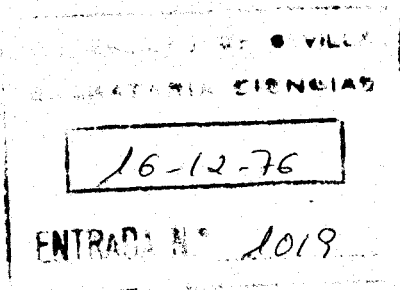


R. 18.587

TI-534



CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL GENERO RHIZOBIUM.
VALORACION DEL ACIDO INDOL ACETICO EN LOS LI-
QUIDOS METABOLICOS.

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en
Ciencias, Sección de Biológicas, por el Licenciado
D. ANGEL M. GUTIERREZ NAVARRO.

Angel M. Gutierrez Navarro

Sevilla, diciembre de 1.976

EL DIRECTOR Y PONENTE

Prof. Dr. D. Julio Pérez Silva.

Catedrático de Microbiología.

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Julio Pérez Silva, al que deseo hacer constar mi agradecimiento por sus orientaciones y sus constantes interés y dedicación.

Asimismo, me es grato expresar mi agradecimiento,

A mis compañeros del Departamento de Microbiología, y muy especialmente, a D. Ramón Bellogín Izquierdo, D. Tomás García Rodríguez y D. Manuel Megías Guijo, por su valiosa y desinteresada ayuda.

Al Departamento de Estadística Matemática, especialmente al Dr. Parra, por su ayuda en el tratamiento matemático de los datos.

A los Dres. Cárdenas y Castillo, del Departamento de Bioquímica, por sus útiles sugerencias.

Al Departamento de Botánica, por la ayuda prestada en la determinación de las plantas utilizadas.

Al Departamento de Genética, por permitirnos utilizar su material para el estudio del ADN.

Finalmente, agradezco el apoyo económico prestado por la Universidad de Sevilla, sin el que hubiera sido imposible la realización del trabajo.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 Antecedentes bibliográficos..... | 2 |
| 1.1.1. El género <u>Rhizobium</u> | 4 |
| 1.1.2. Leguminosas investigadas | 18 |
| 1.1.3. Fisiología de la formación de nódulos | 22 |
| 1.2 Plan del presente trabajo | 31 |
| 2. MATERIALES Y METODOS | 33 |
| 2.1. Materiales | 34 |
| 2.1.1. Plantas utilizadas | 34 |
| 2.1.2. Microorganismos | 35 |
| 2.1.2.1. Microorganismos aisla- dos de <u>Tetragonolobus</u> | 35 |
| 2.1.2.2. Otras especies del gé- nero <u>Rhizobium</u> | 35 |
| 2.1.2.3. Bacterias pertenecien- tes a otros géneros | 36 |
| 2.1.3. Sustancias químicas utiliza- das | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Métodos | 38 |
| 2.2.1. Método de valoración del AIA | |
| en presencia de AIL..... | 38 |
| 2.2.1.1. Cromatografía..... | 38 |
| 2.2.1.1.1. Cromatografía en | |
| papel..... | 38 |
| 2.2.1.1.2. Cromatografía en | |
| capa fina | 39 |
| 2.2.1.2. Reacción de Salkowski | 40 |
| 2.2.1.2.1. Descripción | 40 |
| 2.2.1.2.2. Puesta a punto | 41 |
| 2.2.1.2.3. Elaboración de la | |
| recta de calibrado | 43 |
| 2.2.1.3. Estudios espectrofotomé- | |
| tricos | 43 |
| 2.2.1.4. Estudios fluorimétricos .. | 43 |
| 2.2.1.5. Método de valoración de | |
| AIA en presencia de AIL ... | 44 |
| 2.2.2. Aislamiento de <u>Rhizobium</u> | 45 |
| 2.2.3. Tests de nodulación | 46 |
| 2.2.3.1. Preparación de las semi- | |
| llas | 46 |
| 2.2.3.2. Inoculación de las semi- | |
| llas | 47 |
| 2.2.3.3. Cultivo de las plantas ... | 47 |
| 2.2.4. Estudio de las estirpes de bac- | |
| terias aisladas de <u>Tetragonolo-</u> | |
| <u>bus</u> | 48 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.1. Estudio morfológico..... | 48 |
| 2.2.4.1.1. Descripción de las colonias | 48 |
| 2.2.4.1.2. Estudio citológico co | 49 |
| 2.2.4.1.2.1. Tinción de grá- nulos sudanófilos | 49 |
| 2.2.4.1.2.2. Tinción de grá- nulos metacromáticos | 49 |
| 2.2.4.2. Pruebas bioquímicas | 50 |
| 2.2.4.2.1. Acción sobre la le- che tornasolada | 50 |
| 2.2.4.2.2. Producción de indol . | 50 |
| 2.2.4.2.3. Utilización de citra- to | 50 |
| 2.2.4.2.4. Reacción de Voges Proskauer | 51 |
| 2.2.4.2.5. Reacción del rojo de metilo | 51 |
| 2.2.4.2.6. Reducción de los ni- tratos | 51 |
| 2.2.4.2.7. Prueba de la ureasa . | 52 |
| 2.2.4.2.9. Tolerancia a la sa- linidad | 52 |
| 2.2.4.2.10. Licuación de la gela- tina | 52 |
| 2.2.4.2.11. Hidrólisis de la gelatina | 52 |
| 2.2.4.2.12. Prueba de la catalasa | 53 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4.2.13 Prueba de la oxida- | 53 |
| dasa | |
| 2.2.4.3. Características de cul- | 53 |
| tivo | |
| 2.2.4.3.1. Utilización de diver- | 53 |
| sas fuentes de carbono | |
| 2.2.4.3.2. Estudio del crecimien- | 54 |
| to en relación con el pH .. | |
| 2.2.4.3.3. Estudio de la tempe- | 54 |
| ratura óptima de crecimien- | |
| tp | |
| 2.2.4.3.2. Estudio de la curva | 54 |
| de crecimiento | |
| 2.2.4.3.3. Estudio de necesida- | 54 |
| des de factores de crecimien- | |
| to | |
| 2.2.4.4. Aislamiento de ADN de | 56 |
| las estirpes aisladas de <u>Te-</u> | |
| <u>tragonolobus</u> | |
| 2.2.4.5. Determinación del conte- | 58 |
| nido en guanina + citosina | |
| 2.2.5. Ensayo de la producción de | 59 |
| AIA | |
| 2.2.5.1. Procedimiento de extrac- | 59 |
| ción del AIA | |
| 2.2.5.2. Valoración del AIA en | 60 |
| las muestras | |
| 3. RESULTADOS | 61 |
| 3.1. Determinación de AIA en presencia de | 62 |
| AIA | |

| | |
|--|-----|
| 3.1.1. Resultados obtenidos con los métodos cromatográficos | 62 |
| 3.1.2. Reacción de Salkowski | 64 |
| 3.1.3. Técnica de extracción | 79 |
| 3.1.4. Recta de calibrado para el AIA | 79 |
| 3.1.5. Espectrofotometría | 83 |
| 3.1.6. Espectrofluorimetría | 83 |
| 3.1.7. Método de valoración de AIA en presencia de AIL | 85 |
| 3.2. Descripción de las estirpes de <u>Rhizobium</u> aisladas de <u>Tetragonolobus</u> | 126 |
| 3.2.1. Estirpe TM - 1 | 126 |
| 3.2.2. Estirpe TM - 2 | 127 |
| 3.2.3. Estirpe TM - 3 | 129 |
| 3.2.4. Estirpe TM - 4 | 130 |
| 3.2.5. Estirpe TM - 5 | 131 |
| 3.2.6. Estirpe TM - 6 | 133 |
| 3.2.7. Estirpe TPU- 1 | 134 |
| 3.2.8. Estirpe TPU-2 | 135 |
| 3.2.9. Estirpe TPU- 3 | 136 |
| 3.2.10 Estirpe TPA - 1 | 137 |
| 3.2.11. Estirpe TPA - 2 | 139 |
| 3.2.12. Estirpe TPA - 3 | 140 |
| 3.3. Producción de AIA por bacterias | 143 |
| 3.3.1. Técnicas de extracción | 143 |
| 3.3.2. Eválución de la producción de AIA en los cultivos | 151 |
| 3.3.3. Producción de AIA por las bacterias ensayadas | 161 |

| | |
|-----------------------|-----|
| 4. DISCUSION | 165 |
| 5. CONCLUSIONES | 188 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 192 |

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes bibliográficos

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico ha sido un tema que desde hace tiempo ha atraído la atención de los investigadores, tanto por su importancia económica indudable, como por el interés científico del proceso en sí.

Desde antiguo era conocido y se utilizaba el hecho de que las leguminosas enriquecen el suelo en nitrógeno. Sin embargo, este hecho aislado no se relacionaba con la presencia de nódulos en las raíces de estas plantas, los cuales fueron descritos por MALPIGHI en 1.675. Como puede leerse en la obra de DOMMERCUES Y MANGENOT (24), el estudio científico de la fijación simbiótica comenzó con BOUSSINGAULT, quien en 1.838 demostró de una manera clara que las leguminosas fijaban nitrógeno, y sus resultados se confirmaron un poco después con los experimentos de HELLRIEGEL y WILFART, quienes demostraron en 1.888 que sólo las leguminosas que tenían nódulos eran capaces de fijar el nitrógeno atmosférico; además, de los resultados obtenidos por estos dos autores puede deducirse que la nodulación es la consecuencia de la infección de la raíz por bacte-

rias del suelo. El mismo año BEIJERINCK aisló la bacteria causante de la nodulación, a la que llamó Bacillus radicicola, hoy conocida como Rhizobium leguminosarum. El mismo autor aisló en 1.901 el primer fijador libre de nitrógeno, Azotobacter, y desde entonces se han multiplicado los estudios sobre este tema, en gran parte debido al enorme interés práctico del mismo, pues, como es sabido, en muchos casos el principal aliciente para realizar tales investigaciones ha sido la posibilidad de sustituir los abonos nitrogenados por microorganismos fijadores de nitrógeno, lo que tendría una repercusión económica indudable.

Hasta tal punto tiene importancia el aspecto económico del problema, que, según datos recogidos por DOMMERGES y MANGENOT (24), la F.A.O. calcula que la tasa de fijación de nitrógeno por año en todo el mundo es del orden de 10^8 toneladas, atendiendo solamente al que se fija por vía simbiótica. La fijación libre tiene menos importancia, ya que, como es sabido, la energía necesaria para romper el triple enlace entre los dos átomos de la molécula de nitrógeno es tan grande, que los microorganismos fijadores necesitan un enorme aporte de energía, lo que requeriría una gran cantidad de materia orgánica, que, normalmente, no se encuentra en los suelos. Sin embargo, en el caso de la fijación simbiótica, dicha energía es suministrada por la planta, que contribuye con ella a la eficacia fijadora del sistema simbiótico.

Pero no todos los trabajos sobre la fijación simbiótica del nitrógeno han tenido móviles exclusivamente prácticos. En efecto, la simbiosis que nos ocupa ha tenido gran importancia desde hace tiempo, por constituir uno de los fenómenos más peculiares e interesantes desde el punto de vista de la biología

básica. En consecuencia, son muy numerosos los trabajos y revisiones sobre el tema, cuya relación sería interminable. Por ello, sólo citaremos aquí algunas de las más recientes: RAGGIO y RAGGIO (67), JORDAN (45), DART y MERCER (16), MISHUSTIN y SHILNIKOVA (55), BENEMANN y VALENTINE (4), DALTON (14), DILWORTH (22), EVANS y RUSSEL (28), BURRIS (13) y SHANMUGAN y VALENTINE (78).

1.1.1.- El género Rhizobium

Uno de los aspectos más interesantes en el estudio de la fijación del nitrógeno por Rhizobium es, sin duda, la simbiosis entre dicha bacteria y la leguminosa.

En la asociación simbiótica intervienen dos elementos: la leguminosa hospedadora y el Rhizobium, y es conveniente detenerse un poco en esta breve revisión para destacar algunos aspectos relativos a ambos componentes del sistema.

El primer elemento de la asociación simbiótica es el Rhizobium. Este género de bacterias, en la última edición del BERGEY'S (7), aparece incluido, juntamente con Agrobacterium, en la Parte 7, Familia Rhizobiaceae. Aunque aun se admite su separación en dos géneros, las similitudes entre Agrobacterium y Rhizobium son tan grandes que muchos autores proponen la inclusión de las especies de Agrobacterium dentro del género Rhizobium. (12, 21, 36, 43).

Para estudiar la morfología de Rhizobium es necesario distinguir entre formas vegetativas y bacteroides. Como es sabido, se llaman bacteroides a las células de Rhizobium tal como se

encuentran dentro del nódulo maduro, las cuales son esencialmente distintas de las formas vegetativas, es decir de las células tal como se encuentran en la rizosfera, en el tubo de infección o en los medios de cultivo. (5, 6, 15, 32, 77).

En el citado manual de BERGEY se describen los Rhizobium como bacilos de 0,5-0,9 por 1,2-3,0 micras, que pueden presentar formas pleomórficas cuando las condiciones de cultivo son adversas. Contienen granulaciones intracitoplásmicas de poli-beta-hidroxibutirato, que, al microscopio de contraste de fases, aparecen como gránulos muy refringentes. Estos microorganismos son Gram negativos y móviles en cultivos jóvenes. Presentan de dos a seis flagelos peritricos, o bien, un flagelo polar o subpolar y producen un abundante mucopolisacárido cuando se desarrollan en medios ricos en hidratos de carbono. Este polisacárido da lugar por hidrólisis a glucosa y ácido galacturónico, además de una serie de azúcares que varían de unas estirpes a otras, lo que ha llevado a pensar que, como veremos más adelante, dicho polisacárido desempeña un papel importante en el proceso de nodulación (62). Sin embargo, para otros autores el polisacárido no sería más que un agente de agregación en los suelos (24).

Los Rhizobium son microorganismos aerobios, pero pueden desarrollarse en medios con tensiones débiles de oxígeno (0,01 atm). El pH óptimo de crecimiento es de 6,5 - 7, aunque hay especies muy tolerantes respecto a la acidez. Así, Rhizobium japonicum y el grupo de los Rhizobium que nodulan en Vigna sinensis (el llamado "grupo "cow pea"), pueden vivir a pH de 4,0 e incluso de 3,5 (24). También es conocido el hecho de que Rhizobium trifolii puede desarrollarse a pH 4,5 (37). Por otra parte, los rizobios también pueden multiplicarse en medios de cultivo de alcalinidad relativamente alta (37).

De igual manera, hay Rhizobium que tienden a acidificar los medios de cultivo, mientras que otros no alteran el pH de los mismos. Como veremos, este hecho ha sido utilizado con fines taxonómicos.

En cuanto a las colonias de estos microorganismos, en el BERGEY'S se describen como colonias blancas o incoloras. Una característica de ellas es que, cuando crecen en presencia de rojo fenol (90), o de cristal violeta (30) no concentran el colorante, permaneciendo blancas o incoloras, mientras que otras colonias de bacterias que puedan coexistir en las muestras presentan un intenso color rojo o violeta, según el colorante añadido a los medios de cultivo.

La taxonomía de Rhizobium ha sido siempre muy polémica. Ello es debido a que, hasta el momento, el principal criterio que se utiliza para la división del género en especies se basa en la nodulación específica en plantas hospedadoras. En efecto, no todas las estirpes de Rhizobium pueden nodular en cualquier especie de leguminosa, sino que se observa una gran especificidad en este sentido, lo que ha dado lugar a la división de las leguminosas en los llamados grupos de inoculación cruzada, entendiéndose como tal al grupo de leguminosas que pueden ser infectadas por una determinada especie de Rhizobium. Así, Medicago y Melilotus pertenecen al mismo grupo de inoculación cruzada porque ambas pueden ser infectadas por Rhizobium meliloti. Evidentemente, la aplicación de tal criterio taxonómico, además de ser muy laboriosa, puede conducir a grupos artificiales, sobre todo si no se tiene en cuenta la eficacia. En consecuencia, han aparecido un gran número de trabajos sobre la taxonomía de Rhizobium que llegan a conclusiones muy diferentes, lo que ha acentuado la discusión planteada sobre el tema.

En efecto, ya WILSON (95) publicó un trabajo titulado "quienientas razones para abandonar los grupos de inoculación cruzada de las leguminosas", en el que considera que las propiedades infectivas por sí solas no siempre pueden identificar claramente las especies de "bacterias de los nódulos de la raíz". En el mismo sentido se manifiestan otros muchos autores, como BONNIER (12), NORRIS (58), LANGE (50) y GRAHAM (36, 37).

Por otra parte, hay investigadores que suponen que, dadas las similitudes entre Rhizobium y otras bacterias, especialmente las del género Azotobacter y la familia Bacillaceae, no hay justificación para colocarlas en familias separadas. Así, BISSET (10) sugiere que Rhizobium es un género aberrante de la familia Bacillaceae, derivado de Bacillus polymyxa, y que el género Azotobacter y los Clostridium fijadores de nitrógeno pertenecen a un mismo grupo de bacterias estrechamente relacionadas. Esta idea encontró apoyo cuando HINO y WILSON describieron bacilos muy parecidos a B. polymyxa que podían fijar nitrógeno libremente. A este respecto conviene citar los recientes resultados de PAGAN y colaboradores (61), KURZ y LA RUE (49) y otros investigadores, quienes han demostrado la fijación de nitrógeno por cultivos puros de Rhizobium.

NORRIS (58) indica que las leguminosas tropicales son especies muy primitivas desde el punto de vista evolutivo y por ello supone que los Rhizobium que nodulan en ellas (los llamados del grupo "cow pea") también deben ser muy poco evolucionados, por lo que sugiere la importancia de la revisión de las estirpes de Rhizobium que nodulan en plantas tropicales. BISSET (11), estudiando doce estirpes de Rhizobium que nodulaban en leguminosas silvestres y cultivadas del Congo ex-belga, encontró que dichas estirpes pueden, en efecto, considerarse muy

primitivas y que tienen una gran relación con Azotobacter y con las Bacillaceae.

Estos hechos apoyan la idea primitiva de WILSON sobre la poca consistencia de la división en especies del género Rhizobium y de la separación de las Rhizobiaceae y las Bacillaceae.

En consecuencia, se encamina el estudio taxonómico de Rhizobium hacia el establecimiento de nuevos criterios que permitan una clasificación más natural. A continuación citaremos algunos de los más importantes.

GRAHAM (35) preparó antisueros frente a 58 estirpes de "bacterias aisladas de nódulos" y 16 de Agrobacterium, y probó su acción frente a 113 estirpes de Rhizobium, 20 estirpes de Agrobacterium y otras 20 bacterias a las que consideraba relacionadas con ambas, y llega a la conclusión de que se pueden distinguir tres grupos serológicos entre las bacterias del género Rhizobium: (1) Rh. trifolii, Rh. leguminosarum y Rh. phaseoli; (2) Rh. lupini, Rh. japonicum y Rhizobium spp.; (3) Rh. meliloti. Basándose en estos resultados y en otros anteriormente publicados por el mismo autor (36, 37), propone una reorganización del género Rhizobium, que quedaría dividido en dos especies: Rhizobium meliloti y Rh. leguminosarum; en la primera de estas especies quedarían englobados Rh. meliloti, Agrobacterium radiobacter y A. tumefaciens, mientras que en la segunda se agruparían las antiguas R. leguminosarum, R. phaseoli y Rh. trifolii. Las otras dos especies (Rh. lupini y Rh. japonicum) y el grupo Rhizobium spp., que coincide con el llamado grupo "cow pea", se encuadrarían en un nuevo género, Phytomyxa. Esta nueva clasificación propuesta por GRAHAM puede resumirse en el Cuadro I, tomado de la obra de DONMERGES y MANGENOT (24).

Cuadro I: Clasificación de los Rhizobium, según Graham
(Tomado de DOMMERGES y MANGENOT (24), modifi-
cado)

| Género | Especies | Especies anteriores |
|---|--------------------------|--|
| <u>Rhizobium</u> (crecimiento generalmente rápido) | <u>Rh. leguminosarum</u> | <u>Rh. leguminosarum</u> <u>Rh. trifolii</u> <u>Rh. phaseoli</u> |
| | <u>Rh. meliloti</u> | <u>Rh. meliloti</u> <u>Agrobacterium radio-</u> <u>bacter</u> <u>A. tumefaciens</u> |
| <u>Phytomyxa</u> (crecimiento generalmente lento) | <u>Ph. japonica</u> | <u>Rh. lupini</u> <u>Rh. japonicum</u> Grupo "cow pea" |

Hay otras muchas publicaciones en las que se utilizan las técnicas serológicas para clasificar los Rhizobium(92). Con estas técnicas DROZANSKA (25) y VINTIKOVA y colaboradores (93) llegaron a las mismas consideraciones que GRAHAM, independientemente de él.

En 1.964 GRAHAM y GRAHAM y PARKER (36, 37) publicaron dos trabajos que son fundamentales a la hora de discutir la taxonomía de Rhizobium. En el primero de ellos se aplican las técnicas de computadoras al estudio taxonómico del género. Estudia 83 estirpes del género Rhizobium y 38 pertenecientes a Agrobacterium, Chromobacterium (que en la séptima edición del BERGEY'S aparecía como un tercer género de las Rhizobiaceae), Beijerinckia (un fijador libre de nitrógeno) y Bacillus. Para determinar las afinidades entre estos microorganismos emplea el autor el estudio de una serie de cien características, como son: necesidades de factores de crecimiento, utilización de distintas fuentes de carbono y de nitrógeno, resistencia a los antibióticos, características morfológicas, tanto de las células como de las colonias, pruebas bioquímicas e infectividad. Con este tipo de análisis numérico llega a la conclusión de que Chromobacterium, Bacillus y Beijerinckia están poco relacionados entre sí, y con el resto de las bacterias estudiadas. Sin embargo, los resultados obtenidos con Rhizobium y Agrobacterium le llevan a insistir en las modificaciones propuestas el año anterior, incluida la presentación de un nuevo género, Phytomyxa.

En la discusión del trabajo que acabamos de comentar el mismo GRAHAM llama la atención sobre el hecho de que no todas las características empleadas por él tienen el mismo significado taxonómico y, de acuerdo con ello, GRAHAM y PARKER (37)

publicaron un nuevo trabajo en el que se hace un estudio del valor taxonómico de las características empleadas por ellos y que ya habían sido empleadas por LANGE (50) para caracterizar las bacterias que nos ocupan. De sus trabajos deducen los autores que, mediante los tests de nodulación, sólo se pueden distinguir tres grupos de Rhizobium, pero que hay otras características, cuyo valor taxonómico discuten los autores mediante pruebas estadísticas, tales como chi-cuadrado y el valor G de Sneath, que pueden servir para identificar las especies. Ta les características son: necesidades de tiamina, y pantotenato cálcico, crecimiento a pH 4,5 y 9,5, crecimiento a 37°C, tolerancia a una salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo, reducción de los nitratos a nitritos, tamaño de las colonias y presencia de gránulos metacromáticos.

Pero esta división de los Rhizobium en dos géneros, con tener muchos defensores, no es universalmente admitida, ni mucho menos.

NORRIS (58) realizó en 1.965 un estudio de 717 estirpes de Rhizobium, relacionando la acidificación del medio de cultivo con su posición taxonómica tradicional y con la de la planta hospedadora. Atendiendo a estos criterios divide el género en dos grandes grupos:

Grupo I: Rhizobium que acidifican el medio de cultivo

Rh. leguminosarum

Rh. trifolii

Rh. meliloti

Rh. phaseoli

Grupo II: Rhizobium que no acidifican el medio de cultivo

Rh. lupini

Rh. japonicum

Este autor incluye en la especie Rh. japonicum a los Rhizobium del grupo "cow pea". Además, el grupo I está constituido por las especies de crecimiento rápido, y el grupo II engloba a las especies de crecimiento lento en los medios que contienen extracto de levadura.

Sin embargo, en 1.966 ABDEL-CHAFFAR y JENSEN (1) encontraron cuatro estirpes de Rh. lupini, aisladas de Lupinus densiflorus, Benth., que presentaban rápido crecimiento en los medios sólidos y, además, nodulaban en Lotus corniculatus y Anthyllis vulneraria, que no pertenecen al grupo de inoculación cruzada de Lupinus, por lo que proponen la desaparición de Rhizobium lupini como especie y las bacterias pertenecientes a ella queden englobadas en Rh. leguminosarum, propuesto por Graham, mientras que algunas estirpes de Rh. lupini de crecimiento lento podrían quedar englobadas en Phytomyxa japonica, especie, que, como se recordará, fue propuesta también por Graham.

Con el descubrimiento de nuevas técnicas taxonómicas se acentuó aun más la discusión acerca de la taxonomía del género Rhizobium. Una de las características más utilizadas para caracterizar las especies de Rhizobium han sido las propiedades del ADN (20, 21, 27, 31, 43). Así, DE LEY y RASSEL (20), basándose en las propiedades del ADN de diversas estirpes de Rhizobium propusieron una clasificación que, fundamentalmente, coincide con la de GRAHAM. Estudiando los contenidos en guanina y citosina de 85 estirpes de Rhizobium y la distribución de sus fla-

gelos, encontraron que existe una correlación entre una y otra propiedad y, con estos resultados, dividen a los Rhizobium en dos grupos:

Grupo I: Organismos con flagelos peritricos, con crecimiento rápido en los medios de cultivo y con un contenido bajo en pares de guanina y citosina. Estos organismos se encuentran en todos los grupos de inoculación cruzada estudiados por los autores, quienes los dividen en dos subgrupos a los que llaman Rh. leguminosarum y Rh. meliloti.

Grupo II: Organismos con flagelo subpolar con crecimiento lento en los medios que incluyen extracto de levadura en su composición y un alto contenido en guanina y citosina (62,8 al 65,5 %). Este grupo forma nódulos principalmente en Lupinus, Glycine, Vigna, Lotus y Wistaria, y los autores lo agrupan en una sola especie, a la que llaman Rh. japonicum y que coincide con Phytomyxa japonica, Graham.

Las relaciones entre ambos grupos son muy grandes, puesto que los contenidos en guanina y citosina son muy próximos y, en algunos casos, solapan; además, muchos de los microorganismos incluidos en el grupo I presentan flagelo polar o subpolar. Así pues, según estos autores sólo se pueden distinguir tres especies de Rhizobium: Rh. leguminosarum, Rh. meliloti y Rh. japonicum, estando las dos primeras más relacionadas entre sí que con la última.

Para completar su discusión de la hipótesis de Graham acerca de la nueva clasificación de Rhizobium, DE LEY y colaboradores (21) hicieron un estudio similar de 45 estirpes de Agrobacterium, comparándolas con otras estirpes de microorganismos que consideraban relacionados con él, y llegaron a la conclusión de que Agrobacterium, Rh. leguminosarum y Rh. meliloti (entendiendo estas dos especies en el sentido de DE LEY) tienen un contenido en guanina y citosina muy parecido. Apoyándose en resultados de KLEIN y KLEIN, que ellos mismos regogen (21), según los cuales es posible la transformación entre Rhizobium leguminosarum y Agrobacterium, de forma que se puede transferir la patogenia del segundo al primero, lo que demuestra una gran similitud entre los ADN de ambos microorganismos, DE LEY y colaboradores proponen la inclusión de Agrobacterium dentro de Rh. leguminosarum, lo que está también de acuerdo con la clasificación de GRAHAM, que, como se recordará, incluía a A. radiobacter y A. tumefaciens dentro del género Rhizobium. Por otro lado, basándose en argumentos parecidos, incluyen a Beijerinckia dentro de Rh. japonicum.

Otros trabajos de transformación interespecífica entre Agrobacterium y Rhizobium son los de KERN, citados por De Ley, en los que se demuestra la transformación recíproca entre A. tumefaciens y Rh. leguminosarum, utilizando como marcadores la resistencia a la estreptomycinina y a la sulfamida.

Estos trabajos se complementan con los de HEBERLEIN y colaboradores (43) y GIBBINS y GREGORY (31). En el primero de ellos, los autores hacen experimentos de hibridación del ADN de diversas especies de Rhizobium, Agrobacterium, Chromobacterium y algunos otros microorganismos, llegando a la creación de un nuevo género, al que llaman Rhizobium, pero que re-

sulta de una reagrupación de Rhizobium y Agrobacterium. El nuevo género Rhizobium comprendía seis especies, de las que tres eran las dos especies de Rhizobium de Graham, además del género Phytomyxa del mismo autor, y las otras tres serían especies de Agrobacterium.

En el otro trabajo, se aplican tres métodos de hibridación del ADN al estudio de las analogías entre Rhizobium y Agrobacterium y sus autores llegan a la conclusión de que mediante estas técnicas no pueden distinguirse Rh. leguminosarum y Rh. trifolii, al mismo tiempo que se pueden agrupar Rh. lupini y Rh. japonicum por un lado, y Rh. meliloti y Rh. phaseoli, por otro. Las tres estirpes de Agrobacterium utilizadas por estos investigadores estaban, según ellos, muy relacionadas con Rhizobium lupini y con Rh. leguminosarum.

Todos estos resultados concuerdan en esencia con los de GRAHAM y DE LEY, aunque están realizados aplicando técnicas muy diversas.

Mediante otras técnicas de clasificación se han publicado trabajos que apoyan la clasificación propuesta por GRAHAM. Así GOSTKOWSKA (34) estudió distintas características fisiológicas de Rhizobium y llegó a la misma división en especies propuesta por DE LEY.

Otra técnica aplicada al estudio de este problema ha sido la sensibilidad a fagos; mediante esta técnica STANIEWSKI y KOWALSKA (83) llegaron a conclusiones parecidas.

Pero en 1.967 se aplicó un nuevo método, el llamado método de Van Schreven, que consiste en una tipificación de los microorganismos basándose en sus antibiogramas, o, más concretamente, en la resistencia de los mismos a los antibióticos producidos por los microorganismos del género Streptomyces.

STRZELCOWA (84) aplicó este método a una amplísima colección de Rhizobium y estudió la sensibilidad de todas las estirpes de que disponía a los antibióticos segregados por Str. lavendulae, Str. scabiei, y Str. griseolus, dividiendo el género Rhizobium en tres grupos, a los que no llega a dar categoría de especie. pero que, como puede comprobarse, recuerda mucho a la división de DE LEY:

Grupo I: Rh. meliloti, muy sensible a los antibióticos de Str. lavendulae.

Grupo II: En este grupo se encuentran Rh. trifolii, Rh. leguminosarum y Rh. phaseoli, que eran totalmente inhibidos por los antibióticos de Str. lavendulae

Grupo III: En este tercer grupo se incluyen Rh. japonicum y Rh. lupini, que muestran una inhibición total por Str. lavendulae, mientras que no se afectan por los antibióticos producidos por las otras dos especies de Streptomyces.

Estas técnicas de clasificación no han sido utilizadas solamente para distinguir las especies de Rhizobium, sino que la identificación serológica (80) se ha utilizado también para estudiar diferencias entre estirpes de la misma especie y, las técnicas de comparación de ADN, han sido utilizadas a fin de poner de manifiesto posibles diferencias entre los Rhizobium en forma vegetativa y los bacteroides (69).

Pero volviendo al problema de la taxonomía de Rhizobium, como ha podido comprobarse a lo largo de esta exposición, las pruebas que apoyan la clasificación de GRAHAM son muy numerosas, pero, como hemos dicho, repetidas veces, no todos los autores

se manifiestan de acuerdo con ella.

El trabajo que nos ha parecido más interesante en este sentido es el de 'T MANNETJE (86), en el que, aplicando tratamientos estadísticos, se hace un estudio crítico de los resultados presentados por GRAHAM (36) y DE LEY y RASSEL (20), llegando a las siguientes conclusiones: a) Agrobacterium radiobacter y A. tumefaciens constituyen un taxón bien definido; b) Agrobacterium está más relacionado con los Rhizobium de crecimiento rápido que con los de crecimiento lento; c) todas las estirpes de Rhizobium estudiadas están más relacionadas entre sí que con Beijerinckia y Chromobacterium; d) Bacillus, Beijerinckia y Chromobacterium tienen más similitudes entre sí que con Rhizobium. Es evidente que las conclusiones a) y b) están en clara oposición con las obtenidas por Graham. En consecuencia, 'T MANNETJE considera que las especies de Agrobacterium deben seguir agrupadas en un taxón con categoría de género, ya que no está justificada su inclusión dentro de Rhizobium. Por otra parte, estima que el género Rhizobium debe dividirse en dos secciones que tengan a Rh. japonicum y Rh. leguminosarum como especies tipo y que la división en especies quede postergada hasta el estudio exhaustivo de un mayor número de estirpes.

En el BERGEY'S (7), aparece el género Rhizobium dividido, efectivamente, en dos grupos:

- Grupo I: Dos a seis flagelos peritricos; crecimiento rápido en medios con extracto de levadura; contenidos en guanina + citosina que oscilan entre 59,1 y 63,1 moles %:
1. Rh. leguminosarum
 2. Rh. phaseoli

3. Rh. trifolii

4. Rh. meliloti

Grupo II: Flagelo polar o subpolar; crecimiento lento en medios con extracto de levadura. Contenidos en guanina + citosina que oscilan entre 61,6 y 65,5 moles %.

5. Rh. japonicum

6. Rh. lupini

Evidentemente, en el citado Manual se recogen, en un intento de conciliarlas, las diversas opiniones acerca de la taxonomía del género. Aunque reconoce todavía la validez de los grupos de inoculación cruzada, pone de manifiesto la debilidad de este criterio taxonómico, puesto que hay plantas de un grupo de inoculación cruzada que pueden ser infectadas por microorganismos que, normalmente, infectarían leguminosas de otro grupo distinto.

1.1.2.- Leguminosas investigadas

El otro elemento de la asociación simbiótica es la planta hospedadora.

Según datos recogidos en la obra de DOMMERGES y MANGENOT (24), la Familia Leguminosae es una de las más numerosas de toda la botánica: comprende unos 500 géneros con 10.000 a 12.000 especies, distribuidas en tres subfamilias: Cesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoideae. La mayoría de las especies de la

zona templada están agrupadas dentro de las Papilionáceas, mientras que las otras dos subfamilias están localizadas, con muy pocas excepciones en las zonas tropicales.

Pero, a pesar de ser tan numerosas, solamente se han estudiado en cuanto a su nodulación un bajísimo porcentaje de especies. El mayor estudio realizado en este sentido fue el de ALLEN y BALDWIN, quienes, en 1.954, investigaron la presencia de nódulos en 1.200 especies de leguminosas, encontrando nódulos en el noventa por ciento de las plantas examinadas, la mayoría de las cuales pertenecía a la subfamilia Papilionoideae, siendo las Cesalpinoideae las que se encuentran más a menudo desprovistas de nódulos, mientras que las Mimosoideae ocupaban una posición intermedia.

GRAHAM (36), en uno de sus trabajos sobre la taxonomía de Rhizobium, llama la atención sobre la necesidad de ampliar los estudios con otras especies, sobre todo las silvestres, ya que por razones obvias, casi todos los estudios se han dirigido principalmente a las leguminosas cultivadas.

El mismo año BEADLE hizo un estudio para investigar la presencia de nódulos en diversas leguminosas y, aunque emplea menos especies que ALLEN y BALDWIN, confirma los porcentajes establecidos por éstos (24).

En 1.965, aunque con objetivos distintos, NORRIS (58) hizo un recuento de especies noduladas, pertenecientes a las tres subfamilias, más concretamente a 87 géneros distintos, aislando de ellos 717 estirpe de Rhizobium, que no llega a determinar, aunque sí estudia algunos aspectos de su fisiología, con lo que llega a dividirlos en dos grandes grupos. Posteriormente se han estudiado la presencia de nódulos en otras especies (91), pero, según puede apreciarse en el cuadro II, son muy escasos los gé-

Cuadro II.- Relación alfabética de los géneros de leguminosas estudiados hasta la fecha, en cuanto a la presencia de nódulos en ellas

| Género de leguminosa | Especie de <u>Rhizobium</u> que nodula en ella |
|----------------------|--|
| <u>Acacia</u> | <u>Rhizobium lupini</u> |
| <u>Albizzia</u> | <u>Rh. japonicum</u> <u>Rh. phaseoli</u> |
| <u>Aotus</u> | <u>Rh. lupini</u> |
| <u>Aotus</u> | <u>Rh. lupini</u> |
| <u>Bossiaea</u> | grupo "cow pea" |
| <u>Brachysema</u> | grupo "cow pea" |
| <u>Cassia</u> | |
| <u>Caesalpinia</u> | |
| <u>Cajanus</u> | |
| <u>Chamaecrista</u> | |
| <u>Chorizema</u> | grupo "cow pea" |
| <u>Centrosema</u> | |
| <u>Cynometra</u> | |
| <u>Davesia</u> | |
| <u>Desmodium</u> | |
| <u>Dillwynia</u> | todas |
| <u>Dolichos</u> | |
| <u>Euchilopsis</u> | <u>Rh. lupini</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Eutaxia</u> | <u>Rh. lupini</u> ; <u>Rh. phaseoli</u> ; RH. del grupo "cow pea" |
| <u>Entada</u> | |
| <u>Gastrolobium</u> | <u>Rh. lupini</u> ; grupo "cow pea" |

Cuadro II.- Continuación

| Género de leguminosa | <u>Rhizobium</u> que nodula en ella |
|-----------------------|---|
| <u>Gompholobium</u> | <u>Rh. lupini</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Glycine</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; <u>Rh. lupini</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Hardenbergia</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; <u>Rh. lupini</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Hovea</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Intsia</u> | |
| <u>Isotropis</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; <u>Rh. meliloti</u> grupo "cow pea" |
| <u>Janksonia</u> | <u>Rh. phaseoli</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Kennedya</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; <u>Rh. phaseoli</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Latrobea</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; <u>Rh. phaseoli</u> grupo "cow pea" |
| <u>Leucaena</u> | |
| <u>Lotus</u> | grupo "cow pea" |
| <u>Lupinus</u> | <u>Rh. lupini</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Medicago</u> | <u>Rh. meliloti</u> |
| <u>Mimosa</u> | |
| <u>Mirbelia</u> | <u>Rh. phaseoli</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Neptunia</u> | |
| <u>Ornithopus</u> | <u>Rh. lupini</u> |
| <u>Phaseolus</u> | <u>Rh. phaseoli</u> |
| <u>Pisum</u> | <u>Rh. leguminosarum</u> |
| <u>Pithecellobium</u> | |
| <u>Pultenaea</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; grupo "cow pea" |

Cuadro II.- Continuación

| Género de leguminosa | <u>Rhizobium</u> que nodula en ella |
|----------------------|--|
| <u>Sphaerolobium</u> | grupo "cow pea" |
| <u>Stizolobium</u> | |
| <u>Stylosanthes</u> | |
| <u>Templetonia</u> | <u>Rh. lupini</u> ; <u>Rh. phaseoli</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Trifolium</u> | <u>Rh. trifolii</u> |
| <u>Vicia</u> | <u>Rh. leguminosarum</u> |
| <u>Vigna</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; grupo "cow pea" |
| <u>Wistaria</u> | <u>Rh. japonicum</u> ; grupo "cow pea" |

neros investigados en este sentido.

