

TREBALL DE RECERCA

TOT UN MÓN
ENTRE ARRELS

*Efecte d'Azospirillum Brasilense en
plantes de panís i tomàquet*

Índex

Índex de Figures	4
Índex de Taules	7
Índex de Gràfics.....	8
1. Introducció	9
2. Marc teòric	12
2.1. Gènere <i>Azospirillum</i>	12
2.2. Relació <i>Azospirillum</i> -planta.....	18
2.3. Fisiologia	21
2.3.1. Fixació de nitrogen	21
2.3.2. Biosíntesi d'hormones de creixement	23
2.3.3. Més absorció de nutrients	24
2.4. <i>Azospirillum brasilense</i> sp245.....	25
3. Objectius i hipòtesi	27
4. Material i medis	28
4.1. Material comú.....	28
4.2. Maquinària comú.....	30
4.3. Medis de cultiu	34
5. Capítols.....	36
Capítol 1. Comprovació del medi Roig Congo.	36

Capítol 2. Microscopi de rastreig I: Tinció de contrast.	39
Capítol 3. Microscopi de transmissió: Tinció senzilla.	45
Capítol 4. Mètode per avaluar la implantació d' <i>A. brasilense</i> a arrels de tomàquet i panís.....	52
Capítol 5. Microscopi de rastreig II: Visualització de les llavors inoculades.	73
Capítol 6. Microscopi de fluorescència I: Funcionament del tints per a bacteris.....	80
Capítol 7. Microscopi de fluorescència II: Viabilitat dels bacteris al temps de la inoculació.	86
6. Conclusions finals	89
7. Bibliografia.....	91

Índex de Figures

Figura 1. Bacteris gram positius (tintats de color lila). Bacteris gram negatius (tintats de color rosa). –Font: Wikipedia-.	13
Figura 2. Parts d’una arrel.	19
Figura 3. Fixació del bacteri mitjançant un procés bifàsic a la superfície de l’arrel.	20
Figura 4. Fixació de nitrogen a través de l’enzim nitrogenasa. –Font: text de Biologia 2 Batxillerat-.	22
Figura 5. Il·lustració del material utilitzat en els assajos del treball.	28
Figura 6. Preparació dels CDs pels assajos posteriors.	30
Figura 7. Sala d’autoclaus.	31
Figura 8. Laboratori d’ús comú. Les campanes de flux laminar al fons.	31
Figura 9. Espectrofotòmetre del laboratori de virologia.	32
Figura 10. Centrífuga del laboratori de virologia.	32
Figura 11. Càmara de cultiu.	33
Figura 12. Agitador.	33
Figura 13. Agitador magnètic (A) amb un pHmetre –mesura el pH de la mostra- (B).	34
Figura 14. En la Placa A s’observa el medi Roig Congo, en la placa B es mostra el cultiu d’ <i>A. brasilense</i> amb una nansa de sembra, anomenat sembra per estries, i la placa C el cultiu del bacteri amb una nansa de vidre.	38
Figura 15. Microscopi electrònic de rastreig de la Universitat de Lleida.	40
Figura 16. Primer assaig en el microscopi de rastreig.	43

Figura 17. Segon assaig en el microscopi de rastreig.....	43
Figura 18. Tercer assaig en el microscopi de rastreig	44
Figura 19. Microcopi electrònic de transmissió de la Universitat de Lleida.....	46
Figura 20. Assaig 1 al microscopi de transmissió.....	48
Figura 21. Assaig 2 al microscopi de transmissió.....	49
Figura 22. Assaig 3 al microscopi de transmissió.....	50
Figura 23. Bacteri d' <i>A. brasilense</i> al microscopi de rastreig	51
Figura 24. Imatges del desenvolupament de les llavors de panís a les capsas de CD esterilitzades.....	54
Figura 25. Tubs de Falcon® amb les llavors de panís i tubs Eppendorf® amb les llavors de tomàquet.....	56
Figura 26. Seguiment del creixement de les llavors de panís sense bacteri en els CDs.....	62
Figura 27. Seguiment del creixement de les llavors de panís amb bacteri en els CDs.....	63
Figura 28. Seguiment del creixement de les llavors de tomàquet en els CDs.....	64
Figura 29. Arrels de panís cultivades sense <i>A. brasilense</i> (A) i amb <i>A. Brasilense</i> (B).	68
Figura 30. Arrels de tomàquet cv. Boludo cultivades sense <i>A. brasilense</i> (A) i amb <i>A. brasilense</i> (B).	69
Figura 31. Arrels de tomàquet cv. San Pedro cultivades sense <i>A. brasilense</i> (A) i amb <i>A. brasilense</i> (B).	70
Figura 32. Evaporació de carboni de les llavors de tomàquet i de panís.....	75
Figura 33. Visualització de les llavors inoculades de panís.....	76

