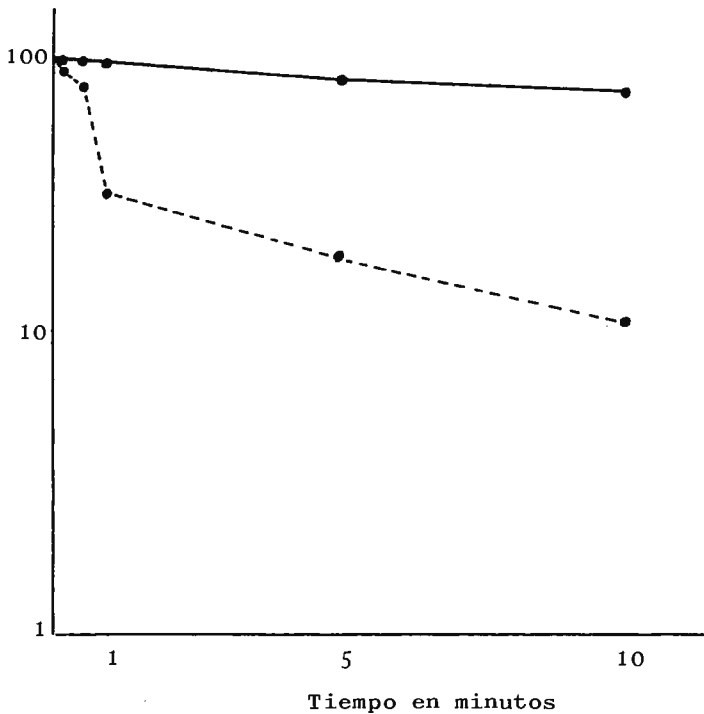


Fig.5.- Muestra las curvas de muerte de las células vegetativas (línea discontinua) y células germinales (línea continua) de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837, al ser sometidas a la acción de ultrasonidos. Como se observa las células germinales presentan una mayor resistencia a los ultrasonidos, que las células cultivadas en medios definidos. Cada punto de la figura, representa la media aritmética de cinco determinaciones.

necesario demostrar la capacidad de resistencia a la desecacion, ya que nosotros hemos demostrado la existencis de formas filtra- bles en suelos conservados en desecacion y esterilidad por perio- dos de tiempo entre 15 y 20 años. De esta forma, en distintos pe- riodos de tiempo de incubacion (ver material y metodos), las ce- lulas de A. vinelandii procedentes desde medios de suelo y Burk's se depositaron en filtros esteriles y estos desecados a 28°C en esterilidad. Los resultados mostrados en la Tabla 6, ponen de manifiesto que los cultivos en medios de dializado de suelo, des- pues de 5 dias de incubacion (casi 100% de celulas germinales), presentan una marcada resistencia a la desecacion, no presente en las celulas cultivadas en medios definidos.

Tabla 6.- Resistencia a la desecacion de Azotobacter vinelandii ATCC 12837, cultivado en medios de dializado de suelo y libres en nitrogeno.

Tiempo de incubacion ^a	Burk's	Dializado de suelo
1	8 ^b	16
2	8	16
3	8	16
4	8	60
5 a 70	8	90

a.- Tiempo en dias de incubacion de los cultivos. b.- Tiempo ma- ximo que las celulas soportan el tratamiento de desecacion, en dias.

Los ultimos estudios realizados en las celulas filtra- bles de Azotobacter, tuvieron por objeto la busqueda de los compo- nentes I y II de la nitrogenasa, ya que aunque mediante determina-

ciones indirectas (reduccion de Acetileno) hemos establecido la incapacidad de la fijacion de nitrogeno, necesitabamos una medida directa de la ausencia de la nitrogenasa, a nivel de sus dos componentes. Este estudio nos permitiria observar si la fijacion de nitrogeno no se realiza bien por una inhibicion de la enzima en su actividad, en su sintesis o porque solamente uno de sus componentes fuera sintetizado.

Las celulas germinales, se inocularon a medios de dializado y libres en nitrogeno. A las 6 y 40 horas de incubacion a 28°C, se determinaron los componentes de la nitrogenasa. Los resultados (mostrados en tabla 7), ponen de manifiesto como solo en medios libres en nitrogeno (despues de 40 horas de incubacion) se detectan los componentes I y II.

Tabla 7.- Muestra los componentes I y II de la nitrogenasa en Azotobacter vinelandii ATCC 12837, dependiendo del tipo de medio en el que las celulas germinales son inoculadas y el estado morfologico.