Como puede deducirse de lo anteriormente expuesto, se han hecho relativamente pocos muestreos para demostrar la presencia de nódulos en las Leguminosas, lo que sugiere la conveniencia de ampliar los estudios sobre la nodulación en Leguminosas silvestres y ésta es una de las líneas de trabajo establecidas en nuestro laboratorio. Concretamente, en la región andaluza existe un género endémico, Tetragonolobus, que nunca había sido estudiado en este sentido. Además, este género presenta una serie de ventajas, como material de trabajo, ya que es fácilmente accesible y posee una ploidía favorable (14 cromosomas) para realizar en él ulteriores estudios (23).

El objeto de nuestro trabajo es, en parte, realizar un estudio de las bacterias causantes de la nodulación en dicho género, para llegar a su identificación.

1.1.3.- Fisiología de la formación de nódulos

Otro de los aspectos del estudio del sistema Rhizobium-leguminosa es la fisiología de la formación de nódulos, esto es, la infección y el establecimiento de la simbiosis.

La infección de las raíces por parte de Rhizobium está regulada tanto por factores dependientes de la planta, como de la bacteria.

El Rhizobium debe ser capaz de penetrar en los tejidos de la raíz, es decir, debe ser "infectivo", o "virulento", pero la infección y la nodulación también dependen de la planta hospedadora. En efecto, se ha demostrado la presencia de factores

genéticos más o menos complejos que inducen una resistencia de la leguminosa a la infección rizobiana, o que condicionan el número y el tamaño de los nódulos (59).

En la mayoría de las leguminosas se pueden distinguir cuatro fases principales en la infección y en la formación del nódulo: a) una fase de preinfección; b) infección y génesis del nódulo; c) madurez nodular, y d) degeneración del nódulo. Dichas fases se representan en el Cuadro III, tomado de DOMMERGES y MANGENOT (24).

Desde el punto de vista de la fisiología de la formación del nódulo, las fases más interesantes son la primera y la segunda. En cuanto a esta última, es decir, en cuanto a la infección y la formación del nódulo, se han hecho muchos estudios citológicos, bioquímicos y genéticos (6, 17, 68).y de algunos de ellos parece deducirse que la formación del nódulo está de alguna manera determinada por la ploidía de la planta (8).

Pero la fase que más nos interesa a nosotros es la primera, la fase de preinfección, porque en ella es en la que se pone de manifiesto con mayor evidencia el mecanismo del establecimiento del sistema simbiótico. Dicha primera fase puede, a su vez, ser dividida en dos etapas: multiplicación específica de los rizobios en la rizosfera de la leguminosa, y deformación de los pelos absorbentes de las raíces de la planta.

Los Rhizobium pueden vivir como habitantes normales de la rizosfera, aun en ausencia temporal de su planta hospedadora, pero su pervivencia en los suelos depende de la existencia de su planta hospedadora habitual, cuya raíz estimula fuertemente su multiplicación (59, 60). El aumento del número de Rhizobium alrededor de la leguminosa hospedadora, como indica NUTMAN (60), es muy distinto del "efecto rizosfera" normal muestra

Cuadro III: Fases de la formación de un nódulo en la simbiosis Rhizobium-leguminosa (24)

| FASES | EVENTOS CORRESPONDIENTES |
|-----------------------------------|--|
| 1. Preinfección de la raíz | <ul style="list-style-type: none"> - Multiplicación de los <u>Rhizobium</u> específicamente en la rizosfera - Deformación de los pelos absorbentes |
| 2. Infección y génesis del nódulo | <ul style="list-style-type: none"> - Penetración de los <u>Rhizobium</u>, formación y progresión del tubo de infección - Multiplicación de las células diploides y tetraploides que forman el tejido nodular (diferenciación del nódulo) |
| 3. Madurez nodular | <ul style="list-style-type: none"> - Liberación de los <u>Rhizobium</u> fuera del tubo de infección y formación o persistencia de la membrana envolvente. - Multiplicación de los <u>Rhizobium</u> liberados. - Conversión a la forma bacteroide. - Establecimiento de la simbiosis funcional; reducción y asimilación del nitrógeno (madurez nodular en sentido estricto) |
| 4. Degeneración | <ul style="list-style-type: none"> - Liberación de los <u>Rhizobium</u> en el suelo |

do por otros muchos microorganismos del suelo, ya que dicho efecto rizosfera consiste en una estimulación de los microorganismos por parte de cualquier planta, en cuya proximidad se encuentre. En el caso de Rhizobium, se trata de una estimulación específica, de forma que las bacterias de este género se afectan poco por plantas no pertenecientes a las Leguminosae, y una estirpe determinada de Rhizobium es estimulada más intensamente por la planta para la que es específica que por otras leguminosas. Sin embargo, se conocen excepciones, como, por ejemplo, la estimulación de Rh. trifolii por el algodón (60).

En estudios hechos en el campo, se ha calculado la proporción entre el número de bacterias en el suelo y en la rizosfera (la proporción R/S) y se ha encontrado, en el caso de Rhizobium, que la razón R/S oscila entre 10^2 y 10^6 , mientras que otras bacterias de la rizosfera tienen un cociente R/S comprendido entre 10 y 10^2 , y aun en los grupos de bacterias que, como las estirpes de Flavobacterium, resistentes a la estreptomycin, que son especialmente estimuladas en la rizosfera de las leguminosas, el valor R/S no pasa de 10^3 ; además se ha demostrado que esta estimulación tiene efectos hasta una distancia de 10 a 20 mm. de la raíz y sus mecanismos no son aun conocidos (60). Posiblemente, se trata de la acción de ciertos exudados radiculares, que, generalmente, son diversos y abundantes en las leguminosas y que incluyen aminoácidos, enzimas, azúcares y vitaminas (59). Parece que los productos de dichos exudados, que en el caso de las leguminosas serían más abundantes, probablemente procedan de los restos de la degradación de las células radicuales.

Entre dichos productos exudados por la planta se encuentra el triptófano (46), que puede ser oxidado a ácido indol acético

(AIA). Por otra parte, un paso de la infección consiste, generalmente, aunque no siempre, en una curvatura de los pelos radicales de la leguminosa (60). Solamente una pequeña proporción de los pelos se curva de una manera característica en su extremo en una ramificación lateral y, además, no todos los pelos deformados son infectados, es decir, no todos contienen tubos de infección, cuya estructura y génesis están muy bien estudiadas. Según RAGGIO y RAGGIO (67), el porcentaje de tubos infectados es, aproximadamente, el 5%.

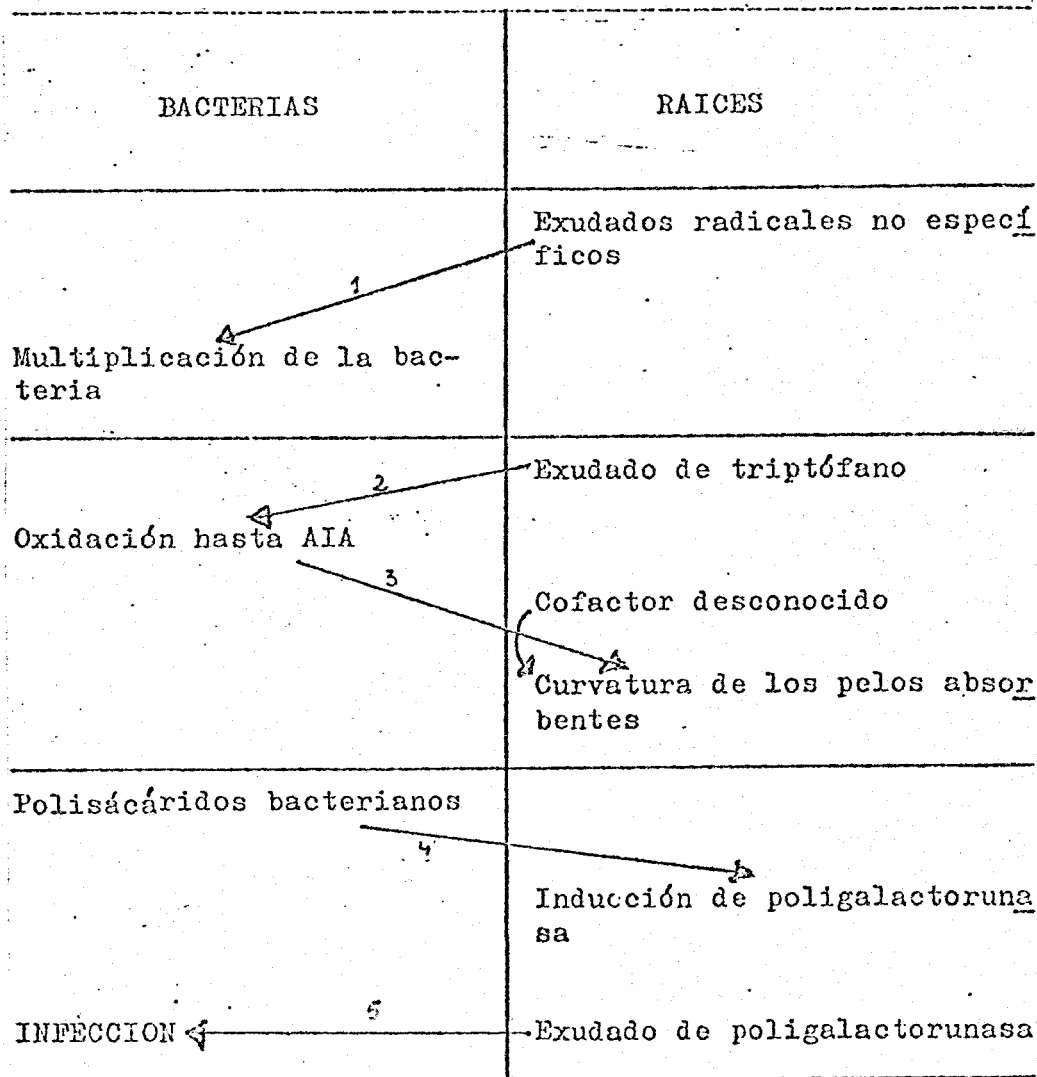
Teniendo en cuenta que la planta no exuda AIA y que éste se encuentra en la rizosfera, y que la reacción de curvatura es típica de una acción de auxinas vegetales, cabe plantear la hipótesis de que Rhizobium transforma el triptófano exudado por la leguminosa, para producir AIA, que provocaría la curvatura de los pelos radicales.

Además, los filtrados obtenidos de células que se han desarrollado en la rizosfera provocan esta curvatura con mayor eficacia que los filtrados procedentes de células cultivadas en el laboratorio (59), lo que sugiere la existencia de algún cofactor producido por la raíz.

Por otra parte, como hemos dicho anteriormente, el mucopolisacárido de Rhizobium desempeña también un importante papel en la nodulación, induciendo una enzima de la planta, la poligalacturonasa (PG), que sería excretada al medio y desencadenaría la infección por parte del Rhizobium.

Aunque este efecto del polisacárido está hoy demostrado (62), ya había sido supuesto por algunos autores (60), entre ellos NUTMAN (59), que resumió todo lo expuesto acerca de la nodulación en el esquema que se representa en el Cuadro IV.

Cuadro IV: Esquema del mecanismo de la fase de preinfección de la raíz en el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, según NUTMAN.



De acuerdo con una de las líneas de trabajo que se siguen en nuestro laboratorio, encaminada al estudio del paso 2 de la citada hipótesis de NUTMAN, damos mayor importancia a la determinación de la capacidad de producir AIA a partir del triptófano, de las distintas estirpes aisladas por nosotros en orden a establecer posibles nuevos criterios taxonómicos y correlacionar la infectividad de tales estirpes con dicha capacidad.

La producción de ácido indol acético a partir de triptófano ha sido demostrada por diferentes autores, como puede verse en la revisión de BAREA y MONTOYA (2). Así, por ejemplo, LARSEN y colaboradores (52) lograron demostrar la biogénesis de algunos compuestos indólicos por Acetobacter xilinum, como resultado de la actividad metabólica de la bacteria cuando se incubaban células lavadas en una solución de triptófano, obteniendo un consumo de éste que supone el 5% del triptófano inicial. En microorganismos distintos de bacterias también hay producción de AIA y otros derivados del indol. Por ejemplo, LE HIR y SCHNEIDER (53) también han demostrado esta actividad metabólica en un hongo, Taphryna deformans, cuando se cultiva en un medio con triptófano.

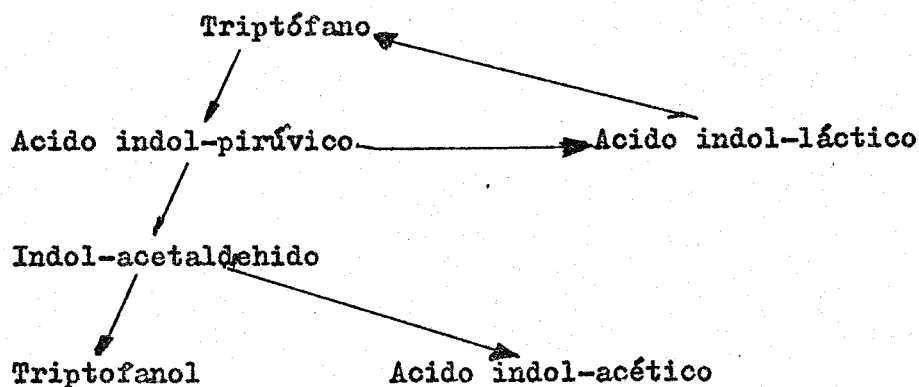
En cuanto a la síntesis simbiótica de AIA, es un fenómeno comprobado desde 1.960, en que KEFFORD y colaboradores (46) encontraron que, cuando se cultivaban plantas de Trifolium subterraneum en agua destilada estéril, durante tres semanas, se podía detectar la presencia de triptófano en el agua. Si se inoculaba con Rhizobium trifolii tres días después de iniciado el experimento, se encontraba AIA, lo que prueba que la formación de este producto en estas condiciones es consecuencia de la acción combinada de ambos elementos simbióticos.

La acción del AIA puede ser, además del efecto auxínico consistente en la deformación de los pelos radicales, disminuir los efectos inhibidores del nitrato sobre la nodulación y contrarrestar una acción semejante de la acidez de los suelos (57).

El autor que ha estudiado con mayor detenimiento el metabolismo del triptófano por cultivos puros de Rhizobium ha sido RIGAUD, como demuestra la gran cantidad de publicaciones suyas que existen sobre este tema (70 a 76, 87). A continuación vamos a comentar aquellos trabajos de este autor que nos parecen más interesantes.

RIGAUD (71) encontró que en medio líquido con triptófano se producían una serie de derivados del indol, especialmente ácido indol láctico y triptofanol, por lo que sugiere que estos dos compuestos son eslabones intermedios de la síntesis de AIA a partir de triptófano. Posteriormente (74, 75) demostró que cuando se ponía en el medio de cultivo triptófano radiactivo se producían ácido indol láctico, indol-3-acetaldehído, triptofanol y ácido indol acético, dependiendo la síntesis de éste y del AIL de una reacción de transaminación. Por otra parte, cuando se añade al medio AIL radiactivo, se puede poner de manifiesto la presencia de triptófano en el medio de cultivo, lo que prueba una conversión del AIL en triptófano. Por ello propone la siguiente vía del metabolismo de triptófano.

Pero además, Rhizobium puede catabolizar el AIA. En efecto, cuando se ponían células lavadas en una solución de AIA, la destrucción del mismo comenzaba después de una fase de latencia relativamente larga (de unas 17 ó 18 horas) y su velocidad era inversamente proporcional a la edad de las células, de forma que cuando éstas son jóvenes destruyen en unas seis horas



casi todo el AIA presente.

Continuando con estos estudios, TRINCANT y RIGAUD (87) consideran que el paso de Acido indol-pirúvico a ácido indol-láctico es irreversible. Se basan en una serie de estudios realizados por ellos en los que extraen láctico-deshidrogenasa de Rhizobium y ensayan su actividad utilizando como sustrato el Acido indol-pirúvico y el ácido indol-láctico. Cuando el sustrato es este último, no detectan actividad enzimática, lo que les lleva a concluir que el citado paso de la cadena de reacciones es irreversible.

1.2. Plan del presente trabajo

A la vista de la problemática expuesta en la bibliografía que acabamos de comentar, nos pareció interesante encaminar nuestro trabajo hacia dos objetivos principales:

Por un lado, hacer un estudio sistemático de rizobios aislados de leguminosas silvestres, con lo que se puede contribuir al conocimiento sobre la taxonomía del género Rhizobium. A tal efecto, elegimos como material de trabajo varias estirpes aisladas de nódulos de tres especies de Tetragonolobus, género endémico de la región andaluza, y que se incluye en la Tribu Lotaeae, a la que pertenece también el género Lotus, en cuyas raíces pueden nodular los Rhizobium del grupo "cow pea" (90), es decir, las estirpes tropicales, cuya posición taxonómica, quizás sea la más discutida.

Por otra parte, siguiendo las directrices de investigación de nuestro Departamento, hemos centrado nuestra atención en el estudio del paso 2 (producción de AIA a partir del triptófano) de la hipótesis de NUTMAN. Como veremos más adelante, esta parte de nuestro trabajo ha tropezado con una serie de problemas técnicos, que no habían sido resueltos satisfactoriamente por otros autores, y que nos ha obligado a detenernos en una serie de experimentos, cuyos resultados nos han permitido poner a punto una técnica de valoración del AIA en presencia de AIL.

Por ello, los resultados que sometemos a la consideración del Tribunal se encuentran divididos en tres apartados:

- a) Valoración del AIA en presencia de AIL
- b) Estudio de las estirpes aisladas de Tetragonolobus
- c) Producción de AIA por diversas estirpes de Rhizobium y

y otras bacterias.

Dados los objetivos que nos hemos planteado, los resultados se exponen de la manera más esquemática posible, resumiendo, en la medida en que ello ha sido factible, los datos en tablas y gráficas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1.- Materiales

2.1.1.- Plantas utilizadas.- Para nuestro estudio hemos utilizado semillas de las siguientes especies vegetales, cuyo origen se indica:

Tetragonolobus maritimum, T. purpureum y T. palestinum, cedidas por el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla.

Medicago sativa, Trifolium repens, T. resupinatum, T. fragiferum, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum y Glycine max, adquiridas en el comercio.

Ornithopus compressus, recogidas por nosotros.

Lotus sp., cedidas por el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Cuarto, del C.S.I.C. y procedentes de la Estação de Melhoramento de Plantas de Elvas (Portugal).

2.1.2.- Microorganismos

2.1.2.1.- Microorganismos aislados de Tetragonolobus.- De las citadas tres especies de Tetragonolobus se aislaron doce estirpes de bacterias, cuya designación y procedencia se indican en el cuadro siguiente:

| <u>Estirpe</u> | <u>Procedencia</u> |
|----------------|---------------------------------|
| TM - 1 | Nódulos de <u>T. marítimum</u> |
| TM - 2 | Nódulos de <u>T. marítimum</u> |
| TM - 3 | Nódulos de <u>T. marítimum</u> |
| TM - 4 | Nódulos de <u>T. marítimum</u> |
| TM - 5 | Nódulos de <u>T. marítimum</u> |
| TM - 6 | Nódulos de <u>T. marítimum</u> |
| TPA-1 | Nódulos de <u>T. palestinum</u> |
| TPA- 2 | Nódulos de <u>T. palestinum</u> |
| TPA- 3 | Nódulos de <u>T. palestinum</u> |
| TPU- 1 | Nódulos de <u>T. purpureum</u> |
| TPU- 2 | Nódulos de <u>T. purpureum</u> |
| TPU- 3 | Nódulos de <u>T. purpureum</u> |

2.1.2.2.- Otras especies del género Rhizobium.- Además de las citadas, se utilizaron otras especies del género Rhizobium, que se describen a continuación, indicando su procedencia:

| <u>Especie</u> | <u>Procedencia</u> |
|-----------------------------|--|
| <u>Rh. trifolii</u> (RS 55) | Aislada por nosotros de nódulos de <u>Trifolium repens</u> |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS 52) | Aislada por nosotros de nódulos de <u>Trifolium sp.</u> |

| | |
|------------------------------------|--|
| <u>Rh. trifolii</u> (RS 102) | Aislada por nosotros de nódulos de <u>Trifolium subterraneum</u> |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS 15) | Aislada por nosotros de nódulos de <u>Trifolium sp.</u> |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS 51) | Aislada por nosotros de nódulos de <u>Trifolium sp.</u> |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS 87) | Aislada por nosotros de nódulos de <u>Trifolium sp.</u> |
| <u>Rh. lupini</u> (RS 108) | Cedido por la Dra. Schiel (República Argentina) |
| <u>Rh. leguminosarum</u> (RS70) | Aislado por nosotros de nódulos de <u>Pisum sativum</u> |
| <u>Rh. phaseoli</u> (RS 92) | Cedido por la Dra. Schiel (República Argentina) |
| <u>Rh. meliloti</u> (RS 94) | Cedido por la Dra. Schiel (República Argentina). |

2.1.2.3.- Bacterias pertenecientes a otros géneros.- También se utilizaron otras bacterias, pertenecientes a las siguientes especies:

| <u>Especie</u> | <u>Procedencia</u> |
|-----------------------------|---|
| <u>Klebsiella aerogenes</u> | Dpto. Microbiología de la Facultad de Ciencias de Sevilla |
| <u>Bacillus cereus</u> | Dpto. Microbiología de la Facultad de Ciencias de Sevilla |
| <u>Escherichia coli</u> | Dpto. Microbiología de la Facultad de Ciencias de Sevilla |

| | |
|---|--|
| <u>Erwinia carotovora</u> | Instituto de Biología del Tabaco de Sevilla |
| <u>Pseudomonas calendula</u> | Instituto de Biología del Tabaco de Sevilla |
| <u>Phytobacterium salici- peuda</u> | Instituto de Biología del Tabaco de Sevilla |
| <u>Salmonella thyphimurium</u> | Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de Sevilla |
| <u>Sarcina lutea</u> | Depto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias de Sevilla |
| <u>Staphilococcus aureus</u> | Dpto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias de Sevilla. |

2.1.3.- Sustancias químicas utilizadas.- Los derivados del indol utilizados por nosotros fueron servidos por las casas SERVA de Alemania y SIGMA CHEMICAL Co., de St. Louis (U.S.A.)

La L-lactato deshidrogenasa, fue servida por la casa SERVA, y la D-lactato deshidrogenasa, por SIGMA CHEMICAL Co.

El NAD⁺ utilizado era de la marca SIGMA.

La lisozima era de la casa MERCK, así como la pronasa.

El lauril sulfato sódico (SDS) era de la marca SIGMA

La ribonucleasa utilizada era Ribonucleasa pancreática

SIGMA

2.2.- Métodos

2.2.1.- Método de valoración del AIA en presencia de AIL

2.2.1.1.- Cromatografía.- Para comprobar la pureza del AIA de las muestras sometidas al análisis y detectar la presencia de otros derivados del indol que pudieran influir en los resultados, se pusieron a punto dos métodos cromatográficos:

2.2.1.1.1.- Cromatografía en papel.- Se utilizó un método descrito por LARSEN (52) para separar los distintos derivados del indol.

Se prepararon soluciones alcohólicas de los siguientes compuestos, que aparecen citados en los diferentes trabajos como posibles intermediarios en la biosíntesis del AIA:

Indol

Acido indol acético

Acido indol pirúvico

Acido indol butírico

Acido indol propiónico

Indol acetaldehído

Indol acetamida

β - indol acetonitrilo

Acido indol láctico

Triptófano

Triptamina

Triptofanol.

Se prepararon también mezclas que consistían en combinaciones de las soluciones alcohólicas de dichos compuestos a concen-

traciones de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Con los patrones y con las mezclas alcohólicas se hicieron cromatografías descendentes en papel Watmann n^o 1, utilizando como solvente una mezcla de isopropanol acético: agua en las proporciones 10:1:1 (V/V). Se permitió que el solvente corriera durante 22 horas, al cabo de las cuales los cromatogramas fueron secados con aire caliente y revelados con el reactivo de ERLICH, cuya composición es la siguiente:

| | |
|--------------------------------|---------|
| p - dimetil-amino-benzaldehido | 2,0 g |
| etanol al 96% en agua | 84,0 ml |
| ácido clorhídrico concentrado | 16,0 ml |

Para que apareciesen las manchas fue necesario calentar los cromatogramas, después de revelados, a 60°C durante cinco minutos.

2.2.1.1.2.- Cromatografía en capa fina.- El método anterior no da una buena separación entre el AIA y el AIL, por lo que se hizo necesario poner a punto otro método, ya descrito por RIGAUD (75), y consistente en una cromatografía en capa fina, utilizando como solvente una mezcla de butanol : ácido acético : agua en las proporciones 6 : 2 : 2 (p/p). En el origen de placas para cromatografía en capa fina MERCK, se aplicaron muestras de soluciones alcohólicas de AIA y AIL en las concentraciones de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y se introdujeron en tanques de cromatografía. Se permitió que el solvente corriera durante seis horas, al cabo de las cuales los cromatogramas fueron secados y revelados con reactivo de EHRLICH.

A fin de determinar el rendimiento de esta técnica como método de valoración de AIA, se hicieron cromatogramas paralelos

de las mezclas de AIA y AIL a las concentraciones de 30 ug/ml de cada compuesto. Una vez desarrollados los cromatogramas, se recogió el polvo de gel de sílice de las bandas correspondientes al AIA y se disolvió en 20 ml de etanol absoluto, agitando en agitador magnético durante 15 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó a 10.000 x g, durante quince minutos para separar el polvo de silicagel. El sobrenadante se dejó evaporar a sequedad y el residuo sólido se redisolvió en 2 ml. de etanol absoluto. El rendimiento de esta técnica es superior al 80 por ciento.

2.2.1.2.- Reacción de Salkowski.-

2.2.1.2.1.- Descripción.- Los ensayos cuantitativos del AIA fueron realizados con esta técnica colorimétrica, para la que se utiliza el reactivo de Salkowski, modificado por Pilet, tal como lo describe RIGAUD (71). Su composición es la siguiente:

| | |
|--|-----------|
| $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 3,465 g |
| agua destilada | 300,0 ml |
| SO_4H_2 concentrado | 100,0 ml. |

Las medidas de densidad óptica (A) se hicieron en un espectrofotómetro SPECTRONIC-20 de Bausch & Lomb.

El AIA en medio fuertemente ácido forma con el cloruro férrico un complejo coloreado que tiene un máximo de absorción a 530 nm. Ahora bien, según UEDA (89), en la reacción se forman otros complejos de color amarillo pardo que interfieren con el del AIA, por lo que se hace necesario establecer una corrección

para eliminar la citada interferencia. Dicha corrección consiste en medir las densidades ópticas de la mezcla reactiva a las longitudes de onda 480 nm (A-480), 530 nm (A-530) y 580 nm (A-580), con objeto de establecer una corrección para eliminar la citada interferencia, consistente en calcular la absorción media debida a estos colores extraños, que viene dada por la expresión:

$$\frac{A-480 + A-580}{2}$$

Toda la absorción por debajo de esta media se desprecia, por considerarla debida a las citadas interferencias. La altura del pico de absorción a 530 nm superior a dicha media viene dada por la expresión:

$$E = A-530 + \frac{A-480 + A-580}{2}$$

y esta es la absorción debida al AIA (Figura 1). La mezcla reactiva consta de :

| | |
|-----------------------|------|
| muestra problema | 1 ml |
| agua | 1 ml |
| reactivo de Salkowski | 3 ml |

2.2.1.2.2.- Puesta a punto.- Para saber si existen otros derivados del indol que absorban a estas longitudes de onda, se prepararon soluciones de 20 ug/ml de los siguientes compuestos:

Indol

Acido indol acético

Acido indol butírico

Acido indol pirúvico

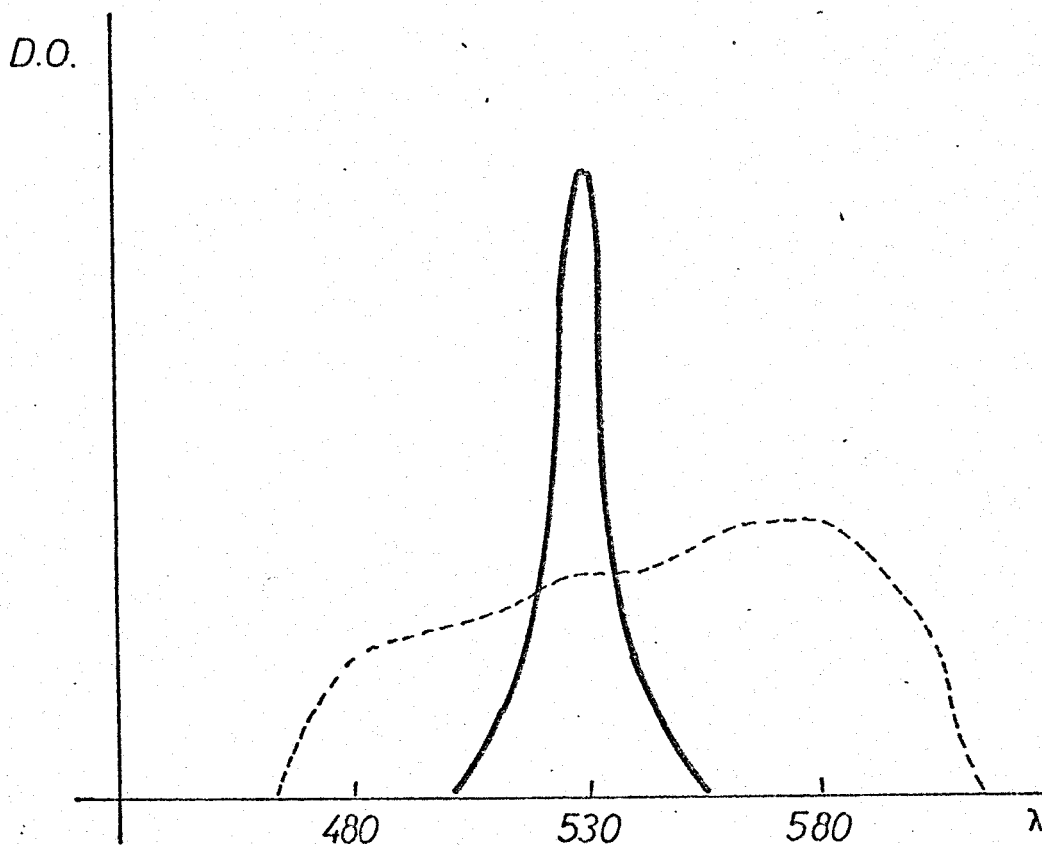


Figura 1.- Explicación de la corrección introducida por UEDA a la reacción de Salkowski.

=====

Acido indol propiónico

Indol acetaldehido

Indol acetamida

Indol acetonitrilo

Acido indol láctico

Indoliáetil-etil éter

Triptamina

Triptofanol

Todas estas soluciones fueron sometidas a la reacción de Salkowski en un baño termostato a 30°C. Las medidas de densidad óptica se hicieron a distintos intervalos de tiempo, con lo que se pretendía fijar también el tiempo al que se produce la máxima intensidad de color.

2.2.1.2.3.- Elaboración de la recta de calibrado.- Se confeccionó una recta de calibrado, sometiendo a la reacción de Salkowski distintas muestras que contenían concentraciones diferentes de AIA.

2.2.1.3.- Estudios espectrofotométricos.-

Basándonos en los resultados de FLETCHER y ZALIK (29), según los cuales es posible determinar espectrofotométricamente el AIA, decidimos realizar un estudio fotométrico del AIA y del AIL. Para ello, preparamos muestras de AIA y AIL, consistentes en soluciones de dichos compuestos en tampón de fosfato de pH 7 y las mezcla de ambas sustancias en el mismo tampón. A cada una de estas muestras se sometió a un espectro de absorción en el ultravioleta y el visible; las medidas fueron hechas en un espectrofotómetro PYE Unicam 1.800.

2.2.1.4.- Estudios fluorimétricos

En la bibliografía consultada hemos encontrado dos métodos fluorimétricos para valorar el AIA (40, 48) y decidimos adoptar

el último de ellos, por parecernos el de realización más sencilla. A fin de explorar sus posibilidades, se prepararon tres muestras que contenían 10 ug de AIA, la primera; 10 ug de AIL la segunda, y una tercera consistente en la mezcla de ambas sustancias en iguales cantidades.

El método consiste en la conversión específica del AIA en indol-alfa-pirona, compuesto que fluoresce cuando se excita con una radiación de una longitud de onda de 440 nm.

A las muestras preparadas como hemos descrito, se les añadió en frío 0,20 ml de una mezcla reactiva constituida por partes iguales de ácido trifluoroacético y anhídrido acético. Se dejaron reaccionar estas sustancias con el AIA durante 15 minutos en hielo, al cabo de los cuales se añadieron 3 ml de agua para detener la reacción.

Una vez realizada la reacción, los productos resultantes fueron excitados con una luz de 440 nm y se estudió su espectro de emisión, comparándolo con el de un blanco consistente en 0,20 ml de la mezcla reactiva y 3 ml de agua destilada.

2.2.1.5.- Método de valoración del AIA en presencia de AIL

Dado que ninguno de los métodos descritos nos permitía una valoración del AIA cuando coexiste en las muestras AIL, decidimos realizar un estudio de la influencia de este último compuesto sobre la respuesta del AIA a la reacción de Salkowski.

Para ello, preparamos diversas soluciones de AIA y AIL con distintas concentraciones de ambos productos, de manera que

las proporciones: /AIA/dividida entre /AIL/ fuesen también variables.

A estas muestras se sometieron a la reacción de Salkowski y se agruparon los datos obtenidos de forma que permitieran un análisis matemático para determinar la influencia del AIL a que ya nos hemos referido.

2.2.2.- Aislamiento de Rhizobium

Se tomaron plantas noduladas pertenecientes a las especies descritas en el apartado de Materiales, antes de la época de la floración para asegurarnos de que los nódulos se conservaban activos, en cuanto a la fijación del nitrógeno.

Se cortaron los nódulos, que fueron sometidos al siguiente tratamiento, descrito por VINCENT (90):

a) se lavaron agitando energicamente en agua destilada para eliminar los restos de suelo que pudieran llevar adheridos.

b) se expusieron brevemente a la acción de etanol al 95%, y, seguidamente, fueron sumergidos durante 3 ó 4 minutos en una solución acuosa de Cl_2Hg al 0,1%, acidificada con ClH diluido.

c) a continuación, los nódulos así desinfectados, fueron lavados seis veces con agua estéril y triturados asépticamente de forma que se producía un líquido lechoso

d) Dicho líquido fue extendido en placas de Petri que contenían 25 ml del medio YMA, cuya composición es la siguiente:

| | |
|---|-------|
| $\text{PO}_4^{\text{HK}}_2$ | 0,5 g |
| $\text{SO}_4^{\text{Mg}} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,2 g |
| ClNa | 0,1 g |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Extracto de levadura(Oxoid) | 0,4 g |
| Manitol | 10,0 g |
| Agar | 20,0 g |
| Agua destilada | 1,0 litro |
| pH | 6,5 - 7,0 |

Este medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos y, una vez enfriado a 45°C, se le añadieron 2,5 ml de cristal violeta al 5%, previamente esterilizado por filtración.

Las placas fueron incubadas a 28°C y se aislaron aquellas colonias que, transcurridos siete días, no habían concentrado el colorante (30).

Las colonias fueron aisladas y sembradas en tubos que contenían el medio YMA, al que se había añadido CO_3Ca (79), como agente neutralizante y para prevenir la inhibición que pudiera deberse al extracto de levadura. Una vez desarrolladas en los tubos de ensayo, se extendieron de nuevo en el medio YMA con cristal violeta para comprobar su pureza. Estas comprobaciones se hicieron periódicamente (al menos, una vez cada dos meses).

2.2.3.- Tests de nodulación

Las estirpes aisladas fueron sometidas a una prueba de nodulación para determinar en qué géneros de leguminosas producían nódulos. Para ello, se utilizaron semillas de las plantas enumeradas en el apartado de materiales.

2.2.3.1.- Preparación de las semillas.- Una vez escarificadas por medios mecánicos, fueron desinfectadas mediante el

siguiente tratamiento: Se seleccionaron semillas de tamaño uniforme dentro de cada especie, y se sumergieron en etanol al 95% en agua, para pasarlas seguidamente a una solución acuosa de Cl_2Hg al 0,2%, acidificada con ClH diluido. Al cabo de tres minutos de tratamiento con esta solución desinfectante, se lavaron al menos cinco veces en agua destilada estéril y se extendieron en placas de Petri estériles.

2.2.3.2.- Inoculación de las semillas.- Las semillas así desinfectadas fueron sumergidas durante 2 horas en una suspensión del microorganismo correspondiente. Esta suspensión se ajustó previamente a una densidad óptica aproximada de 1,0, medida a 460 nm.