Figura 34. Visualització de les llavors inoculades de tomàquet cv. Boludo.....	77
Figura 35. Llavor de tomàquet cv. Boludo amb <i>A. Brasilense</i>	78
Figura 36. Visualització de les llavors inoculades de tomàquet cv. San Pedro.....	79
Figura 37. Microscopi de fluorescència. Font: -Wikipedia-.....	81
Figura 38. Assaig 1 de la tinció amb fluorocroms dels bacteris.....	84
Figura 39. Assaig 2 de la tinció amb fluorocroms dels bacteris.....	85
Figura 40. Comparació de les imatges obtingudes al microscopi de fluorescència. Una imatges amb els bacteris de la rizosfera i l'altra amb els bacteris de l'interior de l'arrel.	87

Índex de Taules

Taula 1. Ventall de beneficis que poden aportar les PGPR a les plantes. Font: -
Encyclopedia of soils in the environment- 16

Taula 2. Seguiment de les llavors cultivades en els CDs (juliol 2013). 60

Taula 3. Seguiment de les llavors cultivades en les bosses Whirl Pak® (juliol 2013). 61

Taula 4. Taula on es mostren els percentatges de les llavors germinades tant en CDs
com en bosses. 66

Índex de Gràfics

Gràfic 1. Quantitat de llavors germinades i sense germinar en el cultiu de llavors en CDs..... 66

Gràfic 2. Quantitat de llavors germinades i sense germinar en el cultiu de llavors en bosses..... 66

Gràfic 3. Percentatge global de llavors germinades. 67

Gràfic 4. Recompte de bacteris..... 71

1. Introducció

Durant el període escolar ens enfrontem a una gran quantitat de reptes i entrebancs que anem superant a poc a poc amb tranquil·litat i sense cap tipus de problemes. Els treballs i exposicions que ens van proposant els professors no són grans projectes i per tant no requereixen de molt temps de preparació. Ara bé, a primer de batxillerat se'ns va oferir desenvolupar un treball de recerca, un treball complicat. El qual s'ha d'agafar amb ganes perquè no és un simple treball que es pugui acabar amb una sola tarda, sinó que és un projecte que es desenvolupa durant sis mesos. El més complicat del treball de recerca és com elegir el tema, el tema marcarà la diferència i sobretot despertarà les teves ganes de seguir endavant.

En un principi tenia un munt de dubtes rondant pel meu cap, ben bé no sabia ni de quin àmbit agafar-lo perquè no tenia clar quina assignatura m'agradava més. En pic em vaig endinsar en la recerca del tema vaig veure que els temes que més m'atreïen eren aquells de biologia, els trobava més interessants i em sentia còmoda pensant que el meu treball podria tractar d'algun d'aquests.

En un principi vaig començar a endinsar-me en el món dels microbis de quiròfan, era un tema que em tocava de ben a prop ja que el meu padrí va morir degut a això; quan ja el tenia ben encaminat em va sorgir una oportunitat única. El projecte Itinera em va proporcionar entrar a formar part d'un equip d'investigació. En el primer moment estava una mica oposada a portar-lo a terme, però quan vaig començar les pràctiques em vaig adonar que era un tema molt interessant, el qual ara m'encanta, i amb el que podia aprendre un gran seguit de tècniques de laboratori i conèixer en primera persona que és dur una investigació.

Azospirillum brasilense és un bacteri gram-negatiu i que pertany a la família dels Proteobacteris, aquest bacteri es troba en el sòl i sobretot a la zona que envolta les arrels de la planta i té la capacitat d'aportar grans beneficis a la planta, una vegada ha estat inoculada amb aquest bacteri.

