

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CRIPTOBIOSIS DE PLASMIDOS DE *AZOTOBACTER VINELANDII*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA
PRESENTA.

JUAN MANUEL SANCHEZ YAREZ

MONTERREY, N.L.

MAYO 1992

TD
Z532
FCB
1992
S2



1020066521

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CRIPTOBIOSIS DE PLASMIDOS DE *AZOTOBACTER VINELANDII*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
PRESENTA

JUAN MANUEL SANCHEZ YAREZ

MONTERREY, N.L.

MAYO 1992

TD
Z5320
FCB
1992
S2



FONDO TESIS

32609

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

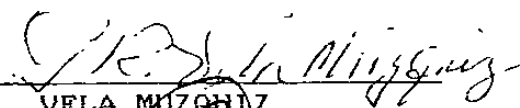
CRIOBIOISIS DE PLASMIDOS DE *Azotobacter vinelandii*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
PRESENTA

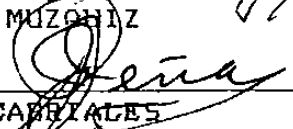
JUAN MANUEL SANCHEZ YAÑEZ

APROBADA
COMISION DE TESIS

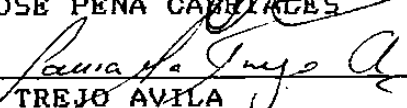
DIRECTOR EXTERNO


DR. ROLANDO G. VELA MIZQUIZ

CODIRECTOR


DR. JUAN JOSE PEÑA CARRIALES

ASESOR INTERNO


DRA. LAURA TREJO AVILA

MIEMBRO DE LA COMISION


DRA. MARIA VALDEZ

MONTERREY, N. L.

MAYO 1992

CRIPTOBIOSIS DE PLASMIDOS DE *AZOTOBACTER VINELANDII*

INDICE

	Pag
RESUMEN	1
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	
a).- Breve reseña histórica sobre <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
b).- Importancia bioquímica y fisiológica de <i>Azotobacter spp</i> y <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
c).- Características de las especies de <i>Azotobacter</i>	5
d).- Plásmidos del género <i>Azotobacter</i>	11
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y METODO	
a).- Origen y tipo de suelos usados.	14
b).- Cuantificación de los microorganismos aerobios sobrevivientes de los suelos texanos almacenados por diferentes períodos.	14
c).- Identificación bioquímica de bacterias Gram negativas aisladas de las muestras de suelos almacenadas por 30 años.	15
d).- Pruebas de resistencia de los aislados de <i>A. vinelandii</i> a antibióticos y agentes químicos.	16
e).- Detección de los ADN-plásmidos en <i>Azotobacter vinelandii</i> .18	
e.1.- Condiciones de cultivo y cepas de referencia.	18
e.2.- Aislamiento de los ADN-plásmidos.	18
e.3.- Electroforesis en gel.	19
e.4.- Tinción y fotografía de los geles.	20
f).- Ensayos sobre la posible función de los plásmidos.	20
g).- Ensayos de eliminación del plásmido (curación).	20

h).- Comportamiento de <i>Azotobacter vinelandii</i> en suelos estériles y no estériles con diferentes tipos de texturas.	21
--	----

RESULTADOS Y DISCUSION

a).- Análisis de las poblaciones de microorganismos aerobios sobrevivientes de suelos texanos almacenados por diferentes períodos.	23
b).- Porcentaje de las bacterias aisladas de los suelos almacenados por diferentes períodos.	25
c).- Densidades de las poblaciones de <i>Azotobacter spp</i> sobrevivientes en suelos almacenados por diferentes períodos.	26
d).- Identificación bioquímica de los aislados sobrevivientes de <i>Azotobacter</i> almacenados por diferentes períodos.	27
e).- Identificación bioquímica de bacterias Gram negativas aisladas de muestras de suelo almacenadas por 30 años. .	28
f).- Patrones de resistencia y susceptibilidad a diversos agentes químicos por aislados de <i>Azotobacter vinelandii</i> recuperados de suelos almacenados por diferentes períodos.	29
g).- Patrones de resistencia y susceptibilidad a compuestos aromáticos por cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> recuperadas de suelos almacenados por diferentes períodos.	29
h).- Patrones de resistencia y susceptibilidad a antibióticos por cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> aisladas de suelos almacenados por diferentes períodos.	30
i).- Patrones de resistencia y susceptibilidad a antibióticos por cepas de <i>A. vinelandii</i> aisladas de suelos almacenados por diferentes períodos antes y después de la eliminación del plásmido.	31
j).- Características generales de los plásmidos detectados en cepas de <i>A. vinelandii</i> asociados a la resistencia a antibióticos.	32
k).- Patrones de resistencia y susceptibilidad a pesticidas por cepas de <i>A. vinelandii</i> aisladas de suelos almacenados por diferentes períodos.	34

l).- Patrones de resistencia y susceptibilidad a pesticidas por cepas de <i>A. vinelandii</i> aisladas de suelos almacenados por diferentes periodos antes y despues de la eliminacion del plasmido.	35
ll).- Caracteristicas generales de los plasmidos de cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> asociadas con la resistencia a pesticidas.	35
m).- Comportamiento de cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> en suelos esteriles y no esteriles con diferentes tipos de texturas.	36
CONCLUSION	67
LITERATURA CITADA	69

INDICE DE TABLAS

1.- Poblaciones de microorganismos aerobios sobrevivientes de suelos texanos almacenados por diferentes períodos .	40
2.- Porcentaje de las bacterias aisladas de suelos almacenados por diferentes períodos	41
3.- Densidades de las poblaciones de <i>Azotobacter spp</i> sobrevivientes de suelos almacenados por 30 años	42
4.- Densidades de las poblaciones de <i>Azotobacter spp</i> sobrevivientes de suelos almacenados por 11 años	43
5.- Densidades de las poblaciones <i>Azotobacter spp.</i> aisladas de suelos recientemente colectados	44
6.- Características bioquímicas de los aislados de <i>Azotobacter vinelandii</i> recuperados de suelos almacenados por diferentes períodos	45
7.- Características bioquímicas de aislados de bacterias Gram negativas sobrevivientes de suelos almacenados por 30 años	46
8.- Patrones de resistencia y susceptibilidad de los aislados de <i>Azotobacter vinelandii</i> recuperados de suelos almacenados por diferentes períodos a diversos agentes químicos y antibióticos	47
9.- Patrones de resistencia y susceptibilidad a compuestos aromáticos por cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> aisladas de suelos recientemente colectados	48
10.- Patrones de resistencia y susceptibilidad a antibióticos por cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> aisladas de suelos almacenados por 30 años	49
11.- Patrones de resistencia y susceptibilidad a diferentes antibióticos por cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> aisladas de suelos recientemente colectados	50
12.- Patrones de resistencia y susceptibilidad a antibióticos por cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> PLA ⁺ y PLA ⁻ aisladas de suelos almacenados por 30 años	51
13.- Patrones de resistencia y susceptibilidad a antibióticos por cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> PLA ⁺ y PLA ⁻ aisladas de suelos recientemente colectados	52

RESUMEN

CRIPTOBIOSIS DE PLASMIDOS DE *AZOTOBACTER VINELANDII*

La bacteria *Azotobacter vinelandii* es importante en la microbiología agrícola y el ciclo del nitrógeno, por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. *A. vinelandii* puede ser aislada de suelo, agua y rizósfera de algunas gramíneas, en medios minerales libres de nitrógeno con una fuente sencilla de carbono. Con ciertas cepas se han realizado investigaciones, en un intento por entender su papel en la naturaleza. A 80 años de su descubrimiento, su genética es bien conocida en algunos aspectos que se relacionan con los genes de la fijación biológica del nitrógeno molecular, sin dilucidar la influencia de plásmidos en la bioquímica y fisiología de *Azotobacter*. Recientemente se publicó que cepas de *A. chroococcum* y *A. vinelandii* contenían plásmidos sin aparente actividad biológica (crípticos). Este estudio tuvo como principal propósito detectar y analizar la presencia de plásmidos con actividad funcional en aislados de *Azotobacter vinelandii* recuperados de suelos almacenadas por 30 años. Por lo que suelos conservados en contenedores de vidrio estériles a temperatura ambiente por 30 años, fueron inoculados directamente en agar Burk, colonias sospechosas de pertenecer a *A. vinelandii* se identificaron bioquímicamente. Los plásmidos detectados en los aislados se les intentó asociar con algunas de sus actividades biológicas. Los resultados mostraron que los aislados de *A. vinelandii* contienen en apariencia un plásmido de diferente peso molecular entre 20 a 48 MDa, asociados con la resistencia a algunos antibióticos y pesticidas, sin afectar la fijación biológica de nitrógeno gaseoso, síntesis del pigmento fluorescente verde ó formación de quistes. Lo que se confirmó por la eliminación (curación) de los plásmidos en las cepas con agentes químicos. Estos

resultado corroboraron : (I) la existencia de plásmidos en las cepas de *A. vinelandii* y (II) señala por primera vez la criptobiosis de plásmidos en cepas de bacterias sobrevivientes en suelos almacenados por 30 años. Finalmente para establecer la influencia del plásmido sobre la capacidad de crecimiento y sobrevivencia de la bacteria en suelo, cepas de *A. vinelandii* con y sin plásmido fueron introducidas en suelos estériles y no estériles. Los resultados bajo condiciones de esterilidad, sugirieron algunos efectos sobre la velocidad y capacidad de crecimiento de una cepa de *A. vinelandii* con plásmido, aislada de suelos almacenados por 30 años y ninguno en una cepa aislada de los suelos recién colectados. Mientras que en los suelos no estériles sólo una cepa con plásmido aislada de los suelos almacenados por 30 años sobrevivió por más de 15 días. Aunque lo anterior no es concluyente, sí parece indicar que el plásmido y ciertas características bioquímicas y fisiológicas que transportan pueden ser estables y expresarse (por inducción específica) en bacterias nativas del suelo. Se requieren estudios ecológicos para aclarar el efecto de los plasmidos sobre el crecimiento y/o sobrevivencia de *A. vinelandii* en el suelo.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

a).- BREVE RESEÑA HISTÓRICA SOBRE AZOTOBACTER

En 1840 Wilfarth, Hellriegel, Riegel y Bertlot citados por Thompson y Skerman (234) demostraron que cierta cantidad de nitrógeno atmosférico llega al suelo por la acción de microorganismos, que asociados con las raíces de plantas leguminosas tienen la capacidad de transformar el nitrógeno molecular en proteínas vegetales constituyendo un aspecto fundamental del ciclo del nitrógeno. Tiempo después se especuló la existencia de otros microorganismos que podrían fijar el nitrógeno del aire sin la asociación con plantas. En 1898 Winogradsky (251) aplicó una nueva forma para aislar esas bacterias fijadoras de nitrógeno del aire y como resultado se obtuvo por primera vez, la bacteria anaeróbica estricta conocida como *Clostridium pasteurianum*. Diez años después, Beijerinck en Holanda (30, 31) repitió los trabajos de Winogradsky, pero con la intención de encontrar alguna bacteria aeróbica capaz de fijar nitrógeno molecular. Al agregar pequeñas cantidades de suelo en matraces erlenmeyer que contenían medio de sales minerales libres de amoníaco, nitrato o cualquier otra forma de nitrógeno combinado, enriquecida con manitol como fuente de carbono, en tres días se desarrolló una delgada película de bacterias en la superficie del líquido, el cual se tornaba turbio. En el microscopio observaron grandes células Gram (-) en forma de bastón, muy diferentes a la única bacteria conocida fijadora de nitrógeno de este tiempo, *C. pasteurianum*. De esta manera se describió por primera vez el género nombrado por Beijerinck como: *Azotobacter* y dos especies, *A. chroococum* y *A. agile*. La primera común en el suelo y la segunda en los canales de la ciudad de Delft. Dos años más tarde, Lipman (154, 155) describió una tercera especie, *A. vinelandii* aislada de la

ciudad de Vineland, N.J., EUA. Desde entonces se han desarrollado muchas investigaciones para evaluar el papel del género *Azotobacter* en el ciclo del nitrógeno, especialmente en la fijación biológica de nitrógeno.

b).- IMPORTANCIA BIOQUIMICA Y FISIOLOGICA DE *AZOTOBACTER SPP* Y
A. VINELANDII

El género *Azotobacter* es de interés en bioquímica y fisiología microbiana, debido a que tiene una de las más altas tasas respiratorias (medida por el porcentaje de asimilación de oxígeno y producción de $\text{CO}_2 = \text{mol O}_2/\text{molCO}_2$) que cualquier otro organismo vivo (10).

El género *Azotobacter* es un modelo para la investigación de la fijación biológica del nitrógeno molecular. En el cual este gas es reducido a amonio, en este proceso de transformación del nitrógeno atmosférico participa un sistema de enzimas colectivamente llamadas nitrogenasa (7, 23, 24). El cual esta formada por dos componentes nitrogenasa I y reductasa de nitrogenasa II o nitrogenasa II (28, 33, 35, 36). Ambos componentes contienen hierro y el componente I contiene también molibdeno (37, 38). El centro activo de la nitrogenasa II se inactiva por el oxígeno (39, 40). Estas enzimas fueron aisladas y purificadas por Burris en 1971 (41) principalmente a partir de *Azotobacter vinelandii* la cual tiene la capacidad genética de producir tres nitrogenasas distintas. nitrogenasa-1 sintetizada cuando la concentración de molibdeno es suficiente para la bacteria, nitrogenasa-2 expresada cuando el molibdeno ha sido reemplazado por vanadio y nitrogenasa-3 sintetizada cuando la concentración de molibdeno y vanadio no son suficientes para la bacteria (40, 45, 66, 135). La nitrogenasa no es específica para el nitrógeno gaseoso(49), sino que también reduce otros compuestos de estructura química

semejantes al nitrógeno molecular como el cianuro, acetileno e hidrógeno (33, 35). La actividad natural de los microorganismos que fijan el nitrógeno del aire, es relativamente fácil de medir por la técnica de reducción del acetileno a etileno, que por otras formas de medición de la fijación biológica del dinitrógeno (88, 118).

c).- CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE *AZOTOBACTER*

Las especies del género *Azotobacter* son miembros importantes de ciertos tipos de suelo (35, 200, 255), de la rizósfera de algunas gramíneas (47, 209) y en la filosfera de algunas plantas acuáticas (131), donde podrían contribuir sustancialmente a la ganancia de nitrógeno a través del mecanismo de fijación biológica de nitrógeno molecular (28, 33, 251). En la actualidad se investigan, otras formas de beneficio de *Azotobacter* para la fertilidad del suelo tales como: la solubilización de fósforo inorgánico, en suelos con problema de disponibilidad de este elemento (20, 193).

En los microorganismos autóctonos del suelo, existe la capacidad de oxidación de ácidos fenólicos derivados de residuos vegetales, como la lignina considerada una de las fracciones de la materia orgánica más abundante del suelo, aunque *Azotobacter* es una bacteria nativa del suelo (1, 4, 6) pocos reportes (177, 258) le reconocen la capacidad de utilizar los ácidos fenólicos como fuente de carbono y energía, lo que podría explicar el crecimiento, sobrevivencia y distribución universal del género *Azotobacter* en los suelos del mundo (196, 199, 211).

Actualmente algunos biotecnólogos agrícolas planean aplicar *Azotobacter* en ciertos suelos donde la acumulación de ácidos fenólicos causa fitotoxicidad a cultivos agrícolas de importancia comercial (Vela comunicación personal).

Las especies del género *Azotobacter* pueden influir positivamente en el crecimiento de plantas porque tienen la capacidad de sintetizar fitohormonas en la rizósfera de gramíneas (211): como caña de azúcar, maíz, trigo, sorgo y algunos pastos tropicales, en especial *Paspalum notatum* (21, 47), efectos similares pueden lograrse cuando se inoculan en semillas y raíces jóvenes de otras plantas (13, 48, 129). Una ventaja del género *Azotobacter* sobre otros microorganismos que producen fitohormonas, es que pueden producirlas in vitro, en medios de cultivo sintéticos simples (52, 107, 227), en suelo dializado (medio que asemeja las condiciones del suelo natural (104) , o "in situ" (102). Los datos anteriores apoyan el punto de vista de que estas sustancias son en realidad el mecanismo más probable por el cual *Azotobacter* tiene un efecto positivo sobre el desarrollo vegetal, más que por la vía de fijación biológica del nitrógeno (82). El género *Azotobacter* puede ser usado en la producción de vitaminas y aminoácidos (103a, 112, 151), sustancias antitumorales (92), alginatos (65) y hasta como suplemento alimenticio de ganado vacuno y peces (211).

Las azotobacterias tienen la capacidad hidrolizar anillos aromáticos comunes en pesticidas (17, 119, 167), esta capacidad genética puede estar codificada en ADN cromosomal o plásmidos (16, 18, 216) y puede ser inducida y expresada en condiciones naturales (218), cuando las concentraciones de los pesticidas afectan negativamente a otros microorganismos nativos del suelo (209, 210, 252), lo que sugiere que las azotobacterias han encontrado mecanismos de intercambio genético muy eficientes en la naturaleza (207) para sobrevivir al efecto bactericida de algunos pesticidas de uso común en la agricultura moderna (252), por tanto es factible que aplicar azotobacterias a suelos contaminados con pesticidas para su bioremediación (86, 164).

El género *Azotobacter* tiene capacidad de formar quistes (57, 58, 59), modificaciones estructurales y fisiológicas de su células vegetativas con resistencia a: la desecación (124, 210, 251), desintegración mecánica (246, 247), radiación ultravioleta e ionizante (245), contra ciertos tipos de predación (113) y antagonismo microbiano en suelo libre de raíces (46, 213). En contraste con las endosporas, los quistes de *Azotobacter* no son resistentes al calor ni completamente inactivos, ya que bajo determinadas condiciones oxidan con rapidez fuentes exógenas de energía. Parece ser que la cubierta del quiste, es la que confiere la resistencia a factores ambientales, pues cuando los quistes se tratan con agentes quelantes de metales, como el citrato de sodio, se origina la solubilización de las capas externas y los quistes pierden la resistencia a agentes físicos y químicos (213). En la naturaleza se cree que *Azotobacter* es inducido a formar quistes por los mencionados agentes físicos y químicos, sin que esto se haya demostrado experimentalmente ni reportado en la literatura (Reddy y Vela 1986) (datos sin publicar). Mientras que cuando *Azotobacter* se cultiva artificialmente el n-butanol y el β -hidroxibutirato como fuente carbono existe una rápida y abundante formación de quistes (213), esta capacidad de formación de quistes de la bacteria se utiliza para su identificación primaria y separación de otros miembros de la familia *Azotobacteracea* (56, 234).

Actualmente se sabe que *Azotobacter* puede sintetizar sideróforos, proteínas inducidas como una respuesta fisiológica a la deficiencia de iones metálicos en el medio ambiente (117, 142), se cree que la producción de estas proteínas es un posible mecanismo de sobrevivencia de la bacteria en suelos minerales pobres. Algunos fitopatólogos han

planeado inocular *Azotobacter* en semillas y raíces de plantas jóvenes, como medida de protección contra microorganismos fitopatógenos de la rizósfera, para que por competencia de iones metálicos eviten la acción de los fitopatógenos, que dependen de estos iones para su establecimiento en la zona de rizósfera (117, 142).

La información anterior sobre *Azotobacter vinelandii*, parte de la literatura actual (7, 234) y la última edición del manual de Bergey (143) señalan que la especie pertenece a la familia *Azotobacteraceae*, con las siguientes características: es un bacilo Gram negativo, móvil por flagelos peritricos, heterotrófico, aerobio estricto, capaz de fijar nitrógeno molecular al oxidar una fuente de carbono sencilla como: glucosa o manitol. Capaz de formar quistes por inducción con n-butanol, miembro en la naturaleza de diversos ecosistemas: agua dulce y marina, rizósfera de algunas gramíneas, distribuido regularmente en el suelo. Esta descripción del género *Azotobacter* fué establecida en base al cultivo de la bacteria en medios químicamente definidos libres de cualquier forma de nitrógeno combinado (88, 249).

En general la fijación biológica del nitrógeno molecular por *Azotobacter spp* se considera el aspecto de mayor relevancia por la literatura científica, que cualquier otra actividad biológica de las atribuida a este género (45, 185, 186).