2.2.3.3.- Cultivo de las plantas.- Una vez inoculadas las semillas, fueron colocadas en tubos que contenían un papel de filtro doblado, formando un escalón y, una cantidad adecuada, según el tamaño del tubo y de las semillas, de una solución nutritiva, descrita por HEWIT (44) y cuya composición es la siguiente:

| | |
|--|--------|
| Cl_2Ca | 0,1 g |
| PO_4HK_2 | 0,1 g |
| $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 0,15 g |
| $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,74 g |
| Citrato de hierro | 5 mg |
| $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 7 mg |
| SO_4Zn | 2,5 mg |
| BO_3H_3 | 1,5 mg |
| IK | 0,7 mg |

| | |
|--|----------------|
| $\text{SO}_4 \text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,4 mg |
| $\text{MoO}_4 \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,02 mg |
| Agua destilada | 1 litro |
| pH | 6,5 |
| Esterilización | por filtración |

Se colocaron dos semillas en cada tubo, y fueron expuestas a una iluminación de 1.000 lux, a temperatura ambiente, durante treinta días, al cabo de los cuales se observaba la presencia o ausencia de nódulos. Los días 3º (en el que las semillas ya habían germinado) y 15º, en el que ya había suficiente crecimiento de las plantas, los tubos fueron inoculados de nuevo con una suspensión del correspondiente microorganismo, de una densidad óptica de 1,0 medida a 460 nm.

2.2.4.- Estudio de las estirpes de bacterias aisladas de Tetragonolobus

2.2.4.1.- Estudio morfológico

2,2.4.1.1.- Descripción de las colonias.- Se observaron los siguientes caracteres relativos a las colonias: concentración de colorante, forma, tamaño, elevación, brillo, producción de mucílago, forma de los bordes.

2.2.4.1.2.- Estudio citológico

Todos los microorganismos aislados de Tetragonolobus fueron sometidos a diversas tinciones, entre ellas, las encaminadas a

investigar la presencia de gránulos sudanófilos y metacromáticos, mediante métodos de tinción específicos que describiremos a continuación.

2.2.4.1.2.1.- Tinción de gránulos sudanófilos.- Después de obtener una abundante cantidad de células en medio YMA, la tercera parte fue sometida a una extracción con éter durante dos horas; otra tercera parte, fue tratada con cloroformo durante el mismo tiempo, y el resto se dejó sin tratar. Cada una de estas fracciones se sometió a una tinción siguiendo el método siguiente:

Una vez secas y fijadas por el calor, las extensiones se sumergieron durante 5 minutos en una solución acuosa de Negro Sudán B al 0,3 %. En continuación se lavaron con xilol durante cinco segundos y se contrastó con una solución de safranina al 0,5 % en agua.

2.2.4.1.2.2.- Tinción de gránulos metacromáticos.- Las soluciones colorantes empleadas fueron:

Solución A

| | |
|------------------------|-----------|
| Azul de toluidina | 0,15 g |
| Verde malaquita | 0,20 g |
| Acido acético glacial | 1,00 ml |
| Alcohol etílico al 95% | 2,00 ml |
| Agua destilada | 100,00 ml |

Solución B

| | |
|-----------------|---------|
| Iodo | 2,00 g |
| Ioduro potásico | 3,00 g |
| Agua destilada | 300 ml. |

El método empleado fue el siguiente: Una vez secas y fijadas por el calor, las extensiones se sumergieron en la solución A durante cinco minutos; a continuación se escurrió sin lavar y se sumergieron durante un minuto en la solución B.

Además, las estirpes aisladas fueron sometidas a las tinciones de Gram, endosporas y cápsulas, siguiendo los métodos descritos por la Society of American Bacteriologists (81).

2.2.4.2.- Pruebas bioquímicas

2.2.4.2.1.- Acción sobre la leche tornasolada.- Se inocularon los tubos que contenían 10 ml. de "Litmus milk" (Oxoid), esterilizada en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, y fueron incubados a 28°C durante cuatro semanas, al cabo de las cuales se leyeron los resultados.

2.2.4.2.2.- Producción de indol.- Se inocularon tubos con 10 ml de agua de peptona y se incubaron a 28°C durante siete días, al cabo de los cuales se añadieron 10 gotas de reactivo de Kovacs (42), para determinar la presencia de indol en los cultivos.

2.2.4.2.3.- Utilización de citrato.- Se prepararon tubos con 10 ml. de "Koser Medium" (Oxoid), que fueron inoculados con

el microorganismo correspondiente, e incubados a 28°C durante siete días.

2.2.4.2.4.- Reacción de Voges Proskauer.- Se inocularon tubos que contenían 10 ml del "VPRM Medium" (Oxoid), que se incubaron durante siete días a 28°C, al cabo de los cuales se añadieron a cada tubo 1ml de KOH y 1 ml de alfa-naftol, para investigar la presencia de acetofina en los líquidos metabólicos.

2.2.4.2.5.- Reacción del rojo de metilo.- En otra serie de tubos que contenían el medio anterior, y que fueron inoculados y cultivados del mismo modo, se añadieron 10 gotas de rojo de metilo.

2.2.4.2.6.- Reducción de los nitratos.- Se prepararon tubos de ensayo que contenían 10 ml. de caldo de peptona enriquecido con nitratos, que se inocularon e incubaron en las mismas condiciones que para el resto de las pruebas.

En unos tubos se determinó la presencia de nitritos; para ello, se añadió 1 ml de alfa-naftil-amina y 1 ml. de ácido sulfanílico disuelto en ácido acético al 1% en agua.

En otra serie de tubos se investigó la presencia de nitrógeno y de amoníaco. Para ello, se ponían los tubos con una campana de Durham, que se depositaba en ellos antes de esterilizarlos y en la que debía acumularse el nitrógeno en el caso de que se produjera. Para poner de manifiesto la presencia de amoníaco se añadió un ml de reactivo de Nessler (42).

2.2.4.2.7.- Prueba de la ureasa.- Se prepararon tubos con 7 ml del medio de Christensen (42) inclinado, que se inocularon con el microorganismo adecuado y se incubaron a 28°C durante 7 días.

2.2.4.2.9.- Tolerancia a la salinidad.- Se prepararon tubos con el medio YMA sin agar, al que se añadió ClNa hasta una concentración final del 2%, o del 3%, que, una vez inoculados, fueron incubados a 28°C durante siete días, al cabo de los cuales se determinó el crecimiento, midiendo la densidad óptica de los cultivos a 460 nm.

2.2.4.2.10.- Licuação de la gelatina.- Se prepararon tubos de ensayo con una solución de gelatina al 12%, que se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos y, después de enfriarlos rápidamente, se inocularon con el microorganismo adecuado y se incubaron a temperatura ambiente durante dos meses, al cabo de los cuales se observaron para determinar la licuação de la gelatina.

2.2.4.2.11.- Hidrólisis de la gelatina.- Se prepararon placas de Petri que contenían 25 ml del medio YMA, suplementado con gelatina al 0,4%, que fueron inoculadas e incubadas a 28°C durante siete días, al cabo de los cuales fueron cubiertas con 8 ó 10 ml de reactivo de Frazier, cuya composición es la siguiente:

| | |
|--------------------|--------|
| Cl ₂ Hg | 15 g |
| ClH concentrado | 20 ml |
| Agua destilada | 100 ml |

La hidrólisis de la gelatina se pone de manifiesto por la presencia de una zona clara en las regiones del cultivo en que ha tenido lugar, mientras que en aquellas zonas de la placa en las que la gelatina no ha sido hidrolizada se forma un precipitado blanco lechoso.

2.2.4.2.12.- Prueba de la catalasa.- Sobre un portaobjetos se hizo una suspensión del microorganismo estudiado en una gota de agua oxigenada de 11 volúmenes, para determinar la presencia de catalasa en los cultivos.

2.2.4.2.13.- Prueba de la oxidasa.- Sobre un portaobjetos limpio se colocó una gota del reactivo de la oxidasa (Difco), en la que se hizo una suspensión del microorganismo.

2.2.4.3.- Características de cultivo.- Se determinaron las características de cultivo de las estirpes aisladas, sometiéndolas a las siguientes pruebas:

2.2.4.3.1.- Utilización de diversas fuentes de carbono.- Según Senez (77), los Rhizobium pueden utilizar la manita, la galactosa y la arabinosa, y el comportamiento frente a estas tres fuentes de carbono puede servir de criterio para distinguir las especies. Por ello, se prepararon tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio YMA sin manita, al que se añadieron los azúcares estudiados hasta una concentración de 10 g/l. Los tubos fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minu-

tos, e inoculados e incubados a 28°C durante siete días. Transcurrido ese tiempo, se determinó el crecimiento midiendo la densidad óptica de los cultivos a 460 nm.

2.2.4.3.2.- Estudio del crecimiento en relación con el pH.- Se preparó medio YMA líquido que, antes de esterilizar, fue puesto a pH que oscilaba entre 3,5 y 10,0. Se esterilizaron después de repartir en tubos, se inocularon y se incubaron a 28°C durante siete días, al cabo de los cuales se midió el crecimiento determinando la densidad óptica de los cultivos a 460 nm.

2.2.4.3.3.- Estudio de la temperatura óptima de crecimiento.- Se cultivaron tubos de YMA líquido a las temperaturas de 4°C, 28°C, 37°C, 40°C y 50°C, durante siete días, al cabo de los cuales se determinó el crecimiento de la misma forma, es decir, midiendo la densidad óptica de los cultivos a 460 nm.

2.2.4.3.4.- Estudio de la curva de crecimiento.- Se sembraron tubos con medio YMA líquido, esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos, con 0,1 ml de una suspensión de cada microorganismo que presentaba una densidad óptica de 0,5 a 460 nm. Los cultivos se mantuvieron a 28°C, y el crecimiento se determinó periódicamente midiendo la densidad óptica a 460 nm. Con ello se pretende establecer el momento en que da comienzo la fase estacionaria de crecimiento y averiguar así si las estirpes aisladas son de crecimiento rápido o lento.

2.2.4.3.5.- Estudio de necesidades de factores de crecimiento.- Por una parte se prepararon tubos con el siguiente medio de cultivo:

| | |
|--|---------|
| Manita | 10,6 g |
| $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 0,45 g |
| $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,1 g |
| Cl_3Fe | 0,02 g |
| Cl_2Ca | 0,04 g |
| Agua destilada | 1 litro |
| pH | 6,8 |

A este medio se añadieron los factores de crecimiento en las cantidades que se indican a continuación

| <u>Factor</u> | <u>Cantidad</u> |
|----------------------------|-----------------|
| - | - |
| Extracto de levadura | 0,4 g/l |
| Glutamato Na | 1,1 g/l |
| Cloruro de tiamina (Sigma) | 100 ug/l |
| Biotina (Sigma) | 200 ug/ml |

El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos y, una vez frío, se le añadió el factor de crecimiento adecuado, disuelto en tampón de fosfato (pH = 7,0) y esterilizado por filtración. Los cultivos fueron incubados a 28°C, y se determinó periódicamente el crecimiento en cada caso. Todas las inoculaciones se hicieron partiendo de una solución de células que contenía 10^9 células/ml, lo que corresponde a una densidad óptica de 1,0 medida a 460nm.

2.2.4.4.- Aislamiento de ADN de las estirpes aisladas de Tetragonolobus.- Se cultivaron las células a 28°C en agitación durante 3 ó 4 días para que alcanzaran la fase exponencial de crecimiento. Se centrifugaron a 5.000 g durante 30 minutos, y se lavaron tres veces con Tampón I, cuya composición es la siguiente:

| | |
|----------------------|----------|
| TRIS | 12,114 g |
| EDTA Na ₂ | 8,405 g |
| Agua destilada | 1 litro |
| pH | 8,0 |

Después de cada lavado se centrifugaron las células a más de 10.000 g y, una vez lavadas tres veces, se resuspendieron en tampón I hasta que quedaron a una concentración tal que las suspensiones tenían una densidad óptica de 60, medida a 460 nm, lo que corresponde a una densidad de células de 2×10^{10} bacterias/ml.

Se añadió lisozima hasta una concentración final de 0,7 mg/ml, y se incubó, agitando suavemente con la mano, durante 1 minuto.

Se añadió poco a poco un volumen igual de una disolución que contenía laurilsulfato sódico (SDS) al 1,6% y pronasa a una concentración de 2 mg/ml, en tampón I. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 12 horas.

Transcurrido ese tiempo, se añade ClO_4Na hasta una concentración final de 1M, y un volumen igual de reactivo de SEVAG (cloroformo : alcohol isoamílico, en las proporciones 24 : 1), se agitó suavemente hasta alcanzar la homogeneización y se centrifugó a más de 10.000 g durante 10 minutos, para separar la

la fase acuosa y la del reactivo, entre las que se forma un pre cipitado interfásico de proteínas. Se recoge la fase acuosa y se somete al mismo tratamiento tantas veces como sea necesario hasta hacer desaparecer el precipitado de proteínas. La última vez se deja toda la noche agitando suavemente a temperatura am biente.

Se centrifuga de nuevo y se recoge la fase acuosa, a la que se añaden dos volúmenes de etanol absoluto, con lo que pre cipita el ADN, que se recoge con una varilla capilar, se lava en alcohol y se resuspende en tampón II, cuya composición es la siguiente:

| | |
|----------------------|----------|
| TRIS | 12,114 g |
| EDTA Na ₂ | 8,405 g |
| Agua destilada | 1 litro |
| pH | 7,6 |

La mezcla del precipitado no recogido con la varilla y el etanol se congela a - 20°C durante dos horas, al cabo de las cuales se centrifuga a más de 10.000 g y menos de 0°C durante dos horas. El precipitado se resuspende en tampón II.

Para eliminar el ARN contaminante, se tratan ambos extrac- tos con ribonucleasa pancreática a una concentración final de 100 ug/ml (previamente tratada a 80°C durante 2 horas), y se incuban a 37°C durante dos horas, transcurridas las cuales, se someten las soluciones a dos ciclos de extracción con reactivo de Sevag, el último de los cuales se deja actuar durante toda la noche.

Se centrifuga a más de 10.000 g durante diez minutos, y a la fase acuosa se le añaden dos volúmenes de etanol absoluto, con lo que precipita el ADN purificado, que se recoge con vari-

lla, se lava en etanol y se resuspende en tampón II, al que se añade una gota de cloroformo. La mezcla del precipitado y el alcohol se congela y se recoge de la manera ya descrita. En caso de que fuera necesario para aumentar la pureza del ADN se hace una diálisis frente a tampón II durante 48 horas.

La riqueza en ADN de las muestras se determina espectrofotométricamente, midiendo la densidad óptica de las soluciones a 260 nm y teniendo en cuenta que una concentración de 50 ug/ml tienen una absorbencia de 1,0 a esta longitud de onda.

2.2.4.5.- Determinación del contenido en guanina y citosina.- Para determinar el porcentaje molar de G + C, se siguió la técnica de DE LEY (20), que consiste en lo siguiente:

Una vez obtenidas las muestras de ADN, se diluyen en tampón 0,1 x SSC, que se obtiene diluyendo 10 veces el siguiente tampón (SSC):

| | |
|------------------------------|---------|
| ClNa | 8,775 g |
| Citrato Na.2H ₂ O | 4,3 g |
| Agua destilada | 1 litro |
| pH | 7,0 |

Se toma una alícuota y se somete a una elevación gradual de la temperatura, desde 40°C hasta 110°C, con una velocidad de 1 grado cada minuto. Durante todo el proceso se mide la densidad óptica a 260 nm, de forma que se obtiene una curva sigmoide, que es la curva de desnaturalización del ADN.

En esta gráfica se determina la temperatura que correspon-

de a una densidad óptica mitad de la máxima alcanzada, que es el punto en el que se produce el 50% de desnaturalización. Esta temperatura es la T_m del ADN. El contenido en guanina y citosina viene dado por la expresión:

$$\% G + C = 2,44 (T_m + 69,4).$$

2.2.5.- Ensayo de la producción de ácido indol acético

Las bacterias aisladas y el resto de los microorganismos que fueron ensayados en este sentido, se sembraron en el medio YMA líquido, suplementado con triptófano a una concentración final del 0,02 %.

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, que contenían 100 ml de medio de cultivo, se incubó a 28°C en oscuridad y en agitación durante cuatro días, al cabo de los cuales, se tomaron muestras que contenían 25 ml de líquido metabólico.

2.2.5.1.- Procedimiento de extracción del AIA.- Las muestras obtenidas se sometieron a centrifugación a 5.000 g, durante cinco minutos para eliminar las células y los líquidos metabólicos fueron sometidos al siguiente tratamiento, recomendado por RIGAUD (74) para extraer el AIA:

Se recogió el sobrenadante al que, después de alcalinizar hasta pH 8,2, se añadió un volumen igual de éter etílico desprovisto de peróxidos, y se agitó la mezcla durante 5 minutos en

agitador magnético. Una vez separadas las dos fases de la mezcla, se recogió la fase acuosa y se acidificó hasta pH = 2,8. Se añadió un volumen igual de éter, y se agitó en agitador magnético durante cinco minutos, transcurridos los cuales se recogió la fase etérea que fue evaporada a sequedad.

El residuo sólido se disolvió en 2 ml de alcohol etílico absoluto.

2.2.5.1.- Valoración del AIA en las muestras.- Dado que los métodos que hemos encontrado en la bibliografía para separar el AIA y el AIL suponen grandes pérdidas (33, 41, 64, 65, 82), sobre todo teniendo en cuenta las bajas concentraciones a que el AIA se encuentran en los líquidos metabólicos, realizamos la valoración por medio del método puesto a punto por nosotros, que, como se verá, no exige la separación de ambos compuestos.

3. RESULTADOS

3.1.- Determinación del AIA en presencia de AIL.- Al tratar de determinar el AIA en los líquidos metabólicos de Rhizobium cultivados en presencia de triptófano, recurrimos en principio a métodos basados en la reacción de Salkowski, que ya habían sido empleados por otros autores, pero tropezamos con el inconveniente de que esta sustancia coexiste siempre con AIL en los líquidos metabólicos, lo cual enmascara los resultados, a pesar de que el AIL puro no da la reacción. Ello nos obligó a introducir en nuestra Tesis el presente apartado encaminado a encontrar un método satisfactorio de valoración del AIA en presencia de AIL.

Pero, antes de exponer nuestros experimentos, describiremos los resultados que hemos obtenido al aplicar los métodos que hasta ahora se venían empleando a los distintos compuestos indólicos, tanto puros como en mezclas previamente preparadas por nosotros.

3.1.1.- Resultados obtenidos con los métodos cromatográficos.- El método cromatográfico descrito por LARSEN dio los resultados que se exponen en la Tabla I. Dado que como puede

Tabla I.- Relación de los Rf y de las reacciones de color de varios derivados del indol, cromatografiados según LARSEN y revelados con el reactivo de Ehrlich.

| Compuesto | Abreviatura | Rf | color |
|-----------------------------|-------------|------|--------------|
| Indol acetil-etil eter | IAEE | 0,86 | rosa pálido |
| Indol | I | 0,84 | rosa pálido |
| Triptofanol | TOL | 0,83 | violeta |
| β -Indol acetonitrilo | IAN | 0,82 | pardo claro |
| Indol acetaldehido | IAA | 0,77 | gris |
| Indol acetamida | IAM | 0,74 | pardo oscuro |
| Triptamina | TPM | 0,69 | rosa-violeta |
| Acido Indol butírico | AIB | 0,52 | violeta (1) |
| Acido indol propiónico | AIP | 0,52 | violeta (2) |
| Acido indol acético | AIA | 0,50 | violeta (1) |
| Acido indol láctico | AIL | 0,49 | violeta (1) |
| Acido indol pirúvico | AIPy | 0,39 | violeta |
| Triptófano | TRP | 0,34 | violeta |

(1) cambia a azul

(2) cambia a verde

apreciarse en la citada Tabla, no hay una buena separación entre el AIA y el AIL, ensayamos otra técnica, consistente en una cromatografía con otro solvente (la mezcla butanol: acético:agua) y cromatografía en capa fina, con el que obtuvimos una separación satisfactoria de ambos productos, como se puede apreciar en la Tabla II.

Este método, recomendado por RIGAUD tiene el inconveniente de que hay considerables pérdidas durante la separación cromatográfica y la subsiguiente elución. Por ello, nos propusimos encontrar un método de valoración en el que no fuese necesaria la separación cromatográfica. Dado que este método obliga a pensar que el AIA va a estar acompañado por otras sustancias indólicas que coexistirían como productos metabólicos derivados del triptófano, comenzamos por ensayar el comportamiento de una serie de productos indólicos frente a la reacción de Salkowski.

3.1.2.- Reacción de Salkowski.-- Una vez preparadas muestras de los derivados del indol, se ensayó su comportamiento frente a la reacción de Salkowski, fijando la atención en la reacción coloreada y en su evolución con el tiempo. Los resultados obtenidos se exponen en las Tablas III a XIV.

Como puede observarse en estas Tablas, los productos que dan reacción positiva con el reactivo de Salkowski son el AIA y la indol-acetamida. Además, en el caso del AIA la máxima absorción tiene lugar a los 60 minutos, mientras que el máximo de absorción de la indol-acetamida tiene lugar a las 5 horas y cuarenta y cinco minutos (Figura 2).

Tabla II.- Rf y reacciones de color del AIA y del
AIL en cromatografía en capa fina (1)
revelados con el reactivo de Erlich

| Compuesto | Rf | Color |
|-----------|-------|-------------|
| AIA | 0,952 | Violeta (2) |
| AIL | 0,790 | Violeta (2) |

(1) Disolvente: butanol : acético : agua (6:2:2)

(2) Cambia a azul

Tabla III.- Evolución de la reacción del indol con
 en reactivo de Salkowski, a lo largo del
 tiempo.

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|--------|
| 0' | 0.070 | 0.060 | 0.020 | 0.0150 |
| 13' | 0.180 | 0.110 | 0.050 | 0.0050 |
| 20' | 0.180 | 0.110 | 0.050 | 0.0050 |
| 30' | 0.150 | 0.100 | 0.160 | 0.0050 |
| 1h | 0.160 | 0.115 | 0.050 | 0.0100 |
| 1h 30' | 0.165 | 0.115 | 0.055 | 0.0050 |
| 2h | 0.170 | 0.110 | 0.055 | 0.0025 |
| 2h 30' | 0.170 | 0.115 | 0.060 | 0.0000 |
| 3h | 0.180 | 0.120 | 0.065 | 0.0025 |
| 3h 30' | 0.180 | 0.120 | 0.065 | 0.0025 |
| 4h | 0.180 | 0.120 | 0.070 | 0.0050 |
| 5h 30' | 0.190 | 0.110 | 0.070 | 0.0020 |
| 6h | 0.180 | 0.110 | 0.070 | 0.0150 |
| 6h 30' | 0.190 | 0.120 | 0.065 | 0.0025 |
| 7h | 0.190 | 0.115 | 0.060 | 0.0100 |
| 8h 30' | 0.190 | 0.115 | 0.060 | 0.0100 |
| 24h 30' | 0.190 | 0.125 | 0.070 | 0.0050 |
| 26h 30' | 0.190 | 0.120 | 0.070 | 0.0100 |

Tabla IV.- Evolución de la reacción del Acido indol acético con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|--------|
| 0' | 0.050 | 0.100 | 0.020 | 0.0650 |
| 13' | 0.250 | 0.380 | 0.050 | 0.2300 |
| 20' | 0.280 | 0.410 | 0.050 | 0.2450 |
| 30' | 0.280 | 0.420 | 0.050 | 0.2550 |
| 1h | 0.330 | 0.460 | 0.040 | 0.2750 |
| 1h 30' | 0.350 | 0.460 | 0.030 | 0.2700 |
| 2h | 0.330 | 0.450 | 0.030 | 0.2700 |
| 2h 30' | 0.350 | 0.450 | 0.030 | 0.2600 |
| 3h | 0.330 | 0.450 | 0.040 | 0.2650 |
| 3h 30' | 0.320 | 0.430 | 0.060 | 0.2400 |
| 4h | 0.330 | 0.430 | 0.050 | 0.2400 |
| 5h 30' | 0.310 | 0.380 | 0.030 | 0.2100 |
| 6h | 0.300 | 0.380 | 0.040 | 0.2100 |
| 6h 30' | 0.400 | 0.360 | 0.030 | 0.1400 |
| 7h | 0.400 | 0.360 | 0.025 | 0.1470 |
| 8h 30' | 0.270 | 0.330 | 0.030 | 0.1300 |
| 24h 30' | 0.210 | 0.210 | 0.025 | 0.0925 |
| 26h 30' | 0.190 | 0.200 | 0.030 | 0.0900 |

Tabla V.- Evolución de la reacción del ácido indol butírico con el reactivo de Salkowski a lo largo del tiempo.

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|--------|
| 0' | 0.005 | 0.010 | 0.000 | 0.0085 |
| 13' | 0.070 | 0.030 | 0.020 | 0.0150 |
| 20' | 0.080 | 0.020 | 0.005 | 0.0225 |
| 30' | 0.080 | 0.025 | 0.010 | 0.0200 |
| 1h | 0.090 | 0.035 | 0.010 | 0.0150 |
| 1h 30' | 0.100 | 0.050 | 0.010 | 0.0050 |
| 2h | 0.100 | 0.050 | 0.010 | 0.0050 |
| 2h 30' | 0.100 | 0.045 | 0.020 | 0.0150 |
| 3h | 0.100 | 0.050 | 0.020 | 0.0100 |
| 3h 30' | 0.100 | 0.050 | 0.030 | 0.0150 |
| 4h | 0.100 | 0.050 | 0.020 | 0.0100 |
| 5h 30' | 0.090 | 0.050 | 0.030 | 0.0100 |
| 6h | 0.090 | 0.050 | 0.020 | 0.0050 |
| 6h 30' | 0.100 | 0.040 | 0.020 | 0.0200 |
| 7h | 0.100 | 0.050 | 0.030 | 0.0150 |
| 8h 30' | 0.090 | 0.050 | 0.030 | 0.0100 |
| 24h 30' | 0.080 | 0.040 | 0.025 | 0.0050 |
| 26h 30' | 0.070 | 0.035 | 0.010 | 0.0000 |

Tabla VI.- Evolución de la reacción del ácido indol pirúvico con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo.

| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
|---------|-------|-------|-------|--------|
| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
| 0' | 0.025 | 0.030 | 0.000 | 0.0175 |
| 13' | 0.050 | 0.070 | 0.015 | 0.0375 |
| 20' | 0.045 | 0.060 | 0.020 | 0.0275 |
| 30' | 0.060 | 0.090 | 0.030 | 0.0450 |
| 1h | 0.070 | 0.090 | 0.020 | 0.0450 |
| 1h 30' | 0.080 | 0.090 | 0.020 | 0.0400 |
| 2h | 0.075 | 0.090 | 0.020 | 0.0325 |
| 2h 30' | 0.070 | 0.090 | 0.020 | 0.0450 |
| 3h | 0.080 | 0.090 | 0.030 | 0.0350 |
| 3h 30' | 0.080 | 0.090 | 0.030 | 0.0350 |
| 4h | 0.080 | 0.090 | 0.030 | 0.0350 |
| 5h 30' | 0.080 | 0.085 | 0.020 | 0.0350 |
| 6h | 0.080 | 0.090 | 0.020 | 0.0400 |
| 6h 30' | 0.085 | 0.085 | 0.015 | 0.0350 |
| 7h | 0.085 | 0.070 | 0.025 | 0.0200 |
| 8h 30' | 0.080 | 0.080 | 0.030 | 0.0250 |
| 24h 30' | 0.080 | 0.065 | 0.030 | 0.0100 |
| 26h 30' | 0.070 | 0.050 | 0.020 | 0.0050 |

Tabla VII.- Evolucion de la reacción del ácido indol
propiónico con el reactivo de Salkowski,
a lo largo del tiempo.

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|--------|
| 0' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.0000 |
| 13' | 0.030 | 0.010 | 0.000 | 0.0050 |
| 20' | 0.030 | 0.010 | 0.000 | 0.0050 |
| 30' | 0.040 | 0.010 | 0.000 | 0.0100 |
| 1h | 0.060 | 0.015 | 0.010 | 0.0200 |
| 1h 30' | 0.070 | 0.025 | 0.020 | 0.0200 |
| 2h | 0.075 | 0.020 | 0.010 | 0.0225 |
| 2h 30' | 0.080 | 0.030 | 0.010 | 0.0150 |
| 3h | 0.090 | 0.030 | 0.015 | 0.0225 |
| 3h 30' | 0.090 | 0.035 | 0.020 | 0.0200 |
| 4h | 0.090 | 0.030 | 0.020 | 0.0150 |
| 5h 30' | 0.090 | 0.030 | 0.015 | 0.0225 |
| 6h | 0.090 | 0.040 | 0.020 | 0.0150 |
| 6h 30' | 0.090 | 0.045 | 0.015 | 0.0065 |
| 7h | 0.085 | 0.030 | 0.020 | 0.0225 |
| 8h 30' | 0.100 | 0.040 | 0.015 | 0.0175 |
| 24h 30' | 0.090 | 0.035 | 0.010 | 0.0150 |
| 26h 30' | 0.085 | 0.030 | 0.020 | 0.0225 |

Tabla VIII.- Evolución de la reacción del indol-acetaldehído con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 0' | 0.080 | 0.100 | 0.030 | 0.045 |
| 15' | 0.100 | 0.110 | 0.030 | 0.045 |
| 20' | 0.105 | 0.110 | 0.040 | 0.037 |
| 30' | 0.110 | 0.110 | 0.040 | 0.035 |
| 1h | 0.090 | 0.090 | 0.035 | 0.027 |
| 1h 30' | 0.070 | 0.075 | 0.025 | 0.027 |
| 2h | 0.065 | 0.060 | 0.020 | 0.017 |
| 2h 30' | 0.060 | 0.055 | 0.015 | 0.017 |
| 3h | 0.050 | 0.050 | 0.015 | 0.019 |
| 5h 45' | 0.040 | 0.030 | 0.015 | 0.002 |
| 6h 30' | 0.040 | 0.030 | 0.015 | 0.002 |
| 7h | 0.040 | 0.030 | 0.015 | 0.002 |
| 7h 30' | 0.035 | 0.025 | 0.010 | 0.002 |
| 8h | 0.035 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 8h 30' | 0.035 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 24h 30' | 0.030 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 26h 30' | 0.030 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |

Tabla IX.- Evolución de la reacción de la indol-acetamida con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo.

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 0' | 0.040 | 0.085 | 0.070 | 0.030 |
| 13' | 0.070 | 0.140 | 0.080 | 0.065 |
| 20' | 0.080 | 0.145 | 0.080 | 0.065 |
| 30' | 0.090 | 0.155 | 0.080 | 0.070 |
| 1h | 0.115 | 0.180 | 0.060 | 0.097 |
| 1h 30' | 0.120 | 0.185 | 0.045 | 0.102 |
| 2h | 0.120 | 0.190 | 0.045 | 0.107 |
| 2h 30' | 0.120 | 0.195 | 0.040 | 0.112 |
| 3h | 0.120 | 0.190 | 0.035 | 0.112 |
| 5h 45' | 0.130 | 0.200 | 0.040 | 0.115 |
| 6h 30' | 0.130 | 0.200 | 0.040 | 0.115 |
| 7h | 0.130 | 0.190 | 0.040 | 0.105 |
| 7h 30' | 0.130 | 0.190 | 0.030 | 0.110 |
| 8h | 0.125 | 0.185 | 0.035 | 0.105 |
| 8h 30' | 0.120 | 0.185 | 0.030 | 0.100 |
| 24h 30' | 0.115 | 0.180 | 0.030 | 0.107 |
| 26h 30' | 0.120 | 0.180 | 0.030 | 0.102 |

Tabla X.- Evolucion de la reacción del beta-indol-acetonitrilo con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo.

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------------------|-------|
| 0' | 0.040 | 0.035 | 0.030 | 0.000 |
| 13' | 0.060 | 0.060 | 0.050 | 0.000 |
| 20' | 0.075 | 0.065 | 0.050 | 0.000 |
| 30' | 0.080 | 0.080 | 0.06 ⁰ | 0.010 |
| 1h | 0.100 | 0.090 | 0.075 | 0.002 |
| 1h 30' | 0.100 | 0.085 | 0.070 | 0.000 |
| 2h | 0.100 | 0.090 | 0.070 | 0.005 |
| 2h 30' | 0.100 | 0.090 | 0.065 | 0.007 |
| 3h | 0.090 | 0.085 | 0.060 | 0.010 |
| 5h 45' | 0.090 | 0.085 | 0.060 | 0.010 |
| 6h 30' | 0.085 | 0.080 | 0.060 | 0.007 |
| 7h | 0.085 | 0.080 | 0.060 | 0.007 |
| 7h 30' | 0.080 | 0.075 | 0.050 | 0.010 |
| 8h | 0.080 | 0.070 | 0.050 | 0.005 |
| 8h 30' | 0.080 | 0.070 | 0.050 | 0.005 |
| 24h 30' | 0.055 | 0.050 | 0.035 | 0.005 |
| 26h 30' | 0.050 | 0.050 | 0.035 | 0.005 |

Tabla XI.- Evolución de la reacción del ácido indol láctico con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 0' | 0.010 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 13' | 0.010 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 20' | 0.015 | 0.020 | 0.010 | 0.007 |
| 30' | 0.020 | 0.020 | 0.015 | 0.002 |
| 1h | 0.020 | 0.015 | 0.010 | 0.000 |
| 1h 30' | 0.025 | 0.025 | 0.010 | 0.007 |
| 2h | 0.030 | 0.030 | 0.015 | 0.007 |
| 2h 30' | 0.030 | 0.030 | 0.010 | 0.010 |
| 3h | 0.035 | 0.040 | 0.010 | 0.017 |
| 5h 45' | 0.050 | 0.040 | 0.010 | 0.010 |
| 6h 30' | 0.050 | 0.040 | 0.010 | 0.010 |
| 7h | 0.050 | 0.040 | 0.010 | 0.010 |
| 7h 30' | 0.050 | 0.030 | 0.010 | 0.000 |
| 8h | 0.050 | 0.025 | 0.010 | 0.000 |
| 8h 30' | 0.040 | 0.030 | 0.010 | 0.005 |
| 24h 30' | 0.050 | 0.030 | 0.015 | 0.000 |
| 26h 30' | 0.035 | 0.020 | 0.000 | 0.000 |

Tabla XII.- Evolución de la reacción del indol acetil-
etil éter con el reactivo de Salkowski, a
lo largo del tiempo

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 0' | 0.010 | 0.015 | 0.020 | 0.000 |
| 13' | 0.010 | 0.015 | 0.010 | 0.005 |
| 20' | 0.010 | 0.015 | 0.010 | 0.005 |
| 30' | 0.010 | 0.015 | 0.010 | 0.005 |
| 1h | 0.050 | 0.050 | 0.010 | 0.020 |
| 1h 30' | 0.050 | 0.050 | 0.050 | 0.000 |
| 2h | 0.010 | 0.020 | 0.050 | 0.000 |
| 2h 30' | 0.005 | 0.050 | 0.000 | 0.025 |
| 3h | 0.005 | 0.005 | 0.000 | 0.025 |
| 5h 45' | 0.005 | 0.010 | 0.000 | 0.075 |
| 6h 30' | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 7h | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 7h 30' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8h | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8h 30' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 24h 30' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 26h 30' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

Tabla XIII.- Evolución de la reacción de la triptamina con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo.

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 0' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 13' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 20' | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 30' | 0.000 | 0.005 | 0.010 | 0.002 |
| 1h | 0.050 | 0.000 | 0.010 | 0.000 |
| 1h 30' | 0.050 | 0.050 | 0.010 | 0.020 |
| 2h | 0.010 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 2h 30' | 0.010 | 0.015 | 0.010 | 0.005 |
| 3h | 0.010 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 5h 45' | 0.020 | 0.020 | 0.010 | 0.005 |
| 6h 30' | 0.020 | 0.020 | 0.010 | 0.005 |
| 7h | 0.020 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 7h 30' | 0.020 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 8h | 0.020 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 8h 30' | 0.020 | 0.010 | 0.010 | 0.000 |
| 24h 30' | 0.030 | 0.020 | 0.015 | 0.000 |
| 26h 30' | 0.030 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |

Tabla XIV.- Evolución de la reacción del triptofanol con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo.

| Tiempo | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 0' | 0.025 | 0.020 | 0.015 | 0.000 |
| 13' | 0.040 | 0.020 | 0.030 | 0.000 |
| 20' | 0.050 | 0.030 | 0.040 | 0.000 |
| 30' | 0.060 | 0.050 | 0.040 | 0.000 |
| 1h | 0.045 | 0.020 | 0.020 | 0.000 |
| 1h 30' | 0.040 | 0.010 | 0.015 | 0.000 |
| 2h | 0.050 | 0.030 | 0.010 | 0.000 |
| 2h 30' | 0.050 | 0.030 | 0.015 | 0.000 |
| 3h | 0.040 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 5h 45' | 0.050 | 0.030 | 0.010 | 0.000 |
| 6h 30' | 0.040 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 7h | 0.040 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 7h 30' | 0.040 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 8h | 0.040 | 0.015 | 0.010 | 0.000 |
| 8h 30' | 0.040 | 0.020 | 0.010 | 0.000 |
| 24h 30' | 0.035 | 0.020 | 0.005 | 0.000 |
| 26h 30' | 0.030 | 0.020 | 0.005 | 0.002 |

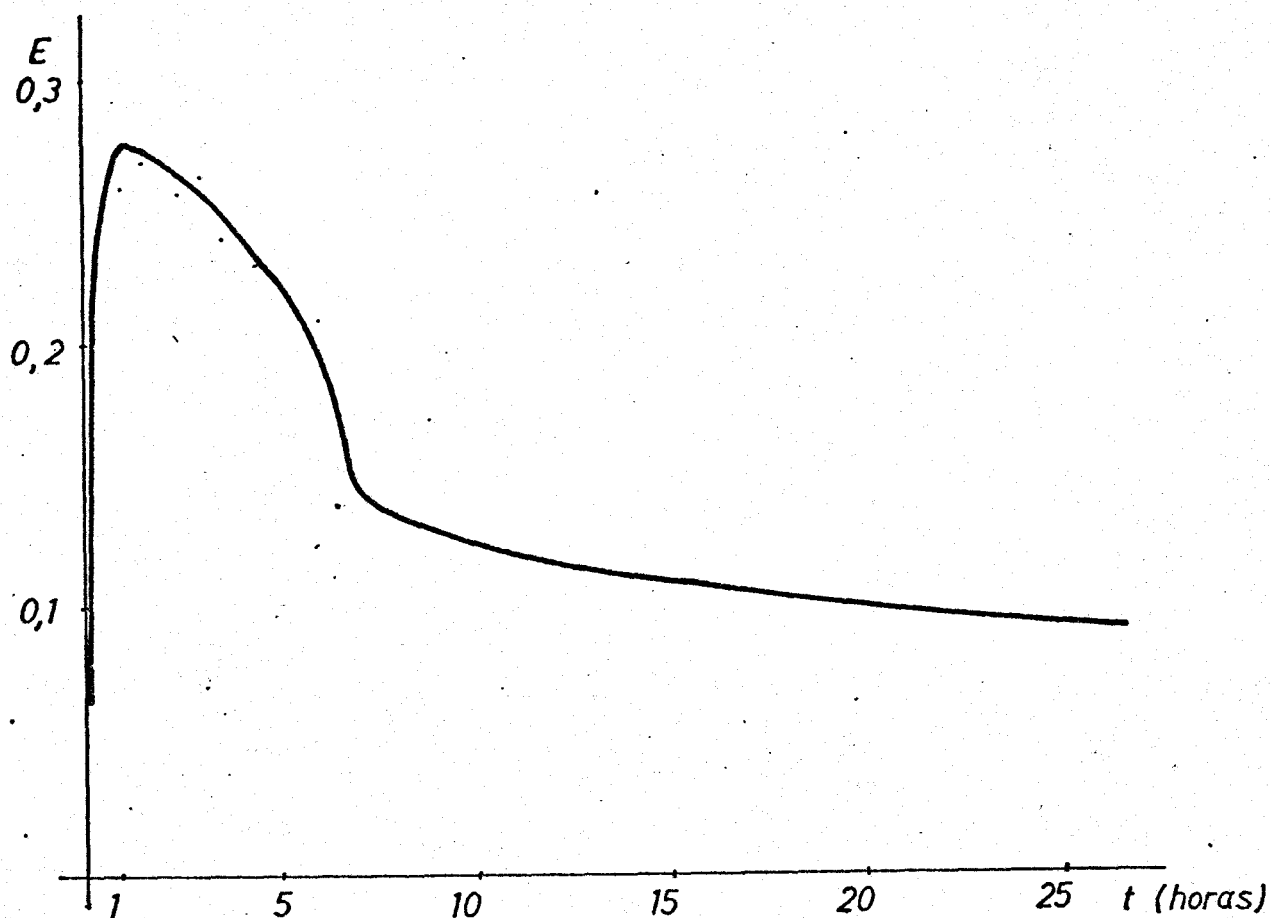


Figura 2.- Evolución de la reacción del AIA con el reactivo de Salkowski, a lo largo del tiempo

A fin de determinar si estos compuestos indólicos se separan juntos en el proceso de extracción adoptado, preparamos una mezcla de diversas sustancias indólicas, que fraccionamos con el procedimiento de extracción de RIGAUD.