Medio de inoculacion ^b	t ^a	% celulas germinales	componente I	componente II
d.s. ^c	6	95	-	-
Burk's	6	92	-	-
d.s.	40	8	-	-
Burk's	40	12	+	+

a.- tiempo de incubacion de las celulas germinales inoculadas en horas. b.- medio de cultivo en el que las celulas germinales se inocularon. c.- Medio de dializado de suelo.

DISCUSION

La gran controversia existente en la literatura en torno al ciclo de vida de Azotobacter y la presencia de formas filtrables creemos que ha sido completamente aclarada. El concepto de principio ecologico establecido por Winogradsky (33), nos parece incorrecto ya que el autor trata de reproducir las condiciones naturales de cultivo, basandose en una fuente de carbono unica en muy baja concentracion y sales minimas adicionadas al mismo. Esta metodologia en ningun caso reproduce ni tan siquiera superficialmente las condiciones naturales de crecimiento de los microorganismos. En la naturaleza, los microorganismos se encuentran en un medio compuesto por numerosos elementos carbonados y sales minerales muy diversas. Todo este conjunto, tendra tanto accion positiva como negativa en el desarrollo. Nuestro medio de cultivo, si bien no reproduce totalmente las condiciones naturales, es el que mas se asemeja a las autenticas condiciones de crecimiento. Este medio no solo es util para el estudio de Azotobacter, sino que pensamos sera aplicable a cualquier microorganismo del suelo o agua.

En este medio de dializado de suelo, al estudiar la morfologia de Azotobacter hemos podido demostrar que estos microorganismos como ya mostraran Lohnis y Smith (20) y otros autores (11, 16, 19, 24), poseen un ciclo de vida complejo (ver Fig. 2). En este ciclo de vida podemos destacar: 1.- Pleomorfismo, 2.- Exis-

tencia de formas filtrables, 3.- No presencia de quistes.

La existencia de formas filtrables, tan duramente atacada por Winogrdsy (33), ha sido en medios de suelo la morfología de Azotobacter a partir del quinto día de incubación en medios de dializado de suelo. Considerando que estas células germinales son predominantes en medios de suelo, podemos decir que estas células son la verdadera morfología de estos microorganismos en hábitat naturales. Las críticas de poca reproductibilidad o uso de sistemas de filtrado poco fiables, han sido en este caso anuladas. Nosotros podemos afirmar con los resultados obtenidos que Azotobacter en medios definidos (con distintas fuentes de carbono) realiza un ciclo de vida sencillo, en la que la presencia de formas filtrables solo ocurre en cultivos muy viejos. En medios semejantes al natural, se verifica un ciclo de vida complejo, en el que las células filtrables representan un estado de reproducción y resistencia.

Si observamos la bibliografía, distintos autores (3, 4, 19, 20) han denominado a las células filtrables con diferentes nombres: Gonidias, microgonidias, arthrosporas, microsporas, etc. Nosotros teniendo en cuenta las características de estas formas filtrables de generar nuevamente células vegetativas no filtrables de Azotobacter, hemos creído como más idóneo el nombre de "células germinales".

No existe duda posible de las características germinales de las células filtrables de Azotobacter. En todas las experiencias realizadas, hemos podido observar como al inocular en medios de dializado de suelo, las células germinales han generado células de Azotobacter no filtrables típicas en morfología a las

desarrolladas en medios libres de nitrógeno. Posteriormente estas células han originado nuevamente células germinales estableciendo de esta forma el ciclo de vida complejo.

Las células germinales difieren grandemente en su composición química cuantitativa (ver tabla 1), en relación a las células desarrolladas en medios definidos. La composición de proteínas, glucidos y lípidos resultan muy superiores en Azotobacter cultivado en medios libres de nitrógeno. Si bien la composición de ácidos nucleicos se mantiene constante, la cantidad de DNA resulta más elevada en las células germinales.

Las células germinales no presentan ni morfológicamente ni fisiológicamente, semejanzas con las esporas bacterianas. No podemos confirmar en contraposición con otros autores (5, 12), que Azotobacter en el suelo no origina estructuras análogas a esporas. Las formas filtrables al microscopio electrónico o con tinciones diferenciales nunca han mostrado ninguna semejanza con esporas. Tampoco las células germinales han mostrado termorresistencia.

Un punto que nunca ha sido aclarado por autores anteriores es como Azotobacter puede sobrevivir en la naturaleza por periodos de tiempo tan prolongados y en condiciones adversas (31). Si bien la estructura de los quistes representan un estado de diferenciación celular, más resistente a la desecación y radiaciones (25), considerando su actividad metabólica, los quistes no pueden explicar los resultados de supervivencia de estos microorganismos. Vela y Wyss (29), pronosticaron al estudiar la resistencia de Azotobacter a las radiaciones en suelos naturales: "La posibilidad de un Azotobacter de menor tamaño al estudiado en el

laboratorio, no debe ser despreciada".