La capacidad de fijación del dinitrógeno por *Azotobacter spp* no es la única ni principal indicadora del papel de la bacteria en la naturaleza, investigaciones recientes (103b, Vela comunicación personal) cuestionan la capacidad de *Azotobacter* para fijar nitrógeno molecular en el suelo, ya que

experimentos de inoculación de *A. vinelandii* en suelos y medios de suelo dializado con diversas concentraciones de nitrógeno combinado y pobres en carbono orgánico sencillo, no lograron detectar fijación biológica de nitrógeno gaseoso medido por la técnica de reducción de acetileno. Lo que sugiere que las condiciones específicas que requiere *Azotobacter* para efectuar la fijación biológica de nitrógeno molecular con dificultad pueden presentarse en el suelo, en especial porque siempre existe en los suelos concentraciones de nitrógeno combinado suficientes para inhibir la reducción biológica del dinitrógeno (257) y probablemente la razón más importante que limita la actividad de fijación biológica de nitrógeno gaseoso es la ausencia de cantidades abundantes (mas de 1%) de carbono orgánico simple, ya que *Azotobacter* deberá oxidar una unidad de azúcar simple para producir de 5-20 mg de nitrógeno reducido, esta cantidad sólo se proporciona a la bacteria en condiciones artificiales, por lo tanto el enriquecimiento con carbohidratos al suelo sería una práctica económicamente poco factible para aplicarse en la agricultura. (49, 105, Vela 1986 comunicación personal).

Los miembros de la familia *Azotobacteraceae* de acuerdo con el manual de Bergey (143) carecen de ciclo biológico cuando se desarrollan en condiciones naturales, aunque desde 1909 Lönhis y Westermann (159), Lönhis y Smith (160, 161), Lewis (158) y Jones (136) publicaron que miembros de la familia poseen ciclos biológicos complejos solo detectables en los suelos natural o en medios de suelos dializados y que ciertos estadios de los ciclos eran los responsables de la sobrevivencia de la familia en el suelo. De acuerdo con estos trabajos algunos estadios responsables de la sobrevivencia de las bacteria en el suelo podían atravesar filtros que retienen a la mayor parte de las bacterias conocidas y mostraban un

comportamiento fisiológico diferente en condiciones de cultivo artificial; en 1950 Jensen (134) refutó todos estos trabajos al señalar que la selección inadecuada de filtros bacterianos usados en esas investigaciones, permitió que bacterias atravesaran los filtros y desarrollaran colonias, por lo que las bacterias obtenidas no pertenecían en realidad a la familia *Azotobacteraceae* y concluyó que ningún miembro de la familia posee ciclo biológico. Finalmente en 1981 González-López y Vela (103), repitieron los trabajos que apoyan el ciclo biológico con el uso de filtros bacterianos de calidad reconocida (0.45 μ), comprobaron que en efecto los miembros de la familia *Azotobacteraceae* poseen ciclos biológicos complejos y que ciertos estadios son filtrables, no crecen en medios libres de nitrógeno y son incapaces de fijar nitrógeno molecular. Sin embargo la literatura científica ha ignorado esta investigación.

Estos no son los únicos argumentos que intentan cambiar el concepto de *Azotobacter* en la microbiología. En 1984 Smith y Vela (221) (datos sin publicar) usaron un medio de suelo dializado que contenía algunos de los ácidos fenólicos más comunes derivados del humus y encontraron que *Azotobacter vinelandii* creció con valores de carga energética (parámetro metabólico que determina indirectamente el estadio fisiológico de la célula) que fluctuaron entre 0.23 a 0.35, muy inferior a lo que se esperaba de 0.70 y 0.80 que corresponde a los valores normales de *Azotobacter* cuando se cultiva en un medio químicamente definido (2) con glucosa como fuente de carbono y energía, lo que significa que según el concepto de Atkinson (2, 10) y Marriot et.al. (173) las células de *Azotobacter* estarían inactivas y no en crecimiento, por lo que Smith y Vela op cit establecieron que el valor de la carga energética cuando *Azotobacter* crece en medio de suelo

dializado se debe al tipo de fuente de carbono y energía y no a la fase específica de la curva de crecimiento. La anterior investigación fué apoyada por Moreno (177) y Wu et.al. (258) al demostrar que *A. vinelandii* utilizó una amplia variedad de ácidos fenólicos: entre ellos p-hidroxibenzoico como fuente de carbono y energía, común en el suelo.

d).- PLASMIDOS DEL GENERO AZOTOBACTER.

El género *Azotobacter* contiene copias múltiples de su genoma (197, 212), de ahí la dificultad para obtener mutantes, aunque la genética de *Azotobacter* en relación a el sitio, regulación y expresión de los genes que codifican para la fijación biológica de nitrógeno gaseoso han sido intensamente estudiados y actualmente estos genes son bien conocidos en *Azotobacter* (36, 37, 38), otros trabajos sugieren que este comportamiento genético puede ser debido a plásmidos, los cuales contienen copias múltiples de su genoma (169, 175) o por lo menos a que *Azotobacter* tiene una carga genética superior a la de los procariotes más conocidos como *Escherichia coli* (215).

En relación a los plásmidos Yano et.al. (260) reportaron plásmidos de *A. vinelandii* que contenían genes *nif*, mientras que Robson et.al. (206) en el mismo año, no pudieron establecer relación alguna entre plásmidos detectados en cepas de *A. chroococcum* y su capacidad de fijación biológica de nitrógeno molecular, resistencia a: antibióticos, metales pesados, radiación de luz ultravioleta y utilización de diversas fuentes de carbono. De igual manera, Maia et.al. (169) detectaron plásmidos en diferentes cepas de *A. vinelandii* sin lograr asociar algunas de las propiedades bioquímicas y fisiológicas señaladas en *A. chroococcum* con la presencia de estos plásmidos, por lo que en ambos trabajos los plásmidos fueron clasificados como crípticos.

Es propósito de esta investigación contribuir a la aclaración de la controversia sobre la función de los plásmidos, asociados con cepas de *Azotobacter vinelandii* sobrevivientes en suelos almacenados por 30 años.

- 1.- ¿Como conservaron las azotobacterias los ADN-plasmídicos durante este periodo ?

- 2.- ¿Existen similitudes entre los plásmidos de las cepas de *A. vinelandii* sobrevivientes en suelos almacenados por 30 años a los detectados en cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos recién colectados ?

- 3.- ¿Influyeron estos plásmidos en la sobrevivencia y/o permanencia de *Azotobacter* en los suelos ?

HIPOTESIS

Azotobacter vinelandii contiene plásmidos que, simultáneamente a la viabilidad de sus células, han conservado su capacidad de expresión génica, no obstante ser recuperadas de suelos almacenados por largos períodos.

OBJETIVOS

- 1) Analizar las poblaciones de microorganismos sobrevivientes de suelos colectados y almacenados por 30 años, con especial interés en las poblaciones sobrevivientes de *Azotobacter spp* y *Azotobacter vinelandii* que contienen plásmidos.
- 2) Demostrar que cepas las sobrevivientes de *Azotobacter vinelandii* recuperados de suelos almacenados por largos períodos pueden preservar (criptobiosis) plásmidos con capacidad de expresión genica.
- 3) Asociar la presencia de plásmidos en cepas sobrevivientes de *Azotobacter vinelandii* aisladas de suelos almacenados por 30 años con algunas de sus características fisiológicas y bioquímicas.

MATERIAL Y METODOS

a).- ORIGEN Y TIPO DE SUELOS USADOS

Un total de 40 muestras de suelos colectadas en las áreas de Austin, Fort Worth y Denton Texas, E.U.A. en diferentes años fueron utilizadas en esta investigación. De un total de 18: 11 fueron de tipo chernozem y 7 de tipo arenoso, según descripción de Moreno et al (178). Los suelos se almacenaron en el laboratorio a temperatura ambiente (25.5 +/- 1.7°C) por 30 años, tres suelos por 11 años: dos de las series Burleson y uno de la serie Crockett y 19 suelos recién colectados: nueve de las series Birome, seis de las series Burleson y cuatro de las series Crockett. De acuerdo con la clasificación de suelos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para el estado de Texas (229). Los suelos se conservaron en viales estériles abiertos sólo el día de su análisis.

b).- CUANTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS SOBREVIVIENTES DE LOS SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

Con el propósito de establecer el número de microorganismos sobrevivientes en cada suelo. Los viales fueron colocados en un sitio esterilizado con radiación ultravioleta, libre de polvo y con una gasa estéril empapada con etanol al 70% fueron abiertos y flameados. Se tomó 1.0 g de cada suelo se suspendieron en tubos de 18 x 150 mm con 9 ml de solución salina (NaCl 0.85 % p/v) pH 7.0, cada muestra de suelo se agitó 30 segundos en un Vortex (VWR Scientific, Boston, Ma) agregó 0.2 ml de cada suspensión y sembro en diferentes medios de cultivo con la siguiente composición química:

1).- Agar Nutritivo (AN): extracto de carne 8.0 g, peptona 5.0 g, agar 15.0 g, agua destilada 1000 ml (Difco. Detroit, Mich), para enumerar las bacterias aerobias totales (64, 171, 226).

2).- Agar Caseína Almidón (ACA): caseína 10.0 g, almidón soluble 2.0 g, KNO_3 2.0 g, NaCl 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ trazas, K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $CaCO_3$ 0.02 g, agar 18.0 g, (Difco. Detroit. Mich), agua destilada 1000 ml. pH 7.2 , para enumerar los actinomicetos (132, 137, 139).

3).- Agar Rosa de Bengala-Estreptomicina (ARBE): glucosa 10.0 g, peptona 5.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, rosa de bengala 33 mg, agar, 15 g, (Difco. Detroit, Mich) agua destilada 1000 ml, pH 3.8 ajustado con H_2SO_4 0.1 N, sulfato de estreptomicina (Sigma. Co. San Luis, Mo) se esterilizó por filtración y agregó al medio base después de esterilizar en autoclave y enfriar para una concentración final de 20 μ g/ml. para enumerar los propágulos sobrevivientes de hongos y levaduras (87, 176).

4).- Agar Burk (AB): glucosa 5.0 g, KH_2PO_4 0.16 g, K_2HPO_4 0.64 g, NaCl 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05 g, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01 g, $FeSO_4$ 0.003 g, agua destilada 1000 ml, pH 6.8 para enumerar las azotobacterias y bacterias afines (90, 214).

Cuando las poblaciones microbianas fueron abundantes se usaron las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} de los suelos con tres repeticiones. Los medios de cultivo AN, ACA y AB inoculados se incubaron una semana a 30°C. Los valores de las cuentas se transformaron al logaritmo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo seco de cada población microbiana.

Para la determinación de la tasa y por ciento de las bacterias Gram-negativas, Gram-positivas: formadoras de esporas y no esporuladas, se tomaron 100 colonias cultivadas en agar nutritivo de cada suelo y se observaron al microscopio por tinción al Gram (68, 69).

c).- BIOQUIMICA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS AISLADAS DE LAS MUESTRAS DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

Para el aislamiento de *Azotobacter spp* y *A. vinelandii* sobrevivientes de los suelos almacenados por 30 años se sembró directamente de los suelos (0.1 g) en cajas de AB. Las colonias que desarrollaron un pigmento fluorescente verde, se separaron y sembraron en agar nutritivo para observar el pleomorfismo de los aislados sospechosos de *Azotobacter*, se uso un microscopio de contraste de fases (134, 143, 249). Mientras que para la inducción de los quistes en los aislados de *Azotobacter* se usó n-butanol (Sigma. Co. San Luis, Mo.) al 0.3 % (v/v) como sustituto de glucosa en el medio AB.

Se usó la técnica de reducción de acetileno para la medición indirecta de la capacidad de fijación de nitrógeno de los aislados de *Azotobacter* y para su identificación las pruebas bioquímicas requeridas fueron: utilización de diferentes fuentes de carbono, para esta prueba se empleó el medio Burk como base y la adición de la fuente específica de carbono en concentración de 0.5 % (p/v), las que se esterilizaron por filtración con membrana milipore de 0.2 μ m (Biotech. Riverton, NJ). Para determinar la variación de pH se agregó azul de bromotimol 0.02 g/l (Sigma. Co San luis, Mo). Esta prueba fué realizada en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con tapón de rosca y repetida en caja de petri con discos de papel filtro impregnados con la fuente de carbono seleccionada, todos los ensayos se realizaron con suspensiones

de *A. vinelandii* de 24 hrs suspendidas en solución salina 0.85 % (143, 178).

De las muestras de suelos almacenados por 30 años se aislaron en agar nutritivo algunas colonias (10 de cada 100 consideradas semejantes) y que microscópicamente no se relacionaron con los géneros *Azotobacter spp* o *Bacillus spp*, tiñeron al Gram y se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: crecimiento en anaerobiosis, citocromo oxidasa, formación de ácido y gas de glucosa y lactosa, producción de acetil metil carbinol (Vogues-Proskauer), utilización de citratos como única fuente de carbono, hidrólisis de urea, movilidad, formación de H₂S e indol (49, 74, 143).

d).- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* A ANTIBIOTICOS Y AGENTES QUIMICOS

Para esta prueba fueron usados agar nutritivo y agar Burk como base para determinar la resistencia de los aislados de *A. vinelandii* a antibióticos (162, 187) impregnados en sensidiscos con las siguientes concentraciones en µg/ml: CM cloranfenicol 25.0, SM estreptomina 25.0, TC tetraciclina 15.0, AP ampicilina 15.0, CB carbencilina 15.0, K kanamicina 1.0, NA ácido nalidíxico 20.0, R rifampicina 10.0, GM gentamicina 10.0, E eritromicina 10.0, B bacitracina 10.0, VA vancomicina 30.0 (Sigma. Co. San Luis).

Ademas de este ensayo se estableció uno para estudiar la resistencia de los aislados de *A. vinelandii*: 1) fenol 0.5 % (o/v), 2) benzoato de sodio 0.5 % (p/v), 3) fluoruro de sodio 0.01 M (234), 4) tolueno 0.1 % (v/v), 5) xileno 0.1 % (v/v) (Sigma. Co. San Luis) (230). Así como en los pesticidas: 1) Sonar 0.1 g/l, 2) Diquat 0.1 g/l, 3) Koplex 0.1 g/l, 4) Endothall 0.1 g/l, 5) 2,4-D 0.1 g/l, 6) K. Tea 0.1 g/l 7)

Karmex 0.1 g/l y B) Aquazine 0.1 g/l (Aldrich. Co. Milwaukee) (16, 17, 18, 19) con sensidiscos por observación del crecimiento o inhibición de los aislados después de una semana de incubación a 30°C (250).

Los aislados de *A. vinelandii* de los suelos se compararon con la cepa de colección *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 y simultáneamente se conservaron en AB y AN.

e).- DETECCION DE LOS ADN-PLASMIDICOS EN *AZOTOBACTER VINELANDII*

e.1).- Condiciones de cultivo

Las 12 cepas de *A. vinelandii*, 7 aisladas de los suelos almacenados por 30 años se designaron: Old-8, Old-R, Old-8i, Old-83, Old-8b, Old-E y Old-81, 5 cepas aisladas de los suelos recién colectados: L-2, D-1, S-6A, UW-A1 y 2489, al igual que 4 cepas de *Escherichia coli* con ADN-plásmido de peso molecular conocido: Col E1 (4.2 MDa), R6-5 (61 MDa), RP4 (34 MDa) y R6-k (24.7 MDa) se usaron como referencia (168), se cultivaron en matraces de 3000 ml con 1000 ml de caldo Burk enriquecido, con 1.0 % de Bacto-peptona y 5.0 % de extracto de levadura (Difco, Detroit, Mich) (92, 249).

Los matraces se incubaron a 28°C durante 2 días en agitación rotatoria a 250 rpm, hasta que las células alcanzaron una densidad óptica de 0.8 - 1.0, por medición en espectrofotómetro Bauch y Lomb 20, a 600 nm (169).

e.2).- Aislamiento de ADN-plásmidicos

Las células de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*, se cosecharon en una centrifuga refrigerada (modelo Superspeed RC2-B, Sorvall, San Francisco, CA) a 6000 X g por 20 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se

resuspendió en 1 ml de regulador E (solución de 40 mM de Tris-Tham-Tris, Hidroximetil aminometano (Fisher. Co. Fairlawn, NJ), se mezcló con 1.5 mM de ácido etilen diamino tetracético y el pH se ajustó a 7.0 con ácido acético glacial), dos ml de regulador de lisis fueron añadidos al paquete celular. Este regulador fué una solución acuosa de 1.5 % (p/v) de dodecil sulfato de sodio (Fisher, Co. Fairlawn. NJ), en 40 ml de regulador Tris. El pH se ajustó a 12.5 con una solución 2 N de NaOH, se mezcló suavemente la suspensión, se incubó en baño de agua a 65°C, por 60 minutos, luego 6 ml de una solución fenol-cloroformo (Fisher, Co. Fairlawn, NJ) 1:1 (v/v), fué agregada delicadamente invirtiendo el tubo una sola vez para mezclar. La suspensión celular fué centrifugada a 7500 x g por 15 minutos. La fase acuosa derivada de las células lisadas que se observó en la mezcla contenía las moléculas solubles con ADN y ARN, fueron colectadas con una pipeta plástica (Drummond. C. Samco. San Francisco, Ca) y se transfirieron a tubos de 5 ml para almacenarse a 4°C hasta su análisis por electroforesis en gel. La interfase que se formó rica en ADN cromosomal se desechó de acuerdo con: Hada y Sizemore (114), Hardman et.al. (120), Hill y Carlisle (128), Holben et.al. (130) y principalmente Kado (146).

e.3).- Electroforesis en gel

Un gel de agarosa horizontal (Marine Colloids. Co. Rockland, Me) se uso para la detección de los plásmidos. Los geles fueron preparados con 0.7 % (p/v) de agarosa (Sigma. Co. San Luis, Mo) para separar los plásmidos, mientras que una concentración de 0.4 % (p/v) de agarosa se uso para la determinación del peso molecular de los plásmidos (170). El aparato de electroforesis (modelo LKB. Broma, Sweden). se manejó con una corriente de 18 V y 120 V (169). En los geles de agarosa se analizaron 9 μ l de las muestras con 3 μ l de

revelador compuesto por una solución acuosa con 20 mg/ml de dodecil sulfato de sodio SDS (Sigma. Co. San Luis, Mo) y 1 ml de azul de bromotimol 7 M (174).

e.4).- Tinción y fotografía de los geles

Para la detección y observación de los ADN-plasmidicos, los geles de agarosa fueron teñidos por 3 minutos con una solución de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma. Co. San Luis, Mo), diluido en 1000 ml de amortiguador E, después se lavaron en el mismo amortiguador E. Se colocaron en el Transiluminador (modelo 3-3000, Fotodyne. Inc. New Berlin) y se fotografiaron con una cámara Polaroid (CU-5 Land tipo 665) provista de un filtro No. 25 naranja (Eastman. Kodak. Co. Rochester), con un tiempo de exposición de 2.5 minutos (63, 170). Todo el material de vidrio fué previamente esterilizado para eliminar la actividad de nucleasas, y se usaron guantes de látex para prevenir contaminación de las muestras con nucleasas de la piel (170).

f).- ENSAYO SOBRE LA POSIBLE FUNCION DE LOS PLASMIDOS

Detectados los plásmidos en las 12 cepas de *A. vinelandii*, se utilizaron los resultados de la caracterización bioquímica de la resistencia a los antibióticos y otros agentes químicos, la capacidad de fijación biológica del nitrógeno y la síntesis del pigmento fluorescente verde como base para establecer alguna relación entre esas características y los plásmidos (127, 191, 206).

g).- ENSAYO DE ELIMINACION DE PLASMIDO (CURACION)

Para verificar que los plásmidos estaban relacionados con alguna de las características bioquímicas y/ó pruebas de resistencia realizadas, las 12 cepas de *A. vinelandii* se inocularon en medio Burk enriquecido (65) con triptona 0.5 % y

extracto de levadura 0.25 % (Difco. Detroit, Mich) adicionados con dodecil sulfato de sodio. (SDS) 0.625 g/l, naranja de acridina (NA) Sigma. Co. San Luis, Mo) 0.25 mM y bromuro de etidio (BE) 0.125 mM. Este medio de cultivo fué preparado en matraces de 500 ml con 150 ml de volumen de trabajo. Los matraces se agitaron a 250 rpm por tres días a 37°C, para luego recuperar las células en agar Burk y/o AN, se repitieron los ensayos de utilización de diversas fuentes de carbono, patrón de resistencia a antibioticos y agentes quimicos, reducción de acetileno y síntesis de pigmento fluorescente verde, realizando la técnica de extracción, purificación, caracterización de los plásmidos y electroforesis en gel para comprobar la eliminación (curación) del plásmido por efecto de SDS, NA y BE (79, 169).

h).- COMPORTAMIENTO DE *AZOTOBACTER VINELANDII* EN SUELOS ESTERILES Y NO ESTERILES EN DIFERENTES TIPOS DE TEXTURAS

Con el propósito de observar el efecto de la presencia y/o ausencia de los plásmidos sobre el comportamiento de las cepas de *A. vinelandii* L-2 y OLD-81 fueron inoculadas en suelos estériles y no estériles de las series Burleson y Crockett. En viales de 20 ml con tapón de rosca se les agregó 10 g de suelos secos y tamizados, los suelos fueron esterilizados en autoclave 121°C por una hora durante tres días. Las células de *A. vinelandii* fueron activadas en agar Burk 48 h, lavadas con solución salina 2 veces por centrifugación a 3000 rpm/15 minutos, para resuspender el paquete celular en amortiguador de fosfatos pH 7.0. Estas células fueron incubadas por 48 h a temperatura ambiente, lavadas de nuevo por centrifugación con solución salina, la suspensión celular fué ajustada a 2.0×10^3 bacterias/ml e inoculadas en los 10 g de suelo (126, 179). Para registrar el comportamiento de las cepas en los suelos se realizaron cuentas viables a intervalos variables (198).