3.1.3.- Técnica de extracción.- Una vez fraccionada la muestra anterior, fue determinada colorimétricamente, mediante la reacción de Salkowski, la cantidad de AIA que aparecía en cada una de las fracciones obtenidas, resultados que se expresan en la Tabla XV. Ello nos permitió determinar el rendimiento de la técnica.

Como puede verse en la citada Tabla, el AIA se recoge en una sola fracción, la correspondiente a la extracción con éter a pH ácido.

A fin de determinar si en esta fracción se separaba sólo el AIA, sometimos la muestra correspondiente a una cromatografía, con lo que pudimos comprobar que esta técnica sólo separa junto con el AIA, el AIL, el AIB y el AIP.

3.1.4.- Recta de calibrado para el AIA.- Por todo lo expuesto, es razonable suponer que al extraer el AIA de los líquidos metabólicos, los únicos productos indólicos que pudieran acompañarle en el extracto serían los anteriormente citados. En principio, este hecho no constituiría ningún obstáculo para la valoración colorimétrica del AIA, puesto que ninguno de ellos da la reacción de Salkowski. Por ello, confeccionamos una recta de calibrado (Figura 3), relacionando la concentración de AIA con los valores de absorción, de acuerdo con los datos experimentales obtenidos (Tabla XVI). Sin embargo, al tratar de aplicar este método a la determinación del AIA en líquidos metabólicos de diferentes estirpes de Rhizobium, observamos grandes oscilaciones en los resultados, que no eran fácilmente explicables. Esto unido al hecho, demostrado por LE HIR y SCHNEIDER (53), de que la presencia de AIL influye en la intensidad de la reacción del AIA con el reactivo de Salkowski, nos hizo

Tabla XV.- Resultados de la aplicación de la reacción de Salkowski a las distintas fracciones obtenidas al separar una mezcla de distintas sustancias derivadas del indol, por el procedimiento de extracción de RIGAUD

| Fracción(1) | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0,060 | 0,030 | 0,010 | 0,000 |
| 2 | 0,330 | 0,500 | 0,030 | 0,952 |
| 3 | 0,060 | 0,030 | 0,000 | 0,000 |

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,952}{0,952} = 1,000$$

(1) Cada fracción se ha obtenido al separar la mezcla al procedimiento de extracción. La fracción 1 corresponde a la fase etérea alcalina, la 2 a la fase etérea ácida, y la 3 al residuo acuoso.

Tabla XVI.- Medidas de absorción obtenidas al someter a la reacción de Salkowski a distintas muestras de AIA puro.

| /AIA/ (1) | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|-----------|-------|-------|-------|--------|
| 100 | 0,700 | 1,300 | 0,140 | 0,8800 |
| 50 | 0,410 | 0,710 | 0,085 | 0,4625 |
| 25 | 0,220 | 0,390 | 0,055 | 0,2525 |
| 20 | 0,180 | 0,305 | 0,035 | 0,1975 |
| 10 | 0,100 | 0,160 | 0,020 | 0,1000 |
| 5 | 0,050 | 0,080 | 0,010 | 0,0500 |
| 1 | 0,020 | 0,020 | 0,005 | 0,0075 |

(1) ug/ml.

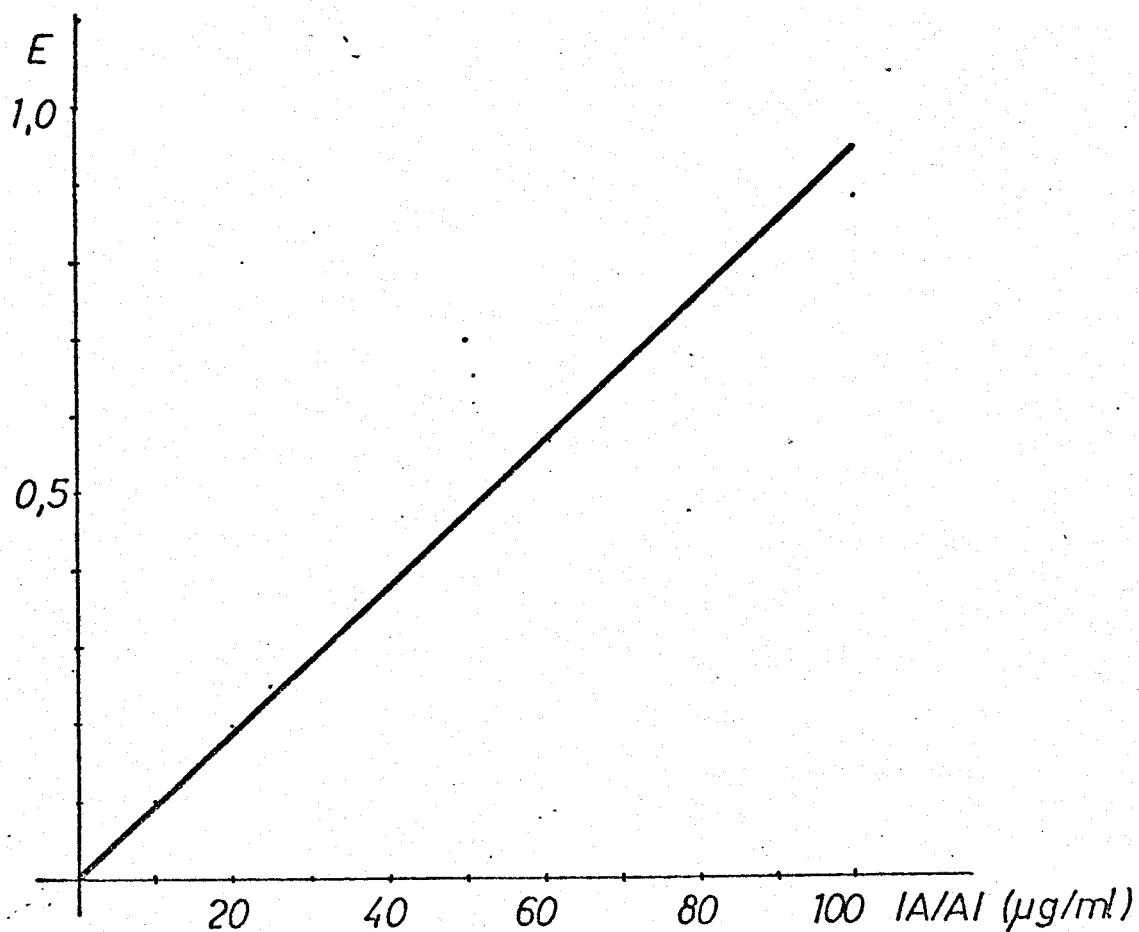


Figura 3.- Recta de calibrado en la que se relacionan las medidas de absorción con la concentración de AIA en las muestras sometidas a la reacción de Salkowski.

descartar este método, ya que, según había demostrado RIGAUD, (71), el AIA coexiste siempre con el AIL en los líquidos metabólicos.

3.1.5.- Espectrofotometría.- Como alternativas posibles probamos dos métodos: la espectrofotometría ultravioleta y visible, y la espectrofluorimetría. Para ver las posibilidades de aplicación del primero de estos métodos, hicimos espectros de absorción de AIA y de AIL, así como de una mezcla de ambos (Figuras 4, 5 y 6).

Como puede observarse en estas figuras, ambas sustancias tienen picos de absorción a 222 nm y a 278 nm y, por tanto, el método tampoco es utilizable.

3.1.6.- Espectrofluorimetría.- Para probar las posibilidades de la espectrofluorimetría, preparamos igualmente soluciones de AIA y AIL y de la mezcla de ambos, que, una vez sometidas a la reacción descrita en los métodos, fue sometida a una radiación excitante de 440 nm. Estudiando sus espectros, se observó que el AIL no emite fluorescencia; el AIA emite a 500 nm y la mezcla emite a esta misma longitud de onda, pero con mayor intensidad. Este resultado es comparable al observado en la reacción de Salkowski, en la que el AIL influye en la absorción del AIA, a pesar de que no absorbe cuando está puro (Tabla XVII)

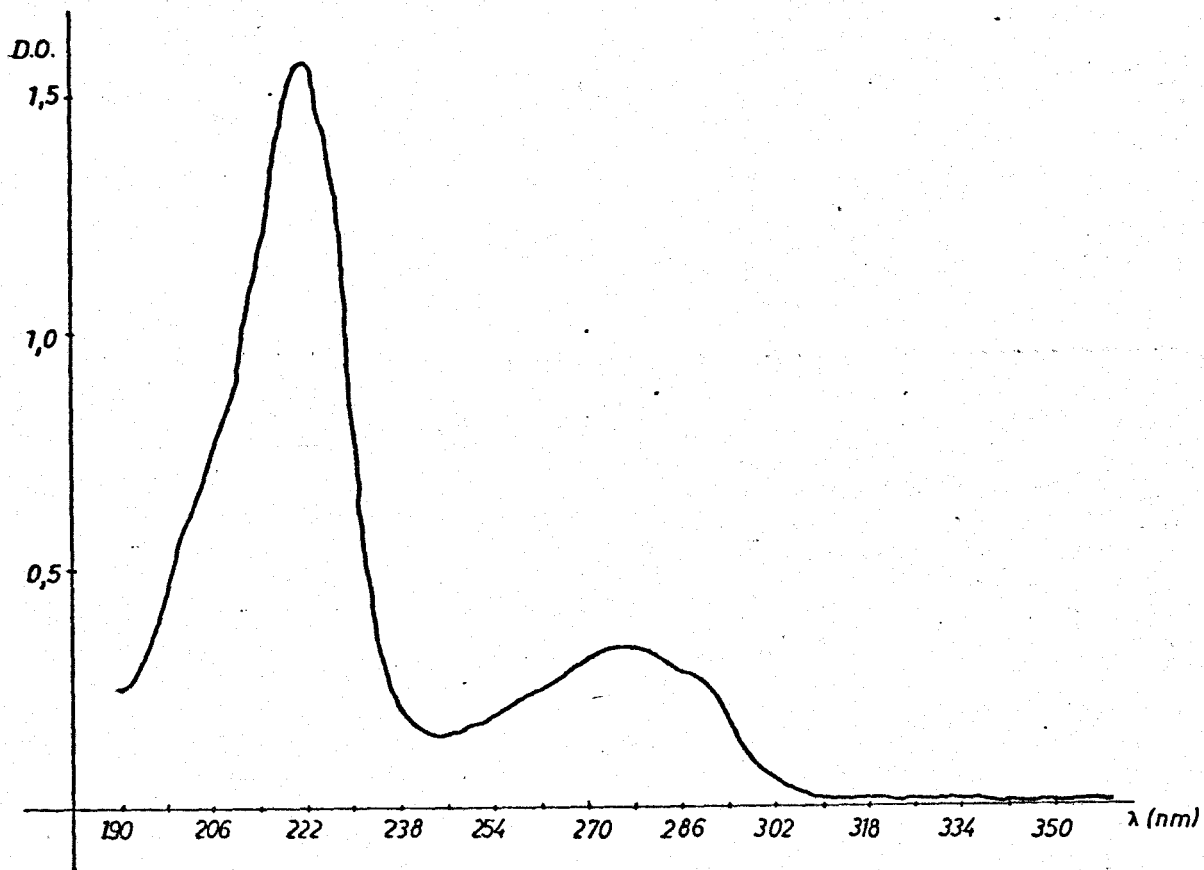


Figura 4.- Espectro de absorción del ácido indol acético.

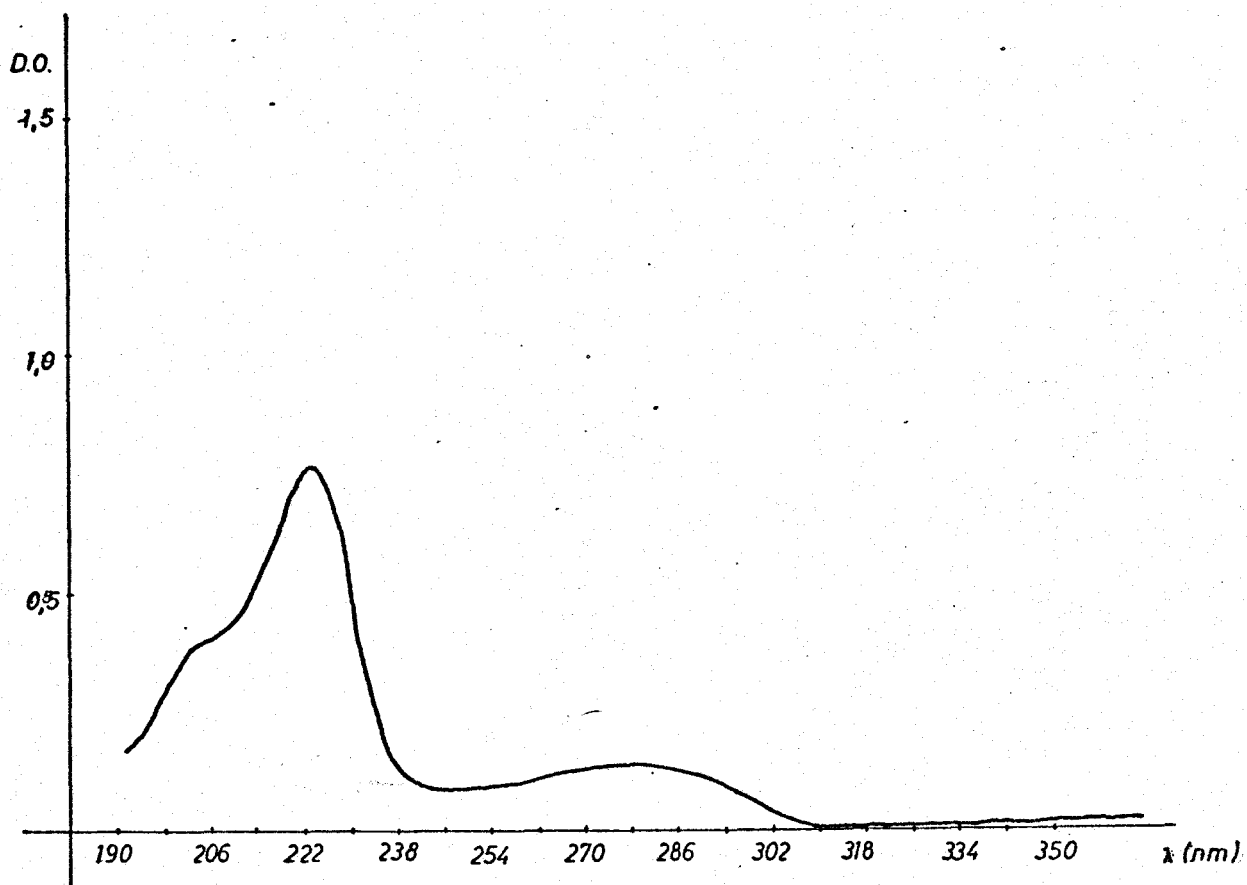


Figura 5.- Espectro de absorção de uma amostra de AII,
puro

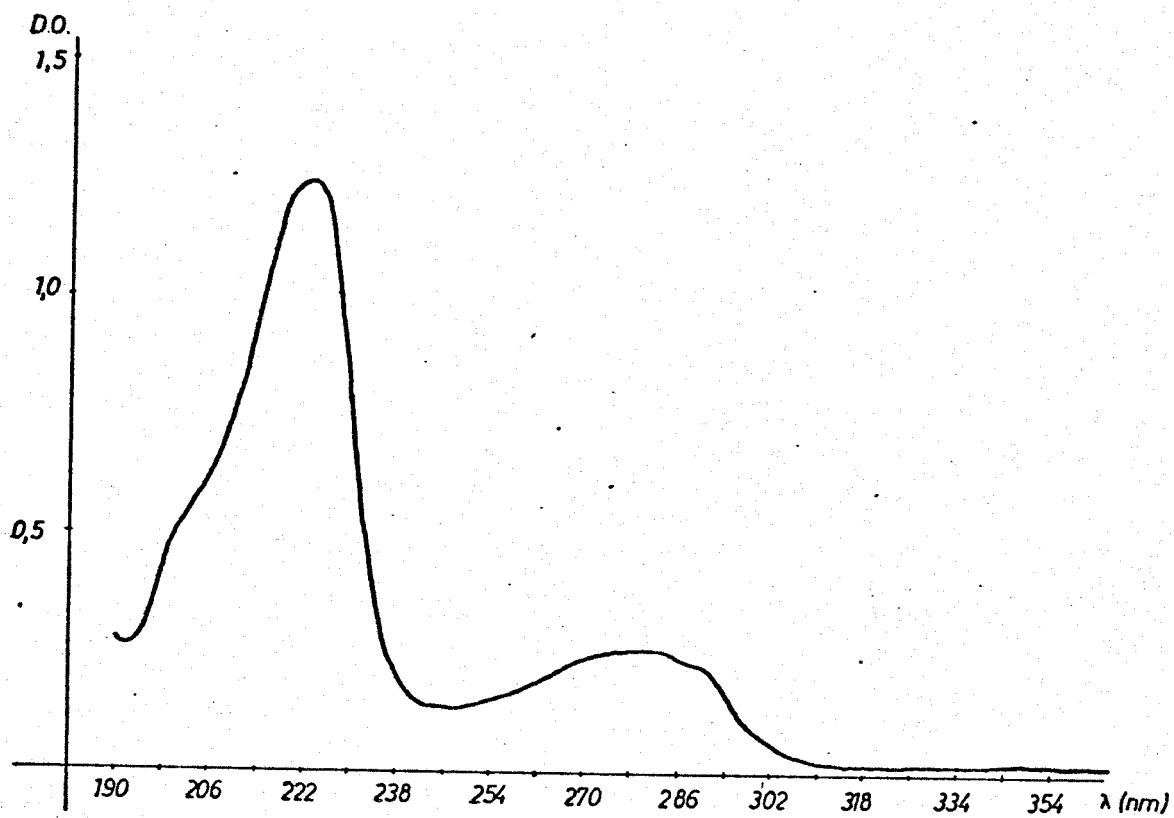


Figura 6.- Espectro de absorción de una mezcla de AIA
y AIL

Tabla XVII.- Valores de densidad óptica obtenidos al aplicar la reacción de Salkowski a distintas muestras de AIL.

| /AIL/(1) | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|----------|-------|-------|-------|--------|
| 100 | 0,115 | 0,065 | 0,015 | 0,0000 |
| 75 | 0,105 | 0,060 | 0,015 | 0,0000 |
| 50 | 0,070 | 0,045 | 0,010 | 0,0050 |
| 25 | 0,040 | 0,027 | 0,005 | 0,0045 |
| 12,5 | 0,015 | 0,010 | 0,000 | 0,0050 |
| 5 | 0,010 | 0,010 | 0,000 | 0,0050 |
| 2,5 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| 1 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |

(1) expresada en $\mu\text{g/ml}$.

3.1.7.- Método de valoración del AIA en presencia de AIL,-
En vista de estos resultados negativos, decidimos explorar nuevamente las posibilidades del método de Salkowski, en el sentido de averiguar si la influencia del AIL tiene alguna correlación con la concentración a la que se encuentre esta sustancia acompañando al AIA.

Para ello, se hicieron dos series de experimentos encaminados a poner de manifiesto la influencia del AIL sobre la absorción debida al AIA.

En una serie de estos experimentos, se prepararon distintas soluciones de AIA, a las que se añadía AIL en distintas concentraciones, de manera que la proporción AIA/AIL fuera variable.

Estas soluciones fueron sometidas a la reacción de Salkowski y se midió la densidad óptica que daban. Los datos obtenidos fueron agrupados de forma que se establecieron seis clases de valores, correspondientes a las seis concentraciones diferentes a las que estaba el AIA (50, 30, 25, 20, 15 y 10 $\mu\text{g/ml}$). Los valores obtenidos se exponen en las tablas XVIII a XXIII, y se representan gráficamente en las figuras 7 y 8.

La otra serie de experimentos consistía en preparar diferentes soluciones de AIL a las que se añadieron cantidades variables de AIA, de forma que las proporciones AIA/AIL fueran también variables. De la misma forma que antes, se obtuvieron una serie de datos, que fueron agrupados en siete clases de valores diferentes, correspondientes cada una de ellas a una determinada concentración de AIL (50, 45, 30, 20, 10, 5 y 1 $\mu\text{g/ml}$). Los valores obtenidos se exponen en las Tablas XXIV a XXX, y se representan gráficamente en la Figura 9.

Tabla XVIII.- Valores de absorción obtenidos al aplicar el método de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (50 $\mu\text{g/ml}$) y cantidades variables de AIL.

| Muestra | /AIL/ (1) | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-----------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 0,00 | - | 0,405 | 0,700 | 0,084 | 0,4555 |
| 2 | 5,55 | 9:1 | 0,640 | 1,100 | 0,080 | 0,7400 |
| 3 | 6,25 | 8:1 | 0,580 | 1,000 | 0,075 | 0,6750 |
| 4 | 7,14 | 7:1 | 0,600 | 1,100 | 0,080 | 0,7600 |
| 5 | 8,33 | 6:1 | 0,620 | 1,300 | 0,090 | 0,9450 |
| 6 | 10,00 | 5:1 | 0,660 | 1,300 | 0,090 | 0,9250 |
| 7 | 12,50 | 4:1 | 0,640 | 1,300 | 0,090 | 0,9350 |
| 8 | 16,66 | 3:1 | 0,790 | 1,400 | 0,090 | 0,9600 |
| 9 | 25,00 | 2:1 | 0,860 | 1,500 | 0,090 | 1,0250 |
| 10 | 50,00 | 1:1 | 0,750 | 1,500 | 0,095 | 1,0775 |
| 11 | 100,00 | 1:2 | 1,000 | 1,700 | 0,140 | 1,1300 |
| 12 | 150,00 | 1:3 | 0,850 | 1,600 | 0,100 | 1,1250 |
| 13 | 200,00 | 1:4 | 0,850 | 1,550 | 0,110 | 1,0700 |
| 14 | 250,00 | 1:5 | 1,000 | 1,750 | 0,130 | 1,1850 |
| 15 | 300,00 | 1:6 | 1,000 | 1,700 | 0,135 | 1,1325 |
| 16 | 350,00 | 1:7 | 1,150 | 1,800 | 0,145 | 1,1525 |
| 17 | 400,00 | 1:8 | 1,350 | 2,000 | 0,160 | 1,2450 |
| 18 | 450,00 | 1:9 | 1,150 | 1,740 | 0,145 | 1,0925 |
| 19 | 500,00 | 1:10 | 1,220 | 1,790 | 0,150 | 1,1050 |

(1) $\mu\text{g/ml}$.

Tabla XIX.- Valores de absorción obtenidos al aplicar el método de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija de AIA (30 $\mu\text{g/ml}$) y cantidades variables de AIL (expresadas, también en $\mu\text{g/ml}$)

| Muestra | /AIL/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|--------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 0,00 | - | 0,280 | 0,465 | 0,055 | 0,2975 |
| 2 | 3,33 | 9:1 | 0,400 | 0,680 | 0,055 | 0,4530 |
| 3 | 3,75 | 8:1 | 0,380 | 0,660 | 0,050 | 0,4500 |
| 4 | 4,28 | 7:1 | 0,390 | 0,690 | 0,055 | 0,4600 |
| 5 | 5,00 | 6:1 | 0,405 | 0,750 | 0,055 | 0,5200 |
| 6 | 6,00 | 5:1 | 0,410 | 0,710 | 0,055 | 0,4775 |
| 7 | 7,50 | 4:1 | 0,420 | 0,750 | 0,060 | 0,5100 |
| 8 | 10,00 | 3:1 | 0,480 | 0,840 | 0,055 | 0,5725 |
| 9 | 15,00 | 2:1 | 0,560 | 0,900 | 0,050 | 0,5950 |
| 10 | 30,00 | 1:1 | 0,500 | 0,950 | 0,070 | 0,6650 |
| 11 | 60,00 | 1:2 | 0,520 | 0,950 | 0,070 | 0,6550 |
| 12 | 90,00 | 1:3 | 0,540 | 0,950 | 0,065 | 0,6475 |
| 13 | 120,00 | 1:4 | 0,530 | 0,950 | 0,070 | 0,6500 |
| 14 | 150,00 | 1:5 | 0,680 | 1,050 | 0,080 | 0,6700 |
| 15 | 180,00 | 1:6 | 0,625 | 1,000 | 0,085 | 0,6450 |
| 16 | 210,00 | 1:7 | 0,660 | 1,100 | 0,100 | 0,7200 |
| 17 | 240,00 | 1:8 | 0,700 | 1,000 | 0,085 | 0,6075 |
| 18 | 270,00 | 1:9 | 0,700 | 1,000 | 0,080 | 0,6100 |
| 19 | 300,00 | 1:10 | 0,900 | 1,200 | 0,100 | 0,7000 |

Tabla XX.- Valores de absorción obtenidos al aplicar el método de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija de AIA (25 $\mu\text{g/ml}$) y cantidades variables de AIL (expresadas, también en $\mu\text{g/ml}$).

| Muestra | /AIL/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|--------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 0,00 | - | 0,200 | 0,380 | 0,050 | 0,2550 |
| 2 | 2,77 | 9:1 | 0,350 | 0,500 | 0,045 | 0,3070 |
| 3 | 3,12 | 8:1 | 0,310 | 0,540 | 0,040 | 0,3650 |
| 4 | 3,57 | 7:1 | 0,325 | 0,580 | 0,045 | 0,3950 |
| 5 | 4,30 | 6:1 | 0,410 | 0,750 | 0,060 | 0,5150 |
| 6 | 5,00 | 5:1 | 0,350 | 0,630 | 0,050 | 0,4300 |
| 7 | 6,25 | 4:1 | 0,340 | 0,600 | 0,050 | 0,4050 |
| 8 | 8,33 | 3:1 | 0,420 | 0,725 | 0,045 | 0,4925 |
| 9 | 12,50 | 2:1 | 0,470 | 0,840 | 0,040 | 0,5850 |
| 10 | 25,00 | 1:1 | 0,420 | 0,830 | 0,035 | 0,6025 |
| 11 | 50,00 | 1:2 | 0,440 | 0,875 | 0,060 | 0,6250 |
| 12 | 175,00 | 1:3 | 0,410 | 0,850 | 0,050 | 0,6200 |
| 13 | 100,00 | 1:4 | 0,560 | 0,925 | 0,070 | 0,6100 |
| 14 | 125,00 | 1:5 | 0,570 | 0,950 | 0,080 | 0,6250 |
| 15 | 150,00 | 1:6 | 0,620 | 1,000 | 0,070 | 0,6550 |
| 16 | 175,00 | 1:7 | 0,620 | 1,000 | 0,080 | 0,6500 |
| 17 | 200,00 | 1:8 | 0,600 | 1,000 | 0,090 | 0,6550 |
| 18 | 225,00 | 1:9 | 0,580 | 0,950 | 0,065 | 0,6275 |
| 19 | 250,00 | 1:10 | 0,650 | 1,000 | 0,070 | 0,6400 |

Tabla XXI.- Valores de absorción obtenidos al aplicar el método de Salkowski a soluciones que contenían una cantidad fija de AIA (20 µg/ml) y cantidades variables de AIL (expresadas, igualmente, en µg/ml).

| Muestra | /AIL/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|--------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 0,00 | - | 0,180 | 0,310 | 0,030 | 0,2050 |
| 2 | 2,22 | 9:1 | 0,220 | 0,390 | 0,030 | 0,2650 |
| 3 | 2,50 | 8:1 | 0,240 | 0,425 | 0,030 | 0,2900 |
| 4 | 2,85 | 7:1 | 0,250 | 0,460 | 0,035 | 0,3175 |
| 5 | 3,33 | 6:1 | 0,225 | 0,420 | 0,030 | 0,2925 |
| 6 | 4,00 | 5:1 | 0,270 | 0,480 | 0,040 | 0,3250 |
| 7 | 5,00 | 4:1 | 0,290 | 0,500 | 0,040 | 0,3350 |
| 8 | 6,66 | 3:1 | 0,320 | 0,520 | 0,030 | 0,3450 |
| 9 | 10,00 | 2:1 | 0,340 | 0,600 | 0,040 | 0,4100 |
| 10 | 20,00 | 1:1 | 0,330 | 0,620 | 0,050 | 0,4300 |
| 11 | 40,00 | 1:2 | 0,320 | 0,600 | 0,040 | 0,4200 |
| 12 | 60,00 | 1:3 | 0,340 | 0,630 | 0,035 | 0,4425 |
| 13 | 80,00 | 1:4 | 0,360 | 0,620 | 0,060 | 0,4100 |
| 14 | 100,00 | 1:5 | 0,450 | 0,750 | 0,050 | 0,5000 |
| 15 | 120,00 | 1:6 | 0,510 | 0,840 | 0,060 | 0,5550 |
| 16 | 140,00 | 1:7 | 0,530 | 0,850 | 0,065 | 0,5525 |
| 17 | 160,00 | 1:8 | 0,520 | 0,810 | 0,065 | 0,5175 |
| 18 | 180,00 | 1:9 | 0,520 | 0,800 | 0,060 | 0,5100 |
| 19 | 200,00 | 1:10 | 0,470 | 0,680 | 0,050 | 0,4200 |

Tabla XXII.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija de AIA (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y cantidades variables de AIL (expresadas, de igual modo, en $\mu\text{g}/\text{ml}$).

| Muestra | /AIL/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|--------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 0,00 | - | 0,150 | 0,240 | 0,030 | 0,1500 |
| 2 | 1,66 | 9:1 | 0,190 | 0,320 | 0,025 | 0,2130 |
| 3 | 1,87 | 8:1 | 0,200 | 0,340 | 0,030 | 0,2250 |
| 4 | 2,14 | 7:1 | 0,195 | 0,360 | 0,030 | 0,2475 |
| 5 | 2,50 | 6:1 | 0,200 | 0,360 | 0,030 | 0,2450 |
| 6 | 3,00 | 5:1 | 0,205 | 0,380 | 0,035 | 0,2575 |
| 7 | 3,75 | 4:1 | 0,205 | 0,360 | 0,035 | 0,2400 |
| 8 | 5,00 | 3:1 | 0,250 | 0,430 | 0,035 | 0,2875 |
| 9 | 7,50 | 2:1 | 0,290 | 0,500 | 0,035 | 0,3375 |
| 10 | 15,00 | 1:1 | 0,280 | 0,500 | 0,035 | 0,3425 |
| 11 | 30,00 | 1:2 | 0,270 | 0,490 | 0,035 | 0,3375 |
| 12 | 45,00 | 1:3 | 0,290 | 0,520 | 0,030 | 0,3600 |
| 13 | 60,00 | 1:4 | 0,330 | 0,560 | 0,060 | 0,3650 |
| 14 | 75,00 | 1:5 | 0,350 | 0,570 | 0,040 | 0,3750 |
| 15 | 90,00 | 1:6 | 0,370 | 0,610 | 0,050 | 0,4000 |
| 16 | 105,00 | 1:7 | 0,400 | 0,620 | 0,050 | 0,3950 |
| 17 | 120,00 | 1:8 | 0,400 | 0,610 | 0,050 | 0,3850 |
| 18 | 135,00 | 1:9 | 0,270 | 0,435 | 0,030 | 0,2850 |
| 19 | 150,00 | 1:10 | 0,325 | 0,500 | 0,030 | 0,3225 |

Tabla XXIII.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija de AIA (10 $\mu\text{g/ml}$) y cantidades variables de AIL (expresadas, también en $\mu\text{g/ml}$).

| Muestra | /AIL/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|--------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 0,00 | - | 0,100 | 0,150 | 0,015 | 0,0925 |
| 2 | 1,11 | 9:1 | 0,115 | 0,200 | 0,010 | 0,1380 |
| 3 | 1,25 | 8:1 | 0,100 | 0,175 | 0,010 | 0,1200 |
| 4 | 1,42 | 7:1 | 0,120 | 0,230 | 0,015 | 0,1625 |
| 5 | 1,66 | 6:1 | 0,130 | 0,225 | 0,030 | 0,1500 |
| 6 | 2,00 | 5:1 | 0,140 | 0,250 | 0,025 | 0,1675 |
| 7 | 2,50 | 4:1 | 0,170 | 0,270 | 0,040 | 0,1650 |
| 8 | 3,33 | 3:1 | 0,175 | 0,295 | 0,010 | 0,2025 |
| 9 | 5,00 | 2:1 | 0,190 | 0,310 | 0,010 | 0,2100 |
| 10 | 10,00 | 1:1 | 0,190 | 0,345 | 0,025 | 0,2375 |
| 11 | 20,00 | 1:2 | 0,210 | 0,365 | 0,030 | 0,2450 |
| 12 | 30,00 | 1:3 | 0,170 | 0,300 | 0,010 | 0,2100 |
| 13 | 40,00 | 1:4 | 0,210 | 0,370 | 0,030 | 0,2500 |
| 14 | 50,00 | 1:5 | 0,250 | 0,410 | 0,030 | 0,2400 |
| 15 | 60,00 | 1:6 | 0,210 | 0,360 | 0,030 | 0,2700 |
| 16 | 70,00 | 1:7 | 0,275 | 0,430 | 0,035 | 0,2750 |
| 17 | 80,00 | 1:8 | 0,225 | 0,410 | 0,035 | 0,2800 |
| 18 | 90,00 | 1:9 | 0,180 | 0,310 | 0,010 | 0,2150 |
| 19 | 100,00 | 1:10 | 0,170 | 0,310 | 0,010 | 0,2200 |

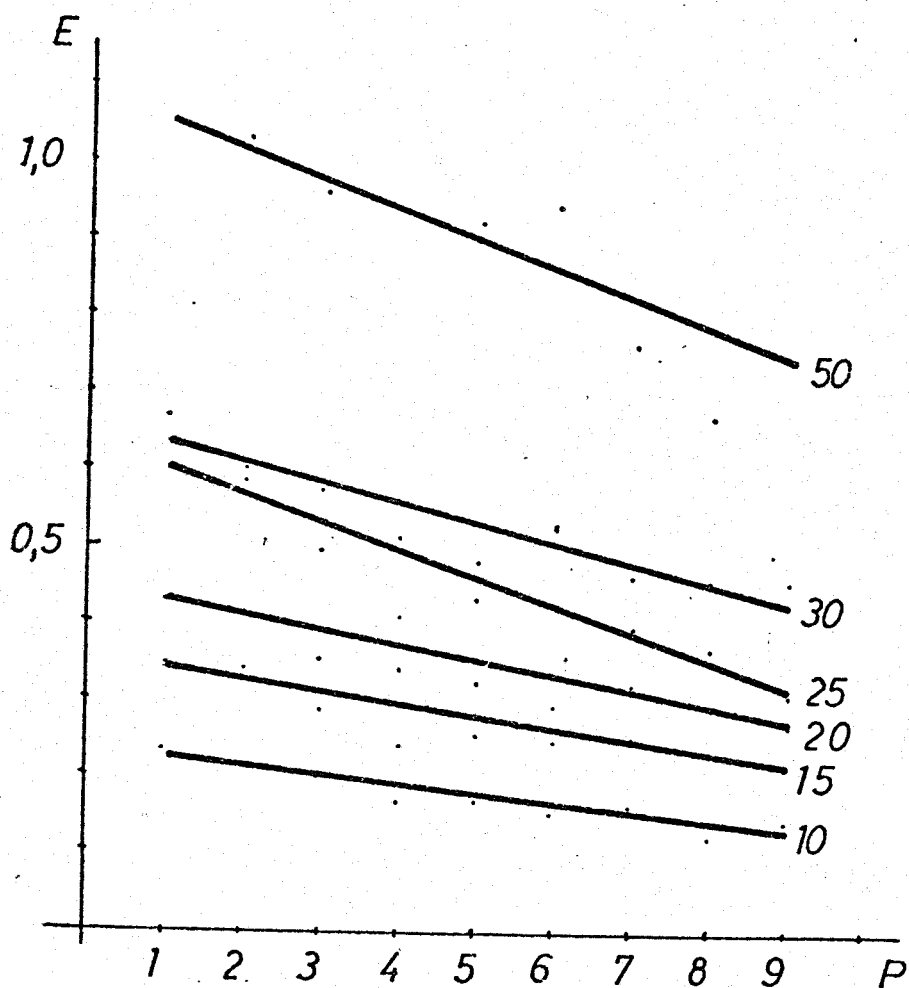


Figura 7. Representación gráfica de los resultados expuestos en las Tablas XVIII a XXIII. P , representa las proporciones entre las concentraciones de AIA y AIL. Se han seleccionado los valores correspondientes a valores de P mayores que 1.