Nuestros resultados confirman esta hipótesis, ya que Azotobacter en el suelo presenta un estado morfológico de célula filtrable. Las células germinales, representan pues un estado de resistencia en la naturaleza, como indican su nulo consumo de oxígeno, baja carga energética de adenilato, alto coeficiente ácidos nucleicos/proteínas (0.4), resistencia a la rotura, resistencia a la desecación y baja actividad proteica (citocromos no sintetizados y eliminación de proteínas de bajo peso molecular). Todos estos resultados junto con el aislamiento de células germinales de suelos conservados en desecación en nuestro laboratorio por 20 años (31), nos ponen de manifiesto que estas células constituyen la forma de resistencia de Azotobacter y no las anteriormente reseñadas (quistes).

La baja actividad metabólica (carga energética de adenilato) y bajo consumo de oxígeno, muestran a las células germinales como un nuevo estado morfológico no descrito con anterioridad.

Una de las características fisiológicas más importantes en Azotobacter, es su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico. Es bien conocida la inhibición de la nitrogenasa por los iones NH_4^+ . En los medios de suelo A. vinelandii nunca presento actividad nitrogenasica y en ningún caso han sido aislados componentes I y II. Esto sugiere que en este tipo de medios, la fijación de nitrógeno no tiene lugar. Nosotros pensamos, si bien aun no tenemos pruebas absolutas, que normalmente en el suelo no existe fijación de nitrógeno por parte de Azotobacter. Para esta de-

duccion, nos basamos:

- 1.- Las formas filtrables, no poseen nitrogenasa y solo las celulas originadas por estas en medios libres en nitrogeno la poseen.
- 2.- Las celulas germinales constituyen la forma normal de Azotobacter en el suelo.
- 3.- Las concentraciones de nitrogeno en el suelo normalmente inhiben la actividad de la nitrogenasa.

Podemos considerar, que la fijacion de nitrogeno es solo manifestada bajo determinadas condiciones fisiologicas y morfologicas de Azotobacter, de dificil realizacion en habitat natural.

Tenemos pues que considerar despues de estos estudios, que Azotobacter constituye una entidad fisiologica distinta a la actualmente aceptada. Nuestros resultados ponen de manifiesto un ciclo de vida complejo, la existencia de las celulas germinales como forma de reproduccion y resistencia. Estos resultados en algunos sentidos de simple introduccion, cambian radicalmente los conceptos de diferenciacion celular, sistemas de reproduccion y supervivencia bacteriana. Futuros trabajos, aportaran mas resultados, para el mejor conocimiento de las incognitas: Fijacion de Nitrogeno, induccion de sistemas enzimaticos, diferenciacion celular, genetica, etc. Estos estudios deberan realizar cambios importantes para el mejor conocimiento de la bacteriologia y biologia en la Naturaleza.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lladegbami,S.L., J.C.Tsai and G.R.Vela. 1979. Adenylate Energy Charge of Azotobacter vinelandii, during encystment. Current Microbiol. 2:327-329.
- 2.- Beijerinck,E. 1901. Centr.Bakt.Parasitenk. II, 7,562, en Morales Manzano,J. 1957. Nuevo estudio biologico del genero Azotobacter (Descubrimiento de las formas L), Tesis Doctoral, Universidad de Madrid-Facultad de Ciencias.
- 3.- Bisset,K.A. 1948. Observations upon the bacterial nucleus. J. Hyg. 46:262-266.
- 4.- Bisset,K.A., and C.M.F.Hale. 1953. The cytology and life-cycle of Azotobacter chroococcum. J.gen.Microbiol. 8:442-448.
- 5.- Bisset,K.A. 1955. Evidence from the cytology of Azotobacter chroococcum of relationship with Rhizobium and Bacillaceae. J.gen.Microbiol. 13:442-445.
- 6.- Bradford,M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding. Anal.Biochem. 72:248-254.
- 7.- Brill,W.J., J.Westphal, M.Stieghorst, L.C.Davis, and V.K. Shah 1974. Detection of Nitrogenase component and other nonheme - iron proteins in polyacrylamide gels. Anal.Biochem. 60:237-241.
- 8.- Buchanan,R.E., and N.E.Gibbons, (Editor), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 1974.
- 9.- Cagle,G.D., and G.R.Vela. 1971. Giant cysts and cysts with multiple central bodies in Azotobacter vinelandii. J.Bacteriol. 107:315-319.
- 10.-Chapman,A.G., Fall,L., and D.Atkinson. 1971. Adenylate energy Charge in Escherichia coli during growth and starvation. J. Bacteriol. 108:1072-1086.