M'he basat en poder conèixer de més a prop aquest bacteri, primer informant-me mitjançant articles i informació de la xarxa. Una vegada ja entrada en matèria vaig conèixer el bacteri a través de diferents tipus de microscopis, de transmissió, de rastreig i de fluorescència, i diferents tècniques. Finalment, he dut a terme un estudi amb llavors de panís i dues varietats de llavors de tomàquet, la Boludo i la San Pedro, en el qual s'ha intentat veure la implantació i els efectes d'*A. brasilense* en les plantes.

Aquest treball de recerca consta d'una part teòrica, on es troba la descripció del bacteri, les seves característiques i l'efecte que té sobre les plantes, i d'una part pràctica. La part pràctica s'ha estructurat mitjançant capítols, ja que conté moltes pràctiques i aquesta manera d'estructuració permet que es faci més entenedor i sigui més fàcil pel lector situar-se i seguir el fil del treball de recerca. La part pràctica està formada per assaigs tant de laboratori com de microscòpia, gràcies als quals s'ha anat entrant amb contacte amb el bacteri i el seu entorn.

Totes les imatges que constitueixen aquest treball de recerca han estat fetes per mi, excepte aquelles que al peu de la imatge posa la font d'on han set extretes.

Finalment trobem les conclusions del treball de recerca, on es dona resposta a les hipòtesis i objectius prèviament pensats. I a continuació trobem la bibliografia, formada per totes les pàgines i articles d'on s'ha obtingut la informació, i els annexos on es troba un CD amb totes les imatges que componen el treball de recerca.

Durant tot el treball s'han trobat diferents dificultats, si més no, perquè en tota pràctica de laboratori sempre hi ha impediments i factors externs que influeixen en el resultat de la pràctica, com l'estat dels bacteris, la contaminació, la temperatura i concentració de les mostres.... Un dels majors problemes trobats i encara no corroborats, és que es creu que les llavors de tomàquet Boludo utilitzades eren molt antigues i podien haver perdut la viabilitat, fet que ha perjudicat en algun dels resultats obtinguts.

Aquest treball consta d'un procés llarg i constant, ja que s'han d'inocular les llavors, sembrar-les, germinar-les i esperar a obtindre resultats; ara bé, si després de dues setmanes els resultats obtinguts no són els esperats s'ha de tornar a repetir-ho des

de zero. La motivació i les ganes de treballar són els que em feien tirar endavant i a no desesperar-me en cada pràctica fallida. Les ganes d'aprendre diferents tècniques de laboratori i la possibilitat que em van brindar al poder treballar en un equip d'investigació, amb professionals experts en el tema i on jo n'era una més entre tots ells, és el que em va ajudar a mirar endavant.

La veritat és que ha estat una experiència inoblidable i que a part de poder desenvolupar el treball de recerca, el més important és que he pogut veure com es treballa en un laboratori, les diferents tècniques que s'utilitzen, la maquinària i finalment, m'ha ajudat a encarar el meu futur i ha decidir-me per una carrera.

2. Marc teòric

Abans de començar a treballar amb el bacteri *A. Brasilense* i desenvolupar la part pràctica del treball de recerca, s'ha de cercar la informació necessària per conèixer com és el bacteri i les seves característiques.

2.1. Gènere *Azospirillum*

El gènere actual *Azospirillum* va ser descobert al 1925 per Beijerinck, qui el va anomenar "*Spirillum lipoferum*". El seu estudi es va deixar al marge de les investigacions fins l'any 1973, quan gràcies a les observacions de Peña-Cabriales i Döbereiner, va començar l'edat moderna del bacteri. Estudis taxonòmics posteriors van portar a la reclassificació del bacteri i ja definitivament el varen anomenar *Azospirillum*, nom que ha perdurat fins l'actualitat.

En un principi es pensava que el gènere *Azospirillum* només estava format per dues espècies, *A. lipoferum* i *A. brasilense*. Però aquest llistat va canviar en la novena edició del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" on se'n van arribar a distingir fins a sis espècies diferents: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. irakense* i *A. largimobile* (Holt, 1994). Aquest grup de sis espècies d'*Azospirillum* és el mateix que es coneix avui en dia.