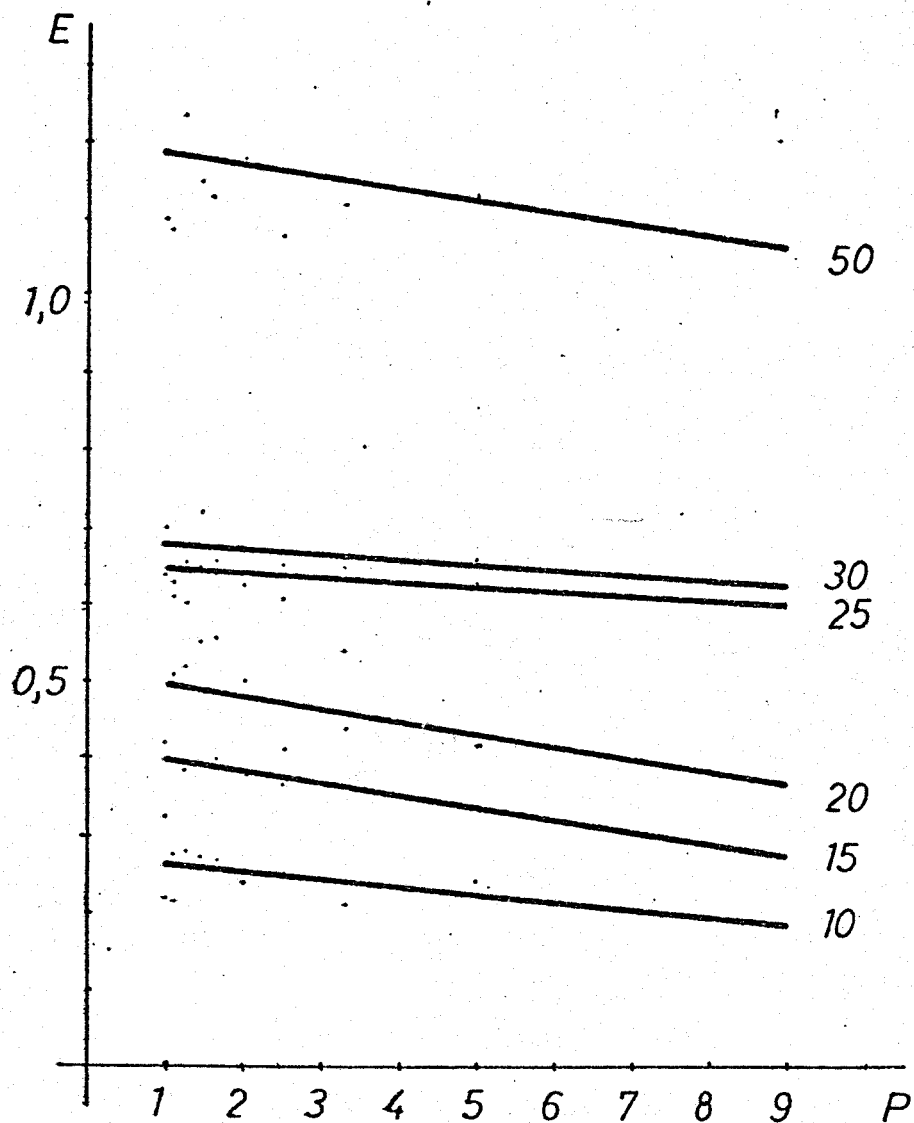


Figura 8.- Representación gráfica de los resultados expuestos en las Tablas XVIII a XXIII. P representa las proporciones, multiplicadas por 10, entre las concentraciones de AIA y AIL. Se han seleccionado los datos correspondientes a valores de P menores que 1.

Tabla XXIV.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de AIL y cantidades variables de AIA, expresadas en $\mu\text{g}/\text{ml}$.

| <u>Muestra</u> | <u>/AIA/</u> | <u>Proporciones</u> | <u>A-480</u> | <u>A-530</u> | <u>A-580</u> | <u>E</u> |
|----------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| 1 | 5 | 0,1 | 0,160 | 0,245 | 0,020 | 0,1550 |
| 2 | 10 | 0,2 | 0,200 | 0,335 | 0,020 | 0,2250 |
| 3 | 15 | 0,3 | 0,300 | 0,530 | 0,040 | 0,3600 |
| 4 | 20 | 0,4 | 0,380 | 0,670 | 0,055 | 0,4525 |
| 5 | 25 | 0,5 | 0,440 | 0,800 | 0,050 | 0,5550 |
| 6 | 30 | 0,6 | 0,550 | 1,000 | 0,070 | 0,6900 |
| 7 | 35 | 0,7 | 0,590 | 1,100 | 0,080 | 0,7650 |
| 8 | 40 | 0,8 | 0,650 | 1,300 | 0,080 | 0,9350 |
| 9 | 45 | 0,9 | 0,700 | 1,450 | 0,095 | 1,0525 |
| 10 | 50 | 1,0 | 0,720 | 1,500 | 0,100 | 1,0900 |

Tabla XXV.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (40 $\mu\text{g/ml}$) de AIL y cantidades variables de AIA, expresadas en $\mu\text{g/ml}$, también.

| Muestra | /AIA/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 4 | 0,1 | 0,130 | 0,200 | 0,020 | 0,1250 |
| 2 | 8 | 0,2 | 0,165 | 0,275 | 0,020 | 0,1825 |
| 3 | 12 | 0,3 | 0,220 | 0,400 | 0,025 | 0,2775 |
| 4 | 16 | 0,4 | 0,300 | 0,520 | 0,035 | 0,3525 |
| 5 | 20 | 0,5 | 0,360 | 0,660 | 0,040 | 0,4600 |
| 6 | 24 | 0,6 | 0,420 | 0,770 | 0,050 | 0,5350 |
| 7 | 28 | 0,7 | 0,480 | 0,875 | 0,055 | 0,6075 |
| 8 | 32 | 0,8 | 0,540 | 1,000 | 0,070 | 0,6950 |
| 9 | 36 | 0,9 | 0,550 | 1,050 | 0,080 | 0,7350 |
| 10 | 40 | 1,0 | 0,660 | 1,300 | 0,090 | 0,9250 |

Tabla XXVI.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (30 $\mu\text{g/ml}$) de AIL y cantidades variables de AIA, expresadas, de igual modo, en $\mu\text{g/ml}$.

| Muestra | /AIA/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 3 | 0,1 | 0,090 | 0,150 | 0,010 | 0,1000 |
| 2 | 6 | 0,2 | 0,140 | 0,230 | 0,020 | 0,1500 |
| 3 | 9 | 0,3 | 0,190 | 0,340 | 0,020 | 0,2350 |
| 4 | 12 | 0,4 | 0,230 | 0,420 | 0,025 | 0,2925 |
| 5 | 15 | 0,5 | 0,270 | 0,500 | 0,030 | 0,3500 |
| 6 | 18 | 0,6 | 0,310 | 0,580 | 0,030 | 0,4100 |
| 7 | 21 | 0,7 | 0,370 | 0,680 | 0,040 | 0,4750 |
| 8 | 24 | 0,8 | 0,410 | 0,750 | 0,050 | 0,5200 |
| 9 | 27 | 0,9 | 0,480 | 0,900 | 0,065 | 0,6275 |
| 10 | 30 | 1,0 | 0,500 | 0,950 | 0,065 | 0,6675 |

Tabla XXVII.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (20 $\mu\text{g/ml}$) de AIL y cantidades variables de AIA, expresadas en $\mu\text{g/ml}$.

| <u>Muestra</u> | <u>/AIA/</u> | <u>Proporciones</u> | <u>A-480</u> | <u>A-530</u> | <u>A-580</u> | <u>E</u> |
|----------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| 1 | 2 | 0,1 | 0,065 | 0,105 | 0,010 | 0,0685 |
| 2 | 4 | 0,2 | 0,085 | 0,1475 | 0,015 | 0,0975 |
| 3 | 6 | 0,3 | 0,120 | 0,210 | 0,020 | 0,1400 |
| 4 | 8 | 0,4 | 0,145 | 0,260 | 0,020 | 0,1775 |
| 5 | 10 | 0,5 | 0,180 | 0,335 | 0,015 | 0,2375 |
| 6 | 12 | 0,6 | 0,215 | 0,400 | 0,015 | 0,2850 |
| 7 | 14 | 0,7 | 0,250 | 0,460 | 0,025 | 0,3225 |
| 8 | 16 | 0,8 | 0,290 | 0,540 | 0,030 | 0,3800 |
| 9 | 18 | 0,9 | 0,300 | 0,550 | 0,040 | 0,3800 |
| 10 | 20 | 1,0 | 0,330 | 0,620 | 0,045 | 0,4325 |

Tabla XXVIII.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (10 $\mu\text{g/ml}$) de AII, y cantidades variables de AIA, expresadas en $\mu\text{g/ml}$.

| Muestra | /AIA/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 1 | 0,1 | 0,030 | 0,050 | 0,000 | 0,0350 |
| 2 | 2 | 0,2 | 0,045 | 0,070 | 0,010 | 0,0425 |
| 3 | 3 | 0,3 | 0,065 | 0,110 | 0,010 | 0,0725 |
| 4 | 4 | 0,4 | 0,080 | 0,140 | 0,005 | 0,0975 |
| 5 | 5 | 0,5 | 0,080 | 0,155 | 0,005 | 0,1125 |
| 6 | 6 | 0,6 | 0,100 | 0,195 | 0,005 | 0,1425 |
| 7 | 7 | 0,7 | 0,120 | 0,220 | 0,010 | 0,1550 |
| 8 | 8 | 0,8 | 0,140 | 0,260 | 0,018 | 0,1825 |
| 9 | 9 | 0,9 | 0,155 | 0,280 | 0,020 | 0,1925 |
| 10 | 10 | 1,0 | 0,190 | 0,355 | 0,025 | 0,2475 |
| 11 | 30 | 3,0 | 0,350 | 0,650 | 0,060 | 0,4450 |
| 12 | 50 | 5,0 | 0,520 | 0,920 | 0,085 | 0,6175 |

Tabla XIX.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (5 $\mu\text{g/ml}$) de AIL y cantidades variables de AIA, expresadas en $\mu\text{g/ml}$:

| Muestra | /AIA/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|--------------|-------|--------|-------|--------|
| 1 | 0,5 | 0,1 | 0,015 | 0,025 | 0,000 | 0,0175 |
| 2 | 1,0 | 0,2 | 0,025 | 0,035 | 0,005 | 0,0200 |
| 3 | 1,5 | 0,3 | 0,035 | 0,060 | 0,005 | 0,0400 |
| 4 | 2,0 | 0,4 | 0,040 | 0,075 | 0,005 | 0,0525 |
| 5 | 2,5 | 0,5 | 0,055 | 0,100 | 0,000 | 0,0725 |
| 6 | 3,0 | 0,6 | 0,055 | 0,100 | 0,000 | 0,0725 |
| 7 | 3,5 | 0,7 | 0,060 | 0,110 | 0,005 | 0,0775 |
| 8 | 4,0 | 0,8 | 0,080 | 0,1475 | 0,010 | 0,1025 |
| 9 | 4,5 | 0,9 | 0,080 | 0,1500 | 0,005 | 0,1075 |
| 10 | 5,0 | 1,0 | 0,090 | 0,155 | 0,010 | 0,1050 |
| 11 | 15,0 | 3,0 | 0,180 | 0,320 | 0,025 | 0,2175 |
| 12 | 25,0 | 5,0 | 0,270 | 0,480 | 0,050 | 0,3200 |
| 14 | 40,0 | 8,0 | 0,400 | 0,700 | 0,065 | 0,4675 |

Tabla XXX.- Valores de absorción obtenidos al aplicar la técnica de Salkowski a soluciones que contienen una cantidad fija (1 $\mu\text{g/ml}$) de AIL y cantidades variables de AIA, expresadas, de igual modo, en $\mu\text{g/ml}$.

| Muestra | /AIA/ | Proporciones | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|--------------|--------|-------|--------|---------|
| 1 | 0,1 | 0,1 | 0,005 | 0,005 | 0,000 | 0,0025 |
| 2 | 0,2 | 0,2 | 0,002 | 0,005 | 0,000 | 0,0040 |
| 3 | 0,3 | 0,3 | 0,005 | 0,010 | 0,000 | 0,0075 |
| 4 | 0,4 | 0,4 | 0,005 | 0,010 | 0,000 | 0,0075 |
| 5 | 0,5 | 0,5 | 0,005 | 0,010 | 0,000 | 0,0075 |
| 6 | 0,6 | 0,6 | 0,005 | 0,015 | 0,000 | 0,0125 |
| 7 | 0,7 | 0,7 | 0,0075 | 0,015 | 0,000 | 0,01175 |
| 8 | 0,8 | 0,8 | 0,010 | 0,025 | 0,000 | 0,015 |
| 9 | 0,9 | 0,9 | 0,0175 | 0,030 | 0,000 | 0,02125 |
| 10 | 1,0 | 1,0 | 0,020 | 0,035 | 0,000 | 0,02500 |
| 11 | 3,0 | 3,0 | 0,040 | 0,070 | 0,0075 | 0,04625 |
| 12 | 5,0 | 5,0 | 0,075 | 0,110 | 0,025 | 0,0600 |
| 13 | 8,0 | 8,0 | 0,090 | 0,160 | 0,025 | 0,1025 |

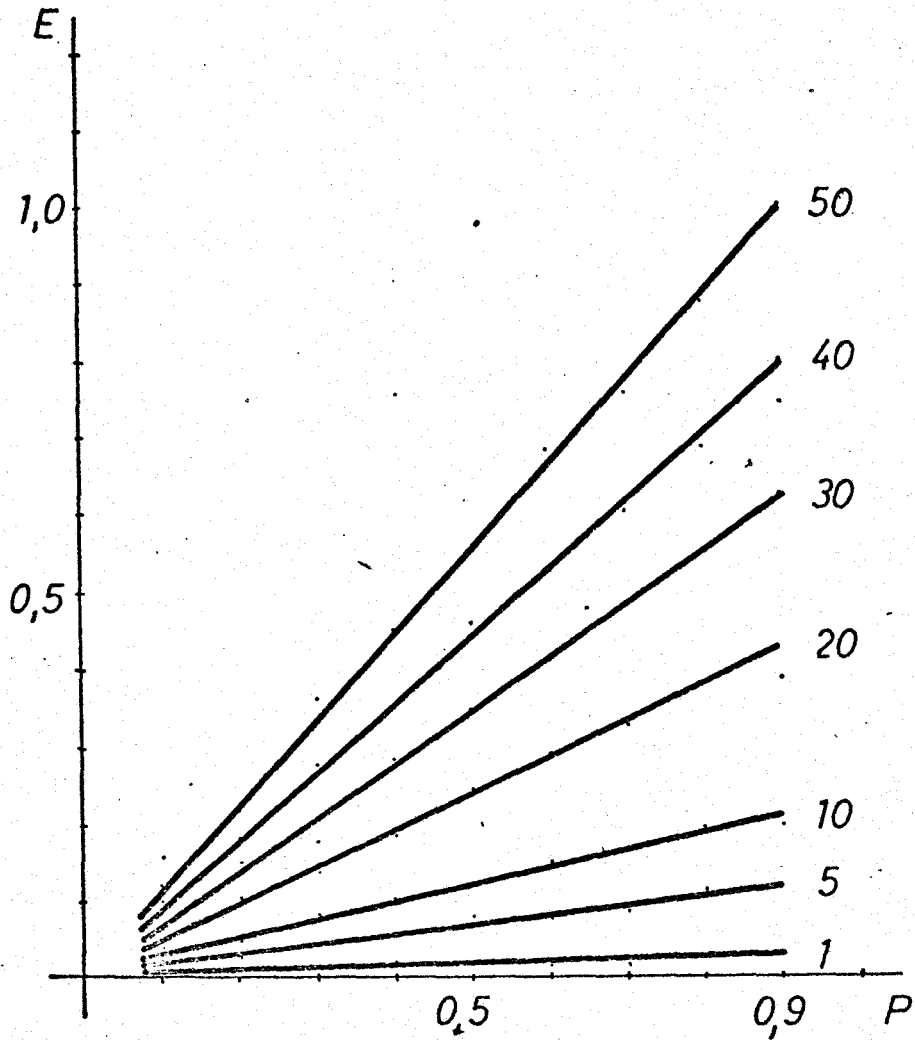


Figura 9.- Representación gráfica de los valores expuestos en las Tablas XXIV a XXX. Los números de la derecha indican los valores de AIL a que corresponden las reatas. P representa las proporciones entre las concentraciones de AIA y AIL.

Como puede apreciarse en la Figura 3, los valores obtenidos cuando la concentración de AIL permanece constante, determinan siete líneas rectas, cada una de las cuales corresponde a una determinada concentración de esta sustancia.

Estas líneas rectas carecen todas de ordenada en el origen, resultado que era de esperar, dado que el origen de coordenadas corresponde a la proporción 0, es decir, al AIL puro, y ya hemos visto que este compuesto da reacción negativa con el reactivo de Salkowski (Tablas XI y XVII).

Así pues, todas estas rectas tienen una ecuación general idéntica, que viene dada por la expresión:

$$E = a \cdot P$$

donde,

E es el valor de absorción obtenida por la técnica de Salkowski

a es la pendiente de las rectas, y

P es la proporción existente entre las concentraciones de AIA y AIL de las muestras.

Dicha expresión también puede ser escrita así:

$$E = a \frac{x}{y} \quad , \text{ donde}$$

x es la concentración de AIA, e

y , la concentración de AIL en las muestras sometidas al análisis.

A fin de determinar con exactitud las pendientes de cada una de las rectas, aplicamos el método de los mínimos cuadrados y se obtuvieron los valores que se exponen en las Tablas XXXI a XXXVII.

Tabla XXXI.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una concentración de 50 µg/ml de AIL y distintas proporciones de AIA

| P | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|------|--------|-------------------|-------------------|----------|----------------|
| 0,1 | 0,1550 | - 0,450 | - 0,4730 | 0,212850 | 0,2025 |
| 0,2 | 0,2250 | - 0,350 | - 0,4030 | 0,141050 | 0,1225 |
| 0,3 | 0,3600 | - 0,250 | - 0,2680 | 0,067000 | 0,0625 |
| 0,4 | 0,4525 | - 0,150 | - 0,1755 | 0,026325 | 0,0225 |
| 0,5 | 0,5550 | - 0,050 | - 0,0730 | 0,003650 | 0,0025 |
| 0,6 | 0,6900 | - 0,050 | 0,0620 | 0,003100 | 0,0025 |
| 0,7 | 0,7650 | 0,150 | 0,1370 | 0,020550 | 0,0225 |
| 0,8 | 0,9350 | 0,250 | 0,2070 | 0,076750 | 0,0625 |
| 0,9 | 1,0525 | 0,350 | 0,4245 | 0,148575 | 0,1225 |
| 1,0 | 1,0900 | 0,450 | 0,4620 | 0,207900 | 0,2025 |
| 5,5 | 6,2800 | 0,000 | 0,0000 | 0,907750 | 0,8250 |
| 0,55 | 0,6280 | 0,000 | 0,0000 | 0,090775 | 0,0825 |

$$a_1 = \frac{0,0907750}{0,0825} = 1,1003$$

Table XXXII.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una concentración de 40 µg/ml de AIL y distintas proporciones de AIA.

| P | E | $X = P - \bar{P}$ | $Y = E - \bar{E}$ | XY | X^2 |
|------|--------|-------------------|-------------------|-----------|--------|
| 0,1 | 0,1250 | - 0,450 | - 0,3645 | 0,1640250 | 0,2025 |
| 0,2 | 0,1825 | - 0,350 | - 0,3070 | 0,1074500 | 0,1225 |
| 0,3 | 0,2775 | - 0,250 | - 0,2120 | 0,0530000 | 0,0625 |
| 0,4 | 0,3525 | - 0,150 | - 0,1370 | 0,0205500 | 0,0225 |
| 0,5 | 0,4600 | - 0,050 | - 0,0295 | 0,0014750 | 0,0025 |
| 0,6 | 0,5350 | 0,050 | 0,0455 | 0,0022750 | 0,0025 |
| 0,7 | 0,6075 | 0,150 | 0,1180 | 0,0177000 | 0,0225 |
| 0,8 | 0,695 | 0,250 | 0,2055 | 0,0513750 | 0,0625 |
| 0,9 | 0,735 | 0,350 | 0,2455 | 0,0859250 | 0,1225 |
| 1,0 | 0,925 | 0,450 | 0,4355 | 0,1959750 | 0,2025 |
| 5,5 | 4,895 | 0,000 | 0,0000 | 0,6982750 | 0,8250 |
| 0,55 | 0,4895 | 0,000 | 0,0000 | 0,0698275 | 0,0825 |

$$a_2 = \frac{0,0698275}{0,0825} = 0,8463939$$

Tabla XXXIII.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una concentración de 30 µg/ml de AIL y distintas concentraciones de AIA.

| P | E | $X = P - \bar{P}$ | $Y = E - \bar{E}$ | XY | X^2 |
|------|---------|-------------------|-------------------|-----------|--------|
| 0,1 | 0,1000 | - 0,450 | - 0,28275 | 0,1272375 | 0,2025 |
| 0,2 | 0,1500 | - 0,350 | - 0,23275 | 0,0814625 | 0,1225 |
| 0,3 | 0,2350 | - 0,250 | - 0,14775 | 0,0369375 | 0,0625 |
| 0,4 | 0,2925 | - 0,150 | - 0,09025 | 0,0135375 | 0,0225 |
| 0,5 | 0,3500 | - 0,050 | - 0,03275 | 0,0016375 | 0,0025 |
| 0,6 | 0,4100 | 0,050 | 0,02725 | 0,0013625 | 0,0025 |
| 0,7 | 0,4750 | 0,150 | 0,09225 | 0,0021003 | 0,0225 |
| 0,8 | 0,5200 | 0,250 | 0,13725 | 0,0343125 | 0,0625 |
| 0,9 | 0,6275 | 0,350 | 0,24475 | 0,0856625 | 0,1225 |
| 1,0 | 0,6675 | 0,450 | 0,28475 | 0,1281375 | 0,2025 |
| 5,5 | 3,8275 | 0,000 | 0,00000 | 0,5123878 | 0,8250 |
| 0,55 | 0,38275 | 0,000 | 0,00000 | 0,0512387 | 0,0825 |

$$a_3 = \frac{0,05123878}{0,0825} = 0,6210751$$

Tabla XXXIV.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una concentración de 20 µg/ml de AIL y distintas concentraciones de AIA.

| P | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|------|--------|-------------------|-------------------|----------|----------------|
| 0,1 | 0,0685 | - 0,450 | - 0,1836 | 0,082620 | 0,2025 |
| 0,2 | 0,0975 | - 0,350 | - 0,1546 | 0,054110 | 0,1225 |
| 0,3 | 0,1400 | - 0,250 | - 0,1121 | 0,028025 | 0,0625 |
| 0,4 | 0,1775 | - 0,150 | - 0,0746 | 0,011190 | 0,0225 |
| 0,5 | 0,2375 | - 0,050 | - 0,0146 | 0,000730 | 0,0025 |
| 0,6 | 0,2850 | 0,050 | 0,0329 | 0,001645 | 0,0025 |
| 0,7 | 0,3225 | 0,150 | 0,0704 | 0,010560 | 0,0225 |
| 0,8 | 0,3800 | 0,250 | 0,1279 | 0,031975 | 0,0625 |
| 0,9 | 0,3800 | 0,350 | 0,1279 | 0,044765 | 0,1225 |
| 1,0 | 0,4325 | 0,450 | 0,1804 | 0,081180 | 0,2025 |
| 5,5 | 2,5210 | 0,000 | 0,0000 | 0,346800 | 0,8250 |
| 0,55 | 0,2521 | 0,000 | 0,0000 | 0,034680 | 0,0825 |

$$a = \frac{0,0346800}{0,0825} = 0,4203636$$

Tabla XXXV.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de AIL y distintas concentraciones de AIA.

| P | E | $X = P - \bar{P}$ | $Y = E - \bar{E}$ | XY | X^2 |
|------|--------|-------------------|-------------------|----------|--------|
| 0,1 | 0,0350 | - 0,450 | - 0,09300 | 0,041850 | 0,2025 |
| 0,2 | 0,0425 | - 0,350 | - 0,08550 | 0,029925 | 0,1225 |
| 0,3 | 0,0725 | - 0,250 | - 0,05550 | 0,013875 | 0,0625 |
| 0,4 | 0,0975 | - 0,150 | - 0,03050 | 0,004575 | 0,0225 |
| 0,5 | 0,1125 | - 0,050 | - 0,01550 | 0,000775 | 0,0025 |
| 0,6 | 0,1425 | - 0,050 | 0,01450 | 0,000725 | 0,0025 |
| 0,7 | 0,1550 | 0,150 | 0,02700 | 0,004050 | 0,0225 |
| 0,8 | 0,1825 | 0,250 | 0,05450 | 0,013625 | 0,0625 |
| 0,9 | 0,1925 | 0,350 | 0,06450 | 0,022575 | 0,1225 |
| 1,0 | 0,2475 | 0,450 | 0,11950 | 0,053775 | 0,2025 |
| 5,5 | 1,2800 | 0,000 | 0,00000 | 0,185750 | 0,8250 |
| 0,55 | 0,1280 | 0,000 | 0,00000 | 0,018575 | 0,0825 |

$$a_5 = \frac{0,0185750}{0,0825} = 0,2251515$$

Tabla XXXVI.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una concentración de 5 ug/ml de AIL y concentraciones variables de AIA.

| P | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|------|---------|-------------------|-------------------|-----------|----------------|
| 0,1 | 0,0175 | - 0,450 | - 0,04925 | 0,0221625 | 0,2025 |
| 0,2 | 0,0200 | - 0,350 | - 0,04675 | 0,0163625 | 0,1225 |
| 0,3 | 0,0400 | - 0,250 | - 0,02675 | 0,0066875 | 0,0625 |
| 0,4 | 0,0525 | - 0,150 | - 0,01425 | 0,0021375 | 0,0225 |
| 0,5 | 0,0725 | - 0,050 | 0,00575 | 0,0002875 | 0,0025 |
| 0,6 | 0,0725 | 0,050 | 0,00575 | 0,0002875 | 0,0025 |
| 0,7 | 0,0775 | 0,150 | 0,01075 | 0,0016125 | 0,0225 |
| 0,8 | 0,1025 | 0,250 | 0,03575 | 0,0089375 | 0,0625 |
| 0,9 | 0,1075 | 0,350 | 0,04075 | 0,0142625 | 0,1225 |
| 1,0 | 0,1050 | 0,450 | 0,03825 | 0,0172125 | 0,2025 |
| 5,5 | 0,6675 | 0,000 | 0,00000 | 0,0899500 | 0,8250 |
| 0,55 | 0,66675 | 0,000 | 0,00000 | 0,0089950 | 0,0825 |

$$a_6 = \frac{0,0089950}{0,0825} = 0,1090303$$

Tabla XXXVII.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una concentración de 1 ug/ml. de AIL y concentraciones variables de AIA.

| P | E | $X = P - \bar{P}$ | $Y = E - \bar{E}$ | XY | X^2 |
|------|---------|-------------------|-------------------|-----------|--------|
| 0,1 | 0,0025 | - 0,450 | - 0,00895 | 0,0038025 | 0,2025 |
| 0,2 | 0,0040 | - 0,350 | - 0,00745 | 0,0026075 | 0,1225 |
| 0,3 | 0,0075 | - 0,250 | - 0,00395 | 0,0009875 | 0,0625 |
| 0,4 | 0,0075 | - 0,150 | - 0,00395 | 0,0005925 | 0,0225 |
| 0,5 | 0,0075 | - 0,050 | - 0,00395 | 0,0001975 | 0,0025 |
| 0,6 | 0,0125 | - 0,050 | 0,00105 | 0,0000525 | 0,0025 |
| 0,7 | 0,01175 | 0,150 | 0,00030 | 0,0000450 | 0,0225 |
| 0,8 | 0,0150 | 0,250 | 0,00355 | 0,0008875 | 0,0625 |
| 0,9 | 0,02125 | 0,350 | 0,00980 | 0,0034300 | 0,1225 |
| 1,0 | 0,0250 | 0,450 | 0,01355 | 0,0060975 | 0,2025 |
| 5,5 | 0,1145 | 0,000 | 0,00000 | 0,0185222 | 0,8250 |
| 0,55 | 0,01145 | 0,000 | 0,00000 | 0,0018522 | 0,0825 |

$$a_7 = \frac{0,00185222}{0,0825} = 0,02245509$$

Comparando estas pendientes (Tabla XXXIII), pueden considerarse proporcionales a las concentraciones de ácido indol láctico en las muestras sometidas al análisis por la técnica de Balkowski.

Las ecuaciones de las rectas representadas en la Figura 9 también pueden ser escritas de la siguiente manera:

$$E = \frac{a}{y} x$$

o, lo que es lo mismo,

$$E = k \cdot x, \text{ donde,}$$

k es la constante de proporcionalidad entre las pendientes de dichas rectas y las concentraciones de AIL a que corresponden x es la concentración de AIA en dichas muestras.

De la última ecuación puede despejarse x, que vendría dada por la siguiente expresión:

$$x = \frac{1}{k} E$$

o bien,

$$x = K \cdot E$$

donde, K es la inversa de la constante de proporcionalidad entre las pendientes de las rectas y la concentración de AIL en las muestras.

Como puede verse en la misma Tabla, el valor medio de K es 46,198574.

Así pues, la concentración de AIA de una muestra en la que coexiste el AIL viene dada por la expresión:

Tabla XXXVIII.- Proporcionalidad existente entre las pendientes de las rectas de la Figura 3 y las concentraciones de AIL de las muestras a que corresponden dichas rectas.

| $y(1)$ | $a(2)$ | $a/Y = k$ | $y/a = K$ |
|--------|------------|------------|------------|
| 50 | 1,10030000 | 0,02200600 | 45,442152 |
| 40 | 0,84639390 | 0,02115980 | 47,259425 |
| 30 | 0,62107510 | 0,02070250 | 48,303345 |
| 20 | 0,42036360 | 0,02101810 | 47,578039 |
| 10 | 0,22515150 | 0,02251515 | 44,414637 |
| 5 | 0,10903030 | 0,02180600 | 45,858937 |
| 1 | 0,02245509 | 0,02245509 | 44,533511 |
| | | y/a | 323,390020 |
| | | | 46,198574 |

(1) Corresponde a las concentraciones de AIL en las muestras

(2) Corresponde a las pendientes de las rectas

$$x = 46,198574 \cdot E$$

siendo E el valor de densidad óptica obtenido al aplicar a tal muestra la técnica de Salkowski.

Resulta lógico pensar que cuando las muestras son de AIA puro, es decir, cuando en ellas no hay AIL, la anterior expresión no es válida, ya que la proporción y/a valdría cero, por ser nulo el numerador, es decir, la concentración de AIL en las muestras.

Por otra parte, tampoco sirve esta expresión para aquellas muestras en las que la proporción entre las concentraciones de AIA y AIL sea mayor que 1. En efecto, si reagrupamos los valores expuestos en las Tablas XXXI a XXXVIII, de forma que elaboramos otras Tablas (XXXIX a LVI), en las que se agrupan todas aquellas mezclas que llevan igual proporción AIA/AIL, pero con diferentes concentraciones absolutas de ambos, podemos obtener dos gráficas diferentes (Figura 10), una que corresponde a las mezclas en que la proporción AIA/AIL es mayor que 1, y otra en las que dicha proporción es menor o igual que 1.

Por ello, se hace necesario asegurar que en las muestras sometidas al análisis mediante la reacción de Salkowski haya siempre mayor concentración de AIL que de AIA.

Dado que, según se desprende de la bibliografía consultada (74), en los líquidos metabólicos de Rhizobium siempre se produce menos de 3 $\mu\text{g/ml}$ de AIA y que en el método de extracción que hemos adoptado se concentran los líquidos metabólicos 15 veces, nunca hay en las muestras sometidas al análisis más de 50 $\mu\text{g/ml}$ de AIA. Para asegurar que la proporción entre las concentraciones de los dos productos sea siempre menor o igual que 1, añadimos AIL a las muestras, sustituyendo el agua por

Tabla XXXIX.- Valores de absorción de distintas muestras de AIA y AIL mezclados en la proporción 9 : 1.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 1,11 | 0,115 | 0,200 | 0,010 | 0,1380 |
| 2 | 15 | 1,66 | 0,190 | 0,320 | 0,025 | 0,2130 |
| 3 | 20 | 2,22 | 0,220 | 0,390 | 0,030 | 0,2650 |
| 4 | 25 | 2,77 | 0,350 | 0,500 | 0,045 | 0,3070 |
| 5 | 30 | 3,33 | 0,400 | 0,680 | 0,055 | 0,4530 |
| 6 | 50 | 5,55 | 0,640 | 1,100 | 0,080 | 0,7400 |

Tabla XL.- Valores de absorción de distintas muestras de AIA y AIL mezclados en la proporción 8 : 1

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 1,25 | 0,100 | 0,175 | 0,010 | 0,1200 |
| 2 | 15 | 1,87 | 0,200 | 0,340 | 0,030 | 0,2250 |
| 3 | 20 | 2,14 | 0,240 | 0,425 | 0,030 | 0,2900 |
| 4 | 25 | 3,12 | 0,310 | 0,540 | 0,040 | 0,3650 |
| 5 | 30 | 3,75 | 0,380 | 0,660 | 0,050 | 0,4500 |
| 6 | 50 | 6,25 | 0,580 | 1,000 | 0,075 | 0,6750 |

Tabla XLI.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 7 : 1

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 1,42 | 0,120 | 0,230 | 0,015 | 0,1625 |
| 2 | 15 | 2,14 | 0,195 | 0,360 | 0,030 | 0,2425 |
| 3 | 20 | 2,85 | 0,250 | 0,460 | 0,035 | 0,3175 |
| 4 | 25 | 3,57 | 0,325 | 0,580 | 0,045 | 0,3950 |
| 5 | 30 | 4,28 | 0,390 | 0,690 | 0,055 | 0,4600 |
| 6 | 50 | 7,14 | 0,600 | 1,100 | 0,080 | 0,7600 |

Tabla XLII.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 6 : 1

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 1,66 | 0,130 | 0,225 | 0,020 | 0,1500 |
| 2 | 15 | 2,50 | 0,200 | 0,360 | 0,030 | 0,2450 |
| 3 | 20 | 3,33 | 0,225 | 0,420 | 0,030 | 0,2925 |
| 4 | 25 | 4,16 | 0,410 | 0,750 | 0,060 | 0,5150 |
| 5 | 30 | 5,00 | 0,405 | 0,750 | 0,055 | 0,5200 |
| 6 | 50 | 8,33 | 0,620 | 1,300 | 0,090 | 0,9450 |

Tabla XLIII.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 5 : 1.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 2,00 | 0,140 | 0,250 | 0,025 | 0,1675 |
| 2 | 15 | 3,00 | 0,205 | 0,380 | 0,035 | 0,2575 |
| 3 | 20 | 4,00 | 0,270 | 0,480 | 0,040 | 0,3250 |
| 4 | 25 | 5,00 | 0,350 | 0,630 | 0,050 | 0,4300 |
| 5 | 30 | 6,00 | 0,410 | 0,710 | 0,055 | 0,4775 |
| 6 | 50 | 10,00 | 0,660 | 1,300 | 0,090 | 0,9250 |

Tabla XLIV.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 4 : 1.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 2,50 | 0,170 | 0,270 | 0,040 | 0,1650 |
| 2 | 15 | 3,75 | 0,205 | 0,360 | 0,035 | 0,2400 |
| 3 | 20 | 5,00 | 0,290 | 0,500 | 0,040 | 0,3350 |
| 4 | 25 | 6,25 | 0,340 | 0,600 | 0,050 | 0,4050 |
| 5 | 30 | 7,50 | 0,420 | 0,750 | 0,060 | 0,5100 |
| 6 | 50 | 12,50 | 0,640 | 1,300 | 0,090 | 0,9350 |

Tabla XLV.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 3 : 1.

| <u>Muestra</u> | <u>/AIA/</u> | <u>/AIL/</u> | <u>A-480</u> | <u>A-530</u> | <u>A-580</u> | <u>E</u> |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| 1 | 10 | 3,33 | 0,175 | 0,295 | 0,010 | 0,2025 |
| 2 | 15 | 5,00 | 0,250 | 0,430 | 0,035 | 0,2875 |
| 3 | 20 | 6,66 | 0,320 | 0,520 | 0,030 | 0,3450 |
| 4 | 25 | 8,33 | 0,420 | 0,725 | 0,045 | 0,4925 |
| 5 | 30 | 10,00 | 0,480 | 0,840 | 0,055 | 0,5725 |
| 6 | 50 | 16,66 | 0,790 | 1,400 | 0,090 | 0,9600 |

Tabla XLVI.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 2 : 1.

| <u>Muestra</u> | <u>/AIA/</u> | <u>/AIL/</u> | <u>A-480</u> | <u>A-530</u> | <u>A-580</u> | <u>E</u> |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| 1 | 10 | 5,00 | 0,190 | 0,310 | 0,010 | 0,2100 |
| 2 | 15 | 7,50 | 0,290 | 0,500 | 0,035 | 0,3375 |
| 3 | 20 | 10,00 | 0,340 | 0,600 | 0,040 | 0,4200 |
| 4 | 25 | 12,50 | 0,470 | 0,840 | 0,040 | 0,5850 |
| 5 | 30 | 15,00 | 0,560 | 0,900 | 0,050 | 0,5950 |
| 6 | 50 | 25,00 | 0,860 | 1,500 | 0,090 | 1,0250 |

Tabla XLVII.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 1.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 10,00 | 0,190 | 0,310 | 0,025 | 0,2375 |
| 2 | 15 | 15,00 | 0,280 | 0,500 | 0,035 | 0,3425 |
| 3 | 20 | 20,00 | 0,330 | 0,620 | 0,050 | 0,4300 |
| 4 | 25 | 25,00 | 0,420 | 0,830 | 0,035 | 0,6025 |
| 5 | 30 | 30,00 | 0,500 | 0,950 | 0,070 | 0,6650 |
| 6 | 50 | 50,00 | 0,750 | 1,500 | 0,095 | 1,0775 |

Tabla XLVIII.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 2.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 20 | 0,210 | 0,365 | 0,030 | 0,2450 |
| 2 | 15 | 30 | 0,270 | 0,490 | 0,035 | 0,3425 |
| 3 | 20 | 40 | 0,320 | 0,600 | 0,040 | 0,4200 |
| 4 | 25 | 50 | 0,440 | 0,875 | 0,060 | 0,6250 |
| 5 | 30 | 60 | 0,520 | 0,950 | 0,070 | 0,6550 |
| 6 | 50 | 100 | 1,000 | 1,700 | 0,140 | 1,1300 |

Tabla XLIX.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 3.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 30 | 0,170 | 0,300 | 0,010 | 0,2100 |
| 2 | 15 | 45 | 0,290 | 0,520 | 0,030 | 0,3600 |
| 3 | 20 | 60 | 0,340 | 0,630 | 0,035 | 0,4425 |
| 4 | 25 | 75 | 0,410 | 0,850 | 0,050 | 0,6200 |
| 5 | 30 | 90 | 0,540 | 0,950 | 0,065 | 0,6475 |
| 6 | 50 | 150 | 0,850 | 1,600 | 0,100 | 1,1250 |

Tabla L.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 4.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 40 | 0,210 | 0,370 | 0,030 | 0,2500 |
| 2 | 15 | 60 | 0,330 | 0,560 | 0,060 | 0,3650 |
| 3 | 20 | 80 | 0,360 | 0,620 | 0,060 | 0,4100 |
| 4 | 25 | 100 | 0,560 | 0,925 | 0,070 | 0,6100 |
| 5 | 30 | 120 | 0,530 | 0,950 | 0,070 | 0,6500 |
| 6 | 50 | 200 | 0,850 | 1,550 | 0,110 | 1,0700 |

Tabla LI.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 5.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 50 | 0,250 | 0,410 | 0,030 | 0,2700 |
| 2 | 15 | 75 | 0,350 | 0,570 | 0,040 | 0,3750 |
| 3 | 20 | 100 | 0,450 | 0,750 | 0,050 | 0,5000 |
| 4 | 25 | 125 | 0,570 | 0,950 | 0,080 | 0,6250 |
| 5 | 30 | 150 | 0,680 | 1,050 | 0,080 | 0,6700 |
| 6 | 50 | 250 | 1,000 | 1,750 | 0,130 | 1,1850 |

Tabla LII.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 6

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 60 | 0,210 | 0,360 | 0,030 | 0,2400 |
| 2 | 15 | 90 | 0,370 | 0,610 | 0,050 | 0,4000 |
| 3 | 20 | 120 | 0,510 | 0,840 | 0,060 | 0,5550 |
| 4 | 25 | 150 | 0,620 | 1,000 | 0,070 | 0,6550 |
| 5 | 30 | 180 | 0,625 | 1,000 | 0,085 | 0,6450 |
| 6 | 50 | 300 | 1,000 | 1,700 | 0,135 | 1,1325 |

Tabla LIII.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 7

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 70 | 0,275 | 0,430 | 0,035 | 0,2750 |
| 2 | 15 | 105 | 0,400 | 0,620 | 0,050 | 0,3950 |
| 3 | 20 | 140 | 0,530 | 0,850 | 0,065 | 0,5525 |
| 4 | 25 | 175 | 0,620 | 1,000 | 0,080 | 0,6500 |
| 5 | 30 | 210 | 0,660 | 1,100 | 0,100 | 0,7200 |
| 6 | 50 | 350 | 1,150 | 1,800 | 0,145 | 1,1525 |

Tabla LIV.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 8.