- 11.- Eisentark,A., K.J.McMahon, and R.Eisentark. 1950. A citological study of pleomorphic strain of Azotobacter with the electron and phase microscopies and the Robinow nuclear-staining techniche. J.Bacteriol. 59:75-81.
- 12.- Hale,C.M.F., and K.A.Bisset. 1956. Comparison of staining reactions of the cell wall of Azotobacter chroococcum and those of Gram-negative and Gram-positive bacteria. J.gen. Microbiol. 15:423-427.
- 13.- Herbert,D., P.J.Phipp, and R.E.Strange. 1971. Method in microbiology vol. 5B. pag.265-277. Ed. por Norris,J.R. y D.W. Ribbons, Acad. Press. London.
- 14.- Herbert,D., P.J.Phipp, and R.E.Strange. 1971. Method in microbiology vol. 5B. pag.316-320. Ed. por Norris,J.R. y D.W. Ribbons, Acad. Press. London.
- 15.- Johnson,R., J.H.Gentile, and S.Cheer. 1974. Automatic sample injector, its application in the analysis of adenosine triphosphate. Analyt.Biochem. 60:115-121.
- 16.- Jones,D.H. 1920. Further studies on the growth cycle of Azotobacter. J. Bacteriol. 5:75-81.
- 17.- Jurtshuk,P., and L.Old. 1968. Cytochrome c oxidation by the electron transport fraction of Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol. 95:1790-1797.
- 18.- Law,J.H., and A.Slepecky. 1961. Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. J.Bacteriol. 82:33-36.
- 19.- Lawrence,J.C. 1955. Filterability of the swarmer of Rhizobium and Azotobacter. Nature 26:1033-1034.

- 20.- Lohnis, F., and Smith, N.R. 1923. Studies upon the life cycle of the bacteria. *J. Agr. Res.* 23:401, en Rubenchick, L.I. 1963. (traducción inglesa). *Azotobacter* and its use in agriculture. Published for the National Science Foundation, Washington D.C.
- 21.- Luft, J.H. 1961. Improvement in epoxy resin embedding method *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414.
- 22.- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3:208-218.
- 23.- Meyers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell, and S. Falkow. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127:1529-1537.
- 24.- Miehle, H. 1923. Sind ultramikopische organismen in der Natur verbreitet. *Biol. Zentralbl.* 43:1, en Rubenchick, L.I. 1963. (traducción inglesa). *Azotobacter* and its use in agriculture. Published for the National Science Foundation, Washington D.C.
- 25.- Socolofsky, M.D., and O. Wyss. 1962. Resistance of the *Azotobacter* cyst. *J. Bacteriol.* 84:119-124.
- 26.- Stewart, W.D.P., G.P. Fitzgerald, and R.H. Burris. 1967. In situ studies on N_2 fixation using acetylene reduction technique. *Biochem.* 58:2071-2078.
- 27.- Stheler, B.L. 1968. Bioluminescence assay: Principles and practice, pp, 99-181. En: Glick, D. (ed.), *Methods of Biochemical analysis*, vol. 16. New York: John Wiley and Sons.
- 28.- Vanden Berghe, D.A., and Pattyn. 1979. Comparison of protein from *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium nonchronogenicum* and *Mycobacterium terrae* using flat bed electrophoresis. *J. gen. Microbiol.* 111:283-291.

- 29.- Vela,G.R., and O.Wyss. 1965. Radiation resistance of soil Azotobacter. J.Bacteriol. 89:1280-1285.
- 30.- Vela,G.R., and J.W.Peterson. 1969. Azotobacter cysts: Reactivation by white light after inactivation by ultraviolet radiation. Science 166:1296-1297.
- 31.- Vela,G.R. 1974. Survival of Azotobacter in dry soil. Appl. Microbiol. 28:77-79.
- 32.- Wilson,P.W., and S.C.Knight. 1952. Experiment in bacterial Physiology, p.49. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- 33.- Winogradsky,S. 1938. Sur la morphologie et l'oecologie des Azotobacter. Ann.Inst.Pasteur,(Paris) 60:351-400.



FUNDACION JUAN MARCH

SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natrlurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH Intracelular.
- 48 García García, A.:
Relación entre Iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el 4^{to} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Álvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de *Artemia salina*.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los linfocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Gallán Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.ª:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótopa.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopía de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.
- 150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna.