Para registrar la sobrevivencia de las cepas de *A. vinelandii* L-2 y OLD-81 en los suelos no estériles, las células fueron preparadas como se describió previamente, inoculando 1×10^6 células/ml en 10 gramos de suelo (67, 102). La selectividad del agar Burk se basó en la adición de: cloranfenicol 25 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma. Co. San Luis), benzoato de sodio al 0.5 % (p/v), micostantin 0.1 g/l (p/v) (Sigma. Co. San Luis) y fenol 0.2 % (p/v) (Aldrich. Co. Milwaukee) (115, 141), con sustitución de glucosa por ramosa (Difco. Detroit), como única fuente de carbono. realizando cuentas viables a intervalos de 5 días durante 15 días.

RESULTADOS Y DISCUSION

A.- ANALISIS DE LAS POBLACIONES SOBREVIVIENTES DE MICROORGANISMOS AEROBIOS DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

En la Tabla No 1. se muestran las poblaciones de los microorganismos sobrevivientes de los suelos del estado de Texas. Las bacterias como se ha reportado fueron el grupo de sobrevivientes mas numeroso encontrado, a pesar del tiempo de almacenamiento de algunas de las muestras de los suelos. Por lo que la diferencia entre el promedio de las densidades de las poblaciones bacterianas de los suelos almacenados por 30 años fué de 1.2×10^6 UFC/ g de suelo seco, dos unidades exponenciales menos que el promedio de las poblaciones homólogas aisladas de los suelos recién colectados de 3.0×10^8 UFC/ g de suelo seco y el menor promedio de las densidades de las poblaciones de bacterias sobrevivientes encontrado fué en los suelos almacenados por 11 años de 5.2×10^4 / g de suelo seco (2 y 4 unidades exponenciales menos en relación al promedio de las poblaciones bacterianas de los otros suelos respectivamente). Lo que sugiere que: la capacidad de resistencia fisiológica de las poblaciones bacterianas, al tipo y condiciones fisicoquímicas de cada suelo influyeron para que su tasa de muerte fuese menor en los suelos almacenados por 30 años y mayor en los suelos almacenados por 11 años (64, 198). Tambien se consideró que estos resultados fueron relativos y no reflejaron las densidades reales de las poblaciones bacterianas, por varias razones: i) limitaciones ampliamente conocidas de la tecnica de cuenta viable en placa (3, 4, 14), ii) abatimiento fisiológico ocasionado en las células microbianas por el cambio del medio ambiente a las condiciones artificiales de aislamiento empleadas, las que pudieron transformar las

células de bacterias cultivables en células vivas pero no cultivables en los medios artificiales de laboratorio (14, 15, 43).

El promedio de las densidades de las poblaciones de los actinomicetos sobrevivientes de los suelos almacenados por 30 años fué de 2.0×10^2 UFC/ g de suelo seco, el cual fué diferente al promedio de las densidades de las poblaciones homólogas de los suelos almacenados por 11 años de 17.0×10^3 UFC/ g de suelo seco y el promedio de las densidades de las poblaciones de los actinomicetos encontrado en los suelos colectados recientemente fué de 6.60×10^5 UFC/ g de suelo seco. Aunque los actinomicetos son microorganismos autóctonos del suelo (4) no existen reportes de una capacidad de sobrevivencia en suelos por periodos semejantes a los de esta investigación. Lo anterior sugiere que los actinomicetos sobrevivientes en los suelos almacenados por 30 años pudieron utilizar ciertas formas de resistencia a las condiciones adversas que existen en los suelos (64) (como la falta de humedad) y que a su vez inhibieron cualquier actividad metabólica (97), reduciendo de ésta manera la velocidad de su tasa de muerte (121, 137), lo que se ha comprobado al disminuir el contenido de humedad en el suelo que induce a la formación de estructuras de latencia o persistencia (182, 240, 254). Aunque será necesario una investigación más profunda de estos actinomicetos para establecer el o los mecanismos responsables de su persistencia.

El promedio de las densidades de poblaciones de propágulos fúngicos sobrevivientes fueron de 25 UFC y 1.5×10^2 UFC / g de suelo seco en los suelos almacenados por 30 años y 11 años respectivamente, en tanto que en los suelos recién colectados el promedio de las densidades de poblaciones

de propágulos viables fué de 7.1×10^4 UFC/ g de suelo seco, lo que sugiere que a pesar de las limitaciones de la técnica de cuantificación empleada, no se reflejó el tamaño real de las poblaciones fúngicas, aunque se logró detectar la presencia de propágulos viables en los suelos almacenados por 30 y 11 años, posiblemente por que las condiciones de pobreza nutricionales y limitaciones de humedad de estos suelos impidieron su crecimiento (85, 87, 93) y por tanto estimularon como ya se explicó la formación de algunas estructuras de resistencia, prolongando su viabilidad (98, 99) por periodos mayores a los conocidos (4, 100). En ninguna de las muestras de los suelos analizadas se detectó la presencia de levaduras, lo que se atribuyó al pH y a la composición fisicoquímica de los suelos estudiados (4).

B.- PORCENTAJE DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE LOS SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

En la Tabla No. 2 se presentan los porcentajes de las bacterias aisladas de los suelos almacenados por diferentes periodos de acuerdo con su morfología y reacción al Gram. En ella se muestra que contrario a lo reportado (3, 27, 32), el mayor porcentaje de bacilos Gram (-) fué de 41.3% en los suelos almacenados por 30 años y no en el porcentaje obtenido de la morfología bacteriana de los suelos recién colectados de 30.2% y de 39.0% en los almacenados por 11 años, lo que confirmó la existencia de una inusual población bacteriana carente de estructuras de resistencia conocidas (124, 152) como las esporas, mientras que el menor porcentaje se observó en los bacilos esporulados Gram (+) de 37.0% en los grupos bacterianos de los suelos almacenados por 11 años (171, 210), de 51.0% y 56.1% en las bacterias de los suelos almacenados por 30 años y recién colectados respectivamente. Mientras que el porcentaje total de los bacilos Gram (+) en los suelos

almacenados por 30 años fué de 58.7% de los cuales un 7.7% no fué formador de esporas, lo anterior parece reafirmar que existen otros mecanismos de resistencia natural de los microorganismos a factores adversos del suelo (97, 138, 201), ésta misma tendencia fué observada en los grupos bacterianos de los suelos almacenados por 11 años en los cuales el 39.0% fué de bacilos Gram (-), el 61% de bacilos Gram (+) y el 24.0% de bacilos Gram (+) no esporulados (29, 152).

C.- DENSIDADES DE LAS POBLACIONES DE *AZOTOBACTER SPP* SOBREVIVIENTES DE LOS SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

Las Tablas No. 3, 4 y 5 presentan las densidades de las poblaciones de *Azotobacter spp* sobrevivientes de los suelos del estado de Texas almacenados por 30 y 11 años, así como las densidades de estas poblaciones en los suelos recién colectados. En estas tablas se muestran que las poblaciones de las azotobacterias fluctuaron desde 0.0 hasta 9.0×10^7 UFC/ g de suelo seco. La Tabla No. 3 confirma los datos conocidos sobre la capacidad de sobrevivencia de *Azotobacter spp* en algunos suelos (178, 214, 244), lo que sugiere que efectivamente esta bacteria posee uno o varios mecanismos de resistencia a las condiciones adversas de los suelos (210), estos mecanismos de adaptación fisiológica (222) le permitieron no sólo permanecer viables sino también cultivables (256), lo anterior no necesariamente significó que fué debido a la formación de quistes (29, 64, 152). La Tabla No. 4 muestra que las densidades de las poblaciones de *Azotobacter spp* sobrevivientes encontradas en los suelos almacenados por 11 años, fueron menores comparadas con el mismo promedio de las densidades de las poblaciones de azotobacterias detectadas en los suelos almacenados por 30 años y recién colectados, lo que parece sugerir que el tipo

de suelo fué el factor más importante que influyó en la sobrevivencia de las azotobacterias (64). En la Tabla No 5 se muestra el rango de variación de las poblaciones nativas de las azotobacterias presentes en los suelos recién colectados del condado de Denton, que como se esperaba, en general dieron las mayores densidades de poblaciones en comparación con las densidades de las poblaciones nativas de las azotobacterias de los otros suelos (143, 203), aunque en algunos suelos no se detectó ninguna población nativa se supone que ésto se debió al tipo de suelo. (14, 15, 44).

D.- IDENTIFICACION MORFOLOGICA Y BIOQUIMICA DE LOS AISLADOS DE *AZOTOBACTER SPP* SOBREVIVIENTES DE LOS SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

En relación a las características generales microscópicas, macroscópicas y bioquímicas, de los aislados sobrevivientes sospechosos de ser *Azotobacter* de los suelos almacenados por 30 años y suelos recién colectados no se encontró ninguna diferente - las reportadas en la literatura (143, 234). Los aislados correspondieron a bacilos G (-), al crecer en medio sin nitrógeno y hierro liberaron un pigmento fluorescente verde, mostraron capacidad de fijar nitrógeno, medido por la técnica de reducción de acetileno al cultivarse en medio carente de nitrógeno combinado, y formaron quistes en medio de Burk con n-butanol como fuente de carbono después de 48 h de incubación. La Tabla No. 6 presenta las características bioquímicas de los aislados de *Azotobacter spp* sobrevivientes de los suelos almacenados por diferentes periodos. Se observaron diferencias entre los aislados de los suelos almacenados por 30 años y los aislados de los suelos recién colectados, lo que permitió establecer que se encontraron diversas cepas de *Azotobacter vinelandii*. En general los aislados que provenían de los suelos almacenados

por 30 años fueron bioquímica y fisiológicamente más versátiles, que los aislados de los suelos recién colectados; de las muestras de suelos clasificadas como Austin y 3.3 Control almacenados por 30 años, se encontró que aproximadamente un 10% de los aislados analizados pertenecían a la especie de *A. vinelandii* (fueron designadas como OLD-R, OLD-8, OLD-8A, OLD-8b, OLD-83, OLD-E, OLD-8r, OLD-8c y OLD-81); mientras que de las 19 muestras de los suelos recién colectados se aislaron 12 cepas de *A. vinelandii* (designadas como S-6A, Wild, S-9, 16-AB, S-61, B-16A, L-2, D-1, S-6, WU-AL, UW y 2489), de las muestras de suelos número 22, 24 y 25 lo que significó un 11% del total de la población de azotobacterias detectada (178, 180, 181), en otras palabras la mayor parte de las poblaciones nativas de *Azotobacter* en todos los suelos, correspondió a la especie de *A. chroococcum*.

E.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS AISLADAS DE MUESTRAS DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

En la Tabla No. 7 se muestra que se encontraron otros grupos bacterianos diferentes a las azotobacterias que pudieron sobrevivir a las condiciones de almacenamiento por 30 años. En general, parece ser que estas bacterias no fueron metabólicamente activas probablemente a causa del abatimiento nutricional al que estuvieron sometidas (11, 12, 121). el cual afectó su capacidad de respuesta a las pruebas bioquímicas usadas para su identificación, en base a las cuales se sospecha que pertenecen a algunos miembros del género *Pseudomonas* y *Citrobacter* (143), éste también es el primer reporte de la sobrevivencia de estos géneros por un periodo de 30 años. Ningún plásmido fué aparentemente detectado en estas bacterias.

F.- PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A DIVERSOS AGENTES QUIMICOS DE LOS AISLADOS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* RECUPERADOS DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

La Tabla No 8 presenta los patrones de resistencia y susceptibilidad de aislados de *Azotobacter vinelandii* recuperados de suelos almacenados por diferentes períodos a varios agentes químicos y antibióticos. Se muestra, que el periodo de almacenamiento de los suelos no afectó totalmente la capacidad de resistencia de las cepas a los distintos inhibidores microbianos, lo que sugirió que la diferencia entre la resistencia de las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos almacenados por 30 años y la de las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos recién colectados, fué debida a que las cepas de *Azotobacter* aisladas de los suelos almacenados por 30 años al permanecer en estado de semilatenencia o latencia (121, 201, 210), no desarrollaron ningún mecanismo de adaptación o resistencia contra estos compuestos (46, 64), mientras que la resistencia a cloranfenicol probablemente se debió al intercambio de información genética de *Azotobacter* con otros grupos microbianos del suelos resistentes este antibiótico (70, 72) pues se sabe que, a pesar de las condiciones adversas naturales, el intercambio de información genética es posible (71, 75), adquirir no sólo la resistencia al cloranfenicol, sino también la capacidad de mantener esta información (81, 96) durante un largo período.

G.- PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A COMPUESTOS AROMATICOS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* RECUPERADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

La Tabla No. 9 muestra los patrones de resistencia y susceptibilidad a compuestos aromáticos: fenol, tolueno y

xileno por cepas de *A. vinelandii* aisladas de suelos recién colectados, indicándose que 3 de las 5 cepas probadas fueron resistentes y 2 fueron completamente susceptibles, la diferencia entre la resistencia y susceptibilidad de las cepas pudo ser el resultado de la composición química y contaminantes de los suelos a partir de los cuales fueron aisladas, ya que existen evidencias de la presencia de estos compuestos en algunos suelos (18, 19) y de que los microorganismos nativos tienen la capacidad de adquirir plásmidos que confieren resistencia a estos compuestos por diversos mecanismos biológicos (97, 157). En contraste ninguna de las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos almacenados por 30 años fué resistente a estos compuestos aromáticos, lo que apoya al argumento de que la capacidad metabólica de los microorganismos depende de su información genética y del medio ambiente en el cual son activos (116, 125, 145) .

H.- PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* AISLADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

Las Tablas 10 y 11 muestran la resistencia y susceptibilidad de las cepas de *A. vinelandii* aisladas de suelos almacenados por diversos períodos, 30 años y suelos recién colectados a un grupo de 13 antibióticos con diferente sitio de actividad antimicrobiana, en general se encontró que todas las cepas de *A. vinelandii* fueron más resistentes a los antibióticos semisintéticos como: ampicilina y carbencilina inhibidores de pared celular, cloranfenicol inhibidor de síntesis de proteínas y rifampicina inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos, que al resto de los antibióticos probados, con claras diferencias en los patrones específicos de resistencia de cada cepa, lo que muy probablemente se

deriva del origen de las cepas (42, 51, 78) o del tipo y condiciones del suelo a partir del cual fueron aisladas (44, 236).

I.-PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* AISLADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS ANTES Y DESPUES DE LA ELIMINACION DEL PLASMIDO

Cuando Las cepas fueron sometidas al tratamiento quimico de eliminación del ADN-plásmidico (Tablas No. 12 y 13), se encontró que la resistencia de *A. vinelandii* cepas OLD-R , OLD-81, OLD-83, S-6, L-2 a cloranfenicol desapareció, lo mismo fué observado en las cepas L-2 a ácido nalidíxico, UW-AL a kanamicina, OLD-8 a rifampicina y ampicilina, OLD-83 y UW-AL a estreptomycin. Lo que sugirió que esta capacidad de resistencia a antibióticos se originó en un factor R compartido por las cepas aisladas de suelos almacenados por 30 años y las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos recién colectados (34, 73). Lo anterior también sugirió que la información genética responsable de esta resistencia fué lo suficientemente estable para expresarse y transferirse entre especies del mismo genero (253) o con otras bacterias saprobias del suelo (8, 9, 97), ya que se ha reportado que la transferencia de genes puede sucederse en los ecosistemas, suelo-agua-aire en una mayor frecuencia de lo que se supone (165, 202, 261), evidencias experimentales han demostrado que existe un verdadero intercambio de ADN entre especies de bacterias genéticamente distantes y obviamente común entre especies del mismo género (237), especialmente hoy, cuando la ingeniería genética ha introducido al medio ambiente microorganismos con ADN modificado (238, 242) y que se evalúa el efecto de la dispersión de estos nuevos genes entre microorganismos nativos de los diversos ecosistemas (232, 236, 237).

J.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PLASMIDOS DETECTADOS EN CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

Las Tablas No. 14 y 15 muestran las características generales de los plásmidos de las cepas de *A. vinelandii* resistentes a antibióticos, aisladas de suelos almacenados por 30 años y suelos recién colectados. En ambas se muestra que sólo encontró un plásmido por cepa, cuyo peso molecular que fluctua entre 20 a 52 MDa, en general con una doble resistencia a otros antibióticos. Parece ser que el plásmido de la cepa OLD-81 sólo contenía resistencia para cloranfenicol, como en las cepas D-1 y S-6 lo tuvieron para estreptomina y gentamicina. Lo anterior sugiere que la resistencia a antibióticos no requiere de una continua inducción humana para que bacterias saprobas como *Azotobacter* la desarrollen (94. 147, 233), sugiere también que las propiedades de poseer y transferir factores R puede ser natural entre los microorganismos autóctonos, antes del uso generalizado de antibióticos en la vida del hombre, lo que significa que esta capacidad de resistencia plasmídica va se presentaba en la naturaleza genética de los microorganismos (70, 71, 83), evidencia de ello son investigaciones en suelo y agua que han demostrado que en algunos sitios donde jamás se han aplicado antibióticos, los microorganismos nativos poseen resistencia cromosomal y/o en plásmidos (8, 51, 81).

Los plásmidos detectados previamente en las cepas de *A. vinelandii* no habían mostrado poseer alguna función biológica definida (169. 206), por lo que reportes previos para esta especie los consideraron de tipo críptico (167). Este es pues el primer reporte que asocia la presencia de plásmidos tipo R en cepas sobrevivientes de *A. vinelandii* aisladas de suelos almacenados por 30 años y cepas de la misma bacteria aisladas

de suelos recién colectados. También se estableció que la proporción de las cepas de *A. vinelandii* que contenían un solo plásmido fué de 40 % y 30 % en relación al total de la población de *A. vinelandii* aislada de los suelos almacenados por 30 años y de los suelos recién colectados respectivamente, proporción relativamente alta comparada con investigaciones de frecuencia de plásmidos en otras bacterias de suelo y acuáticas, en zonas con alta y baja incidencia en el uso de antibióticos (22, 26, 91).

Otros trabajos señalan que las células bacterianas pueden poseer plásmidos por períodos de almacenamiento no mayores a 2 años y que estos plásmidos pudieron mantener alguna característica biológica funcional por un tiempo máximo de 2 años (54, 55, 259), sin embargo estas investigaciones no aclaran el o los mecanismos de preservación (criptobiosis) de los plásmidos en las bacterias en condiciones naturales, Aunque sí establecen la posibilidad de que durante períodos en los cuales el medio ambiente no permite el crecimiento microbiano, mediante modificaciones de la fisiología celular el material extracromosómico no sea utilizado como una fuente de carbono y energía (81, 184, 188), de manera que al cultivar artificialmente en el laboratorio estas células sobrevivientes el plásmido queda expresare acorde con la inducción específica (62, 96). Con la posibilidad de que estos plásmidos tipo R sean transferidos entre células bacterianas de igual o diferente género (195, 145, 204).