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 80 | 0,225 | 0,410 | 0,035 | 0,2800 |
| 2 | 15 | 120 | 0,400 | 0,610 | 0,050 | 0,3850 |
| 3 | 20 | 160 | 0,520 | 0,810 | 0,065 | 0,5175 |
| 4 | 25 | 200 | 0,600 | 1,000 | 0,090 | 0,6550 |
| 5 | 30 | 240 | 0,700 | 1,000 | 0,085 | 0,6075 |
| 6 | 50 | 400 | 1,350 | 2,000 | 0,160 | 1,2450 |

Tabla LV.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 9

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 90 | 0,180 | 0,310 | 0,010 | 0,2150 |
| 2 | 15 | 135 | 0,270 | 0,435 | 0,030 | 0,2850 |
| 3 | 20 | 180 | 0,520 | 0,800 | 0,060 | 0,5100 |
| 4 | 25 | 225 | 0,580 | 0,950 | 0,065 | 0,6275 |
| 5 | 30 | 270 | 0,700 | 1,000 | 0,080 | 0,6100 |
| 6 | 50 | 450 | 1,150 | 1,740 | 0,145 | 1,0925 |

Tabla LVI.- Valores de absorción de distintas mezclas de AIA y AIL en la proporción 1 : 10

| Muestra | /AIA/ | /AIL/ | A-480 | A-530 | A-580 | E |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 10 | 100 | 0,170 | 0,310 | 0,010 | 0,2200 |
| 2 | 15 | 150 | 0,325 | 0,500 | 0,030 | 0,3225 |
| 3 | 20 | 200 | 0,470 | 0,680 | 0,050 | 0,4200 |
| 4 | 25 | 250 | 0,650 | 1,000 | 0,070 | 0,6400 |
| 5 | 30 | 300 | 0,900 | 1,200 | 0,100 | 0,7000 |
| 6 | 50 | 500 | 0,750 | 1,500 | 0,095 | 1,0775 |

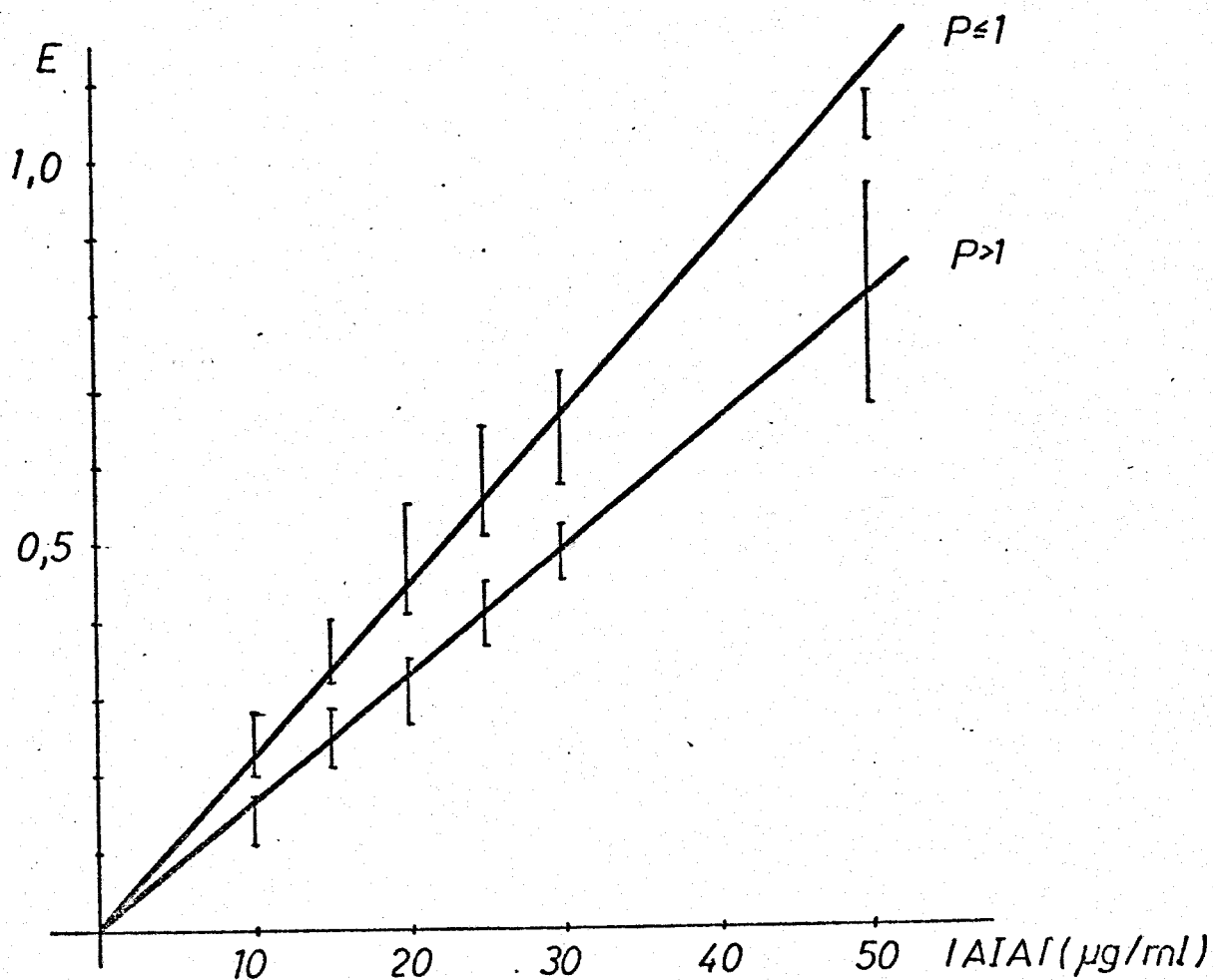


Figura 10.- Comparación de las rectas obtenidas al aplicar la técnica de Salkowski a muestras en que la proporción AIA/AII es mayor que 1 (recta inferior), o menor o igual que 1 (recta superior).

una solución acuosa de AIL de concentración 50 $\mu\text{g/ml}$.

De esta forma, el método de análisis de Salkowski quedaría modificado como se indica en el cuadro siguiente:

| | Blanco | Problema |
|---|--------|----------|
| Muestra problema (en alcohol) | - | 1 ml |
| Alcohol absoluto | 1 ml | - |
| Solución acuosa de AIL (50 $\mu\text{g/ml}$) | 1 ml | 1 ml |
| Reactivo de Salkowski | 3 ml | 3 ml |

Dado que, como demostraremos más adelante, este método da resultados satisfactorios, ha sido el adoptado por nosotros para hacer todas las mediciones de las concentraciones de ácido indol acético presente en los líquidos metabólicos.

Así, pues, la valoración de ácido indol acético en los líquidos metabólicos, realizada por el método de Salkowski, modificado por nosotros, puede verificarse mediante el empleo de la recta de calibrado que se representa en la Figura 11 y que ha sido confeccionada relacionando los valores de absorción con los correspondientes valores de concentración de ácido indol acético.

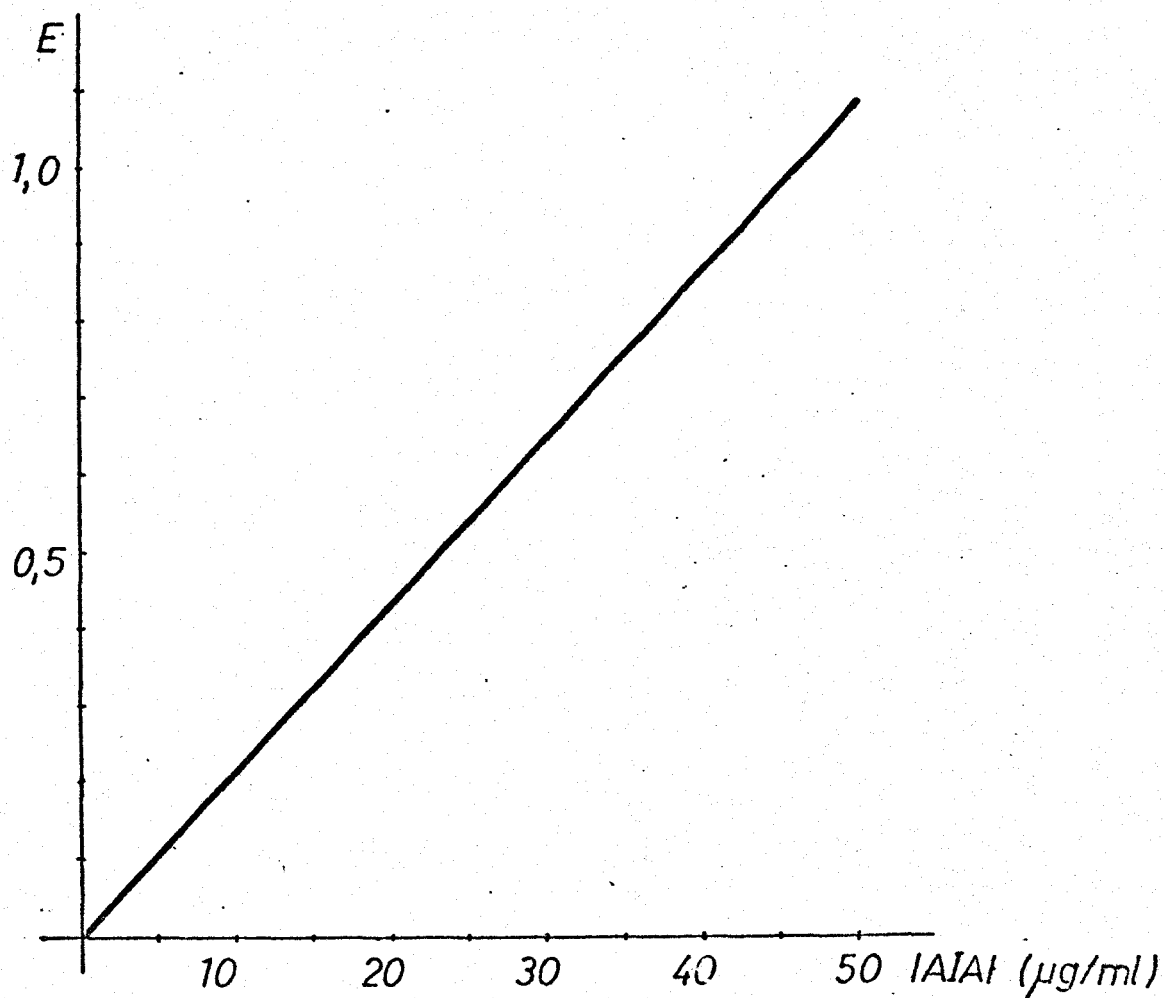


Figura 11.- Recta de calibrado para la valoración del ácido indol acético por el método de Salkowski, modificado por nosotros.

El hecho, demostrado por RIGAUD (71) de que los rizobios produzcan AIL juntamente con AIA nos indujo a pensar en un método para determinar también la cantidad de AIL producido. Pero, dado que el método de valoración que acabamos de describir no nos permite conocer este dato, tratamos de hacer una valoración enzimática del AIL. Para ello, partiendo de la base de que esta sustancia puede ser oxidada hasta ácido indol pirúvico por la láctico deshidrogenasa, preparamos unos experimentos consistentes en determinar si efectivamente el ácido indol láctico puede actuar de sustrato para este enzima, y encaminados a poner a punto un método de valoración del AIL.

Los resultados hasta ahora obtenidos en experimentos preliminares no nos permiten llegar a conclusiones claras en cuanto a las posibilidades de determinación cuantitativa del AIL, aunque podemos asegurar que esta sustancia sirve de sustrato a la enzima, si bien su K_M es muy alta en las condiciones en la que hemos ensayado. Quizás encontrando las condiciones óptimas de experimentación sería posible determinar no sólo la cantidad de AIL producido, sino también si éste es de la forma D, o L, o la mezcla de ambas, y, en este último caso, la proporción en que se encuentran.

3.2.- Descripción de las estirpes de Rhizobium aisladas de Tetragonolobus

De los nódulos radicales de las leguminosas del género *Tetragonolobus* se aislaron doce estirpes de *Rhizobium*, cuya designación y procedencia se indican en la Tabla LVII.

A continuación se exponen las características morfológicas y fisiológicas de cada una de ellas

3.2.1.- Estirpe TM - 1

Bacilos de 2,4 micras de largo por 0,6 micras de diámetro con extremos redondeados.

Cuando se cultivan en el medio YMA forma colonias circulares de 1,5 mm de diámetro, de elevación convexa, borde entero y muy mucilaginosas.

Las células son Gram negativas, acumulan poli-beta-hidroxibutirato y presentan cápsulas muy visibles por tinción negativa.

Tiene un contenido en guanina + citosina de 63,6 moles por ciento.

Como fuente de carbono puede utilizar la arabinosa, la manita y la galactosa, pero el crecimiento es óptimo cuando la fuente de carbono es la manita a una concentración del 1 por ciento.

El pH óptimo de crecimiento es 6 - 6,5, aunque crece a valores de pH comprendidos entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C y no se desarrolla ni a 4°C, ni a 37°C. La fase estacionaria de crecimiento se alcanza a las 96 horas de incubación.

Alcaliniza la leche tornasolada y produce una zona clara

de suero cuando se desarrolla sobre ella. Da los siguientes resultados frente a las pruebas bioquímicas:

Ureasa positivo; reduce los nitratos a nitritos; no hidroliza ni licúa la gelatina; no utiliza los citratos como única fuente de carbono; produce indol a partir de las peptonas; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; oxidasa negativo; catalasa, positivo; no produce amoniaco; tolera la salinidad de un 2% de ClNa en los medios de cultivo, pero no puede crecer a concentraciones superiores de esta sal en los medios de cultivo.

Produce nódulos en Tetragonolobus marítimum y en Trifolium repens.

3.2.2.- Estirpe TM - 2.- Bacilos de 3 micras de largo por 0,6 micras de diámetro, de extremos redondeados.

Cuando crecen en el medio YMA, lo hacen formando colonias circulares de 3 mm de diámetro, de elevación convexa y bordes enteros.

Las células son Gram negativas, acumulan granulaciones de poli-beta-hidroxibutirato, y presentan cápsulas muy visibles mediante tinción negativa.

Tiene un contenido en guanina y citosina de 61, 25 moles por ciento.

Pueden utilizar como fuente de carbono la manita, la arabinosa y la galactosa, sin que se aprecien diferencias en cuanto a la utilización de estas tres fuentes de carbono.

El pH óptimo de los cultivos para esta estirpe oscila entre 5,5 y 6,5, pero puede desarrollarse cuando los valores de pH de los medios de cultivo varía entre 4,5 y 8,5. La tempe-

Tabla LVII.- Denominación y procedencia de las estirpes
de Rhizobium aisladas de Tetragonolobus.

| Estirpe | Procedencia |
|---------|----------------------|
| TM - 1 | <u>T. maritimum</u> |
| TM - 2 | <u>T. maritimum</u> |
| TM - 3 | <u>T. maritimum</u> |
| TM - 4 | <u>T. maritimum</u> |
| TM - 5 | <u>T. maritimum</u> |
| TM - 6 | <u>T. maritimum</u> |
| TPA- 1 | <u>T. palestinum</u> |
| TPA- 2 | <u>T. palestinum</u> |
| TPA- 3 | <u>T. palestinum</u> |
| TPU- 1 | <u>T. purpureum</u> |
| TPU- 2 | <u>T. purpureum</u> |
| TPU- 3 | <u>T. purpureum</u> |

ratura óptima de crecimiento es 28°C y no se desarrolla ni a 4°C, ni a 37°C. La fase estacionaria de los cultivos se alcanza a las 96 horas de incubación.

Alcaliniza la leche tornasolada y produce una zona clara de suero; da las siguientes reacciones frente a las pruebas bioquímicas:

Ureasa, positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; no hidroliza la gelatina, ni tampoco la licua; no utiliza los citratos como única fuente de carbono; produce indol a partir de las peptonas; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer negativo; oxidasa, negativo; catalasa, positivo; no produce amoníaco y tolera una salinidad del 3% de ClNa en los medios de cultivo.

Produce nódulos en Tetragonolobus maritimum y en Trifolium repens.

3.2.3.- Estirpe TM - 3

Bacilos de 2,4 micras de largo por 0,4 micras de diámetro con extremos redondeados, que se desarrollan produciendo colonias, que, a los tres días y sobre el medio YMA, son circulares, de 1,5 mm de diámetro, de elevación convexa, borde entero y muy mucilaginosas.

Las células son Gram negativas, presentan acumulaciones de poli-beta-hidroxi-butirato y tienen una cápsula muy visible mediante tinción negativa.

Como fuente de carbono pueden utilizar la manita, la galactosa y la arabinosa, aunque se aprecia un crecimiento ligeramente superior sobre esta última.

El pH óptimo de crecimiento es 6 - 6,5 y se desarrolla bien a pH comprendidos entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C, pero crece a 37°C, si bien a esta temperatura el crecimiento es menor; no crece a 4°C. La fase estacionaria de crecimiento se alcanza a los 96 horas de incubación.

Tienen un contenido de Guanina + Citosina de 62,46 moles por ciento.

Alcaliniza la leche tornasolada y produce una zona clara de suero. Frente a las pruebas bioquímicas da los siguientes resultados:

Ureasa positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos no hidroliza la gelatina y tampoco la licúa; no utiliza los citratos como única fuente de carbono; produce indol a partir de la peptona; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; oxidasa, negativo; catalasa, positivo; no produce amoníaco; tolera una salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo, pero no la correspondiente a un 3% de dicha sal.

Produce nódulos en Tetragonolobus marítimum y en Trifolium resupinatum.

3.2.4.- Estirpe TM - 4

Bacilos rectos de 2,8 micras por 0,6 micras de diámetro, que cuando se desarrollan sobre el medio YMA, producen colonias que, a los tres días son circulares de 2 mm de diámetro, de elevación convexa y bordes enteros.

Las células son Gram negativas, acumulan granulaciones de polibeta-hidroxibutirato y presentan una cápsula muy visible me

diante tinción negativa.

Tiene un contenido de guanina + citosina de 61,73 moles por ciento.

Puede utilizar la arabinosa, la manita y la galactosa como fuente de carbono, pero el crecimiento es mayor sobre esta última.

El pH óptimo de crecimiento es 6 - 6,5, pero se desarrolla bien en medios de cultivo, cuyos pH oscilen entre 4,0 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C y crece bien a 37°C; no se desarrolla a 4°C. La fase estacionaria de crecimiento se alcanza a las 108 horas de incubación.

Alcaliniza la leche tornasolada y produce en ella una zona clara de suero. Frente a las pruebas bioquímicas da las siguientes reacciones:

Ureasa, positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; ni hidroliza ni licúa la gelatina; no utiliza el citrato como única fuente de carbono; produce indol a partir de las peptonas; rojo de metilo, negativo; catalasa, positivo; oxidasa, negativo; no produce amoníaco; tolera una salinidad del 3 % de ClNa en los medios de cultivo.

Nodula en Tetragonolobus maritimum y en Trifolium repens.

3.2.5.- Estirpe TM - 5.

Bacilos de 1,5 micras de largo, por 0,8 micras de diámetro, de extremos redondeados, que, cuando se desarrollan en el medio YMA, producen colonias que, a los tres días de incubación, son circulares, de 3 mm de diámetro, elevación convexa y borde entero.

Las células son Gram negativas y presentan granulaciones intracitoplásmicas de poli-beta-hidroxibutirato, así como cápsulas visibles fácilmente mediante tinción negativa.

Utiliza como fuente de carbono la manita, la arabinosa y la galactosa, presentando mayor crecimiento sobre la primera de estas sustancias.

Tiene un contenido de guanina + citosina de 61,97 moles por ciento.

El pH óptimo de crecimiento es 6,5 - 7, pero se desarrolla bien en medios de cultivo, cuyos pH oscilen entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C, pero crece bien a 37°C.

Alcaliniza la leche tornasolada, produciendo en ella una zona clara de suero. Frente a las pruebas bioquímicas da las siguientes reacciones:

Ureasa, positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; no produce amoníaco; produce indol en los medios de peptona; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; oxidasa, negativo; catalasa, positivo.

Tolera una salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo, pero no la del 3% de dicha sal.

La fase estacionaria de crecimiento sobre medio YMA se alcanza a las 96 horas de incubación.

Nodula en Tetragonolobus maritimum y en Trifolium repens.

3.2.6.- Estirpe TM - 6

Bacilos de 2,4 micras de largo, por 0,7 micras de diámetro, con extremos redondeados, que, cuando crecen en el medio YMA producen colonias que, a los tres días de incubación, son circulares, de 3 mm de diámetro, elevación convexa y borde entero y son muy mucilaginosas.

Las células son Gram negativas, acumulan granulaciones de poli-beta-hidroxi-butirato y presentan una cápsula fácilmente visible mediante tinción negativa.

Tienen un contenido en guanina + citosina de 62,46 moles por ciento.

Como fuentes de carbono pueden utilizar las tres ensayadas, pero se obtiene un crecimiento superior sobre la manita.

El pH óptimo de cultivo es 6,0, pero se desarrollan bien en medios de cultivo, cuyos pH varíen entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C y no se desarrolla ni a 4°C, ni a 37°C. En el medio YMA la fase estacionaria de crecimiento se alcanza a las 108 horas.

Alcaliniza la leche tornasolada y produce en ella una zona clara de suero. Con las pruebas bioquímicas se obtienen los siguientes resultados:

Ureasa positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; ni hidroliza ni licúa la gelatina; no utiliza los citratos como única fuente de carbono; en los medios con peptona produce indol; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; oxidasa, negativo; catalasa, positivo; no producen amoníaco.

Toleran una salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo, pero no la de un 3% de dicha sal.

Nodula en Tetragonolobus maritimum y en Trifolium repens.

3.2.7.-Estirpe TPU - 1

Bacilos de 2,8 micras de largo, por 0,7 micras de diámetro que, cuando se desarrollan en el medio YMA, forma colonias que, a los tres días de incubación son circulares, de elevación convexa, bordes enteros y muy mucilaginosas. Tienen un diámetro de 2,5 mm.

Las células son Gram negativas y acumulan gránulos intracitoplásmicos de poli-beta-hidroxi-butilato y presentan una cápsula visible mediante tinción negativa.

Tienen un contenido en guanina + citosina de 63,44 moles por ciento.

Puede utilizar las tres fuentes de carbono ensayadas, pero se obtiene un mayor rendimiento cuando el medio contiene manita.

El pH óptimo de crecimiento es 6,0, pero crece bien cuando el pH de los medios de cultivo oscila entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C y no se desarrolla ni a 4°C ni a 37°C. La fase estacionaria de crecimiento sobre el medio YMA líquido se alcanza a las 108 horas de incubación.

Alcaliniza la leche tornasolada y produce en ella una zona clara de suero. Con las pruebas bioquímicas da los siguientes resultados:

Ureasa, positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; no produce amoníaco; ni hidroliza ni licúa la gelatina; no

utiliza el citrato como única fuente de carbono; cuando se desarrolla en medios de peptona, produce indol; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; oxidasa, negativo; catalasa, positivo.

Toleran la salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo, pero no la del 3% de esta sal.

Nodula en Tetragonolobus purpureum y en Trifolium repens.

3.2.8.- Estirpe TPU - 2

Bacilos rectos de 2,4 micras de largo, por 0,6 micras de diámetro, que, cuando crecen en el medio YMA, forman colonias que, a los tres días de incubación, son circulares, de 2,5 mm de diámetro, de elevación convexa y de bordes enteros, y que son muy mucilaginosas.

Las células son Gram negativas y presentan acumulaciones intracitoplásmicas de poli-beta-hidroxi-butirato, y una cápsula visible con facilidad mediante tinción negativa.

Como fuente de carbono puede utilizar la manita, la galactosa y la arabinosa, pero se obtiene un crecimiento ligeramente superior sobre el segundo de estos azúcares.

Tienen un contenido en guanina + citosina de 63,68 moles por ciento.

El pH óptimo de crecimiento es 6,5, pero crece a valores de pH que oscilan entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es de 28°C, aunque puede crecer a 37°C; no se aprecia crecimiento a 4°C. Cuando se desarrolla en el medio YMA, se alcanza la fase estacionaria de crecimiento a las 96 horas.

de incubación.

En leche tornasolada, además de alcalinizarla, produce una zona clara de suero. Frente a las pruebas bioquímicas da las siguientes reacciones:

Ureasa positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; no produce amoníaco; ni hidroliza ni licúa la gelatina; no utiliza los citratos como única fuente de carbono; producen indol en los medios peptonados; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; catalasa, positivo; oxidasa, negativo.

No toleran una salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo.

Produce nódulos en Tetragonolobus purpúream y en Trifolium fragiferum.

3.2.9.- Estirpe TPU - 3.-

Bacilos rectos de 2 micras de largo, por 0,5 micras de diámetro, de extremos redondeados, que, cuando crecen en el medio YMA, produce colonias que, a los tres días de incubación, son circulares, de 1,5 mm de diámetro, elevación convexa, borde entero y son muy mucilaginosas.

Las células son Gram negativas y acumulan granulaciones intracitoplásmicas de poli-beta-hidroxi-butirato; presentan, asimismo, una cápsula que se puede ver con facilidad mediante tinción negativa.

Tienen un contenido en guanina + citosina de 61,0 moles por ciento.

Como fuente de carbono puede utilizar la manita, la galactosa y la arabinosa, pero se obtienen mejores rendimientos cuando

do los medios de cultivo contienen el primero de estos hidratos de carbono.

El pH óptimo es 6,5, pero también se desarrollan en medios cuyos pH oscilan entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima es de 28°C, pero crecen también a 37°C. No se aprecia crecimiento a 4°C. Cuando crecen sobre el medio YMA líquido, la fase estacionaria de crecimiento se alcanza a las 96 horas de incubación.

Producen una zona de suero y alcalis cuando se desarrollan sobre la leche tornasolada. Da los siguientes resultados frente a las pruebas bioquímicas:

Ureasa, positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; no produce amoniacó; ni hidroliza ni licúa la gelatina; no utiliza el citrato como única fuente de carbono; no produce indol a partir de las peptonas; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; catalasa, positivo; oxidasa, negativo.

Toleran una salinidad del 2% de ClNa de los medios de cultivo, pero no la de un 3%.

Produce nódulos en Tetragonolobus purpúreum y en Trifolium repens.

3.2.10.- Estirpe TPA - 1

Bacilos rectos de 2,7 micras de largo, por 0,5 micras de diámetro, que, cuando crecen en el medio YMA, producen colonias que, a los tres días de incubación, son circulares de 2 mm de diámetro, de elevación convexa y borde entero, y son muy mucilaginosas.

Las células son Gram negativas y acumulan poli-beta-hidroxibutirato. Presentan una cápsula muy visible por tinción nega-

tiva.

Tienen un contenido en guanina + citosina de 62,46 moles por ciento.

Como fuentes de carbono pueden utilizar las tres ensayadas, pero se obtiene un mejor rendimiento sobre el primero de estos hidratos de carbono.

El pH óptimo de crecimiento es 5,5 - 6,0, aunque crecen bien cuando el pH de los cultivos oscila entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C, aunque crece bien a 37°C; no puede detertarse crecimiento a 4°C. Cuando se desarrollan en el medio YMA, se alcanza la fase estacionaria de crecimiento a las 96 horas.

Alcalinizan la leche tornasolada y producen en ella una zona clara de suero. Da los siguientes resultados frente a las pruebas bioquímicas:

Ureasa, positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; no produce amoniaco; ni hidroliza ni licúa la gelatina; no utiliza los nitratos como única fuente de carbono; produce indol a partir de la peptona; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; catalasa, positivo; oxidasa, negativo.

No toleran la salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo.

Produce nódulos en Tetragonolobus palestinum y en Trifolium resupinatum.

3.2.11.- Estirpe TPA - 2

Bacilos rectos de 2,5 micras de largo, por 0,7 micras de diámetro, con extremos redondeados, que, cuando crecen en el medio YMA forma colonias que, a los tres días de incubación, son circulares, de elevación convexa y bordes rectos, que miden 2,5 mm de diámetro y son muy mucilaginosas.

Las células son Gram negativas y acumulan gránulos de poli-beta-hidroxi-butilato; tienen cápsulas fácilmente visibles mediante tinción negativa.

Tienen un contenido de guanina + citosina de 64,9 moles por ciento.

El pH óptimo de los cultivos es 6,5, pero también se desarrollan con facilidad cuando los pH de los medios oscilan entre 4,5 y 8,5. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C aunque crecen a 37°C. No crecen a 4°C. Cuando se desarrollan en el medio YMA, se alcanza la fase estacionaria de crecimiento a las 96 horas de incubación.

Alcalinizan la leche tornasolada y producen en ella una zona clara de suero. Frente a las pruebas bioquímicas da las siguientes reacciones:

Ureasa, positivo; reduce los nitratos, pero no los nitritos; no producen amoníaco; ni hidrolizan ni licúan la gelatina; no utiliza el citrato como única fuente de carbono; producen indol a partir de la peptona; rojo de metilo, negativo; Voges-Proskauer, negativo; oxidasa, negativo; catalasa, positivo.

Toleran la salinidad de una concentración del 3% de ClNa en los medios de cultivo.

Nodula en Tetragonolobus palestinum y en Trifolium repens.

3.2.12.- Estirpe TPA - 3

Bacilos rectos de 2,5 micras de largo, por 0,6 micras de diámetro, de extremos redondeados, que, cuando crecen en el medio YMA, forman colonias blancas, circulares, de bordes enteros y elevación convexa, que, a los tres días de incubación, miden 1,5 mm de diámetro.

Las células son Gram negativas y en ellas se aprecian acumulaciones intracitoplásmicas de poli-beta-hidroxi-butilato. Tienen cápsulas y producen un abundante mucopolisacárido soluble en agua.

Tienen un contenido en guanina + citosina de 62,22 moles por ciento.

De las fuentes de carbono ensayadas, la que da mejor rendimiento es la manita, pero pueden desarrollarse bien sobre las otras dos.

El pH óptimo de los cultivos es 6,0 - 6,5, pero se pueden desarrollar en medios cuyos pH oscilen entre 4,5 y 8,0. La temperatura óptima de crecimiento es 28°C, y no crecen ni a 37°C, ni a 4°C. Cuando se desarrollan en el medio YMA se alcanza la fase estacionaria a las 96 horas de incubación.

Produce álcalis y una zona clara de suero cuando se desarrolla en leche tornasolada. Frente a las pruebas bioquímicas da los siguientes resultados:

Ureasa, positivo; no reduce los nitritos, pero sí los nitratos; no produce amoníaco; produce indol en los medios con peptona; no utilizan el citrato como única fuente de carbono; rojo de metilo, negativo; Voges Proskauer, negativo; catalasa, positivo; oxidasa, negativo.

Toleran la salinidad del 3% de ClNa en los medios de cul-

tivo.

Nodula en Tetragonolobus palestinum y en Trifolium repens

Si se comparan las descripciones que acabamos de exponer, puede verse que estas estirpes de Rhizobium aisladas de tres especies de Tetragonolobus son muy similares entre sí, con las excepciones siguientes: a) tolerancia a la salinidad en la que vemos que hay unas estirpes (TM-2, TM-4) que toleran el 3% de ClNa, otras (TM-1, TM-3, TM-5, Tm-6, TPU-1, TPU-3) que toleran el 2% y, las restantes que no toleran el 2% de ClNa en los medios de cultivo. b) Todas las estirpes producen indol, excepto TPU - 3, que no lo produce; solamente una crece a pH = 4,0 (la estirpe TM - 4); aunque la temperatura óptima de crecimiento es 28°C, ha siete (TM-3, TM-4, TM-5, TPU-2, TPU-3, TPA-1 y TPA-2) que pueden desarrollarse a 37°C, mientras que las restantes, no;

Todas las estirpes necesitaban para crecer biotina y tiamina y todas tienen contenidos en guanina + citosina muy próximos.

Con las pruebas de inoculación que hemos realizado, hemos elaborado la Tabla LVIII, en la que puede verse que estas estirpes, además de nodular en Tetragonolobus, lo pueden hacer también en Trifolium, mientras que no producen nódulos en el resto de las leguminosas ensayadas.

Tabla LVIII.- Resultados del test de nodulación realizado con las estirpes aisladas de Tetragonolobus (1)

| Estirpes | Trif. | Tetr. | Orn. | Pis. | Pha. | Gly. | Med. |
|----------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| TM-1 | + | + | - | - | - | - | - |
| TM-2 | + | + | - | - | - | - | - |
| TM-3 | + | + | - | - | - | - | - |
| TM-4 | + | + | - | - | - | - | - |
| TM-5 | + | + | - | - | - | - | - |
| TM-6 | + | + | - | - | - | - | - |
| TPU-1 | + | + | - | - | - | - | - |
| TPU-2 | + | + | - | - | - | - | - |
| TPU-3 | + | + | - | - | - | - | - |
| TPA-1 | + | + | - | - | - | - | - |
| TPA-2 | + | + | - | - | - | - | - |
| TPA-3 | + | + | - | - | - | - | - |

(1) Las plantas ensayadas son las que se enumeran en el apartado de material. En esta Tabla se designan por las abreviaturas de sus géneros.

3.3.- Producción de AIA por bacterias

3.3.1.- Técnica de extracción

Aunque en la parte de esta Memoria dedicada a Materiales y métodos exponemos la técnica de extracción de los productos indólicos a partir de líquidos metabólicos, en realidad, la elección de esta técnica, que es esencialmente la recomendada por RIGAUD, nos supuso un trabajo previo en el que comparamos la eficacia de otros métodos, recomendado por MOORE y SHANER (56), así como diversas modificaciones introducidas por nosotros.

En este estudio comparativo preliminar ensayamos los siete procedimientos diferentes que se exponen esquemáticamente en las páginas siguientes.

Con objeto de realizar un estudio crítico de estas técnicas, preparamos una disolución acuosa de los siguientes productos:

Triptófano
Acido indol acético
Acido indol butírico
Acido indol pirúvico
Acido indol propiónico
Indol

Como se puede apreciar, en la mezcla no había ácido indol láctico, para evitar las interferencias producidas por este compuesto en la valoración del AIA.