La capacidad de resistencia de las cepas de *A. vinelandii*, se explica en la Tabla No. 16 que muestra que la resistencia de las cepas de *A. vinelandii* aisladas de suelos recién colectados estaba asociada con plásmidos tipo R (8), ya que al eliminar este elemento extracromosómico (curación)

con agentes químicos, la resistencia de la cepa D-1 a estreptomina se perdió, así como la de la cepa L-2 al ácido nalidíxico y cloranfenicol, de igual forma la resistencia de la cepa UW-AL a kanamicina y estreptomina, la cepa S-6 la perdió a cloranfenicol. Se encontró que la resistencia de las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos recién colectados a cloranfenicol, kanamicina y estreptomina fué compartida por las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos almacenados por 30 años, lo que sugiere que la información genética de resistencia que se encontró asociada a los plásmidos de ambas cepas, fué estable en las azotobacterias sobrevivientes aisladas de los suelos almacenados por 30 años, lo cual fué demostrado cuando estas bacterias se probaron en condiciones de cultivo artificial (62, 239, 259).

K.- PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PESTICIDAS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* AISLADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

Las Tablas No. 16 y 17 contienen datos que muestran la resistencia y susceptibilidad a pesticidas por cepas de *A. vinelandii* aisladas de suelos almacenados por diferentes periodos. En general se observaron diferentes respuestas de las cepas de *A. vinelandii* a los pesticidas, por ejemplo: las cepas de *A. vinelandii* aisladas de suelos almacenados por 30 años fueron más susceptibles al 2,4-D que las cepas aisladas de los suelos recién colectados, respuesta semejante se detectó para Diquat y K. Tea. Lo anterior sugiere que el contacto de las azotobacterias del suelo con pesticidas es más frecuente en la actualidad (16, 167) que lo fue hace 30 años (94). ésto es: *Azotobacter* probablemente desarrolló resistencia a pesticidas por diversos mecanismos, basados en su diversidad metabólica (111); la cual le permitió modificar y adaptar su

fisiología a la presencia de moléculas xenobióticas (16), y/o por intercambio genético con ADN cromosomal o plásmidos de microorganismos resistentes a pesticidas (71, 67, 149).

L.- PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PESTICIDAS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS ANTES Y DESPUES DE LA ELIMINACION DEL PLASMIDO

En las Tablas 18 y 19 se muestran los efectos de los agentes de curación sobre la respuesta de las cepas de *A. vinelandii* a los pesticidas, con la demostración de que cuando las cepas de *A. vinelandii* aisladas de suelos almacenados por diferentes períodos fueron sometidas a la eliminación del plásmido, la resistencia a pesticidas como Aquazine (cepas Old-81 y L-2), Diquat (cepa L-2), Endothall (cepas Old-8, L-2), Karmex (cepa Old-81), Koplex (cepas S-6A), K. Tea (cepa UW-AL), Sonar (cepas Old-83) y 2,4-D (cepas Old-83, 2489) se perdió. Lo que sugirió la asociación de la resistencia a los pesticidas con los plásmidos (16, 18). Como ya se ha señalado el valor de este experimento radica en el hecho de que las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos almacenados por 30 años, difícilmente estuvieron en contacto con los pesticidas empleados, sin embargo debido a que existen en la naturaleza compuestos análogos (103b, 258) la posibilidad de que estas bacterias desarrollaran un mecanismo de protección contra los pesticidas no es remoto (94), ya que existen evidencias de esto con otros compuestos químicos artificiales (16, 114, 167).

LL.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PLASMIDOS DE CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* ASOCIADAS CON LA RESISTENCIA A PESTICIDAS

En el estudio general de los plásmidos asociados con la

resistencia a los pesticidas, en las cepas de *A. vinelandii* se encontró que el peso molecular de los plásmidos de las cepas aisladas de los suelos recién colectados fluctuaron entre 9 a 40 MDa mientras que para las cepa de *A. vinelandii* aisladas de los suelos almacenados por 30 años fluctuaron entre 20 a 29 MDa. La cepa L-2 aislada de los suelos recién colectados en apariencia tenía un sólo plásmido (pL-2) asociado con una multiresistencia a Diquat, Endothall, 2,4-D, y Aquazine, la mayoría de estas cepas contenían plásmidos asociados con la resistencia a un pesticida, mientras las cepas de *A. vinelandii* aisladas de los suelos almacenados por 30 años contenían plásmidos que fueron asociadas a la resistencia para Karmex y Aquazine (pOLD-81), Sonar y 2,4-D (pOLD-83) y un sólo plásmido asociado a la resistencia a un pesticida.

La cepa de *A. vinelandii* 2489 tuvo el plásmido de menor peso molecular de 9 MDa, que en apariencia sólo codificó para la resistencia a 2,4-D, muchos microorganismos autóctonos del suelo han desarrollado resistencia contra este pesticida, debido a su similitud química con algunos derivados de la lignina comunes en el suelo (86, 108, 119). Estos resultados sugieren, que la resistencia de las cepas de *A. vinelandii* a los pesticidas puede ser una característica genética (cromosomal o en plásmidos) que al igual que la resistencia a antibióticos puede ser preservada y transferida entre generos bacterianas afines y diferentes, como lo han demostrado investigaciones realizadas en sitios fuertemente contaminados con pesticidas (26, 183, 237).

M.- COMPORTAMIENTO DE CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* EN SUELOS ESTERILES Y NO ESTERILES CON DIFERENTES TIPOS DE TEXTURAS

Las Figuras No. 1 y 2 muestran el crecimiento de la cepa

de *A. vinelandii* L-2 PLA⁺ y PLA⁻ (con plásmido y sin plásmido) introducida en suelos estériles con diferentes tipos de texturas. En estas figuras puede observarse que la velocidad y el crecimiento máximo de la cepa no fué afectada por la presencia o ausencia del plásmido, con lo que se confirman 2 cosas, por un lado la capacidad de crecimiento de *Azotobacter* en diferentes tipos de texturas por la probablemente utilización de los compuestos orgánicos complejos de los suelos como fuente de carbono (103, 177, 258), y por otro la no dependencia de la bacteria al plasmido (149, 204).

La Figura No. 3 muestra el crecimiento de *A. vinelandii* cepa OLD-81 PLA⁺ (con plásmido) introducida en suelos estériles con diferentes tipos de texturas, en esta figura el comportamiento de la cepa OLD-81 fué semejante al de la cepa L-2 aislada de suelos recién colectados. Esta similitud en el crecimiento de ambas cepas de *A. vinelandii*, sugiere que el abatimiento fisiológico al que probablemente la cepa OLD-81 estuvo sometida, durante su permanencia en el suelo almacenado por 30 años, no afectó su capacidad de respuesta fisiológica para (11, 121, 124) la utilización de los compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía presentes en estos suelos que sólo fueron humedecidos.

La Figura No. 4 muestra la sobrevivencia de la cepa de *A. vinelandii* OLD-81 PLA⁺ (con plásmido) inoculada en suelos no estériles con los diferentes tipos de texturas. En esta figura se observan curvas de crecimiento más cortas, con una menor cantidad de células producidas y un período de viabilidad que no sobrepasó los 15 días, este comportamiento pudo ser la respuesta de la cepa a las condiciones naturales del suelo, en el cual *Azotobacter* probablemente expresó el o los plasmidos por ciertos períodos (22, 34, 261) en contraste

con el comportamiento de esta cepa bajo condiciones de esterilidad (Figs No. 1 y 2), otras posibles diferencias en los suelos no estériles fueron: la competencia biológica (60, 102, 262) y la predación por algunos microorganismos de este ambiente (5, 61, 217) que influyeron negativamente en la sobrevivencia de la cepa de *A. vinelandii*, al igual que compuestos antimicrobianos del suelo que contribuyeron a la muerte de las bacterias (46, 163, 231).

No se muestran las Figuras de las cepas de *A. vinelandii* L-2 PLA⁺ y PLA⁻ (con plásmido y sin plásmido) porque al introducirse en los suelos no estériles con diferentes tipos de texturas, no se lograron detectar azotobacterias sobrevivientes en un período menor de 7 días, probablemente por que la manipulación de las cepas en el laboratorio influyó en su pérdida de capacidad de sobrevivencia en el suelo, lo que se ha comprobado en *Azotobacter* y otros géneros bacterianos que al cultivarse artificialmente, disminuyen su resistencia a factores antimicrobianos del suelo, en contraste con especies bacterianas de los mismos géneros que mantenidas en condiciones naturales son más resistentes a estos factores (244, 245), o por modificaciones fisiológicas estas bacterias pierden la capacidad de crecer en medios de cultivo de laboratorio sin morir (viabilidad) en el ambiente (54, 259).

Finalmente la Figura No. 5 muestra el crecimiento de la cepa de *A. vinelandii* OLD-81 PLA⁻ (sin plásmido) introducida en suelos estériles con diferentes tipos de texturas. En esta figura se observa que en apariencia la ausencia del plásmido, aumentó la velocidad de crecimiento de la cepa y redujo su capacidad de producción de células en comparación al comportamiento de la misma cepa en presencia del plásmido, no

sabemos porque, pues se supone que el plásmido no debió influir en la velocidad de crecimiento o producción celular aunque esta observación no es concluyente, ya que no se ha definido en forma objetiva el papel de los plásmidos en las bacterias (34, 76, 190). En general la presencia del plásmido en la cepa de *A. vinelandii* OLD-B1 parece conferir ventajas fisiológicas que no se observaron en la misma cepa sin plásmido (94, 96, 110).

TABLA No 1

POBLACIONES DE MICROORGANISMOS AEROBIOS SOBREVIVIENTES DE
SUELOS TEXANOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

POBLACIONES	UFC X 10 ³ /g DE SUELO SECO PERIODO EN AÑOS		
	30 ¹	11 ²	RECIBEN COLECTADOS ³
Bacterias	1.200	52	300,000
Actinomicetos	0.2	17	660
Hongos (propágulos)	0.2	0.1	71
<i>Azotobacter spp.</i>	520	0.15	52,000

Simbología:

1. - Promedio de 18 muestras. 2. - Promedio de 3 muestras.
3. - Promedio de 10 muestras.

TABLA No. 2
 PORCENTAJE DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS
 ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

CATEGORIAS MORFOLOGICAS	30 ¹	PERIODO EN AÑOS	
		11 ²	RECIENTE COLECTADOS ³
Bacilos Gram (-)	41.3	39.0	30.2
Bacilos Gram (+) (Total)	58.7	61.0	69.8
No Esporulados	7.7	24.0	13.7
Esporulados	51.0	37.0	56.1
Relación Gram (-) / Gram (+)	0.70	0.63	0.43

Simbología:

1= Promedio de 18 muestras. 2= Promedio de 9 muestras. 3= Promedio de 19 muestras.

TABLA No. 3

DENSIDADES DE POBLACIONES DE *AZOTOBACTER SPP* SOBREVIVIENTES
DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

DESIGNACION ORIGINEAL	ORIGEN	TIPO DE SUELO	UFC/g DE SUELO SECO X 10 ³ <i>Azotobacter spp</i>
EAST	SAN ANTONIO	C	0.30
SOUTHSIDE	SAN ANTONIO	S	0.30
MAT WEST	SAN ANTONIO	C	0.30
12, 2.200	AUSTIN	C	0.090
	MISSION	S	10.0
61-63	AUSTIN	C	10.0
250-CONTROL	AUSTIN	C	13.0
2-8-63	AUSTIN	S	11.0
J	AUSTIN	C	37.0
350 KR	AUSTIN	C	N.D
3.3 CONTROL	AUSTIN	C	14.5
DOWNTOWN	MANOR	S	6.0
DOWNTOWN	BROOKS	C	7.3
C.	AUSTIN	S	1.0
SHADYWOOD	AUSTIN	C	1.0
CONTROL 5-23-63	AUSTIN	C	0.72
CONTROL 9-63	AUSTIN	S	0.10
CADILLAC	AUSTIN	S	0.69

Simbología:

C= Quernoquémico S= arenoso N. D. = No se detectó ninguno posible

AZOTOBACTER.

TABLA No. 4

DENSIDADES DE POBLACIONES DE *AZOTOBACTER SPP* SOBREVIVIENTES
DE SUELOS ALMACENADOS POR 11 AÑOS

DESIGNACION ORIGINAL	ORIGEN	SERIE DE SUELO	UFC/g DE SUELO SECO $\times 10^9$ <i>Azotobacter spp.</i>
D	DENTON	B	0.90
F W	FORTH WORTH	C	51.0
D- I	DENTON	B	42.0

Simbología:

B= Burleson (Arenoso), C= Crockett (Arenoso-Limoso).

DENSIDADES DE LAS POBLACIONES DE *AZOTOBACTER SPP* AISLADAS
DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

DESIGNACION ORIGINAL	SERIE DE SUELO	UFC/g DE SUELO SECO / 10 ³ <i>Azotobacter spp</i>
1	B	0.13
2	R	0.15
3	CK	250.0
4	B	0.3
5	CK	N.D.
6	CK	N.D.
7	R	250.0
8	B	1.100
9	B	1.600
10	B	1,600
11	R	4.300
12	CK	5,300
13	R	40.000
14	B	30.000
15	B	40,000
16	R	40,000
17	R	800
18	B	90,000
19	B	10,000

Simbología:

B= Birome (Arenoso-Limoso), R= Burleson (Arenoso), CK= Crockett (Arenoso-Limoso), Suelos del Condado de Denton, Texas., N.D. = No se detectó ningún posible AZOTOBACTER.

TABLA No. 6

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS AISLADOS DE
AZOTOBACTER VINELANDII RECUPERADOS DE SUELOS
ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS

CARACTERISTICA	AISLADOS	
	30 AÑOS ^a	RECIENTE COLECTADOS ^b
Temperatura de crecimiento (°C).		
18	+	-
30	+	+
37	-	+
Crecimiento en presencia de 1% de NaCl	-	+
Utilización de:		
fructosa	+	-
glucosa	+	+
sacarosa	+	+
etanol	+	-
etilenglicol	+	-
galactosa	+	-
ramnosa	+	+

Simbología:

(+)= reacción positiva a la prueba y/o utilización. (-)= reacción negativa a la prueba. a= promedio de 10 aislados. b= promedio de 12 aislados.

TABLA No. 7

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE AISLADOS DE BACTERIAS G (-)
SOBREVIVIENTES DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS.

CARACTERISTICA	CEPA	
	V-7-4	V-7
Movilidad	-	-
Citratos	+	+
Indol	-	-
H ₂ S	-	-
Ureasa	-	-
MR	-	-
VP	-	-
Fermentación de:		
Glucosa	-	-
Lactosa	-	-

Simbología:

(+)= reacción positiva a la prueba. (-)= reacción negativa a la prueba.

TABLA No. 8

PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* RECUPERADOS DE SUELOS ALMACENADOS POR DIFERENTES PERIODOS A DIVERSOS AGENTES QUIMICOS Y ANTIBIOTICOS

AGENTE/ANTIBIOTICO	AISLADOS	
	30 AÑOS ^a	RECIENTE COLECTADOS ^b
Benzoato de sodio 0.5 %	-	+
Fluoruro de sodio 0.01 M.	-	+
Fenol 0.5 %	-	+
Estreptomizina 25 µg/ml	+	+
Carbencilina 15 µg/ml.	+	+
Ampicilina 14 µg/ml.	+	+
Tetraciclina 15 µg/ml.	+	-
Cloranfenicol 30 µg/ml.	+	+
Micostatina 0.1 mg/ml.	+	+

Simbología:

(-) = susceptible. (+) = resistente. a = promedio de 30 aislados. b = promedio de 12 aislados.

TABLA No. 9

PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A COMPUESTOS
 AROMATICOS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII*
 AISLADAS DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

AROMATICO	UW	UW-AL	CEPAS 2489	S-6A	L-2
FENOL (0.5%)	-	+	+	+	-
TOLUENO (0.1%)	-	-	+	+	-
XILENO (0.1%)	-	+	+	+	-

Simbología:

(-) = susceptible. (+) = resistente.

TABLA No. 10
 PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS
 POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* AISLADAS
 DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$)		CEPAS			
		OLD-R	OLD-81	OLD-8	OLD-8b
Rifampicina	1.0	+	+	+	+
Ac. nalidíxico	20.0	+	+	-	-
Kanamicina	1.0	-	-	-	+
Eritromicina	10.0	+	-	-	-
Vancomicina	30.0	-	+	-	-
Bacitracina	10.0	-	+	-	-
Gentamicina	10.0	+	-	-	-
Cloranfenicol	25.0	+	+	+	+
Estreptomina	25.0	-	-	+	+
Tetraciclina	15.0	+	-	+	+
Ampicilina	15.0	+	+	+	+
Carbencilina	15.0	+	+	+	+
Micostatina	0.1 $\mu\text{g/l}$	+	+	+	+

Simbología:

(-) = susceptible. (+) = resistente.

TABLA No. 11

PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A DIFERENTES
ANTIBIOTICOS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII*
AISLADAS DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

ANTIBIOTICOS ($\mu\text{g/ml}$)		D-I	L-2	CEPAS S-6A	UW-AL	UW
Rifampicina	1.0	+	+	+	+	+
Ac. nalidixico	20.0	+	+	+	-	-
Eritromicina	10.0	-	+	+	+	-
Vancomicina	30.0	-	+	+	-	-
Bacitracina	10.0	-	+	+	-	-
Gentamicina	10.0	-	-	+	-	-
Kanamicina	1.0	+	-	+	-	+
Cloranfenicol	25.0	+	+	+	+	+
Estreptomina	25.0	+	-	-	+	+
Tetraciclina	15.0	-	-	-	-	-
Ampicilina	15.0	+	+	+	+	+
Carbencilina	15.0	+	+	+	+	+
Micostatina	0.1 g/l	+	+	+	+	+

Simbologia:

(-) = susceptible.

(+) = resistente

TABLA No. 12
 PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS
 POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* PLA⁺ Y PLA⁻
 AISLADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

ANTIBIOTICO (µg/ml)	CEPAS									
	OLD-R		OLD-B1		OLD-B		OLD-B1		OLD-B3	
	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻
Rifampicina	1.0	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A.nalidíxico	20.0	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Kanamicina	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	10.0	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Vancomicina	30.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacitracina	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	10.0	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	25.0	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Estreptomina	25.0	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Tetraciclina	10.0	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Amplicilina	10.0	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Carbencilina	10.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Simbología:

(-) = susceptible. (+) = resistente. Pla⁺ = con plásmido (no curada). Pla⁻ = sin plásmido (curada). Agentes de la curación: dodecil sulfato de sodio 0.025g/L, naranja de acridina 0.25mM, bromuro de etidio 0.125 mM.

TABLA No. 13.

PATRONES RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS
 POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* PLA⁺ Y PLA⁻
 AISLADAS DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

ANTIBIOTICOS (μ g/ml)	CEPAS								
	D-1 Pla ⁺ Pla ⁻		L-2 ⁺ Pla ⁺ Pla ⁻		S-6 ⁺ Pla ⁺ Pla ⁻		UW-AL Pla ⁺ Pla ⁻		
Rifampicina	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+
A. nalidixico	20.0	+	+	+	-	+	+	-	-
Kanamicina	1.0	+	+	-	-	+	+	+	-
Eritromicina	10.0	-	-	+	+	+	+	+	+
Vancomicina	30.0	-	-	+	+	+	+	-	-
Bacitracina	10.0	-	-	+	+	+	+	-	-
Gentamicina	10.0	-	-	-	-	+	-	-	-
Cloranfenicol	25.0	+	+	+	-	-	-	+	+
Tetraciclina	15.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	15.0	+	+	+	+	+	+	+	+
Carbencilina	15.0	+	+	+	+	+	+	+	+
Micostatina	0.1g/l	+	+	+	+	+	+	+	+

Simbología:

PLA⁺ = con plásmido (no curada). PLA⁻ = sin plásmido (curada).
 (-) = susceptible. (+) = resistente. Agentes de la curación:
 dodecil sulfato de sodio 0.625 g/l, naranja de acridina 0.25 mM,
 bromuro de etidio 0.125 mM.

TABLA No. 14

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PLASMIDOS DE CEPAS
AZOTOBACTER VINELANDII ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA
 A ANTIBIOTICOS AISLADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

CEPA	PESO MOLECULAR (MDa)	ANTIBIOTICO (μ g/ml)	PLASMIDO
OLD-R	48	Cloranfenicol 25.0 Tetraciclina 15.0	pOLD-R
OLD-81	20	Cloranfenicol 25.0	pOLD-81
OLD-8	28	Rifampicina 1.0 Ampicilina 15.0	pOLD-8
OLD-83	25	Kanamicina 1.0 Estreptomicina 25.0	pOLD-83

Simbología:

MDa= megadaltons. Los pesos moleculares de los plásmidos de A. VINELANDII fueron calculados por comparación con plásmido de ESCHERICHIA COLI Col-E1 (4.2 Mda), R6-5 (61 MDa), RP4 (34 MDa), R6-K (24.7 MDa).

TABLA No. 15

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PLASMIDOS ASOCIADOS
 CON LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER*
VINELANDI AISLADAS DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

CEPA	PESO MOLECULAR (MDa)	ANTIBIOTICO ($\mu\text{g/ml}$)	PLASMIDO
L-2	40	A. nalidíxico 20.0 Cloranfenicol 25.0	pL-2
D-1	35	Estreptomicina 25.0	pD-1
S-6	30	Gentamicina 10.0	pS-6
UW-AL	52	Kanamicina 1.0 Estreptomicina 25.0	pUW-AL

Simbología:

MDa= Megadaltons. Los pesos moleculares de los plásmidos de A. VINELANDII fueron calculados por comparación con plásmidos de cepas de ESCHERICHIA COLI Col-E1 (4.2 MDa), R6-5 (61 MDa), RP4 (94 MDa), R6-K (24.7 MDa).

TABLA No. 16

PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PESTICIDAS
 POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* AISLADAS
 DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

PESTICIDA (0.1 g/l)	CEPAS			
	OLD-81	OLD-83	OLD-8b	OLD-R
Sonar	+	+	-	-
Diquat	-	-	-	-
Koplex	-	+	-	-
Endothall	+	+	+	-
2,4-D	-	+	-	-
K. Tea	-	-	-	-
Karmex	-	+	+	-
Aquazine	+	+	+	-

Simbología:

(-) = susceptible. (+) = resistente.

TABLA No. 17

PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PESTICIDAS
 POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* AISLADAS
 DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

PESTICIDAS (0.1 g/L)	CEPAS					
	L-2	D-1	S-6A	UW-AL	UW	2489
Sonar	+	-	+	-	-	-
Diouat	+	+	-	-	-	-
Koplex	+	-	+	-	-	-
Endothall	+	+	-	-	-	-
2,4-D	+	-	-	+	-	+
K. Tea	-	-	+	+	-	-
Karmex	+	-	-	-	-	-
Aquazine	+	-	-	-	-	-

Simbología:

(-) = susceptible. (+) = resistente.

TABLA No. 18.

PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PESTICIDAS
 POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* PLA⁺ Y PLA⁻
 AISLADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

PESTICIDAS (0.1 g/l)	CEPAS									
	OLD-81		OLD-83		OLD-8		OLD-81		OLD-8b	
	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻
Sonar	+	+	+	-	+	+	-	-		-
Diquat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Koplex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endothall	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
2-4, D	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
K. Tea	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Karmex	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Aquazine	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+

Simbología:

PLA⁺ = con plásmido (no curada). PLA⁻ = sin plásmido (curada). (-) = susceptible. (+) = resistente. Agentes de la curación: didecil sulfato de sodio 0.625 g/l, naranja de acridina 0.25 MM, bromuro de etidio 0.125 MM.

TABLA No. 19

PATRONES DE RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PESTICIDAS
 POR CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* PLA⁺ Y PLA⁻
 AISLADAS DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

PESTICIDAS (0.1 g/L)	CEPAS									
	L-2		D-1		S-6A		UW-AL		2489	
	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻	Pla ⁺	Pla ⁻
Sonar	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Diquat	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Koolex	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Endothall	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
K. Tea	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Karmex	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Aquazine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Simbología:

PLA⁺ = con plásmido (no curada). PLA⁻ = sin plásmido (curada). (-) = susceptible. (+) = resistente. Agentes de la curación: dodecil sulfato de sodio 0.625 g/L, naranja de acridina 0.25 mM, bromuro de etidio 0.125 mM.

TABLA No. 20

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PLASMIDOS ASOCIADOS
CON LA RESISTENCIA A PESTICIDAS POR CEPAS DE *AZOTOBACTER*
VINELANDII AISLADAS DE SUELOS ALMACENADOS POR 30 AÑOS

CEPA	PESO MOLECULAR (MDa)	PESTICIDA (0.1 g/l)	PLASMIDO
OLD-8	29	Endothall	pOLD-8
OLD-81	20	Karmex Aquazine	pOLD-81
OLD-83	25	Sonar 2,4-D	pOLD-83

Simbología:

MDa= Megadaltons. Los pesos moleculares de los plásmidos de las cepas de *A. VINELANDII*, fueron calculados por comparación con plásmidos de cepas de *ESCHERICHIA COLI* Col-E1 (4.2 MDa), R6-5 (61 MDa), RP4 (34 MDa), R6-K (24.7 MDa).

TABLA No. 21

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PLASMIDOS ASOCIADOS
CON LA RESISTENCIA A PESTICIDAS POR CE - - DE *AZOTOBACTER*
VINELANDII AISLADAS DE SUELOS RECIENTEMENTE COLECTADOS

CEPA	PESO MOLECULAR (MDa)	PESTICIDA (0.1 g/l)	PLASMIDO
L-2	40	Diquat Endothall 2,4-D Aquazine	pL-2
D-1	35	Endothall	pD-1
S-6A	30	Koplex	pS-6A
UW-AL	52	K. Tea	pUW-AL
2487	7	2,4-D	p2458

Simbología:

MDa= Megadaltons.

Los pesos moleculares de las cepas de A. VINELANDII fueron calculados por comparación con plásmidos de cepas de ESCHERICHIA COLI Col-E1 (4.2 MDa), R6-5 (61 MDa), RP4 (34 MDa), R6-K (24.7 MDa).

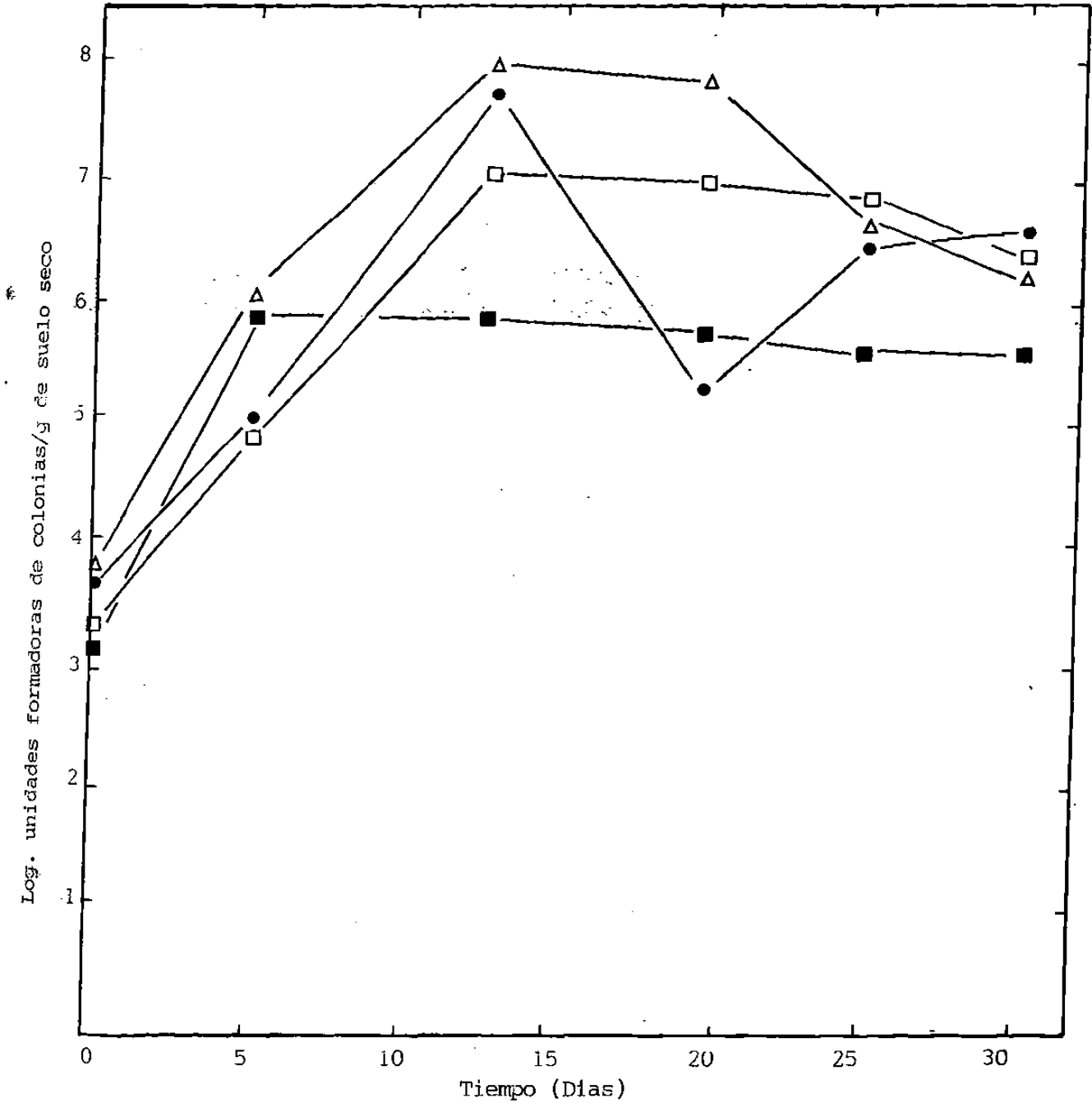


FIG. 1 . CRECIMIENTO DE *Azotobacter vinelandii* CEPA L-2 PLA⁺ INTRODUCIDA EN SUELOS ESTERILES CON DIFERENTES TIPOS DE TEXTURAS.

(PLA⁺) Con plásmido, (■) aL-1 (□) bL-4 (●) cL-4 (△) dLL-2
 a= arcillosa, b=limosa-arcillosa, c= arenosa-arcillosa, d= arcillosa-limosa

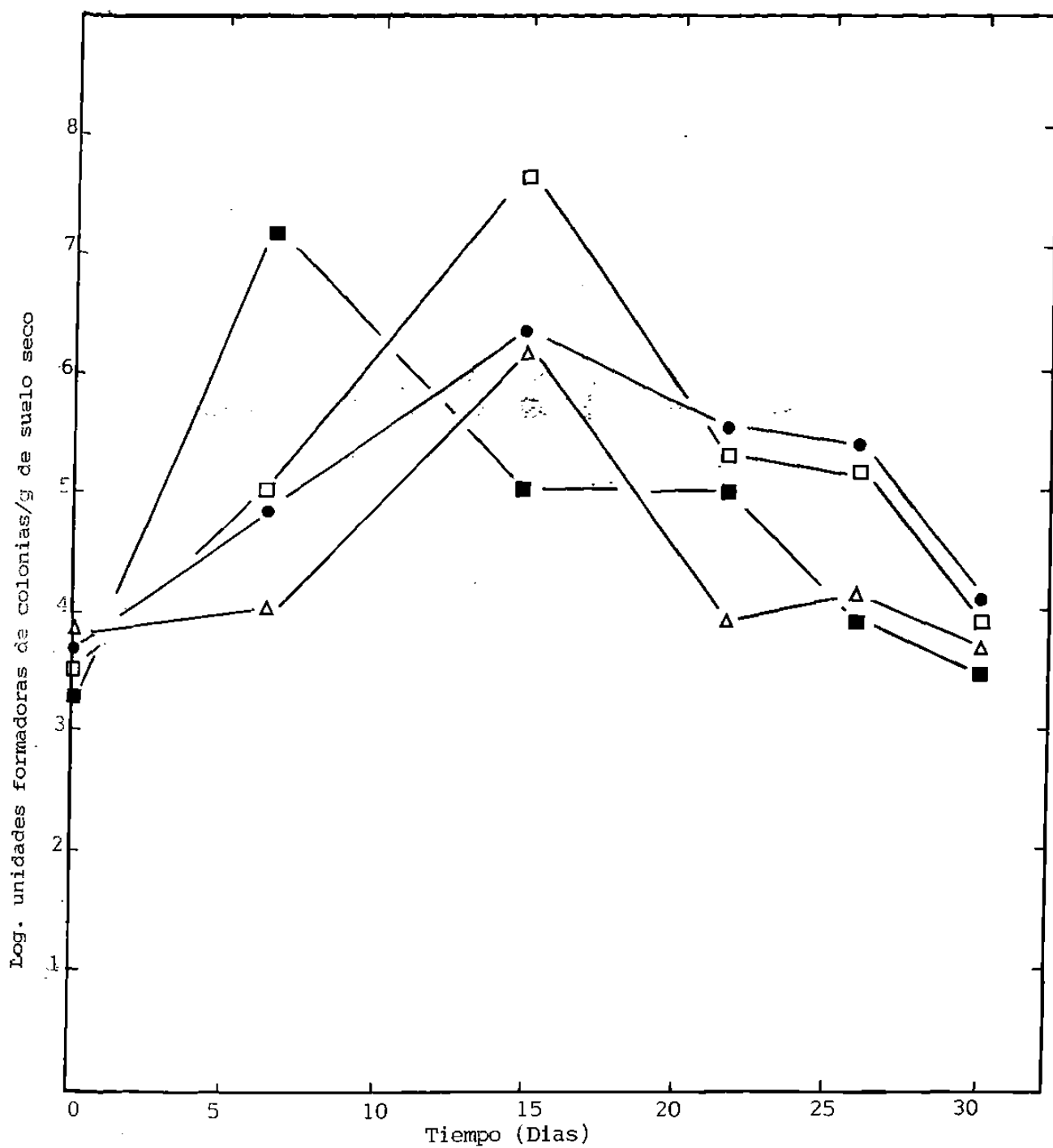


FIG. 2 . CRECIMIENTO DE *Azotobacter vinelandii* CEPA L-2 PLA⁻ INTRODUCIDA EN SUELOS ESTERILES CON DIFERENTES TIPOS DE TEXTURAS.

(PLA⁻) Sin plásmido, (■) aL-1 (□) bT-4 (●) cL-4 (Δ) dLL-2, a= arcillosa, b= limosa-arcillosa, c= arenosa-arcillosa, d= arcillosa-limosa

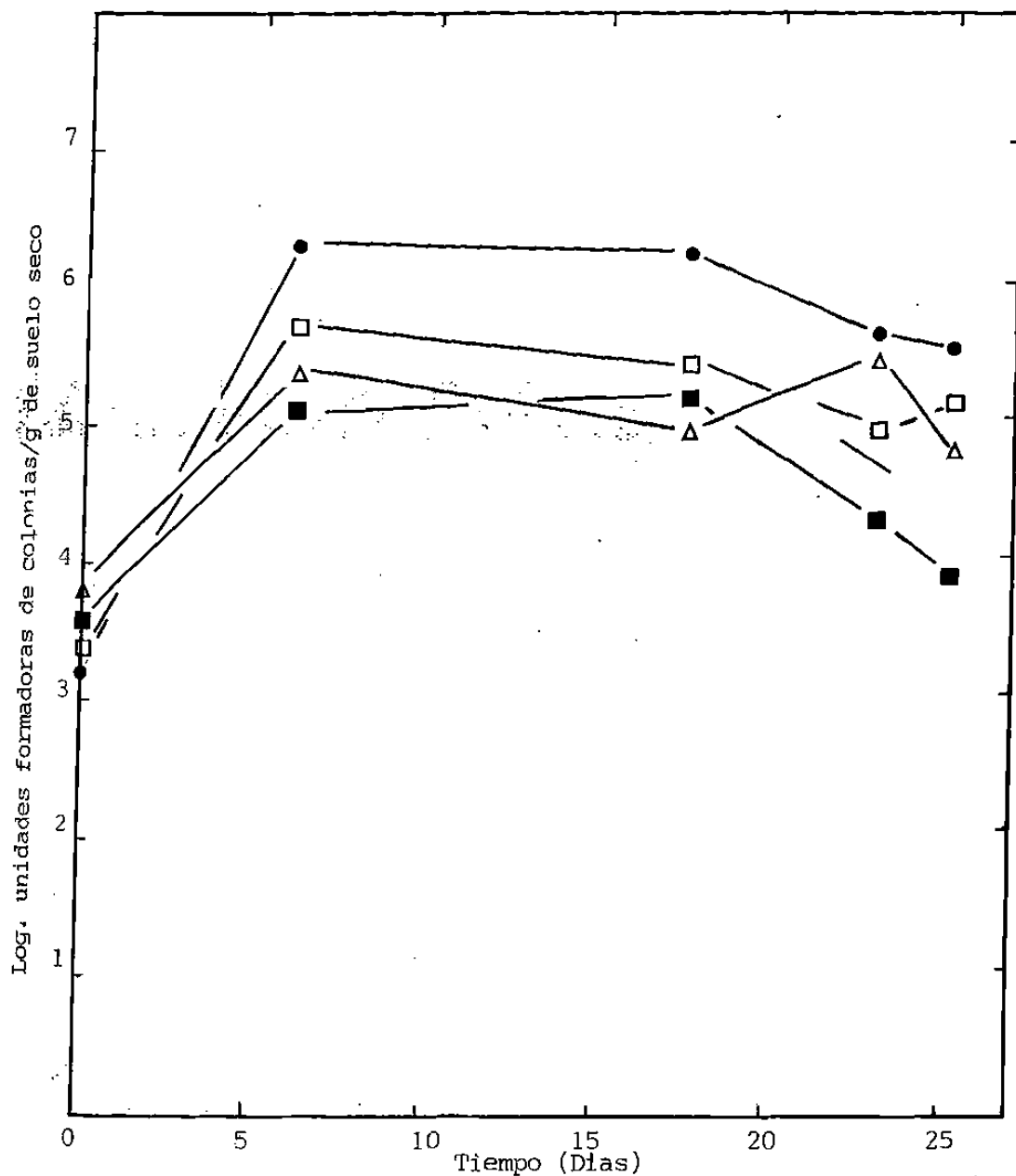


FIG. 3 . CRECIMIENTO DE *Azotobacter vinelandii* CEPA OLD-81 PLA⁺ INTRODUCIDA EN SUELOS ESTERILES CON DIFERENTES TIPOS DE TEXTURAS.