Esta mezcla fue sometida a los distintos procedimientos de extracción y a cada fracción obtenida se le hizo un análisis cromatográfico para determinar qué compuestos aparecían en ella, y fue sometida a la reacción de Salkowski, a fin de

PROCEDIMIENTO Num. 1
=====

17 ml de mezcla (pH=2.6)

↓
añadir 15 ml. de benceno

↓
agitar durante 5 minutos

↓
Fase acuosa

↘ Fase de benceno

↓
acidificar a pH=0 con ClH

↓
añadir 15 ml. de Cl_2CH_2

↓
agitar durante 5 minutos

↓
Fase de diclorometano

↘ Fase acuosa

PROCEDIMIENTO Núm 2

17 ml. de mezcla (pH=2,6)



añadir 1 ml. de ClH



añadir 15 ml. de Cl₂CH₂



agitar durante 5 minutos



Fase acuosa.

Fase de Cl₂CH₂

PROCEDIMIENTO Núm 3

17 ml. de mezcla.

↓
Añadir 15 ml. de benceno

↓
agitar durante 5 minutos

↘ Fase benceno

↓
Fase acuosa

↓
alcalinizar a pH=8.2

↓
añadir 15 ml. de Cl_2CH_2

↓
agitar durante 5 minutos

↘ Fase de Cl_2CH_2

↓
Fase acuosa

↓
acidificar a pH= 2.8

↓
añadir 15 ml. de Cl_2CH_2

↓
agitar durante 5 minutos

↘ Fase de Cl_2CH_2

↓
Fase acuosa

PROCEDIMIENTO Núm 4

17 ml. de mezcla (pH=2.6)

↓
alcalinizar a pH=8.2

↓
añadir 15 ml. de Cl_2CH_2

↓
agitar durante 5 minutos

↘ Fase de Cl_2CH_2

↓
Fase acuosa

↓
acidificar a pH=2.8

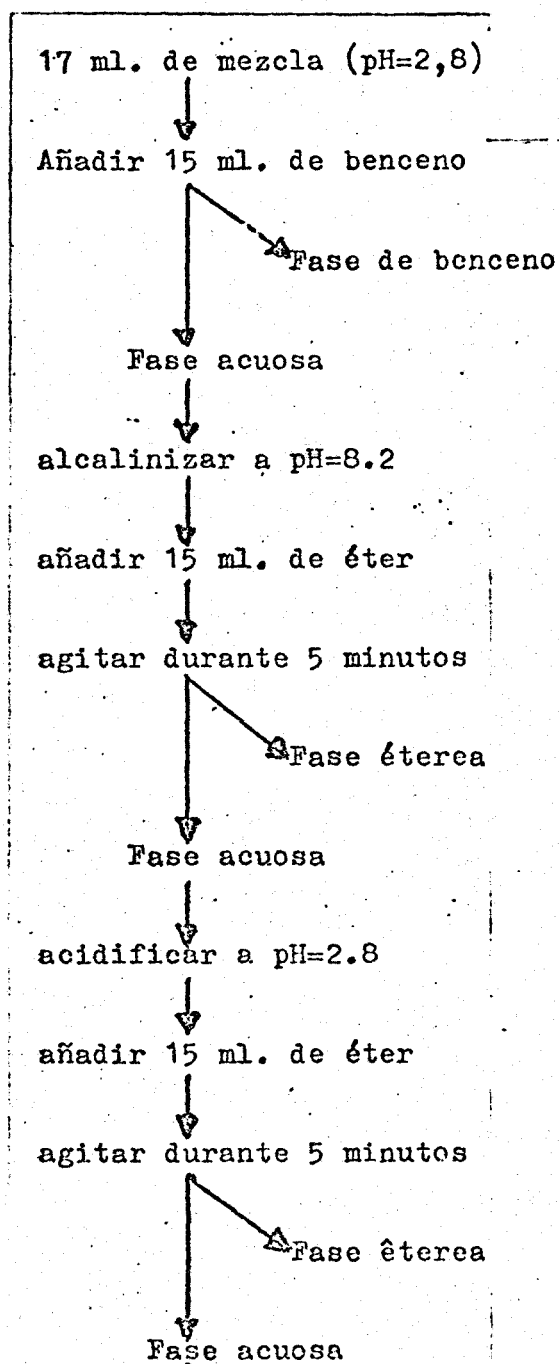
↓
añadir 15 ml. de Cl_2CH_2

↓
agitar durante 5 minutos

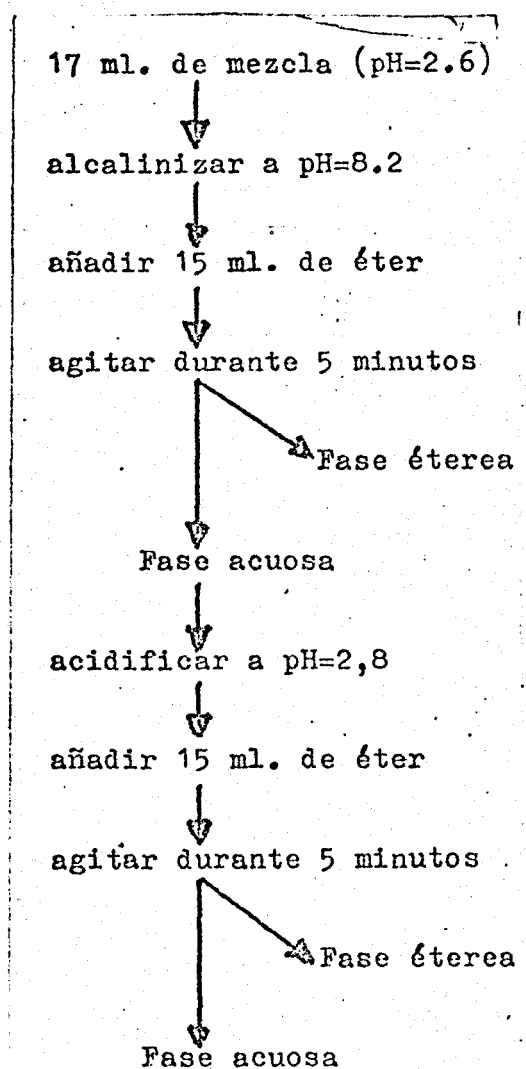
↘ Fase de Cl_2CH_2

↓
Fase acuosa

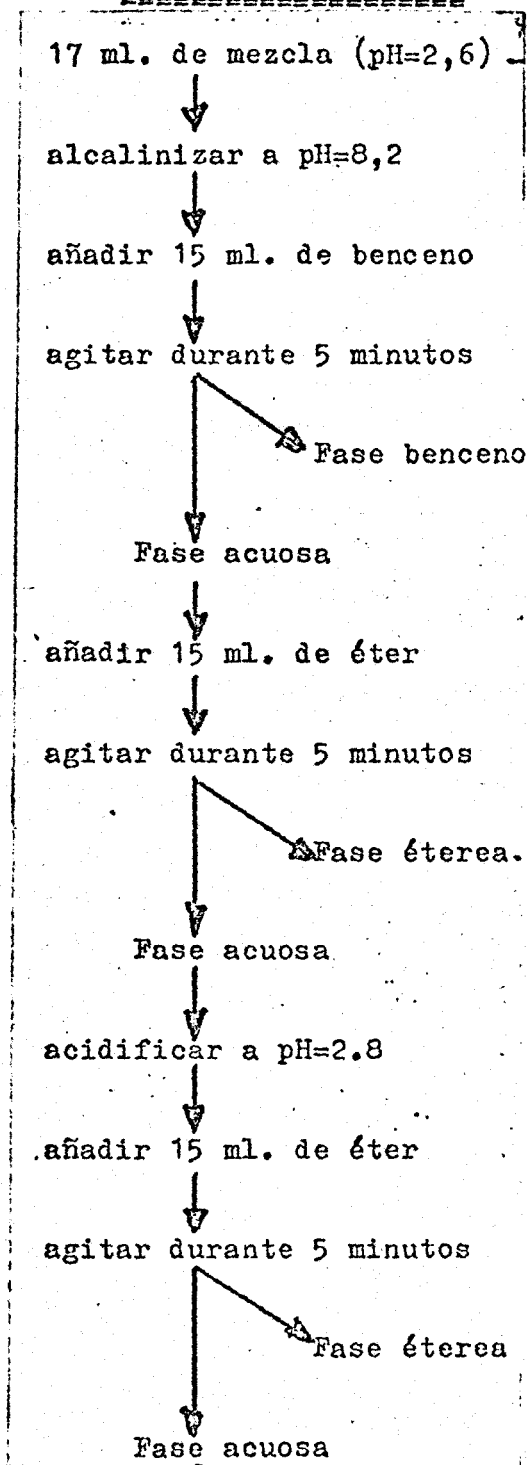
PROCEDIMIENTO Núm 5



PROCEDIMIENTO Núm 6



PROCEDIMIENTO Núm 7



determinar la fracción de AIA separada en cada una de ellas y, por tanto, el rendimiento de la técnica.

Los resultados se exponen en las Tablas LIX a LXV.

Comparando los rendimientos de cada una de las técnicas de extracción, puede comprobarse que la que da mejores resultados es la número seis, que coincide con la empleada por RIGAUD y, por tanto, fue la que nosotros adoptamos para hacer la separación del AIA de los líquidos metabólicos y es la que se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

3.3.2.- Evolución de la producción de AIA en los cultivos

A fin de comprobar en qué momento del cultivo se produce la máxima acumulación de AIA en los líquidos metabólicos, cultivamos una estirpe de Rhizobium trifolii en medio YMA suplementado con triptófano al 0,02 por ciento, en el que se fue siguiendo la evolución de la producción de AIA con el tiempo.

De los resultados de este experimento, expuestos en la Tabla LXVI y representados en la gráfica 12, puede deducirse que la máxima producción de AIA tiene lugar a los cuatro días de incubación, que, como hemos visto, coincide con el inicio de la fase de crecimiento estacionario de los cultivos de las estirpes de Rhizobium aisladas por nosotros.

Además, para comprobar la eficacia del método de extracción adoptado sobre los líquidos metabólicos, hicimos análisis cromatográficos mediante las técnicas descritas de la fracción correspondiente al AIA y pudimos comprobar que, efectivamente, este producto solamente va acompañado por el AII.

Tabla LIX.- Estudio cromatográfico y colorimétrico de las fracciones del procedimiento número 1

| Fracción | E | Productos separados |
|----------|------|--|
| 1 | 0,42 | Triptófano Acido indol acético Acido indol butírico Acido indol pirúvico Indol |
| 2 | 0,25 | Triptófano Acido indol acético |
| 3 | 0,90 | Acido indol acético Acido indol butírico Acido indol pirúvico |

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,90}{0,90 + 0,25 + 0,42} = 0,56$$

Tabla LX.- Estudio cromatográfico y colorimétrico de
de las fracciones del procedimiento número 2

| Fracción | E | Productos separados |
|----------|------|---|
| 1 | 0,39 | Triptófano Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 2 | 0,88 | Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,88}{0,88 + 0,39} = 0,67$$

Tabla LXI.- Estudio cromatográfico y colorimétrico de
las fracciones del procedimiento número 3

| Fracción | E | Productos separados |
|----------|-------|---|
| 1 | 0,315 | Indol Acido indol acético |
| 2 | 0,000 | |
| 3 | 0,487 | Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 4 | 0,412 | Triptófano Acido indol acético |

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,487}{0,315 + 0,487 + 0,412} = 0,401$$

Tabla LXII.- Estudio cromatográfico y colorimétrico de las fracciones del procedimiento número 4

| Fracción | E | Productos separados |
|----------|-------|---|
| 1 | 0,000 | Triptófano Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 2 | 0,915 | Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 3 | 0,330 | Acido indol acético triptófano |

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,915}{0,915 + 0,330} = 0,737$$

Tabla LXIII.- Estudio cromatográfico y colorimétrico de
las fracciones del procedimiento número 5

| Fracción | E | Productos separados |
|----------|-------|---|
| 1 | 0,315 | Acido indol acético Triptófano Indol |
| 2 | 0,000 | |
| 3 | 0,855 | Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 4 | 0,000 | |

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,855}{0,885 + 0,315} = 0,73$$

Tabla LXIV.- Estudio cromatográfico y colorimétrico de
las fracciones del procedimiento número 6

| Fracción | E | Productos separados |
|----------|-------|---|
| 1 | 0,000 | |
| 2 | 0,952 | Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 3 | 0,000 | |

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,952}{0,952} = 1,00$$

Tabla LXV.- Estudio cromatográfico y colorimétrico de
las fracciones del procedimiento número 7

| Fracción | E | Productos separados |
|----------|-------|---|
| 1 | 0,085 | Acido indol acético |
| 2 | 0,020 | Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 3 | 1,08 | Acido indol acético Acido indol propiónico Acido indol butírico |
| 4 | 0,005 | Triptófano Acido indol acético |

$$\text{Rendimiento} = \frac{1,080}{0,085 + 0,020 + 1,080 + 0,005} = 0,908$$

Tabla LVI.- Evolución de la producción de AIA en un cultivo de Rhizobium trifolii

| Tiempo (1) | E | /AIA/ (2) | /AIA/ en los líquidos (2) |
|---------------|--------|--------------|------------------------------|
| 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 8 | 0,0075 | 0,34 | 0,0462 |
| 10 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 12 | 0,005 | 0,231 | 0,030 |
| 16 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 24 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 36 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 48 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 50 | 0,0675 | 3,12 | 0,42 |
| 60 | 0,1125 | 5,20 | 0,693 |
| 72 | 0,165 | 7,62 | 1,02 |
| 84 | 0,1875 | 8,66 | 1,16 |
| 96 | 0,6775 | 31,30 | 4,17 |
| 120 | 0,5225 | 24,14 | 3,22 |

(1) expresado en horas

(2) expresada en ug/ml.

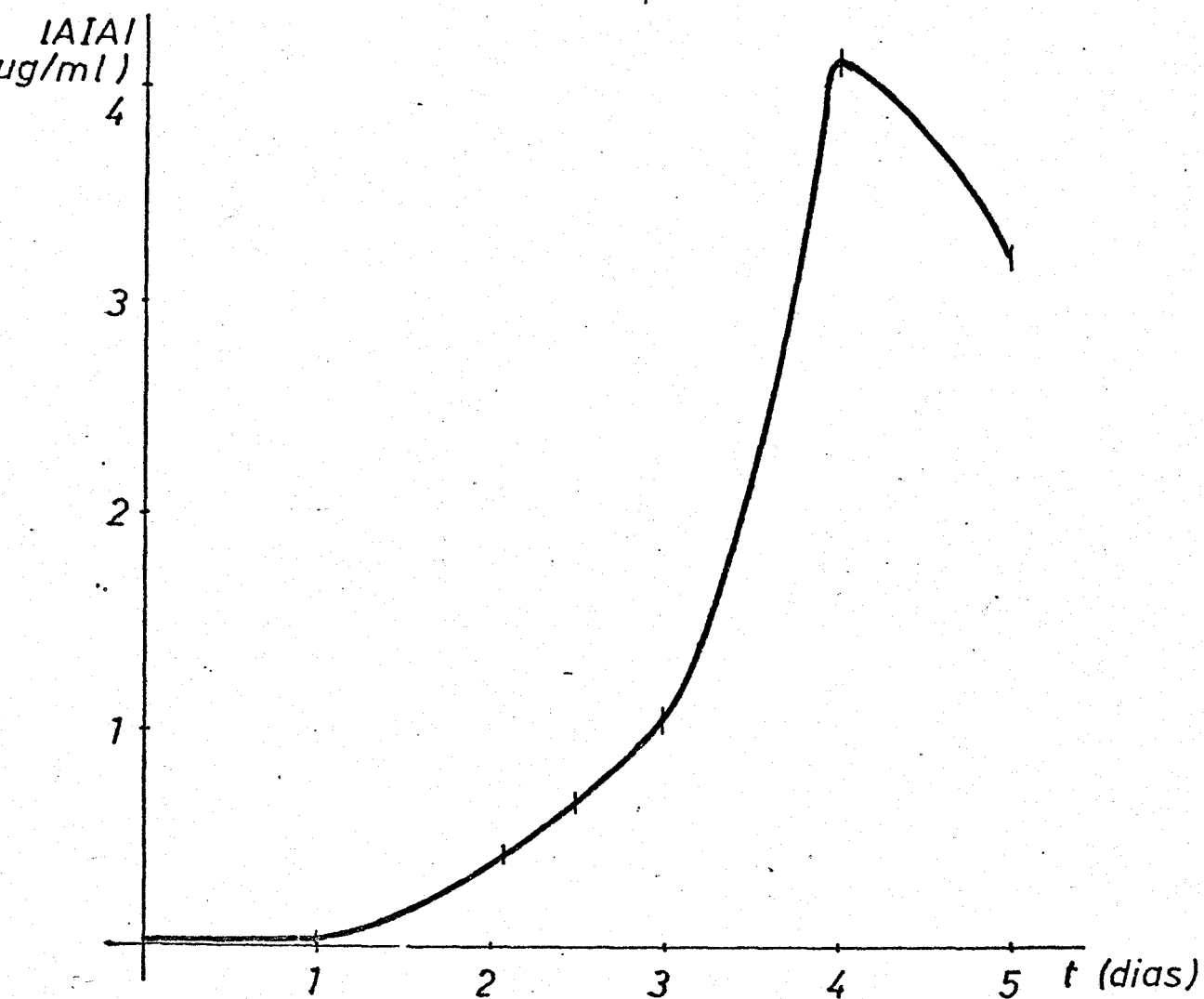


Figura 12.- Evolución de la producción de ácido indol acético por un cultivo de Rhizobium trifolii

3.3.3.- Producción de AIA por las bacterias ensayadas

Las bacterias cultivadas en el medio YMA durante cuatro días fueron tratadas como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Los líquidos metabólicos fueron fraccionados según la técnica de extracción descrita en el mismo apartado:

En las Tablas LXVII a LXIX se exponen los resultados obtenidos por nosotros.

Como puede apreciarse en ellas, la producción de AIA es muy variable, tanto en lo que se refiere a las estirpes de Rhizobium aisladas de Tetragonolobus, como al resto de las bacterias ensayadas.

Observando la Tabla LXIX puede apreciarse que la producción de AIA no es privativa de las bacterias del género Rhizobium, sino que hay otras bacterias, como Escherichia coli, Pseudomonas calendula y Sarcina lutea, que también producen esta sustancia.

Tabla LXVII.- Producción de ácido indol acético por las estirpes de Rhizobium aisladas de Tetragonolobus

| Estirpe | E | /AIA/ (2) | /AIA/ (3) |
|---------|--------|--------------|--------------|
| TM - 1 | 0,1525 | 7,05 | 0,40 |
| Tm - 2 | 0,0925 | 4,27 | 0,24 |
| TM - 3 | 0,1970 | 9,10 | 0,52 |
| TM - 4 | 0,1375 | 6,35 | 0,36 |
| TM - 5 | 0,1100 | 5,10 | 0,29 |
| TM - 6 | 1,2335 | 56,99 | 3,26 |
| TPU- 1 | 0,1275 | 5,89 | 0,34 |
| TPU- 2 | 1,0475 | 48,40 | 2,76 |
| TPU-3 | 0,9825 | 45,29 | 5,19 (4) |
| TPA-1 | 0,8025 | 37,07 | 2,12 |
| TPA- 2 | 0,7050 | 32,57 | 1,86 |
| TPA- 3 | 0,560 | 25,87 | 1,48 |

(2) expresada en $\mu\text{g/ml}$

(3) en los líquidos metabólicos (expresada en $\mu\text{g/ml}$)

(4) todos los líquidos metabólicos están concentrados 70/4 veces, menos éste que lo está 70/8 veces.

Tabla LXVIII.- Producción de ácido indol acético por
bacterias del género Rhizobium

| Microorganismo | E | /AIA/ (1) | /AIA/ (2) |
|--|--------|--------------|--------------|
| <u>Rh. trifolii</u> (RS55) | 0,99 | 46,74 | 2,67 |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS52) | 1,132 | 52,30 | 2,99 |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS102) | 1,250 | 57,75 | 3,30 |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS15) | 0,55 | 25,41 | 1,45 |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS51) | 0,14 | 6,47 | 0,37 |
| <u>Rh. trifolii</u> (RS 87) | 0,752 | 34,74 | 1,99 |
| <u>Rh. lupini</u> (RS 108) | 0,938 | 43,34 | 4,95 (3) |
| <u>Rh. legumi-</u> <u>nosarum</u> (RS 70) | 1,048 | 48,42 | 5,53 (3) |
| <u>Rh. phaseoli</u> (RS92) | 0,1275 | 5,89 | 0,34 |
| <u>Rh. meliloti</u> (RS94) | 0,165 | 7,62 | 0,44 |

(1) expresada en $\mu\text{g/ml}$

(2) corresponde a los líquidos metabólicos

(3) estos líquidos metabólicos se concentraron la mitad que los restantes.

Tabla LXIX.- Producción de ácido indol acético por microorganismos distintos de Rhizobium

| Microorganismo | E | /AIA/ (1) | /AIA/ (2) |
|-----------------------------|-------|--------------|--------------|
| <u>Klebsiella aerogenes</u> | | | |
| <u>nes</u> | 0,945 | 43,66 | 2,49 |
| <u>Bacillus cereus</u> | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| <u>Escherichia coli</u> | 0,200 | 9,24 | 0,53 |
| <u>Erwinia carotovora</u> | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| <u>Ps. calendula</u> | 0,290 | 13,40 | 0,77 |
| <u>St. aureus</u> | 0,025 | 1,16 | 0,07 |
| <u>Salmonella thy-</u> | | | |
| <u>phimurium</u> | 0,000 | 0,00 | 0,00 |
| <u>Sarcina lutea</u> | 0,310 | 14,32 | 0,82 |
| <u>Phytobacterium</u> | | | |
| <u>salicepoda</u> | 0,000 | 0,00 | 0,00 |

(1) expresada en $\mu\text{g/ml}$

(2) corresponde a los líquidos metabólicos y también se expresa en $\mu\text{g/ml}$.

4. DISCUSSION

Los principales objetivos que nos proponíamos al iniciar este trabajo eran, en primer lugar, el estudio taxonómico de estirpes de Rhizobium aisladas de leguminosas silvestres del Valle del Guadalquivir y, en segundo lugar, el estudio de la producción de ácido indol acético por Rhizobium cultivado en presencia de triptófano. Para comenzar nuestro trabajo elegimos el género Tetragonolobus, que está representado en esta región de Andalucía por varias especies, como son T. maritimum, T. purpureum y T. palestinum, de cuyos nódulos aislamos doce estirpes de Rhizobium, que hemos utilizado para estudios taxonómicos.

Al mismo tiempo que estudiábamos estas estirpes de Rhizobium comenzamos a realizar experimentos preliminares para determinar la producción de AIA por éstas y otras bacterias; sin embargo, al utilizar los métodos de determinación de esta sustancia basados en la reacción de Salkowski, tropezamos con una serie de problemas, que más adelante discutiremos, los cuales

nos obligaron a detenernos en la puesta a punto de un método para valorar con exactitud el ácido indol acético. Esta es la razón de que en el trabajo que aquí presentamos se dedique mayor atención a este método de valoración que a los dos objetivos que en principio nos habíamos propuesto.

Como ya hemos indicado, la producción de ácido indol acético a partir de triptófano ha sido estudiada no solamente en Rhizobium (74, 76), sino en otros microorganismos (52, 53) y otros materiales (56, 66). Estos trabajos han sido revisados recientemente por BAREA y MONTOYA (2) y, según se desprende de ellos, los métodos de valoración de AIA se pueden reducir a los siguientes:

a) determinación colorimétrica, valiéndose de la reacción de Salkowski (89)

b) separación cromatográfica y determinación cuantitativa de los productos por medida de la radiactividad de las manchas (56, 64, 65).

c) valoración biológica por efectos sobre el crecimiento de Saccharomyces cerevisiae (3).

Según el propio RIGAUD, el método cromatográfico de la determinación por la medida de la radiactividad, además de ser muy laborioso, lleva a resultados en los que puede haber errores del veinte por ciento, o más, debido a las pérdidas durante la separación cromatográfica. Asimismo, estos errores son tanto mayores cuanto menores sean las cantidades a determinar.

Por otra parte, el método biológico no es aplicable a nuestro trabajo, ya que, como dicen sus autores, es válido solamente para el caso en que las auxinas estén puras y, como ha demostrado RIGAUD y nosotros mismos hemos comprobado, el AIA

que se produce a partir del triptófano siempre va acompañado por ácido indol láctico.

También hemos descartado los métodos espectrofotométrico y espectrofluorimétrico, ya que tampoco soslayan el problema de la interferencia del AIL.

Por tanto, el método que consideramos más conveniente para nuestro trabajo es el basado en la reacción de Salkowski, previa extracción de los productos como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Sin embargo, este método, tal como lo aplica RIGAUD supone las mismas pérdidas que las señaladas para la determinación por medida de la radiactividad. Por otra parte, como hemos demostrado en el presente trabajo, la aplicación directa de la reacción de Salkowski a los extractos etéreos, sin cromatografía previa tiene también el inconveniente de que la presencia de AIL interfiere en tal grado que hace inaplicable el método. No obstante, a través de numerosos ensayos hemos logrado soslayar la interferencia del ácido indol láctico, poniendo a punto el método descrito en los resultados, que tiene la ventaja de que, al no ser necesaria la separación cromatográfica, resulta menos laborioso y más exacto, ya que se evitan pérdidas de ácido indol acético.

Para determinar la exactitud de nuestro método se prepararon diferentes soluciones con distintas concentraciones de AIA y de AIL. Estas muestras fueron sometidas al análisis y se compararon los valores obtenidos por aplicación del método, con los valores reales de las concentraciones de AIA presentes en las muestras, mediante la prueba de chi cuadrado. Los resultados se exponen en la Tabla LXX. Como puede apreciarse, el valor de chi cuadrado obtenido, 1,948, es muy inferior al valor de chi cuadrado máximo para 39 grados de libertad, lo que in-

Tabla LXX.- Comparación de los valores reales (R) de concentración de AIA en ug/ml y los obtenidos al aplicar el método de valoración (O). La comparación se hace mediante la prueba de chi cuadrado.

| R | O | R - O | $(R - O)^2$ | $\frac{(R - O)^2}{R}$ |
|-----|------|--------|-------------|-----------------------|
| 0,1 | 0,11 | - 0,01 | 0,0001 | 0,001 |
| 0,2 | 0,18 | 0,02 | 0,0004 | 0,002 |
| 0,3 | 0,34 | - 0,04 | 0,0016 | 0,005 |
| 0,4 | 0,34 | 0,06 | 0,0036 | 0,007 |
| 0,5 | 0,34 | 0,16 | 0,026 | 0,051 |
| 0,6 | 0,57 | 0,03 | 0,0009 | 0,001 |
| 0,7 | 0,54 | 0,16 | 0,026 | 0,004 |
| 0,8 | 0,69 | 0,11 | 0,012 | 0,015 |
| 0,9 | 0,98 | - 0,08 | 0,006 | 0,007 |
| 1,0 | 1,15 | - 0,15 | 0,022 | 0,022 |
| 1,5 | 1,84 | - 0,34 | 0,116 | 0,077 |
| 2,0 | 1,96 | 0,04 | 0,002 | 0,001 |
| 2,5 | 3,34 | - 0,84 | 0,706 | 0,282 |
| 3,0 | 3,34 | - 0,34 | 0,116 | 0,038 |
| 3,5 | 3,58 | - 0,08 | 0,006 | 0,001 |
| 4,0 | 4,50 | - 0,50 | 0,250 | 0,062 |
| 4,5 | 4,96 | - 0,46 | 0,212 | 0,047 |
| 5,0 | 5,19 | - 0,19 | 0,036 | 0,007 |
| 6,0 | 6,46 | - 0,46 | 0,212 | 0,035 |
| 7,0 | 7,16 | - 0,16 | 0,026 | 0,004 |

Tabla LXX.- Continuación

| R | O | R - O | (R - O) ² | $\frac{(R - O)^2}{R}$ |
|------|-------|--------|----------------------|-----------------------|
| 8,0 | 8,20 | - 0,20 | 0,040 | 0,005 |
| 9,0 | 8,89 | 0,11 | 0,012 | 0,001 |
| 10,0 | 11,43 | - 1,43 | 2,045 | 0,204 |
| 12,0 | 12,82 | - 0,82 | 0,672 | 0,056 |
| 15,0 | 16,63 | - 1,63 | 2,657 | 0,177 |
| 16,0 | 16,28 | - 0,28 | 0,078 | 0,005 |
| 18,0 | 18,90 | - 0,90 | 0,810 | 0,045 |
| 20,0 | 20,90 | - 0,90 | 0,810 | 0,040 |
| 21,0 | 21,94 | - 0,94 | 0,884 | 0,042 |
| 24,0 | 24,02 | - 0,02 | 0,0004 | 0,000 |
| 25,0 | 25,40 | - 0,40 | 0,160 | 0,006 |
| 27,0 | 28,98 | - 1,98 | 3,920 | 0,145 |
| 28,0 | 28,06 | - 0,06 | 0,004 | 0,000 |
| 30,0 | 30,83 | - 0,83 | 0,689 | 0,023 |
| 32,0 | 32,10 | - 0,10 | 0,010 | 0,000 |
| 35,0 | 35,34 | - 0,34 | 0,116 | 0,003 |
| 36,0 | 33,95 | 2,05 | 4,202 | 0,116 |
| 40,0 | 43,19 | - 3,19 | 10,176 | 0,254 |
| 45,0 | 47,35 | - 2,35 | 5,522 | 0,123 |
| 50,0 | 50,35 | - 0,35 | 0,122 | 0,002 |
| | | | | 1,948 |

Valor máximo de chi cuadrado para 39 grados de libertad y un coeficiente de seguridad de 0,999, 17,26

dica que las diferencias existentes entre los valores teóricos (concentraciones reales de AIA en las muestras) y los obtenidos por aplicación del método no son significativas y que, por lo tanto, el método es satisfactorio como método de valoración de AIA en soluciones en las que se encuentra presente el AIL.

Por otro lado, como puede apreciarse en la Tabla XLVI, los valores de densidad óptica cuando es 2 la proporción entre las concentraciones de ambos compuestos en las muestras, aunque inferiores, son muy parecidos a los que corresponden a las proporciones inferiores o iguales que uno, lo que asegura la fiabilidad de los resultados obtenidos al analizar los líquidos metabólicos de las bacterias utilizadas en el presente trabajo.

Además, si se hace un estudio de las rectas representadas en la Figura 8 (Tablas LXXI a LXXVI), se demuestra que sus pendientes son próximas a cero, lo que indica que la absorbencia depende de la concentración absoluta de AIA.

Estos resultados también concuerdan con los representados en la Figura 10, en la que se aprecia claramente que es posible agrupar los datos de densidad óptica obtenidos, en dos grupos claramente diferenciados. Para una determinada concentración de ácido indol acético y concentraciones variables de ácido indol láctico, los datos pueden ser agrupados en dos rangos, cada uno de los cuales corresponde a las muestras en que las proporciones de AIA y AIL son inferiores o iguales a 1, y a las muestras en que tal proporción es superior a uno. Dado que agrupando así los datos se obtienen rectas con diferentes pendientes, la aplicación del método exige conocer con qué rango de proporciones estamos trabajando, lo que se consigue añadiendo a la muestra pro

Tabla LXXI.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a muestras con una cantidad fija (50 ug/ml) de AIA y cantidades variables de AIL.

| P - | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|-------|---------|-------------------|-------------------|----------|----------------|
| 0,100 | 1,1050 | - 0,192 | - 0,0260 | 0,0050 | 0,0368 |
| 0,111 | 1,0925 | - 0,181 | - 0,0385 | 0,0069 | 0,0327 |
| 0,125 | 1,2450 | - 0,167 | 0,1140 | - 0,0190 | 0,0278 |
| 0,143 | 1,1525 | - 0,149 | 0,0215 | - 0,0032 | 0,0222 |
| 0,166 | 1,1325 | - 0,126 | 0,0015 | - 0,0002 | 0,0158 |
| 0,200 | 1,1850 | - 0,092 | 0,0540 | - 0,0049 | 0,0084 |
| 0,250 | 1,0700 | - 0,042 | - 0,0610 | 0,0026 | 0,0017 |
| 0,333 | 1,1250 | 0,041 | - 0,0060 | - 0,0002 | 0,0016 |
| 0,500 | 1,1300 | 0,208 | - 0,0010 | - 0,0002 | 0,0432 |
| 1,000 | 1,0775 | 0,708 | - 0,0535 | - 0,0379 | 0,5012 |
| 2,929 | 11,3150 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0511 | 0,6983 |
| 0,292 | 1,131 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0051 | 0,0698 |

$$a_1 = \frac{- 0,0051}{0,0698304} = - 0,073034$$

Tabla LXXII.- Cálculos de las pendiente de la recta correspondiente a una cantidad fija (30 ug/ml) de AIA y cantidades variables de AIL

| P | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|-------|--------|-------------------|-------------------|----------|----------------|
| 0,100 | 0,7000 | - 0,192 | 0,0430 | - 0,0082 | 0,03686 |
| 0,111 | 0,6100 | - 0,181 | - 0,0470 | 0,0085 | 0,03276 |
| 0,125 | 0,6075 | - 0,167 | - 0,0495 | 0,0083 | 0,02788 |
| 0,143 | 0,7200 | - 0,149 | 0,0630 | - 0,0094 | 0,02220 |
| 0,166 | 0,6450 | - 0,126 | - 0,0120 | 0,0015 | 0,01587 |
| 0,200 | 0,6700 | - 0,092 | 0,0130 | - 0,0012 | 0,00846 |
| 0,250 | 0,6500 | - 0,042 | - 0,0070 | 0,0003 | 0,00176 |
| 0,333 | 0,6475 | 0,041 | - 0,0095 | - 0,0004 | 0,00168 |
| 0,500 | 0,6550 | 0,208 | - 0,0020 | - 0,0004 | 0,04326 |
| 1,000 | 0,6650 | 0,708 | 0,0080 | 0,0057 | 0,50126 |
| 2,929 | 6,5700 | 0,000 | 0,0000 | 0,0047 | 0,69830 |
| 0,292 | 0,6570 | 0,000 | 0,0000 | 0,0005 | 0,06983 |

$$a_2 = \frac{0,0005}{0,069830} = 0,0071602$$

Tabla LXXIII.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una cantidad fija (25 ug/ml) de AIA y cantidades variables de AII.

| P | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|-------|--------|-------------------|-------------------|----------|----------------|
| 0,100 | 0,6400 | -0,192 | 0,0090 | - 0,0017 | 0,036864 |
| 0,111 | 0,6275 | - 0,181 | - 0,0035 | 0,0006 | 0,032761 |
| 0,125 | 0,6550 | - 0,167 | 0,0240 | - 0,0040 | 0,027889 |
| 0,143 | 0,6500 | - 0,149 | 0,0190 | - 0,0028 | 0,022201 |
| 0,166 | 0,6550 | - 0,126 | 0,0240 | - 0,0062 | 0,015876 |
| 0,200 | 0,6250 | - 0,092 | - 0,0060 | 0,0006 | 0,008464 |
| 0,250 | 0,6100 | - 0,042 | - 0,0210 | 0,0009 | 0,001764 |
| 0,333 | 0,6200 | 0,041 | - 0,0110 | - 0,0005 | 0,001681 |
| 0,500 | 0,6250 | 0,208 | - 0,0060 | - 0,0012 | 0,043264 |
| 1,000 | 0,6025 | 0,708 | - 0,0285 | - 0,0202 | 0,501264 |
| 2,929 | 6,3100 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0345 | 0,698304 |
| 0,292 | 0,6310 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0034 | 0,069830 |

$$a_3 = \frac{- 0,0034}{0,069830} = - 0,048690$$

Tabla LXXIV.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una cantidad fija (20 ug/ml) de AIA y cantidades variables de AIL.

| P | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|-------|---------|-------------------|-------------------|----------|----------------|
| 0,100 | 0,4200 | - 0,1920 | - 0,0557 | 0,0107 | 0,036864 |
| 0,111 | 0,5100 | - 0,1810 | 0,0342 | - 0,0062 | 0,032761 |
| 0,125 | 0,5175 | - 0,1670 | 0,0417 | - 0,0070 | 0,027889 |
| 0,143 | 0,5525 | - 0,1490 | 0,0767 | - 0,0011 | 0,022201 |
| 0,166 | 0,5550 | - 0,1260 | 0,0792 | - 0,0100 | 0,015876 |
| 0,200 | 0,5000 | - 0,0920 | 0,0242 | - 0,0022 | 0,008464 |
| 0,250 | 0,4100 | - 0,0420 | - 0,0667 | 0,0028 | 0,001764 |
| 0,333 | 0,4425 | 0,0410 | - 0,0332 | - 0,0014 | 0,001681 |
| 0,500 | 0,4200 | 0,2080 | - 0,0557 | - 0,0116 | 0,043264 |
| 1,000 | 0,4300 | 0,7080 | - 0,04575 | - 0,0324 | 0,501264 |
| 2,929 | 4,7575 | 0,0000 | 0,0000 | - 0,0584 | 0,698304 |
| 0,292 | 0,47575 | 0,0000 | 0,0000 | - 0,0059 | 0,069830 |

$$a_4 = \frac{- 0,0059}{0,069830} = - 0,083631$$

Tabla LXXV.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una cantidad fija (15 ug/ml) de AIA y cantidades variables de AIL

| P | E | X = P - P̄ | Y = E - Ē | XY | X ² |
|-------|--------|------------|------------|----------|----------------|
| 0,100 | 0,3225 | - 0,192 | 0,0018 | - 0,0003 | 0,036864 |
| 0,111 | 0,2850 | - 0,181 | - 0,0357 | 0,0065 | 0,032761 |
| 0,125 | 0,3850 | - 0,167 | 0,0643 | - 0,0107 | 0,027889 |
| 0,143 | 0,3950 | - 0,149 | 0,0743 | - 0,0111 | 0,022201 |
| 0,166 | 0,4000 | - 0,126 | 0,0793 | - 0,0010 | 0,015876 |
| 0,200 | 0,3750 | - 0,092 | 0,0543 | - 0,0050 | 0,008464 |
| 0,250 | 0,3650 | - 0,042 | 0,0443 | - 0,0019 | 0,001764 |
| 0,333 | 0,3600 | 0,041 | 0,0393 | 0,0016 | 0,001681 |
| 0,500 | 0,3375 | 0,208 | 0,0168 | 0,0035 | 0,043264 |
| 1,000 | 0,3425 | 0,708 | 0,0218 | 0,0154 | 0,501264 |
| 2,929 | 3,2075 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0030 | 0,698304 |
| 0,292 | 0,3207 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0003 | 0,069830 |

$$a_5 = \frac{- 0,0003}{0,069830} = - 0,004296$$

Tabla LXVI.- Cálculo de la pendiente de la recta correspondiente a una cantidad fija (10 ug/ml) de AIA y cantidades variables de AIL.

| P | E | X = P - \bar{P} | Y = E - \bar{E} | XY | X ² |
|-------|--------|-------------------|-------------------|----------|----------------|
| 0,100 | 0,2200 | - 0,192 | - 0,02425 | 0,0047 | 0,036864 |
| 0,111 | 0,2150 | - 0,181 | - 0,02925 | 0,0053 | 0,032761 |
| 0,125 | 0,2800 | - 0,167 | 0,03575 | - 0,0060 | 0,027889 |
| 0,143 | 0,2750 | - 0,149 | 0,03075 | - 0,0046 | 0,022201 |
| 0,166 | 0,2700 | - 0,126 | 0,02575 | - 0,0032 | 0,015876 |
| 0,200 | 0,2400 | - 0,092 | - 0,00425 | 0,0004 | 0,008464 |
| 0,250 | 0,2500 | - 0,042 | 0,00575 | - 0,0002 | 0,001764 |
| 0,333 | 0,2100 | 0,041 | - 0,03425 | - 0,0014 | 0,001681 |
| 0,500 | 0,2450 | 0,208 | 0,00075 | 0,0002 | 0,043264 |
| 1,000 | 0,2375 | 0,708 | - 0,00675 | - 0,0048 | 0,501264 |
| 2,929 | 2,4425 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0096 | 0,698304 |
| 0,292 | 0,2442 | 0,000 | 0,0000 | - 0,0009 | 0,069830 |

$$a_6 = \frac{- 0,0009}{0,069830} = - 0,012888$$

blema un exceso de AIL, que nos permite utilizar la recta correspondiente a las proporciones inferiores o iguales a 1.