(PLA⁺) Con plásmido, (■) aL-1 (□) bT-4 (●) cL-4
 (△) dLL-2, a= arcillosa, b= limosa-arcillosa, c= arenosa-arcillosa, d= arcillosa-limosa

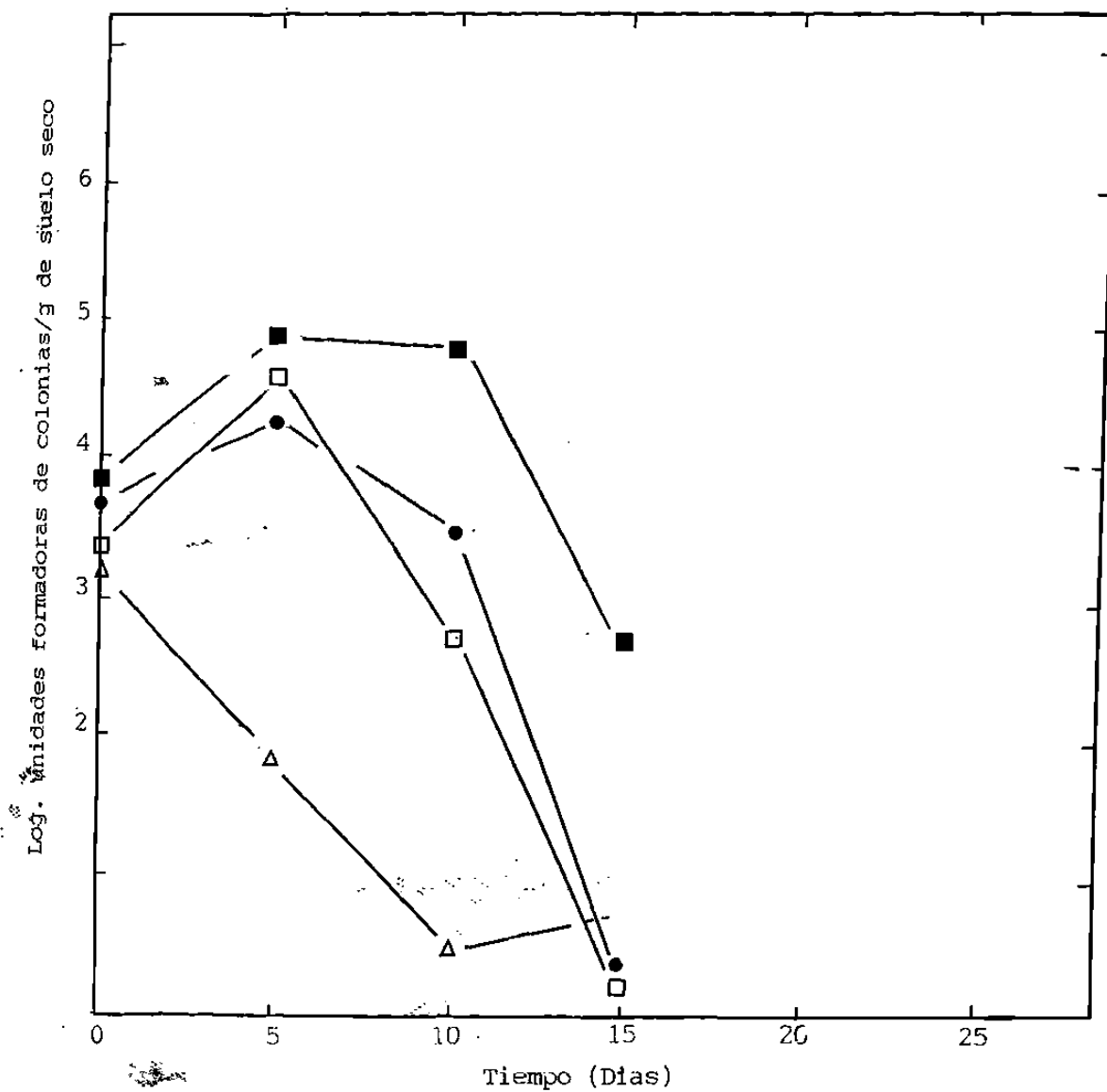


FIG. 4 . SOBREVIVENCIA DE *Azotobacter vinelandii* CEPA OLD-81 PLA⁺ INTRODUCIDA EN SUELOS NO ESTERILES CON DIFERENTES TIPOS DE TEXTURAS.

(PLA⁺) Con plásmido, (■) aL-1 (□) bT-4 (●) cL-4 (△) dLL-2, a= arcillosa, b= limosa-arcillosa, c= arenosa-arcillosa, d= arcillosa-limosa

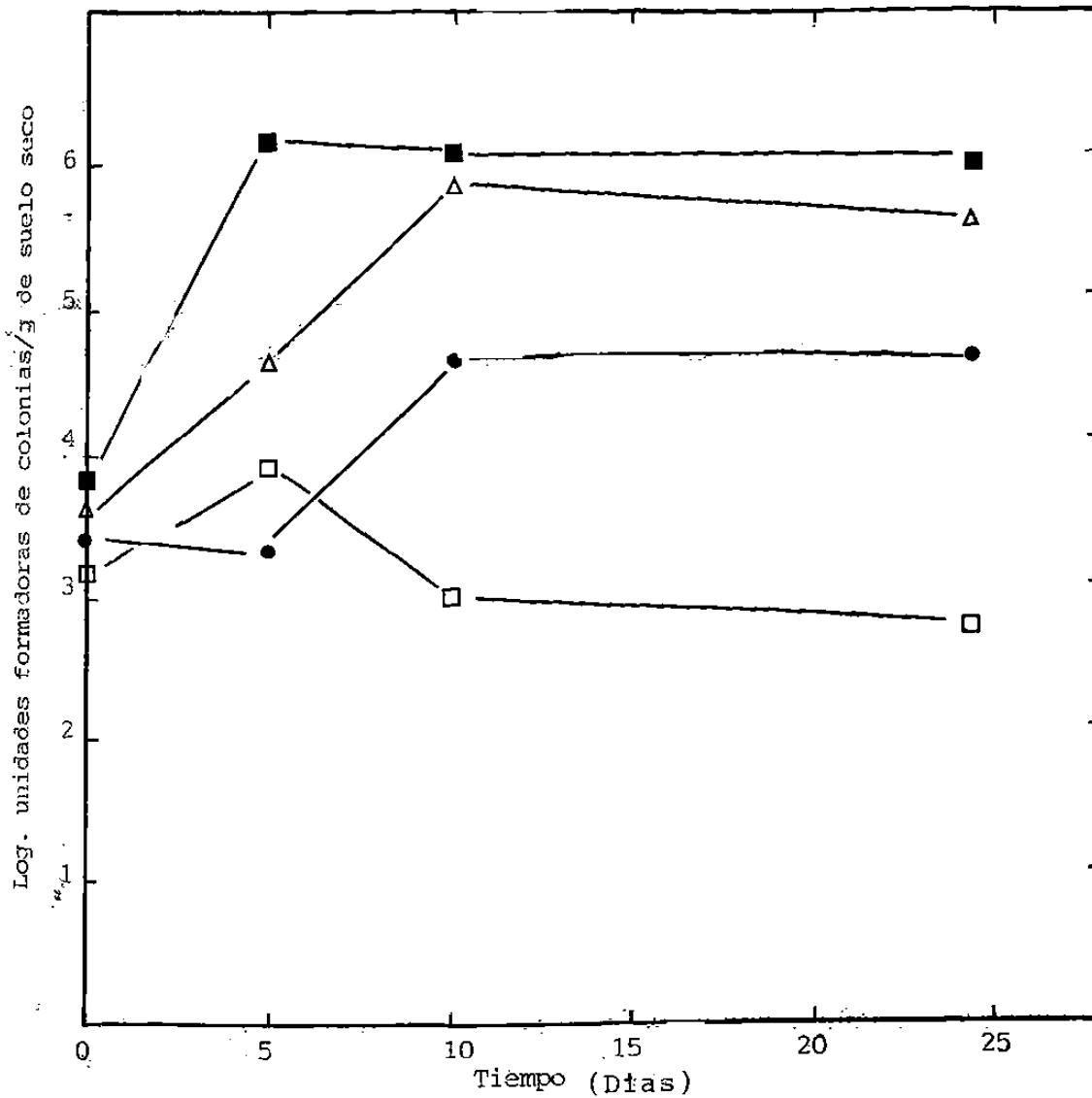


FIG. 5 . CRECIMIENTO DE *Azotobacter vinelandii* CEPA OLD-81 PLA⁻ INTRODUCIDA EN SUELOS ESTERILES CON DIFERENTES TIPOS DE TEXTURAS.

(PLA⁻) Sin plásmido, (■) aL-1 (□) bT-4 (●) cL-4
 (▲) aLL-2, a= arcillosa, b= limosa-arcillosa, c= arenosa-arcillosa, d= arcillosa-limosa

CONCLUSION

El género *Azotobacter* con énfasis en la especie *vinelandii* se considera importante para el ciclo del nitrógeno por la premisa de que al fijar nitrógeno atmosférico, contribuye a la fertilidad del suelo y por que su enzima nitrogenasa se usa como modelo genético-bioquímico de expresión de proteínas funcionales.

Para *A. vinelandii* poca o ninguna importancia se da a otro tipo de actividades o propiedades biológicas que posee, estas son conocidas sólo por algunas investigaciones que lento pero seguro, intentan modificar de fondo el concepto sobre el papel de *Azotobacter* en la naturaleza.

En general algunas de las propiedades expuestas antes y señaladas como fundamentales para el género *Azotobacter* habrán de ser revisadas como: i) Su capacidad de fijación biológica del nitrógeno molecular en condiciones naturales, aún en la rizósfera de gramíneas, ya que actualmente se ha comprobado que esta capacidad de *Azotobacter* podría ser más eventual que generalizada, ii) El mecanismo natural de sobrevivencia de la bacteria, por medio de formas celulares diferentes a los quistes y que no están ampliamente reconocidas, iii) Este es el primer reporte que establece la posibilidad de que el ADN de plásmidos puede ser estable y expresar alguna función biológica en *Azotobacter* sobrevivientes al abatimiento fisiológico, en suelos no estériles almacenados durante largos períodos.

Estos resultados sugieren también, que algunas de las características de resistencia a antibióticos y pesticidas

asociados con los plásmidos detectados en las cepas de *A. vinelandii* sobrevivientes aisladas de los suelos almacenados por 30 años, no están relacionados con actividades antropogénicas y que fueron probablemente adquiridas de otros microorganismos autóctonos e invasores del suelo, ya que estas características, se relacionaron con los plásmidos detectados en las azotobacterias aisladas de los suelos recién colectados.

Finalmente, no sabemos cuales fueron los efectos específicos de los plásmidos sobre el crecimiento y sobrevivencia de *A. vinelandii* en los suelos estériles y no estériles, debido a la escasa investigación desarrollada sobre las condiciones ambientales que inducen a la expresión de las propiedades genéticas de los plásmidos contenidas en *Azotobacter* nativos de los suelos, mucho menos sobre la capacidad de estas bacterias para mantener y transportar plásmidos con la presente investigación, por lo que probablemente estos plásmidos influyan más de lo que suponemos en el papel de *Azotobacter* en la naturaleza, lo cual no parece ser ilógico si se considera, que de acuerdo con el principio de economía energética de la célula, sólo se mantiene en ellas aquello que contribuye a la permanencia de la especie en el ecosistema.

- 1.- Abd-El-Malek, Y. 1971 Free Living Nitrogen Fixing Bacteria in Egyptian Soils and Their Possible Contribution To Soil Fertility: pp 377-391 in T. D. Lie and E. G. Mulde. eds. Biological Nitrogen Fixation in Natural and Agricultural Habitats. M. Nijhoff. The Hague. Netherlands.
- 2.- Aladebmi, S., J. C. Tasi, and G.R. Vela. 1979. Adenylate Energy Charge of *Azotobacter vinelandii* During Encysment. Current Microbiol. 2:327-329.
- 3.- Alexander, M. 1971. Microbiol. Ecology. Ed. John Wiley and Sons. New York, U.S.A. pp:200-250.
- 4.- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Second ed. Ed. John Wiley and Sons. New York, U.S.A. pp:241-326.
- 5.- Alexander, M.1981. Why Microbiol Predators and Parasites Do Not Eliminate Their Prey and Hosts. Annu. Rev. Microbiol.35:113-133.
- 6.- Alexander. M. 1977. Ecology of Nitrogen-Fixing Organisms. In Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics (A. Ayanaba and P. J. Dart, Eds), John Wiley and Sons. New York. pp: 100-119.
- 7.- Elmerich, C. 1984. Molecular Biology and Ecology of Diazotrophs Associated with Non-Legumes Plants. Biotech 11:967-970.
- 8.- Anderson, E.S. 1966. Possible Importance of Transfer R Factor in Bacterial Evolution. Nature 209:637.
- 9.- Anderson, E.S. 1968. The Ecology of Transferable Drug Resistance in the Enterobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 22:131-180.
- 10.- Atkinson, D.E. 1968. The Energy Charge of Adenylate Pool as Regulatory Parameter. Interaction With Feedback Modifier. Biochem. 7:4030-4034.
- 11.- Amy, S. P., C. Pauling, and R. Y. Morita. 1983. Starvation-Survival Processes of a Marine Vibrio. Appl Environ Microbiol. 45:1041-1048.
- 12.- Amy, P.S., and R. Y. Morita. 1983. Starvation- Survival Patterns of Sixteen Freshly Isolated Open-Ocean Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 45:1109-1115.

- 13.- Azcon, R. and J. M. Barea. 1975. Synthesis of Auxine, Gibberellins and Cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* Related to Effects Produced on Tomato Plants. *Plant Soil* 37: 451-453.
- 14.- Bakken, L. R., and R. A. Olsen. 1987. The Relationship Between Cell Size and Viability of Soil Bacteria. *Micro. Ecol* 13:103-114.
- 15.- Bakken, L. R. 1985 Separation and Purification of Bacteria From Soil. *Appl. Environ. Microbiol* 49:1482-1487.
- 16.- Balajee, S. 1989. Dissimilation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Evidence for a Dissimilatory Plasmid in *Azotobacter chroococcum*. PhD. Thesis. University of Madras. India pp:227.
- 17.- Balajee, S., and A. Mahadevan. 1989. Utilization of Chloroaromatic Substances by *Azotobacter chroococcum*. Systematic. *Appl. Microbiol.* (in press).
- 18.- Balajee, S., and A. Mahadevan. 1989. Evidence for A Dissimilatory Plasmid in *Azotobacter chroococcum*. *FEMS. Microbiol. Letters.* 65:2673-2681.
- 19.- Balajee, S., and A. Mahadevan. 1990. Utilization of Aromatic Substances by *Azotobacter chroococcum*. *Res. Microbiol.* 141:577-584.
- 20.- Bhat, J. V. 1959. Experimentos de bacterización con *Azotobacter*. Simposium sobre Radioisótopos Fertilizantes y Plantas de Gas de Estiércol de Vaca. Consejo Hindú de Investigación Agrícola. Nueva Delhi, India.
- 21.- Barea, J. M., and M. E. Brown. 1974. Effects of Plant Growth Produced by *Azotobacter paspali* Related to Synthesis of Plant Growth Regulating Substances. *J. Appl. Bacteriol.* 37:583-593.
- 22.- Baya, A. M., F. R. Brayton, V. L. Brown, D.J. Grimes, E. Russek-Cohen, and R.R. Colwell 1986. Coincident Plasmids and Antimicrobial Resistance in Marine Bacteria Isolated From Polluted and Unpolluted Atlantic Ocean Samples. *Appl. Environ. Microbiol* 51:1285-1292.
- 23.- Benemann, J. R., D. C. Yoch, R. C. Valentine, and D. I. Arnon. 1969. The Electron Transport System in Nitrogen Fixation by *Azotobacter I.* Azotofavin as an Electron Carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 6:1079-1086.

- 24.- Benemann, J. R., D. C. Yoch, R. C. Valentine, and D. I. Arnon. 1971. The Electron Transport *Azotobacter* III. Requirements for NADPH-Supported Nitrogen Activity. *Biochem. Biophys. Acta* 226: 205-212.
- 25.- Boyd, W. L. and J. W. Boyd. 1962. Presence of *Azotobacter* Species in Polar Regions. *J. Bacteriol.* 83:429-430.
- 26.- Burton, N. F., M. J. Day and A. T. Bull 1982. Distribution of Bacterial Plasmid in Clean and Polluted Sites in South Wales River. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:55-83.
- 27.- Burton, G.A., Jr., D. Gunnison, and G. R. Lanza. 1987. Survival of Pathogenic Bacteria in Various Freshwater Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:633-638.
- 28.- Burk, D., and H. Linewear. 1930. The Influence Fixation of Nitrogen on *Azotobacter*. *J. Bacteriol* 19:389-414.
- 29.- Bea, H.C., C.H. Cota-Robles, and L.E. Casida Jr. 1972. Microflora of Soil Incubation as Viewed by Transmission Electron Microscopy of Cell Thin Sections. *Appl. Microbiol.* 23:637-648.
- 30.- Beijerinck, M.W. 1901. Ueber Oligonitrophile Mikroben. *Zenbi Paras. Abat. II.* 7:561-582.
- 31.- Beijerinck, M.W., and R. Van Delden. 1902. Ueber Die Assimilation des Frein Stickstoffs Durch Bakterien. *Zentbl. Bakt. Paras. Abt.* 117:3-34.
- 32.- Bissonnettes, G. K., J. J. Jezeski, G. A. McFeters, and D. G. Stuart 1975. Influence of Environmental Stress on Enumeration of Indicator Bacteria From Natural Waters. *Appl. Microbiol.* 29:186-194
- 33.- Berkun V. P. and B. B. Bohlool. 1980. Evaluation of Nitrogen Fixation by Bacteria in Association With Roots of Tropical Grasses. *Microbiol. Rev.* 44:491-517.
- 34.- Beringer, J.E., and P.R. Hirsh. 1982. Genetic Adaptation to the Environment the Role of Plasmids in *Microbiol. Ecology*. Blackwell Scientific Publications London. pp:52-60.
- 35.- Beteson, C.L., L. Benham, and F.H. Skinner. 1986. *Microorganisms in Agriculture.* Society for Applied Bacteriology. Blackwell Scientific Publications London. pp:595-665.

- 36.- Bishop, E. P. 1981. An Alternative Nitrogen Fixation System in *Azotobacter vinelandii* in Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp:89-98.
- 37.- Bishop, P.E., and W. J. Brill. 1977. Genetic Analysis of *Azotobacter vinelandii* Mutant Strains Unable to Fix Nitrogen. J. Bacteriol. 130:954-956.
- 38.- Bishop, P. E., D. M. L. Jarlenski, and D. R. Hetherington. 1982. Expression of an Alternative Nitrogen Fixation System in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:7342-7346.
- 39.- Bulen, W.A., and J. R. Le Comte. 1966. The Nitrogenase System From *Azotobacter*. Proc Natl Acad. Sci U.S.A. 53:532-538.
- 40.- Burns, R. C., R. D. Holsten, and R. W. F. Hardy. 1970. Isolation by Crystallization of the Mo-Fe Protein of *Azotobacter* Nitrogenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39:90-99.
- 41.- Burris, R. H. 1971. Fixation by Free-Living Micro-organisms: Enzymology, p. 105-160. In J. Postgate (ed). The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation. Plenum Press, New York.
- 42.- Bush, J. A., and P. W. Wilson. 1959. A Nongummy Chromogenic Strain of *Azotobacter vinelandii*. Nature 184:381.
- 43.- Bottomeley, P. V., M. H. Dughari. 1989. Population Size and Distribution of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in Relation to Total Soil Bacteria and Soil Depth. Appl. Environ. Microbiol 55:959-964.
- 44.- Brady, N. C. 1974. The Nature and Properties of Soils. Macmillan Publishing Co., New York. pp:21-51.
- 45.- Brill, W.J. 1980. Biochemical Genetics of Nitrogen Fixation. Microbiol. Rev. 44:449-497.
- 46.- Brown. M. E. 1973. Soil Bacteriostasis in Growth of Soil and Rhizosphere Bacteria. Can. J. Microbiol. 19:195-199.
- 47.- Brown. M. E. 1976. Role of *Azotobacter paspali* in Association With *Paspalum notatum*. J. Appl. Bacteriol. 40:341-348.
- 48.- Brown. M. E. and S. K. Burlingham. 1968. Production of Plant Growth Substances by *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol 53:135-144.

- 49.- Brock, T.D. 1984. Biology of Microorganisms. First ed. Ed. Prestice-Hall. California, U.S.A. pp:20-50.
- 50.- Bull, A. T., and J. H. Slater. 1982. Microbial Interactions and Communities. The Analysis of Microbial Interactions and Communities in Situ. Academic Press. New York. pp:10-50.
- 51.- Burke, W. J., and K. W. MacDonald. 1983. Naturally Occurring Antibiotic Resistance in *Bacillus sphaericus* and *Bacillus licheniformis*. Current Microbiology 9:69-72.
- 52.- Burkard-Maturin, R. T. E., J. Wilson. 1983. Continuous Culture of *Azotobacter vinelandii* and *Candida lipolytica* In Artificial Seawater. Microbiol. Linmol. 27:547-550.
- 53.- Burns, G. R., and J.H. Slater. 1982. Experimental Microbiol. Ecology. Blackwell Scientific London. pp: 275, 555, 613.
- 54.- Byrd, J. J., and R. R. Colwell. 1990. Maintenance of Plasmids pBR 322 and pUC8 in Nonculturable *Escherichia coli* in the Marine Environment. Appl. Environ. Microbiol. 56:2104-2107.
- 55.- Caldwell, B. A., C. Ye, R. P. Goiffiths, C. Moyer., and R.Y. Morita. 1989. Plasmid Expression and Maintenance During Long Starvation Survival of Bacteria in Well Water. Appl. Environ. Microbiol. 55:1860-1864.
- 56.- Cagle, G. D., R. M. Pfister, and G. R. Vela. 1972. Improved Staining of Extracellular Polymer For Electron Microscopy: Examination of *Azotobacter*, *Zooglea*, *Leuconostoc* and *Bacillus*. Appl. Microbiol. 24:477-478.
- 57.- Cagle, G. D., R. M. Pfister, G.R. Vela and J.J. Porter. 1973. External Morphology of *Azotobacter vinelandii* During Cyst Formation. Can. J. Microbiol. 19:1481-1485
- 58.- Cagle, G. D. and G. R. Vela. 1972. Cysts of *Azotobacter vinelandii* With Double Coats. J. Bacteriol 112:615-617.
- 59.- Cagle, G. D., G.R. Vela, and R. M. Pfister. 1972. Freeze-Etching of *Azotobacter vinelandii*: Examination of Wall, Exine, and Vesicles. J. Bacteriol. 109:1191-1197.
- 60.- Casida, L. E., Jr. 1980. Death of *Micrococcus luteus* in Soil Appl. Environ. Microbiol. 39:1031-1034.

- 61.- Casida, L. E., Jr. 1980. Bacterial Predators of *Micrococcus luteus* in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:1035-1041.
- 62.- Caulcott, C. A., A. Dunn, H.A. Robertson, N. S. Cooper, M.E. Brown, and P. M. Rhodes. 1987. Investigation of the Effect of Growth Environment on the Stability of Low Number Plasmid in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 133:1881-1889.
- 63.- Cearade, J. C. 1979. Electrophoretic Mobility of Ght, High Molecular Weigh Double Tranded DNA on Agarose Gel. *Gene.* 6:221-234.
- 64.- Chen, M., and M. Alexander. 1973. Survival of Soil Bacteria During Prolonged Desiccation. *Soil Biol. Biochem* 5:213-221.
- 65.- Chen, P. W., J. Y. Chen., S. Ch. Chang, and Ch. L., Su. 1985. Bacterial Alginate by Mutant of *Azotobacter vinelandii* . *Appl. Environ Microbiol.* 49: 543-546.
- 66.- Chisnell, L. R., R. Premakumar, and P. E. Bishop. 1988. Purification of a Second Alternative Nitrogenase from a NifHDK. Deletion of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol* 170:27-23.
- 67.- Compeau, G., B. J. Al-Achi, E. Platsouka and S. B. Levy. 1988. Survival of Rifampin-Resistan Mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in Soil System. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2432-2438.
- 68.- Clark, F. E. 1965. Aerobic Sporeforming Bacteria. In C. A. Black et al. (ed.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy* 9:1473-1476. Am. Soc of Agron., Madison, Wis.
- 69.- Clark, F. E. 1965. Agar Plate Method For Total Microbial Count. In. C. A. Black et al. (ed.) *Methods of Soil Analysis Part 2 Agronomy* 9:1460-1466.. Am. Soc. of Agron., Madison Wis.
- 70.- Clewell. B. D. 1981. Plasmids, Drug Resistance, and Gene Transfer in the Genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.* 3:409-436.
- 71.- Coughter J. P., and G. J. Stewart. 1989. Genetic Exchange in the Environment. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol-Serol.* 55:15-22.
- 72.- Cole, M. A., and Elkan G. H. 1979. Multiple Antibiotic Resistance in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol* 37:867-870.

- 73.- Cooke, M. D. 1975. Antibiotic Resistance in Coliform and Fecal Coliform Bacteria From Natural Waters and Effluents. N.Z.J. Mar. Freshwater Res. 10:391-397.
- 74.- Crosse, J. E. 1968. Plant Pathogenic Bacteria in Soil. In T.R.G. Gray., and D. Parkinson. (ed). The Ecology of Soil Bacteria. Liverpool University Press. Liverpool United Kingdom. pp:552-572.
- 75.- Cruz-Cruz, N. E., G. A. Toranzos, D. G. Ahearn, and T. C. Hazen. 1988. In Situ Survival of Plasmid-Bearing and Plasmidless, *Pseudomonas aeruginosa* in Pristine Tropical Waters. Appl. Environ. Microbiol. 54:2574-2577.
- 76.- Couturier, F. B., P. L. Bergquist, and W. K. Maas. 1988. Identification and Classification of Bacterial Plasmids. Microbiol Rev. 52:375-395.
- 77.- Dalton, H., and Mortenson, E. L. 1972: Dinitrogen (N₂) Fixation (With a Biochemical Emphasis). Bacteriol. Rev. 36:231-260.
- 78.- Dacherty, A., G. Grandi., R. Gryezan., T. V. Shivakumar., A.G. Dubanav. 1981. Naturally Ocurring Macrolide Lincosamide-Streptogramin B Resistance in *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. 145: 129-132.
- 79.- Datta, N.R., W. Hedges., E.J. Shaw, R.B. Sykes., and M.H. Richmond. 1971. Properties of R Factor on *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 108:1244-1249.
- 80.- Davies, J., and D. I. Smith. 1978. Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Agents. Annu. Rev. Microbiol. 22:469-518.
- 81.- Devanas, M. A., D. Bafaeli-Eshkol., and G. Stotzky. 1986. Survival of Plasmid-Containing Strains of *Escherichia coli* in Soil: Effect of Plasmid Size and Nutrient on Survival of Hosts and Maintenance of Plasmids. Curr. Microbiol. 13:269-277.
- 82.- Davison, J. 1988. Plant Benefical Bacteria. Biotechnology 6:282-286.
- 83.- Dranos. D. J., B. C. Hemming, and S. McPherson. 1986. Tracking Recombinant Organisms in the Environment: β -galactosidase as a Selectable Non-Antibiotic Marker for Fluorescent *Pseudomonads*. Biotechnology 4:439-444.

- 84.- Dykhuizen, D. E. 1990. Experimental Studies of Natural Selection in Bacteria. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21:373-389.
- 85.- Domsch, K. H. and W. Gams. 1973. *Fungi in Agricultural Soils*. Halsted Press John Wiley and Sons, New York. pp:12-50.
- 86.- Don, R. H., and J. M. Pemberton. 1981. Properties of Six Pesticide Plasmids Degradation Isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145:681-686.
- 87.- Eggleton, W. G. E. 1934. Soil Fungi *J. Agr. Sci.*, 24:416-434.
- 88.- Elmerich, C. 1984. *Azotobacter* and *Azospirillum*. Genetic and Molecular Biology in Current Developments in Biological Nitrogen by N.S. Subba Rao and E. Arnold Publishers.
- 89.- Foster, T. 1983. Plasmid Determined Resistance To Microbial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. *Microbiol Rev* 47:361-409.
- 90.- Fredrickson, J. K., D. F. Bezdicek, F. J. Brockman, and S. W. Li 1988. Enumeration of Tn5 Mutant Bacteria in Soil by Using a Most-Probable-Number-DNA Hybridization Procedure and Antibiotic Resistance. *Appl. Environ Microbiol* 54:446-453.
- 91.- Fredrickson, J. K., R. J. Hicks., S. W. Li and F.J. Brockman. 1988. Plasmid Incidence in Bacteria from Deep Subsurface Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2916-2923.
- 92.- Gaffar, H., and S. Shethna. 1975. Partial Purification and Antitumor Activity of L-Asparaginase from *Azotobacter vinelandii*. *Curr. Sci* 44:727-279.
- 93.- Garret, S.D. 1963. *Soil Fungi and Soil Fertility*. Pergamon Press, Oxford. pp: 10-20.
- 94.- Gleckman, R. A., and M. S. Madoff. 1979. Environmental Pollution With Resistant Microbes. *N. Engl. J. Med.* 291:677-678.
- 95.- Goyal, S. M., C. P. Gerba. and J.L. Melnick. 1979. Transferable Drug Resistance in Bacteria of Coastal Canal Water and Sediment. *Water Res.* 13:349-356.
- 96.- Godwin, D., and J. H. Slater. 1979. The Influence of the Growth Environment of the Stability of a Drug Resistance Plasmid in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol* 111:201-210.

- 97.- Grabow, W. D. K., D. W. Prozesky, and J. S. Burger. 1975. Behavior in a River and Soil of Coliform Bacteria with Transferable or Non-Transferable Drug Resistance. *Water Res.* 9:779-782.
- 98.- Griffin, D. M. 1969. Plant Disease by Fungi Soil *Annu. Rev. Phytopathol.*, 7:289-310.
- 99.- Griffin, D. M. 1972. Ecology of Soil Fungi. Chapman and Hall, London. pp: 100-105.
- 100.- Gest, H., and J. Mandelstam. 1987. Longevity of Microorganisms in Natural Environments. *Microbiol. Sci.* 4:69-71.
- 101.- Glick, B. R., H. E. Brooks and J. J. Pasternak. 1985. Transformation of *Azotobacter vinelandii* With Plasmid DNA. *J. Bacteriol* 162:276-279.
- 102.- González-García, M. M., J. J. Peña-Cabriales, y J.M. Sánchez-Yáñez. 1991. Sobrevivencia y Colonización de Bacterias Fijadoras Libres de Nitrógeno en Suelo y Raíces de Gramíneas y Frijol. (En prensa).
- 103.- González-López. J., and G. R. Vela. 1981. True Morphology of *Azotobactereaceae* Filtrable Bacteria. *Nature.* 289:588-590.
- 103a.- González-López. J., Salmeron J. V. Moreno, Ramos Cormenzana A. 1983. Aminoacids and Vitamins Produced by *Azotobacter vinelandii* in Chemically-Defined Media and Dialyzed Soil Media. *Soil Biol. Biochem* 15: 711-713.
- 103b.- González-López. J., Moreno. Ballesteros F. Ramos-Cormenzana A. 1984. Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in Dialyzed and Normal Soil Media. *Microbios letters* 27: 121-126.
- 104.- González-López., V. Salmeron, M. V. Martinez-Toledo, F. Ballesteros. and A. Ramos-Cormenzana. 1986. Production of Auxin, Gibberelins and Cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837. in Chemically Defined Media and Dialysed Soil Media. *Soil Biol. Biochem.* 18:119-120
- 105.- Gray, T. R., and D. Parkinson. 1976. The Growth Bacteria in Soil Twenty Sixth Symposium of the Society for General Microbiology Cambridge. Great Britain.
- 106.- Gray, T. R. G., and S. T. Williams. (1971). Soil Microorganisms. Longman Ed. pp:55-90.

- 107.- Greene, E. M. 1980. Cytokinin Production by Microorganisms. Bot. Rev 46:25-74.
- 108.- Groseclose, E. E., and D. W. Ribbons. 1981. Metabolism of Resorcinolyic Compounds by Bacteria. Evidence of a New Pathway for Resorcinol Catabolism in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol.. 146:460-466.
- 109.- Gruss, A. and S. D. Ehrlich. 1989. The Family of Highly Interrelated Single-Stranded Deoxyribonucleic Acid Plasmids. Microbiol. Rev. 53:231-241.
- 110.- Gunsalus, I. C., M. Herman, W. A. Toscano Jr. L. Katz, and S. K. Barg. 1975. Plasmid and Metabolic Diversity. In: Microbiology. Holt, Reinhart and Wilson, Dallas, USA. pp. 98-222.
- 111.- Gupta, Y. P. 1971. 1971. Metabolic Activity of *Azotobacter chroococcum*. Indian. J. Microbiol 12:127-130.
- 112.- Gupta, Y. P. and N. B. Das. 1959. Preliminary Studies on the Synthesis of Vitamin B by *Azotobacter chroococcum*. Science and Culture 25:141-151.
- 113.- Habte, M., and M. Alexander. 1978. Mechanisms of Persistence of Low Number of Bacteria Preyed Upon By Protozoa. Soil Biol. Biol Biochem. 10:1-6.
- 114.- Hada, H. S., and R. K. Sizemore. 1981. Incidence of Plasmids in Marine *Vibrio spp* Isolated From an Oil Field in the NorthWesternGulf of Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 41:199-202.
- 115.- Hagedorn, C., W. D. Gould., T. R. Bardinelli., and D. R. Gustason. 1987. A Selective Medium For Enumeration and Recovery of *Pseudomonas cepacia* Biotypes From Soil. Appl. Environ. Microbiol. 53:2262-2264.
- 116.- Hermansson, M., G. W. Jones, and S. Kjelleberg. 1987. Frequency of Antibiotic and Heavy-Metal Resistance, Pigmentation, and Plasmid in Bacteria of the Marine Air-Water Interface. Appl. Environ. Microbiol 53:2338-2342.
- 117.- Huyer, M. and W. J. Page. 1988. Zn²⁺ Increase Siderophore Production in *Azotobacter vinelandii*. Appl. Environ Microbiol 54:2625-2631.

- 118.- Eady, R. R., and B. E. Smith. 1979. Physico-Chemical Properties of Nitrogenase and Its Components. In A Treatise On Nitrogen Fixation. Sec I and II: Inorganic and Physical Chemistry and Biochemistry. (R. W. F. Hardy., F. Bottomley and R. C. Burns Eds) Wiley and Sons. pp:399-490.
- 119.- Hardisson, C., J. M. Sala-Trepat, and R. Y. Stanier. 1970. Pathway for the Oxidation of Aromatic Compounds by *Azotobacter*. *J. Gen. Microbiol.* 58:1-11.
- 120.- Hardman, D.J., P. C. Gowland., and J.H. Slater. 1986. Large Plasmid from Soil Bacteria Enriched on Halogenated Alkanoic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:46-51.
- 121.- Harder, W., and L. Dijkhuizen. 1983. Physiology Response to Nutrient Limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:1-23.
- 122.- Hattoni, T. 1973. *Microbial Life in the Soil*. Marcel Deker. New York. pp:123.
- 123.- Hermansson, M., G. W. Jones, and S. Kijelleberg. 1987. Frequency of Antibiotic and Heavy Metal Resistance Pigmentation and Plasmid in Bacteria of the Marine Air Water Interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2338-2342.
- 124.- Henis, Y. 1987. *Survival and Dormancy of Microorganisms*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- 125.- Menschke, R. B., and F. R. J. Schmidt. 1989. Survival Distribution, and Gene Transfer of Bacteria in Compact Soil Microcosm System. *Biol. Fertil. Soils* 8:19-24.
- 126.- Herron, P. R., and E. M. H. Wellington. 1990. New Method For Extraction of *Streptomyces* Spores From Soil and Application to the Study of Lysogeny in Sterile and Nonsterile Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 1406-1412.
- 127.- Hershfield, V. 1979. Plasmids Mediating Multiple Drug Resistance in Group B *Streptococcus*: Transferability and Properties. *J. Bacteriol.* 29:250-256.
- 128.- Hill, W. E., and C. L. Carlisle. 1981. Loss of Plasmids During Enrichment for *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225-1228.
- 129.- Hennenquin, J. R. et H. Blachere. 1966. Reserches Sur La Synthèse de Phytohormones et de Composes Phenoliques Par *Azotobacter* et Des Bacteries de la Rhizosphere. *Ann. Inst Pasteur* 11:89-111.

- 130.- Holben, W. E., J. K. Jansson., B. K. Chelm, and J. M. Tiedje 1988. DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Appl. Environ. Microbiol* 54:703-711
- 131.- Iswaran, V. S., and R. Apter. 1973. *Azotobacter chroococcum* in the Phyllosphere of Water Hyacinth (*Eichornia crassipes*). *Plant and Soil* 39:461-463.
- 132.- James, N, and M. L. Sutherland. 1939. Actinomycetes *Can. J. Res., C*, 17:97-108.
- 133.- Jenkins. M. B. and P. J. Bottomley. 1985. Composition and Field Distribution of the Population of *Rhizobium meliloti* in Root Nodules of Uninoculated Field-Grown Alfalfa Soil *Biol Biochem Z*:1173-179.
- 134.- Jensen, H. C. 1954. The *Azotobacteraceae*. *Bacteriol Rev* 18:195-213.
- 135.- Joergers, R.D., M.R. Jacobson, and P. E. Bishop - Two Nif-Like Genes Required for Expression of Nitrogenase by *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol* 171:3258-3267.
- 136.- Jones, D. - 1920. Further Studies on the Growth Cycle of *Azotobacter*. *J. Bacteriol* 5:325-333.
- 137.- Johnston, D. B. 1947. Actinomycetes of Soil. *Soil Sci.* 64:453-458.
- 138.- Katznelson, H. 1940. Survival of Microorganisms Introduced Into Sterilized Soil. *Soil Sci* 49:211-217.
- 139.- Katznelson, H. 1940b. Survival of Microorganisms Introduced Into Soil. *Soil Sci.* 49:283-392.
- 140.- Kibbey, H. J., C. Hagedorn, and E. L. McCoy. 1978. Use of Fecal Streptococci as Indicators of Pollution in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:711-717.
- 141.- Klein, T. M., and M. Alexander. 1986. Bacterial Inhibitors in Lake Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:114-118.
- 142.- Knosp, O., M. Von Tigerstrom, and W. J. Page. 1984. Siderophore-Mediated Uptake of Iron in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol* 159:288-292.

- 143.- Krieg, N.R., and J.G. Holt (ed.). 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp:219-234.
- 144.- Kozynovskaya, N. A., R. I. Gvozdyak, V. A. Muras., and V. A. Korsyum. 1984. Change in Properties of Phytopathogenic Bacteria Effected by Plasmid pRD1. Arch. Microbiol. 137: 338-343.
- 145.- Krasovsky, V. N., and G. Stotzky. 1987. Conjugation and Genetic Recombination in *Escherichia coli* in Sterile and Non Sterile Soil. Soil Biol Biochem 13:631-638.
- 146.- Kado, C. I. and S. T. Liu. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmid. J. Bacteriol 145:1365-1373.
- 147.- Klech, W. J. and J. S. Lee. 1978. Antibiotic Resistance of Gram Negative Bacteria Isolated from Environmental Sources. Appl. Environ. Microbiol. 36:450-456.
- 148.- Kobori, H. C. W. Sullivan., and H. Shizuya. 1984. Bacterial Plasmids in Antarctic Natural Microbial Assemblages. Appl. Environ. Microbiol. 48:515-518.
- 149.- Krawiec, A., and R. Riley. 1991. Chromosome Organization. Microbiol. Rev. 54:500-550.
- 150.- Lawrence, J. C. 1935. Filtrability of the Swimmers of *Rhizobium* and *Azotobacter*. Nature 176:1033-1034.
- 151.- Lee, M. C., C. Breckenridge, and R. Knowles. 1970. Effect of Some Culture Condition on the Production of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol 159:288-292.
- 152.- Lewis, D. L., and D. K. Gattie. 1991. The Ecology of Quiescent Microbes. ASM. News. 57:27-32.
- 153.- Line, M. A., and M. W. Loutit. 1969. Occurrence of *Azotobacter* in Some Soils of South Island, New Zealand. N.Z. Jl. agric. Res. 12:630-638.
- 154.- Lipman, J. G. 1909. News Facts About Bacteria of California Soils. Science 29:941-942.
- 155.- Lipman, J. G. 1903. Experiments on the Transformation and Fixation of Nitrogen by Bacteria. Rev. New. Jers. St. Agric. Exp. Stn. 24th (1902/1903):217-285.

- 156.- Levy, S. B., and R. V. Miller (ed). 1989. Gene Transfer in the Environment. McGraw-Hill. New York. pp: 20-35.
- 157.- Levy, S. B. and B. M. Marshall. 1988. Genetic Transfer in the Natural Environment, pp:61-67. In M. Sussman, C. H. Collins, F. A. Skinner, and D. E. Stewart-Tull (ed). Academic Press, Inc., New York
- 158.- Lewis, L. M. 1937. Cell Inclusions and the Life Cycle of *Azotobacter*. J Bacteriol 34:191-205.
- 159.- Löhnis, F., and T. Westermann. 1909. Ueber Stickstofffixierende Bakterien Centr. Bakt. Parasitenk. 1122:234-254.
- 160.- Löhnis, F., and N. R. Smith. 1916. Life Cycle Bacteria. Agr Res. 6:675-705
- 161.- Löhnis, F. and N. R. Smith. 1923. Studies Upon the Cycles of the Bacteria. J. Agr. 23:401-432.
- 162.- Lore, A. M., K. M. S. Aziz., I. Huq., J. B. Raper., H. A. Lockman., E. F. Remmers., W. M. Soira., M. J. Voll., and R.R. Colwell. 1980. Isolation of Drug Resistance *Aeromonas hydrophila* from Aquatic Environments. Antimicrob. Agents. Chemother. 17:481-483.
- 163.- Lowendorf, H. S. 1980. Factors Affecting Survival of *Rhizobium* in Soil. Adv. Microbiol. Ecol. 4:87-124.
- 164.- Lynch, J. M., and N. J. Poole. 1979. Microbial Ecology A Conceptual Approach. Blackwell Scientific Publications. pp: 67--87.
- 165.- Mach, P. A., and D. J. Grimes. 1982. R-Plasmid Transfer in a Wastewater Treatment Plant. Appl. Environ. Microbiol. 44:1395-1403.
- 166.- Mancini, F., S. Fertels., D. Nave., and M. A. Gealt. 1987. Mobilization of Plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101 in a Laboratory-Scale Waste Treatment Facility, Appl. Environ. Microbiol. 53:665-671.
- 167.- Mackenzie, K. A., Macrae, I. C. 1972. Tolerance of the Nitrogen-Fixing System of *Azotobacter vinelandii* for 4 Commonly Used Pesticides. Antonie V. Leewuenhoek. 38:529-535.
- 168.- Macrina, F. L., D. J. Kopecko, K. R. Jones, D. J. Avers. and S. M. McCowen. 1978. A Multiple Plasmid-Containing *Escherichia coli* Strain: Convenient Source of Size Reference Plasmid Molecules. Plasmid 1:417-420.