Tanto el análisis de las pendientes de todas las rectas obtenidas como la prueba de chi cuadrado, indican que nuestro método constituye un medio exacto y relativamente sencillo para la determinación del ácido indol acético en soluciones en las que coexista el AIL. Además, dado que en la modificación introducida por nosotros en el método de valoración de Salkowski se añade AIL en cantidad suficiente, el método se hace válido para cualquier proporción en que se encuentren ambas sustancias en las muestras analizadas.

Asímismo, hemos de señalar que la sensibilidad de este método es suficiente para la determinación de las concentraciones de ácido indol acético que aparecen en los líquidos metabólicos estudiados por nosotros, ya que, como se puede apreciar en la Figura 11, es posible determinar concentraciones de AIA del orden de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, y las concentraciones halladas en los extractos concentrados (Tablas LXVII, LXVIII y LXIX) suelen ser muy superiores a este valor.

Con este método hemos podido resolver el problema que se nos planteó en nuestros primeros experimentos en los que estudiábamos la producción de ácido indol acético a partir de triptófano, ya que, como hemos señalado, la determinación de esta sustancia con la recta de calibrado preparada para AIA puro daba resultados que no sólo eran irreproducibles, sino que incluso presentaban considerables oscilaciones en un mismo experimento.

A la vista de los resultados expuestos en las Tablas III a XIV, cabría suponer que la indol acetamida interfiriese

ra con el ácido indol acético ya que, además de éste, es el único compuesto de los ensayados que da reacción de Salkowski positiva. Pero, según la bibliografía consultada, este compuesto no aparece citado como intermediario en la biosíntesis del AIA y, como hemos comprobado nosotros, no se detecta dicho compuesto en la extracción del AIA de los líquidos metabólicos, por lo que no parece probable que interfiera con el AIA valorado. Por otra parte, el máximo de absorción de este compuesto tiene lugar a las cinco horas y cuarenta y cinco minutos de iniciada la reacción, mientras que el máximo de absorción debido al ácido indol acético tiene lugar una hora después de iniciada la reacción, por lo que decidimos descartar la posible influencia de la indol acetamida.

Una vez establecidos los procedimientos cromatográficos y colorimétricos que nos iban a servir para determinar la eficacia y el rendimiento de los métodos de separación de indoles, se planteó el problema de decidirse por uno de ellos. Consultada la bibliografía encontramos dos técnicas, la de MOORE y SHANER (56) y la otra, empleada por RIGAUD (74). En la primera de ellas se utiliza como disolvente el diclorometano, mientras que en la otra, el disolvente es el éter etílico desprovisto de peróxidos. Dado que en ninguna de los trabajos aparece referencia alguna al rendimiento de estas técnicas, nos pareció conveniente enfocar parte de nuestro trabajo al estudio del citado rendimiento.

En primer lugar, cabe destacar el hecho de que, dado que en los líquidos metabólicos existen muchas sustancias lipídicas que producen emulsiones que dificultan los pasos siguientes del procedimiento de extracción, fue necesario separar previamente

estas sustancias, para lo cual, en el caso de la primera técnica trabajamos con benceno, y en la segunda, con éter a pH = 8,2, ya utilizado por RIGAUD con este mismo fin.

Dividiremos los procedimientos de extracción en dos grupos: unos, en los que se emplea el diclorometano como disolvente, y otros, en los que se utiliza el éter etílico. Como la observación de las tablas LIX a LXV demuestra, puede apreciarse en primer lugar, que, como regla general, los primeros son menos eficaces que los segundos. Además, en ambos casos, puede apreciarse que la introducción del benceno reduce apreciablemente el rendimiento de la técnica porque extrae parte del ácido indolacético presente en las muestras, al mismo tiempo que triptófano, indol butírico e indol propiónico.

En el estudio cromatográfico del procedimiento de extracción número 1 puede apreciarse que todas las fracciones arrastran parte del ácido indol acético, con lo que las pérdidas a lo largo del proceso son considerables. (Tabla LIX)

En la Tabla LX se aprecia un aumento en el rendimiento del procedimiento, como consecuencia de la eliminación del tratamiento con benceno.

En la Tabla LXI se exponen los resultados del procedimiento de extracción número 3. Como puede apreciarse, el rendimiento es aun más bajo que en el primer caso, ya que el diclorometano a pH = 2,6 extrae en menor proporción que a pH = 0.

En cuanto al procedimiento número cuatro, cabe destacar el aumento del rendimiento con respecto al caso anterior, como resultado de la supresión del tratamiento con benceno. Al igual que en el caso anterior, el diclorometano a pH alcalino no ex-

trae en absoluto ácido indol acético (Tabla LXII)

Contemplando los resultados del procedimiento de extracción número cinco, puede apreciarse (Tabla LXIII) que por primera vez, aunque el rendimiento del procedimiento es aún bajo, no aparecen cantidades de ácido indol acético detectables colorimétricamente en la fase acuosa. También es de notar que el éter no extrae triptófano, que es el compuesto indólico que, por haber sido añadido al medio de cultivo, cabe suponer se encuentre en mayor o menor proporción, en los líquidos metabólicos.

El procedimiento de extracción número 6, que coincide con la técnica de extracción utilizada por RIGAUD, es el que presenta mejores resultados. Como puede apreciarse en la Tabla LXIV, todo el AIA queda en el extracto con éter a pH ácido. En dicho extracto se encuentran también ácido indol butírico y ácido indol propiónico, pero ya ha quedado establecido que ninguno de ellos presenta reacción coloreada con el reactivo de Salkowski; por otra parte, al no ser citado en la bibliografía en ningún caso como precursores de la síntesis del AIA, o productos de su degradación, cabe suponer altamente improbable su presencia en los líquidos metabólicos objeto de nuestro estudio posterior.

De nuevo la introducción del tratamiento con benceno se traduce en la disminución del rendimiento de la técnica de extracción, como se puede apreciar en el estudio del procedimiento número 7 (Tabla LXV).

Dado que el procedimiento número 6 es el que ofrece mayores ventajas en todos los sentidos, ha sido elegido como técnica de extracción para los líquidos metabólicos en los que se incuban las bacterias.

Con estos tanteos previos hemos pretendido, además de encontrar la técnica de extracción que mejor se adaptaba a nuestros propósitos, comprobar la idoneidad de la empleada por RIGAUD que demuestra ser la más eficaz de las encontradas en la bibliografía.

Entrando en la discusión de los resultados obtenidos al hacer el estudio de la capacidad de producción de ácido indol acético por parte de las estirpes aisladas por nosotros de los nódulos radicales de Tetragonolobus y de otras especies de Rhizobium y otras bacterias, cabe destacar (Tablas LXVII, LXVIII y LXIX) los siguientes hechos:

Por un lado, la producción de AIA a partir de triptófano no es privativa de las bacterias del género Rhizobium, ya que es una propiedad que presentan bacterias pertenecientes a otros géneros, como Klebsiella aerogenes, Escherichia coli, Pseudomonas calendula, Sarcina lutea.

Por otra parte, la producción de dicha sustancia es muy variable dentro de la misma especie de Rhizobium, ya que, como puede verse en las Tablas LXVIII y LXVII, la producción de AIA varía mucho de unas estirpes a otras dentro de la misma especie y, por supuesto, de una especie a otra del género Rhizobium. Un hecho interesante es que las especies de crecimiento lento, representadas en nuestro estudio por Rh. meliloti, producen menos cantidad de AIA que las de crecimiento rápido en los medios con extracto de levadura; ello puede ser debido más que a una baja productividad de AIA, a un crecimiento menor en el medio de cultivo empleado, que, como hemos indicado, lleva extracto de levadura.

Este razonamiento nos llevó a comparar la producción de AIA con el crecimiento de la bacteria ensayada y hemos podido comprobar en estudios preliminares que, en general, estas especies de

crecimiento lento tienen una productividad más elevada, entendiendo como tal a la producción de AIA por célula.

Por otra parte, es sabido que no todas las estirpes de Rhizobium presentan la misma rapidez para inducir la formación de nódulos en las leguminosas que les son específicas. Ello puede ser debido a la diferente facilidad que tienen para transformar el triptófano en ácido indol acético, lo que está de acuerdo con la idea expuesta por NUTMAN (60), por lo que sería interesante realizar trabajos en los que se comparen la facilidad para inducir la formación de nódulos y la facilidad para producir AIA a partir del triptófano, en cada estirpe de Rhizobium.

Otro hecho, citado por DOMMERGES y MANGENOT es que para que se produzca la nodulación es necesario que la densidad de Rhizobium en el suelo sea de 10^9 células por gramo de suelo. En el caso de que la nodulación estuviese regulada por la acción del ácido indol acético, como sugiere NUTMAN, es lógico pensar que si el Rhizobium infectante es una estirpe que presente una gran capacidad para producir ácido indol acético, este número podría reducirse en gran medida. Incluso, dado que estas auxinas vegetales actúan en concentraciones críticas comprendidas entre márgenes muy estrechos, cabe pensar que tratándose de estas estirpes muy productoras de AIA, lejos de favorecer la nodulación, la inhibirían en gran medida, porque de la acción conjunta de tal número de células podría resultar una cantidad excesiva de ácido indol acético.

En cuanto a la producción de ácido indol acético por otras bacterias, vamos a destacar aquí el hecho de que presente esta propiedad Pseudomonas. Dado que hay especies de este género que son fitopatógenas, este hecho nos induce a pensar que quizás

la producción de ácido indol acético forme parte del mecanismo de infección de la planta hospedadora.

Como ya hemos señalado, las estirpes de Rhizobium aisladas por nosotros de leguminosas silvestres del género Tetragonolobus son muy similares entre sí, tanto en sus características morfológicas como bioquímicas y fisiológicas. Todas ellas presentan acumulaciones intracitoplásmicas de poli-beta-hidroxi-butilato, característica que, como ya hemos señalado, es común a las bacterias del género Rhizobium y que, al ser confundidas con endosporas, ha dado lugar a una serie de pretendidos ciclos biológicos de este género (9, 38).

Estas estirpes solo presentan diferencias en cuanto a la tolerancia a la salinidad, producción de indol, desarrollo a 37°C, crecimiento a pH = 4,0 y en el contenido de guanina + citosina. Por tanto, la comparación entre estas doce estirpes puede reducirse a la Tabla LXXVII, en la que se aprecia que estas diferencias no guardan relación con la procedencia de las estirpes. Por ello, es razonable considerarlas como pertenecientes a una misma especie, que, a juzgar por el conjunto de características comunes que presentan, no es fácil de incluir en ninguna de las seis especies actualmente admitidas. En primer lugar, hay que destacar el hecho de que once de estas estirpes son productoras de indol, característica que, según GRAHAM (37), es negativa en las setenta y nueve estirpes de Rhizobium estudiadas por él, que se repartían entre las distintas especies de este género. En segundo lugar, dando mayor peso al criterio de la producción de nódulos, hemos de considerar a todas las estirpes aisladas por nosotros como pertenecientes a Rhizobium trifolii, ya que como se señala en la Tabla LVIII, nodulan en Tetra-

gonolobus y en Trifolium y no en el resto de las leguminosas ensayadas. Sin embargo, estas estirpes presentan significativas diferencias con Rhizobium trifolii, si se tienen en cuenta otros criterios. En efecto, además de la producción de indol, ya señalada, estas estirpes difieren de Rhizobium trifolii en que, mientras ninguna de las estirpes de esta especie estudiadas por Graham crece a pH = 4,0, una de las aisladas por nosotros sí lo hace; además, las estirpes estudiadas por Graham no toleran la salinidad del 2% de ClNa en los medios de cultivo.

Sin embargo, las estirpes aisladas por nosotros se asemejan a Rhizobium trifolii en las siguientes características: reacción con la leche tornasolada, pruebas de la catalasa y la oxidasa, reducción de los nitratos y los nitritos, prueba de los citratos y de la ureasa, necesidades de factores de crecimiento y en la utilización de los tres azúcares ensayados.

Por otra parte, si bien estas estirpes aisladas por nosotros pertenecen claramente a las de crecimiento rápido en los medios con extracto de levadura, sin embargo, presentan en conjunto porcentajes de guanina + citosina algo más elevados que los que corresponderían a este grupo (7, 20).

Asimismo, creemos interesante señalar el hecho de que los rizobios aislados de Tetragonolobus no nodulen en las leguminosas del género Lotus, a pesar de que ambos géneros pertenecen a la tribu Loteae. No obstante, para poder discutir este hecho, sería necesario obtener más datos derivados de experimentos de inoculación cruzada. Igualmente, sería interesante realizar experimentos de nodulación de Rhizobium trifolii sobre Tetragonolobus.

Aunque, como hemos visto, estas estirpes de Rhizobium aisladas de Tetragonolobus no se ajusten exactamente a la descrip-

Tabla LXXVII.- Comparación de las estirpes aisladas de
Tetragonolobus (2)

| Estirpe | Proc. (1) | G+C | Tolerancia ClNa | | Indol | Crec. pH 4 | Crec. 37°C |
|---------|----------------|------|-----------------|----|-------|---------------|---------------|
| | | | 2% | 3% | | | |
| TM - 1 | <u>T. mar.</u> | 63,6 | + | - | + | - | - |
| TM - 2 | <u>T. mar.</u> | 61,2 | + | + | + | - | - |
| TM - 3 | <u>T. mar.</u> | 62,4 | + | - | + | - | + |
| TM - 4 | <u>T. mar.</u> | 61,7 | + | + | + | + | + |
| TM - 5 | <u>T. mar.</u> | 61,9 | + | - | + | - | + |
| TM - 6 | <u>T. mar.</u> | 62,4 | + | - | + | - | - |
| TPU- 1 | <u>T. pur.</u> | 63,4 | + | - | + | - | - |
| TPU- 2 | <u>T. pur.</u> | 63,6 | - | - | + | + | + |
| TPU- 3 | <u>T. pur.</u> | 61,0 | + | - | - | - | + |
| TPA- 1 | <u>T. pal.</u> | 62,4 | - | - | + | - | + |
| TPA- 2 | <u>T. pal.</u> | 64,9 | + | + | + | - | + |
| TPA- 3 | <u>T. pal.</u> | 62,2 | + | + | + | - | - |

(1) Los nombres de la plantas se representan por sus abreviaturas: T. mar., Tetragonolobus marítimum; T. pal., T. palestinum, y T. pur., T. purpureum.

(2) + indica crecimiento; - indica no crecimiento.

ción de Rhizobium trifolii, creemos que los resultados de las pruebas de nodulación, así como el gran número de características fisiológicas y bioquímicas en que coinciden con Rh. trifolii, nos autorizan a identificarlas con esta especie.

Pero es necesario señalar aquí que la mayoría de los estudios taxonómicos realizados sobre el género Rhizobium se refieren a estirpes aisladas de leguminosas cultivadas y de ahí que no sea fácil identificar estirpes aisladas de nódulos de leguminosas silvestres. Creemos, pues, que, dedicando mayor atención a estas estirpes, se podría facilitar la revisión del género Rhizobium, no sólo en cuanto a su división en especies, sino también en relación con sus proximidad con otros géneros afines.

5. CONCLUSIONES

1.- Los métodos de valoración de AIA basados en separación cromatográfica descritos en la Bibliografía presentan el inconveniente de su poca exactitud, debido a las pérdidas que se originan durante el desarrollo de la cromatografía y la subsiguiente elución.

2.- La valoración del ácido indol acético mediante el reactivo de Salkowski, sin previa purificación cromatográfica es im practicable debido a la interferencia producida por el ácido in dol láctico, que coexiste siempre en los líquidos metabólicos. También los métodos biológicos de valoración exigen que el AIA no vaya acompañado de otros compuestos indólicos.

3.- La interferencia del ácido indol láctico en la determinación colorimétrica del ácido indol acético no es fácil de explicar, dado que el AIL puro no da la reacción de Salkowski positiva. Sin embargo, se pueden establecer los hechos siguien

tes:

a) la presencia de ácido indol láctico siempre aumenta la absorbencia del ácido indol acético.

b) el aumento de absorbencia no guarda relación con la concentración absoluta de ácido indol láctico, sino que depende de la proporción entre las concentraciones de ácido indol acético y ácido indol láctico.

c) la influencia de la proporción AIA/AIL sobre la absorbencia es diferente si esta relación es mayor que 1, o menor o igual que uno; pero dentro de estos dos rangos, la variación de densidad óptica es proporcional a la concentración de ácido indol acético, sea cual fuere la cantidad absoluta de AIL coexistente. Por tanto, es posible valorar el ácido indol acético en presencia de ácido indol láctico, siempre que se confeccionen las rectas de calibrado correspondientes a ambos rangos.

d) dado que en un líquido metabólico problema no es posible conocer "a priori" la proporción AIA/AIL, es necesario añadir a la muestra un exceso de AIL para asegurar que la proporción entre ambas sustancias es inferior a 1.

4.- El valor de chi cuadrado obtenido sobre cuarenta valoraciones efectuadas con este método es 1,948, muy inferior al valor máximo, 17,26, para 39 grados de libertad y un coeficiente de seguridad de 0,999, lo que demuestra que este método es satisfactorio en cuanto a su exactitud.

5.- Nuestro método de valoración permite determinar concentraciones del orden de 0,5 ug/ml de ácido indol acético.

6.- El rendimiento del método de extracción de AIA recomendado por RIGAUD es del 100 por cien, muy superior al propuesto por MOORE Y SHANER, y al de las modificaciones introducidas por nosotros, cuyos rendimientos oscilan entre el 40,1 y el 90,8 por ciento.

7.- Las 22 estirpes de Rhizobium ensayadas producen ácido indol acético a partir de triptófano, si bien existe una gran variabilidad, no sólo de unas especies a otras, sino también entre las estirpes de una misma especie.

8.- La producción de ácido indol acético a partir de triptófano no es una característica exclusiva de las bacterias del género Rhizobium, sino que la presentan otras bacterias, pertenecientes a géneros diversos, como Klebsiella aerogenes, Escherichia coli, Pseudomonas calendula y Sarcina lutea.

9.- Las doce estirpes de bacterias aisladas por nosotros de Tetragonolobus presentan características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas muy similares entre sí, todas ellas compatibles con el género Rhizobium, excepto la producción de indol:

10.- Las pruebas de nodulación indican que las estirpes aisladas de Tetragonolobus pertenecen a la especie Rhizobium trifolii, si bien presentan diferencias con esta especie en cuanto a características fisiológicas y bioquímicas..

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) ABDEL-CHAFFAR, A.S. and H.L. JENSEN: The Rhizobia of Lupinus densiflorus Benth., with some remarks on the classification of root nodule bacteria. Arch. Mikrobiol., 54, 393 - 405 (1.966)
- (2) BAREA, J.M. y E. MONTOYA: Producción de hormonas vegetales por microorganismos. Anales Edaf. Agrobiol., 11-12, 1075 - 1096 (1.975)
- (3) BAREA, J.M., E. NAVARRO, A. PALOMARES and E. MONTOYA: A rapid microbiological assay method for auxins, gibberellic acid and kinetin using yeast. J. Appl. Bact., 37, 171 - 174 (1.973).
- (4) BENEMANN, J.R. and C.R. VALENTINE: The pathways of nitrogen fixation. Adv. Microbiol. Physiol., 8, 59 (1.972)
- (5) BERGERSEN, F.J.: The cytology of bacteroids from root nodules of subterranean clover (Trifolium subterraneum, L.). J. Gen. Microbiol., 13, 411 - 419 (1.955)
- (6) BERGERSEN, F.J. and M.J. BRIGGS: Studies on the bacterial component of Soybean root nodules: Cytology and organization in the host tissue. J. Gen. Microbiol., 19, 482 - 490 (1.958)
- (7) BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8th. Edition. The Willians and Wilkins Company. Baltimore. 1.974.

- (8) BHASKARAN, S. and S.S. SWAMINATHAN: Polyploidy and the genesis of the leguminous root nodules. The nucleus, 1, 75 - 88 (1.954)
- (9) BISSET, K.A.: Complete and reduced life-cycle in Rhizobium. J. Gen. Microbiol., 7, 233 (1.952)
- (10) BISSET, K.A.: Evidence from the cytology of Azotobacter chroococcum of a relationship with Rhizobium and the Bacillaceae. J. Gen. Microbiol., 13, 443 (1.955)
- (11) BISSET, K.A.: Some characters of Rhizobium strains from tropical legumes. J. Gen. Microbiol., 20, 89 - 90, (1.959)
- (12) BONNIER, C.: Classification et spécificité de l'hôte dans le genre Rhizobium. Proc. 6th. Int. Congr. Microbiol., 6, 325 (1.953).
- (13) BURRIS, R.H.: Biological Nitrogen Fixation. Plant Physiol. 54, 443 - 449 (1.974)
- (14) DALTON, H.: Fixation of Dinitrogen by free-living microorganisms. CRC Critical Reviews in Microbiology, 183 - 220 (1.974)
- (15) DART, P.J. and F.V. MERCER: Development of the bacteroid in the root nodule of barrel medic (Medicago tribuloides, Desr.) and subterranean clover (Trifolium subterraneum, L.). Arch. Mikrobiol., 46, 382 (1.963)

- (16) DART, P.J. and F.V. MERCER: The legume rhizosphere. Arch. Mikrobiol., 47, 344 - 378 (1.964)
- (17) DART, P.J. and F.V. MARCER: Fine structure changes in the development of the nodules of Trifolium subterraneum, L. and Medicago tribuloides, Desr. Arch. Mikrobiol., 49, 209 - 235 (1.964).
- (18) DATKO, A.H. and G.A. MACLACHLAN: Indoleacetic acid and the synthesis of glucanases and pectic enzymes. Plant Physiol., 43, 735 - 742 (1.967).
- (19) DE HERTOGH, A.A., P.A. MAYEUX and H.J. EVANS: Effect of cobalt on oxidation of propionate by Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 87, 746 - 747 (1.964)
- (20) DE LEY, J. and A. RASSEL: DNA Base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium. J. Gen. Microbiol., 41, 85 - 91 (1.965)
- (21) DE LEY, J., M. BERNAERTS, A. RASSEL and J. GUIMOT: Approach to an improved taxonomy of the genus Agrobacterium. J. Gen. Microbiol., 43, 7 - 17 (1.966)
- (22) DILWORTH, M.J.: Dinitrogen fixation. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 81 - 144 (1.974).
- (23) DOMINGUEZ VILCHES, E.: Comunicación personal
- (24) DOMMERGES, Y. et F. MANGENOT: Ecologie microbienne du sol. 595 - 634. Masson et cie. Editeurs. Paris. 1.970

- (25) DROZANSKA, D.: Antigenic relationships among strains of Rhizobium. Acta Microbiol. Pol., 42, 163 - 164 (1.963)
- (26) DYGDALA, K.: Influence of irradiation on the morphology and cytology of Rhizobium. Acta Microbiol. Pol., 12, 155 - 157 (1.963)
- (27) ELKAN, G.H.: Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of Rhizobium japonicum. Plant Soil, special vol., 25 - 104 (1.971).
- (28) EVANS, H.J. and S.A. RUSSEL: Physiological Chemistry of symbiotic nitrogen fixation by legumes.
En: The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation. (J.R. Postgate, Ed.) Plenum Press. London
191 - 244 1.971
- (29) FLETCHER, R.A. and S. ZALIK: Quantitative spectrophotometric determination of Indolyl-3-acetic acid. Nature, 199, 903 - 904 (1.963)
- (30) FRAILE, G.: Comunicación personal
- (31) GIBBINS, A.M. and K.F. GREGORY: Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species determined by three methods of nucleic acid hybridization. J. Bacteriol., 111, 129 - 141 (1.972)
- (32) GOLEBIOSWKA, J. and H. SYNIEWSKA: Studies on the develop-

- ment cycle of Rhizobium lupini in root nodule. Acta Microbiol. Pol., 11, 313 - 318 (1.962)
- (33) GORDON, S.A.: Intracellular localization of the tryptophan-indoleacetate enzyme system. Plant Physiol., 33, 23-27 (1.958)
- (34) GOSTKOWSKA, K.: Effect of amino acids on symbiotical activity of Rhizobium. Acta Microbiol. Pol., 12, 158 - 162 (1.963)
- (35) GRAHAM, P.H.: Antigenic Affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie van Leeuwenhoek, 29, 281 - 291 (1.963)
- (36) GRAHAM, P.H.: The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol., 35, 511 - 517 (1.964)
- (37) GRAHAM, P.H. and C.A. PARKER: Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. Plant Soil., 20, 383 - 395 (1.964)
- (38) GRAHAM, P.H., C.A. PARKER, A.E. OAKLEY. R.T. LANGE and I.J.V. SANDERSON: Spore formation and heat resistance in Rhizobium. J. Bacteriol., 86, 1.350 - 1.351 (1.963)
- (39) GUPTA, K.G. and A. SEN: Variations in the characteristics of Rhizobium spp. of gram (Cicer arietinum), methi

(Trigonella foenum graecum) and pea (Pisum sativum).
Indian J. Agric. Sci., 32, 260 - 265 (1.962).

- (40) HAARD, F.N., G. CHISM and N. NAGLE: A fluorimetric method for the kinetic assay of indole-3-acetic acid oxidase. Anal. Biochem., 69, 627 (1.975)
- (41) HAMILTON, R.H.: Isolation of indole-3-acetic acid from corn kernels and etiolated corn seedlings. Plant Physiol., 36, 354 - 359 (1.961)
- (43) HARRIGAN, W.F. and M.E. Mc.CANCE: Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press. London. 1966
- (43) HEBERLEIN, G.T., J. DE LEY and R. TIJTGAT: Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of Agrobacterium, Rhizobium and Chromobacterium. J. Bacteriol., 94, 116 - 124 (1.967)
- (44) HEWITT, E.J.: Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Comm. 22. Farnham Royal Brahs Commonwealth Agricultural Bureau. 1.952
- (45) JORDAN, D.C.: The bacteroids of the genus Rhizobium. Bact. Rev., 26, 119 - 141 (1.962)
- (46) KEFFORD, N.P., J. BROCKWELL and J.A. ZWAR: The symbiotic synthesis of auxin legume and nodule bacteria and its role in nodule development. Aust. J. Biol. Sci., 43, 456 - 467 (1.960)

- (47) KLECZKOWSKA, J., P.S. NUTMAN, F.A. SKINNER and J.M. VINCENT:
The identification and classification of Rhizobium.
En: Identification Methods for Microbiologists. Part
B (B.M. Gibbs and D.A. Shapton, Ed.) Academic Press
London. New York. 1.970
- (48) KNEGT, E. and J. BRUINSMA: A rapid, sensitive and accurate
determination of indolyl-3-acetic acid. Phytochemistry, 12, 753 - 756 (1.973)
- (49) KURZ, W.G.W. and T.A. LA RUE: Nitrogenase activity in rhizobia
in absence of plant host. Nature, 256, 407 - 409 (1.975)
- (50) LANGE, R.T.: Nodule bacteria associated with the indigenous
leguminosae of South-Western Australia. J. Gen. Microbiol., 26, 351 - 359 (1.961)
- (51) LANTICAN, B.P. and R.M. MUIR: Isolation and properties of
the enzyme system forming indoleacetic acid. Plant Physiol., 42, 1158 - 1160 (1.967)
- (52) LARSEN, P.: On the biogenesis of some indole compounds
in Acetobacter xylinum. Physiol. Plantarum, 15,
552 - 565 (1.962)
- (53) LE HIR, M. et A. SCHNEIDER: Dosage, dans les filtrats de
culture des acides β -indolyl-acétique et β -indolyl-lactique
élaborés par Taphrina deformans à partir du tryptophane. C.R. Acad. Sci. Paris Série D.,
274, 2034 (1.975).

- (54) LIBBERT, E. and R. SCHRODER: The role of indoleacetaldehyde in IAA production from tryptophan by plants and by their epiphytic bacteria. *Biologia Plantarum*, 12, 369 - 377 (1.970)
- (55) MISHUSTIN, E.N. and V.K. SHIL'NIKOVA: Biological fixation of atmospheric nitrogen. Mac Millan Press. London 1.971
- (56) MOORE, T.C. and C.A. SHANER: Biosynthesis of indoleacetic acid from tryptophan-¹⁴C in cell-free extracts of pea shoot tips. *Plant Physiol.*, 42, 1.787 - 1.796 (1.967)
- (57) MUNNS, D.N.: Nodulation of Medicago sativa in solution culture. IV. Effects of indole-3-acetate in relation to acidity and nitrate. *Plant Soil*, XXIX, 257 - 262 (1.968)
- (58) NORRIS, D.O.: Acid Production by Rhizobium a unifying concept. *Plant Soil*, XXII, 143 - 166 (1.965)
- (59) NUTMAN, P.S.: Relation between root-hair infection by Rhizobium and nodulation in Trifolium and Vicia. *Proc. Roy. Soc. London B*, 156, 122 - 137 (1.962)
- (60) NUTMAN, P.S.: The relation between nodule bacteria and the legume host in rhizosphere and in the process of infection.
En: *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens* (K.F.

Baker and W.C. Snyder, Ed.) University of California
Berkeley. 1.965

- (61) PAGAN, J.D., J.J. CHILD, W.R. SCOWCROFT and A.H. GIBSON:
Nitrogen Fixation by Rhizobium cultured on a defined
medium. *Nature*, 256, 406 - 407 (1.975)
- (62) PALOMARES DIAZ, A.J.: Tesis Doctoral. Universidad de Gra-
nada (1.975)
- (63) PARKER, G.A. and A.E. OAKLEY: Nodule bacteria for two
species of serradella (Ornithopus sativus and Or-
nithopus compressus) *Aust. J. exp. Agric. Anim. Husb.*
3, 9 (1.963)
- (64) POWELL, L.E.: Separation of plant growth regulating subs-
tances on silica gel columns. *Plant Physiol.*, 35,
256 - 261 (1.960)
- (65) POWELL, L.E.: Solvent system for silica gel column chro-
matography of indole derivates. *Nature*, 200, 79
(1.963)
- (66) RADLEY, M.: Gibberellin-like substances in plants. *Nature*,
191, 684 - 685 (1.961)
- (67) RAGGIO, M. and N. RAGGIO: Root nodules. *Ann. Rev. Plant
Physiol.*, 13, 109 - 128 (1.962)
- (68) RAUTANEN, N. and S. SAUBERT: Root nodules of leguminous

plants. A chemical study. Acta Chemica Fenn., 28 B,
66 (1.955)

- (69) REIJNDERS, L., L. VISSER, A.M.J. AALBERS, A. VAN KAMMEN
and A. HOUWERS: A comparaison of DNA from free living
and endosymbiotic Rhizobium leguminosarum (strain
PRE). Biochim. Biophys. Acta, 414, 206 - 216 (1.975)
- (70) RIGAUD, J.: Sur la présence d'indolyl-3-aldehyde et d'acide
indolyl-3-carboxilique dans les milieux de culture
de Rhizobium. C.R. Acad. Sci. Paris, 261, 784 (1.965)
- (71) RIGAUD, J.: Synthèse d'acid indolyl-3-lactique et de trypto-
phol par Rhizobium cultivé en présence de trypto-
phane. C.R. Acad. Sci. Paris, 262, 100 - 102 (1.966)
- (72) RIGAUD, J.: Mise en évidence de l'indolyl-3-acetaldehyde lors
du métabolisme du tryptophane par Rhizobium. C.R. Acad.
Sci. Paris, 265, 1.654 - 1.656 (1.967)
- (73) RIGAUD, J.: Sur le métabolisme de la tryptamine par Rhizo-
bium. C.R. Acad. Sci. Paris, 267, 2.216 - 2.219
(1.968)
- (74) RIGAUD, J.: La biosynthese de l'acide indolyl-3-acétique en
liaison avec le métabolisme du tryptophol et de l'in-
dolyl-3-acetaldehyde chez Rhizobium, Physiol. Plant.,
23, 176 - 178 (1.970)
- (75) RIGAUD, J.: L'acide indolyl-3-lactique et son métabolisme

- chez Rhizobium. Arch. Mikrobiol., 72, 297 - 307
(1.970)
- (76) RIGAUD, J. and A. PUPPO; Indole-3-acetic acid catabolism
by soybean bacteroids. J. Gen. Microbiol., 88, 223-
228 (1.975)
- (77) SENEZ, J.: Microbiologie Générale. Masson et cie. Editeurs
Paris. 1.968
- (78) SHANMUGAN, K.T. and R.C. VALENTINE: Molecular biology of
nitrogen fixation. Science, 187, 919 - 924 (1.975)
- (79) SHERWOOD, M.T.: Inhibition of Rhizobium trifolii by yeast
extracts or glycine is prevented by calcium. J. Gen.
Microbiol., 71, 207 - 220 (1.972)
- (80) SKRDLETA, V.: Serological analysis of eleven strains of
Rhizobium japonicum. Antonie van Leeuwenhoek, 35
77 - 83 (1.969)
- (81) SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS: Manual of microbio-
logical methods. Mc.Graw-Hill Book Company, Inc.
New York 1.957
- (82) SOLHEIM, B. and J. RAA: Characterization of the substances
causing deformation of root hairs of Trifolium repens
when inoculated with Rhizobium trifolii. J. Gen. Mi-
crobiol., 77, 241 - 247 (1.973)

- (83) STANIEWSKI, R. and W. KOWALSKA: Typing of Rhizobium meliloti mutants by means of phages. Acta Microbiol. Pol., 6, 183 (1.965)
- (84) STRZELCOWA, A.: The use of the technique of van Schreiven for the taxonomy of Rhizobium strains. Acta Microbiol. Pol., 17, 263 - 268 (1.968)
- (85) SUTTON, W.D.: Some features of the DNA of Rhizobium bacteroids and bacteria. Biochim. Biophys. Acta, 366, 1 - 10 (1974)
- (86) 'T MANNETJE, L.: A re-examination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis. Antonie van Leeuwenhoek, 33, 477 - 491 (1.967)
- (87) TRINCANT, J.C. and J. RIGAUD: Lactate dehydrogenase from Rhizobium. Purification and role in indole metabolism. Physiol. Plant., 32, 394 - 399 (1.974)
- (88) TRUELSEN, T.A.: Indole-3-pyruvic acid as an intermediate in the conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid
I. Some characteristics of tryptophan transaminase from Bean seedlings. Physiol. Plant., 26, 289 - 295 (1.972)
- (89) UEDA, M. and R.S. BANDURSKI: A quantitative estimation of alkali-labile indole-3-acetic acid compounds in dormant and germinating maize kernels. Plant. Physiol., 44, 1175 - 1181 (1.969)

- (90) VINCENT, J.M.: A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook num. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1.970
- (91) VINCENT, J.M.: Comunicación personal
- (92) VINCENT, J.M. and D. HUMPHREY: Taxonomically significant group antigens in Rhizobium. J. Gen. Microbiol., 63, 379 - 382 (1.970)
- (93) VINTIKOVA, H., M. SROGL and V. SKRDLETA: A contribution to the serological typization of the Rhizobium. Folia microbiol (Prague), 6, 243 -249 (1.961)
- (94) WERNER, D., J. WILCOCKSON and B. KALKOWSKI: Nitrogen fixing activity in Rhizobium japonicum separated from plant cell cultures. Z. Naturforsch., 30c, 687 - 688 (1.975)
- (95) WILSON, J.K.: Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. Soil Sci., 58, 61 (1.944)
- (96) WINTER, A.: A hypothetical route for the biogenesis of IAA. Planta (Berl.), 71, 229 - 239 (1.966)

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS

El Tribunal integrado por los abajo firmantes
en esta fecha, para juzgar la Tesis Doctoral

de Angel M. Jimenez Navarro
titulada "Contribución al estudio del género
Arizobolus. Valoración del ácido urico cálico
en la leucemia metastásica"

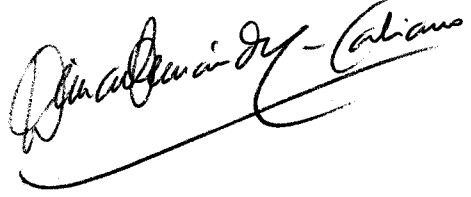
acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
cum laude

Sevilla, 21 de Enero 1977

El Vocal,



El Presidente,



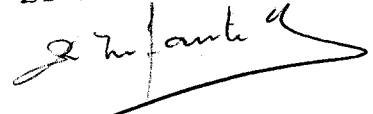
El Vocal,



El Secretario,

B. Valdes

El Vocal,



El Doctorando



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672944