- 169.- Maia, M. J. M. Sánchez., and R. G. Vela. 1987. Plasmids of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 158:1984-1985.
- 170.- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N.Y.
- 171.- Martin, J. K. 1975. Comparison of Agar Media for Counts of Viable Soil Bacteria. Soil. Biol. Biochem 7:401-402.
- 172.- McPerson, P., and M. A. Gealt. 1986. Isolation of Indigenous Wastewater Bacteria Strains Capable of Mobilizing Plasmid pBR325. Appl. Environ. Microbiol. 51:904-909.
- 173.- Merriot, I. D., E. A. Dawes., B. I. Rowkwy. 1981. Effect of Growth Rate and Nutrient Limitation on the Adenine Nucleotide Content, Energy Charge and Enzymes of Adenylate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. J. Gen. Microbiol. 25:375-382.
- 174.- Meyers, J.A., L. P. Sánchez., and S. Falkow. 1976. Simple Agarose Gel Electrophoresis Method for the Identification of Plasmid Deoxiribonucleic Acid. J. Bacteriol 127:1521-1537.
- 175.- Mehdora, M. S., H. Phadinis, and H. K. Das. 1983. Construction of a Gene Library From the Nitrogen Fixing Aerobe *Azotobacter vinelandii*. Gene 25:355-360.
- 176.- Mishustin, E. N. 1956. Soil Fungi. Soils Fert.. 19:385-392.
- 177.- Moreno, J. 1986. Actividad Biologica de *Azotobacter* en el Suelo, Fijación Biológica de Nitrógeno Atmosférico y Utilización de Compuestos Fenólicos. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España. (Inédita). pp:45-65.
- 178.- Moreno, J., J. Gonzalez-Lopez and G. R. Vela. 1986. Survival of *Azotobacter spp* in Dry Soils. Appl. Environ. Microbiol 51:123-125.
- 179.- Madson, E. L., and M. Alexander. 1982. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* Through Soil. Soil Sci Soc. Am. J. 46:557-560.
- 180.- Marshall, K. C. 1964. Survival of Root-Nodule Bacteria in Dry Soils Exposed to High Temperatures. Aust. J. Agric. Res. 15:273-281.

- 181.- Mahler, R. L. and A. G. Wollum, II. 1981. The Influence of Soil Water Potential and Soil Texture on the Survival of *Rhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* Isolated in the Soil. *Soil Sci. Am. J.* 45:761-766.
- 182.- Mayfield, C. I., S. T. Williams, S. M. Ruddeck., and H. L. Hatfield. 1972. Studie on the Ecology of Actinomycetes in Soil. IV. Observations on the Form and Growth of *Streptomycetes* in Soil. *Soil Biol. Biochem.* 4:79-91.
- 183.- Mergeay, M. D Springael., and E. Top. 1990. Gene Transfer in Polluted Soil. In J. Fry (ed.). *Bacterial Genetics and Natural Environments*. Marius Press. Lancashire. United Kingdom. pp:100-170.
- 184.- Morita, R. Y. 1982. Starvation-Survival of Heterotrophs in the Marine Environment. *Adv. Microbio. Eco.* 6:171-198.
- 185.- Mulder, E. G. and S. Brotonegoro. 1974. Free-Living Heterotrophic Nitrogen-Fixing Bacteria. In *The Biology of Nitrogen Fixation* Quispel, A. Ed. A. Neuberger and E. L. Tatum, ed. North Holland Co. Amsterdam. pp:37-85.
- 186.- Mulder, E. G. 1975. Physiology and Ecology of Free-Living Bacteria. In *Nitrogen Fixation by Free-Living Micro-Organisms*. Stewart, W. D. P. Ed.. International Biological Programme 6. Cambridge University Press. pp:3-101.
- 187.- Murray, G. E., R. S. Tobin, B. Junkins, and D. J. Kushner. 1984. Effect of Chlorination on Antibiotic Resistance Profiles of Sewagw-Related Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:73-77.
- 188.- Nelson, L., and D. Parkinson. 1978. Effect of Starvation on Survival of Three Bacterial Isolates From an Artic Soil. *Can. J. Microbiol.* 24:1460-1467.
- 189.- Nuti, M. A. Lepidi, R. K. Prakash, R. Schlieperoord, and C. Cannon. 1976. Evidence for Nitrogen Fixation (*Nif*) Genes on Indigenous *Rhizobium* Plasmid. *Nature* 282:533-535.
- 190.- Novick, P. R., R. C. Clowes, S. N. Cohen., R. Curtis III, N., Dattas, Falkow. 1976. Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids: A Proposal. *Bacteriol. Rev.* 40:166-189.
- 191.- Olsen, R. H., and P. Shipley. 1973. Host Range and Properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R Factor. *J. Bacteriol.* 113:772-780.

- 192.- Olson, B. H., T. Barkay, and R. R. Colwell. 1979. Role of Plasmids in Mercury Transformation by Bacteria Isolated From the Aquatic Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:478-485.
- 193.- Ocampo, J. A., J. M. Barea, and E. Montoya. 1975. Interactions Between *Azotobacter* and Phosphobacteria and Their Establishment in the Rhizosphere as Affected by Soil Fertility. *Can. J. Microbiol.* 21:1160-1165.
- 194.- Dgunseitán, G. A., E. T. Tedford, D. Pacia, K. M. Sirotkin, and G. S. Sajler. 1987. Distribution of Plasmids in Groundwater Bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 1:311-317.
- 195.- Page, W. J. 1977. Transformation of *Azotobacter vinelandii* Strains Unable To Fix Nitrogen With *Rhizobium* spp. DNA. *Can. J. Microbiol.* 24:209-214.
- 196.- Parker, C. A. 1955. Non Symbiotic Nitrogen Bacteria in Soil Studies on *Azotobacter*. *Aust. J. Agric. Res.* 6:388-397.
- 197.- Punita, S.J., M.A. Reddy, and H.K. Das. 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 171:3133-3138.
- 198.- Peña-Cabriales, J. J. and Alexander. 1979. Survival of *Rhizobium* in Soils Undergoing Drying. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 43: 962-966.
- 199.- Peterson, H. B., and Gooding, H., 1941. The Geographic Distribution of *Azotobacter* and *Rhizobium meliloti* in Nebraska Soil in Relation to Certain Environmental Factors. *Nebr. Agri. Exp. Sta. Bull* 121.
- 200.- Poindexter, J. S. 1985. Leadbetter Bacteria in Nature Bacteria Activities in Perspective. Plenum Press. New York. pp:178-190.
- 201.- Postgate, J. R., and J. R. Hunter. 1962. The Survival of Starved Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 29:233-263.
- 202.- Raffii, F., and D. L. Crawford. 1988. Transfer of Conjugative Plasmids and Mobilization of a Nonconjugative Plasmid Between *Streptomyces* Strains on Agar and in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1334-1340.
- 203.- Rangaswami, G. K. and U. Sadasivami. 1964. Studies on the Occurrence of *Azotobacter* in Some Soil Types. *Res. de la Soc. Hindú de Ciencia de los Suelos.* 12:1-10.

- 204.- Reaney, D. 1976. Extrachromosomal Elements as Possible Agents of Adaptation and Development. *Bacteriol. Rev.* 40:552-590.
- 205.- Reddy S. B. and G. R. Vela. 1986. Resistance and Morphology of *Azotobacter vinelandii* Growth on Dialized Soil Agar. Department of Biological Sciences. North Texas State University Denton, Texas. 76201. U.S.A. (sin publicar)
- 206.- Robson, R. L., J. A. Chesshyre, C. Wheeler., R. Jones., P. R. Woodley., J. R. Postgate. 1984. Genome Size and Complexity in *Azotobacter chroococcum* *J. Gen Microbiol* 130:1603-1612.
- 207.- Reaney, D. C., P. C. Gowland., and J. H. Slater. 1983. Genetic Interactions Among Microbiol Communities. pp:379-421. In J.H. Slater. R. Whittenbury., and J.W.T. Wimpenny (ed). *Microbes in Their Natural Environments*. Society for General Microbiology No. 34. Cambridge University Press, Cambridge.
- 208.- Richmond, M.H. 1969. Extrachromosomal Elements and The Spread of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Biochem. J.* 113:225-234.
- 209.- Rosswall, T. 1972. *Modern Methods in the Study of Microbiol Ecology* Blackwell Scientific Publications. New York. pp:17, 170, 237, 239.
- 210.- Roszak, D. B., and, R. R. Colwell. 1987. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiol. Rev.* 51:365-379.
- 211.- Rubenchik, L. I. 1960. *Azotobacter* and Its Use in Agriculture. Published for the National Science Foundation, Washington, D. C. Translated from Russian (1963). pp:1-20, 50-80.
- 212.- Sadoff, H., L. B. Simek, and, S. Ellis 1979. Characterization of *Azotobacter vinelandii* Deoxyribonucleic Acid and Folded Chromosomes. *J. Bacteriol.* 138:871-877.
- 213.- Sadoff, H. L. 1975. Encystment and Germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* 39:516-539.
- 214.- Sánchez, J. M., J. Moreno., and, G. R. Vela. Survival of *Azotobacter spp* in Dry Soil. Fall Meeting Texas Branch American Society for Microbiology. Temple, Texas., October 23-25. 1986.

- 215.- Samina, J. R. R., M. A. Reddy, and H. K. Das. 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol* 171:3133-3138.
- 216.- Sala-Trepat, J. M., and W. C. Evans. 1971. The Metabolism of 2-Hydroxymuconic Semialdehyde by *Azotobacter* sp. *Europ. J. Biochem.* 20:400-413.
- 217.- Sardeshpande, J. S., R. H. Balasubramanya, J. H. Kulkarni., and D. J. Bagyaraj. 1977. Protozoa in Relation to *Rhizobium* S-12 and *Azotobacter chroococcum* in Soil. *Plant Soil.* 47:75-80.
- 218.- Save, D.J., O. Ogunseitan, G. S. Saylor., and R. V. Miller. 1987. Potential for Transduction of Plasmids in a Natural Freshwater Environment: Effect of Plasmid Donor Concentration and Natural Microbiol Community in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:985-987.
- 219.- Sen, A. 1955. Studies on Nitrogen Fixation by *Azotobacter* Occurring in Tank Silts. *Rev. Hindu. Cien. Agr.* 25:131-142.
- 220.- Sjogren, E. R. and M. J. Gibson. 1981 Bacterial Survival in a Dilute Environment. *Appl. Environ Microbiol* 41: 1331-1336.
- 221.- Smith, D. H., and R. G. Vela 1985. Growth of *Azotobacter vinelandii* in Soil Medium a Problem With Energy Charge Values. Department of Biological Sciences, North Texas State University. Denton, Texas 76201. U. S. A. (sin publicar).
- 222.- Sinclair, J. L. and M. Alexzander. 1984. Role of Resistance to Starvation in Bacterial Survival in Sewage and Lake Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:410-415.
- 223.- Sinclair, J. L., and M. Alexander. 1989. Effect of Protozoan Predation on Relative Abundance of Fast and Slow-Growing Bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25:572-582.
- 224.- Summers, J. O., and G. A. Jacoby. 1978. Plasmid-Determined Resistance to Boron and Chromium Compound in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 637-640.
- 225.- Sneath, P.H.A. 1962. Longevity of Microorganisms. *Nature.* 195:643-646.
- 226.- Stotzky, G. 1965. Replica Plating Technique for Studying Microbial Interactions in Soil. *Can. J. Microbiol.* 11:629-636.

- 227.- Tiller, B. J. ad T. Y. Wong. 1989. Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* Culture Medium. *Appl. Environ Microbiol* 55:266-267.
- 228.- Tamhane, R.V., D.P. Motiramani, y Y.P. Bali. 1970. Suelos: su Química y Fertilidad en Zonas Tropicales. Ed. Diana. Mexico. pp:256-260.
- 229.- Soil Survey of Denton County of Texas. 1980. USDA. Soil Conservation Service in Cooperation with Texas Agricultural Experiment Station. pp:1-8, 50-70.
- 230.- Tchan, Y. 1979. Family II. *Azotobacteraceae*. *Fibram* 1933. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.) Eds. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. pp:219-234. Williams and Wilkins Baltimore.
- 231.- Tang, Y.J., and M. Alexander. 1987. Absence of a Role for Lytic Microorganisms in the Decline of Bacteria and *Saccharomyces* Introduced Into Soil. *Microb. Ecol.* 14:67-73.
- 232.- Tiedje, J.M., R.K. Colwell, Y.L. Grossman, R.E. Hodson, R.E. Lenski, R.N. Mack, and P.J. Regal. 1989. The Planned Introduction of Genetically Engineered Organisms: Ecological Considerations and Recommendations. *Ecology* 70:298-315.
- 233.- Timoney, J. F., J. Port, J. Giles, and J. Spanier. 1978. Heavy Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sediments of New York Bight. *Appl. Environ Microbiol.* 36:465-472.
- 234.- Thompson, J. P. V. B. Skerman. 1979. *Azotobacteraceae*. The Taxonomy and Ecology of Aerobic Nitrogen Fixing Bacteria. Academic Press. Ltd. London. pp:250-360.
- 235.- Tortolero, M. E. Santero. and J. Casadesus. 1983. Plasmid Transfer and Mobilization of Nif Markers in *Azotobacter vinelandii*. *Microbios. Letters.* 22:21-35.
- 236.- Trevors, J. T. and K.M. Dodie. 1986. R-Plasmid Transfer in Soil and Water. *Can. J. Microbiol.* 32:611-613.
- 237.- Trevors, J. T., T. Barkay., and W. Soullain. 1987. Gene Transfer Among Bacteria in Soil and Aquatic Environments a Review. *Can. J. Microbiol.* 33:191-198
- 238.- Trevors, J. T., J. D. Van Elsas, L. S. Van Overbeek and M. E. Starodub. 1989a Transport of a Genetically Engineered *Pseudomonas fluorescens* Strain Through a Soil Microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:401-408

- 239.- Trevors, J. T., J. D. Van Elsas, M. E. Starodub., and L. S. Van Overbeek. 1989. Survival of and Plasmid Stability in *Pseudomonas* and *Klebsiella* spp. Introduced Into Agricultural Drainage Water Can. J. Microbiol. 35:675-680.
- 240.- Unsworth, B. A., T. Cross, M. R. D. Seaward, and R.E. Sims. 1977. The Longevity of Thermoactinomycete Endospore in Natural Substrates. J. Appl. Bacteriol. 42:45-52.
- 241.- Van Elsas, J.,D., A. F. Dijkstra, J. M. Govaert.,and J. A. Van Veen. 1986. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* Introduced Into Two Soils of Different Texture in Field Microplots. FEMS Microbiol. Ecol. 30:151-160.
- 242.- Van Elsas, J. D., J. T. Trevors, L. S. Van Overbeek.,and M. E. Starodub 1989a. Survival of *Pseudomonas fluorescens* Containing Plasmid RP4 or pRK2501 and Plasmid Stability After Introduction into Two Soils of Different Texture. Can J. Microbiol. 35:951-959.
- 243.- Van Elsas, J. D., J. T. Trevors, M. E. Starodoub., and L. S. Van Overbeek. 1990. Transfer of Plasmid RP4 Between *Pseudomonas* after Introduction Into Soil Influence of Spatial and Temporal Aspects of Inoculations. FEMS. Microbiol. Ecol. 73:1-12.
- 244.- Vela, G. R. 1974. Survival of *Azotobacter* in Dry Soil. Appl Microbiol 28:77-79.
- 245.- Vela, G. R. and D. Wyss. 1965. Radiation Resistance of Soil *Azotobacter*. J. Bacteriol 89:1280-1285.
- 246.- Vela, G. R., and G. Cagle. 1969. Formation of Fragile Cysts by a Strain of *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol. 57:365-368.
- 247.- Vela, G. R., and G. D. Cagle.1972. Aggregates of *Azotobacter vinelandii* Cysts. Can. J. Microbiol. 18:371-373.
- 248.- Vela, G. R., G. D. Cagle, and P.R. Holmgren 1970. Ultrastructure of *Azotobacter vinelandii* J. Bacteriol. 104:933-939.
- 249.- Vela, G. R., and R. S. Rosenthal. 1972. Effects of Peptone on *Azotobacter* Morphology. J. Bacteriol. 111: 260-266.
- 250.- Wilson, F. W. and S. G. Knight. 1952. Experiments in Bacterial Physiology. Burges, Publishing Co., Minneapolis. MN.

251.- Winogradsky, S. 1938. Etudes sur La microbiologie du sol et des eaux Sur la morphologie et L' ecologie des *Azotobacter*. Ann. Inst. Pasteur. 60: 351-400.

252.- Waskman, S. A., and H. B. Woodruff. 1942 The Occurrence of Bacteriostatic and Bactericidal Substances in the Soil. Soil Sci. 53:233-239.

253.- Wellington, E.M.H., V.A. Saunders, N. Cresswell., and A. Wipat. 1988. Plasmid Transfer Between *Streptomyces* in Soil pp:303-305 In Y. Okami, T. Beopu and H. Ogawara (ed) *Biology of Actinomycetes*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

254 - Wellington, E. M. H., N Cresswell., and V. A. Saunders. 1990. Growth and Survival of Streptomyceete Inoculants and Extent of Plasmid Transfer in Steril and Nonsterile Soil. Appl. Environ. Microbiol. 56:1413-1419.

255.- West N. E and Skujins, J.J. 1978. Nitrogen in Desert Ecosystems. Dowden, Hutchinson, Ross, Inc. pp:20-30.

256.- Wiggins, B.A., Jones, B. H. and M. Alexander. 1987. Explanations for the Acclimation Period Preceding the Mineralization of Organic Chemicals in Aquatic Enviroments. Appl. Environ. Microbiol. 53:791-796.

257.- Wu L , P. W. Hull and R. H. Burris. 1943. Competition Between Free and Combined Nitrogen in Nutrition of *Azotobacter* Proc, Natl, Acad. Sci. USA 29:289-294.

258.- Wu, F. J., J. Moreno, and, G. R. Vela. 1987. Growth of *Azotobacter vinelandii* on Soil Nutrients. Appl Environ. Microbiol. 53:489-494.

259.- Xu H. S., N. Roberts, F. L. Sengleton, R. W. Atwell, D. J. Grimes., and R.R. Colwell. 1982. Survival and Viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the Estuarine and Marine Environment. Microb. Ecol. 8:313-323.

260.- Yano K., M. Anazawa., F. Murai., and M. Fukuda. 1984. pMY1 a Large Plasmid of *Azotobacter vinelandii* AVY5, Has DNA Sequences Hybridizable to KpnI and PpKyl ans PpXvl. In Advances in Nitrogen Fixation Research. C. Veeger and W.E. Newton (eds) Wageningen., Netherland. pp:200-235.

261.- Van Elsas , J. D., J. M. Govaert., and J. A. Van Veen. 1987. Transfer of Plasmid pFT30 Between Bacilli in Soil as Influenced by Bacterial Population Dynamics and Soil Conditions. Soil Biol. Biochem. 19:639-647.

262.- Zechman, J. M., and L. E. Casida. Jr. 1982. Death of *Pseudomonas aeruginosa* in Soil. Can. J. Microbiol. 28:788-794.