Azospirillum és un subgrup de bacteris que pertany al grup dels Proteobacteris, nom que prové del Déu grec "Proteus", que podia assumir moltes formes. Aquesta agrupació és extensa i complexa, i conté al voltant d'unes 1300 espècies de microorganismes que només estan relacionades des del punt de vista filogenètic, és a dir, la proximitat evolutiva. Ja que tots els bacteris provenen d'un avantpassat fotosintètic en comú, tot i que ara molts d'aquests microorganismes han perdut la capacitat fotosintètica. Tot i tenir un avantpassat comú aquests bacteris són molt variables en quant a la morfologia (forma), fisiologia (funció que duen a terme) i el tipus de vida que desenvolupen.

Tots els Proteobacteris són gram negatius (gram -), per tant es tenyeixen d'un color rosat en la tinció de Gram. Els bacteris gram positius i gram negatius es diferencien principalment per la seva paret bacteriana, tot i això en el dos tipus de bacteris la capa més interna de la paret bacteriana està formada per mureïna (peptidoglicà) format per N-acetilglucosamina i N-acetilmuramic, responsables de la rigidesa. No obstant, la capa externa de la paret bacteriana no és la mateixa per bacteris gram + i gram - . En els bacteris gram negatius és una capa més prima i que conté lipoproteïnes, proteïnes i lipopolisacàrids i a més a més té propietats antigèniques. D'altra banda la paret dels bacteris gram positius és més gruixuda i està formada per àcids teicòids, polisacàrids i proteïnes.

Gràcies a la diferent composició de la paret bacteriana, els bacteris gram + i gram - es tenyeixen de forma diferent en la tinció de Gram. Aquesta és una tinció diferencial on els bacteris gram + resisteixen la decoloració amb alcohol i acetona i mantenen el color lila, mentre que els bacteris gram - perdent el color prèviament adquirit perquè són més permeables al alcohol que és l'encarregat de destenyir el colorant adquirit (Figura 1).

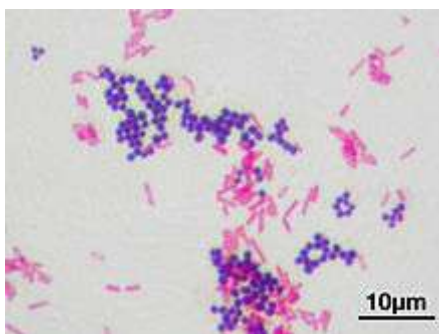


Figura 1. Bacteris gram positius (tintats de color lila). Bacteris gram negatius (tintats de color rosa). –
Font: Wikipedia-.

Aquest grup tant gran de Proteobacteris es divideix en cinc subapartats (que reben el nom de lletres gregues): El subgrup “alfa” inclou als bacteris que creixen amb nivells baixos de nutrients i algunes estan dotades de prolongacions cel·lulars; els “beta” tenen la característica d’habitar tant en aigua com en el sòl; en els “gamma” s’inclou les ordes de *Pseudomonas* i *Echerichia*; dels “delta” en són exemples el gènere

Bdellovibrio i finalment el subgrup “èpsilon” inclou a gèneres de patògens humans. *Azospirillum* per tant, pertany als alfa-proteobacteris on s’inclouen tant els bacteris fixadors de nitrogen, com els quimioautòtrofs¹ i els quimioheteròtrofs².

Azospirillum és un alfa-proteobacteri que es troba a la rizosfera, nom que ha esdevingut de la paraula grega “rhiza” que significa arrel. Com el seu nom indica aquest bacteri es troba principalment en la zona que envolta les arrels de les plantes (on hi ha una major quantitat de nutrients). La rizosfera és per tant una zona on hi ha interaccions entre les arrels i els microorganismes del sòl, aquesta zona prové un microambient dinàmic on els microorganismes, en associació amb les arrels, formen comunitats úniques que tenen potencial per la detoxificació (eliminació de toxines) de compostos orgànics.

Tot i que es parli de que *Azospirillum* es troba en la rizosfera, aquest bacteri es un microorganisme que habita lliurement pel sòl; però sent més predilecció per la rizosfera, (Döbereiner,1984). Alguns estudis mostren que la quimiotaxis³ entre les substàncies que deixa anar l’arrel i el bacteri és un dels factors que influeix a l’arribada d’aquest bacteri. La resposta quimiotàctica a diferents fonts de carboni i oxigen varia depenen de l’espècie d’*Azospirillum* (Reiner i Okon, 1986).

S’han identificat mostres amb bacteris del gènere *Azospirillum* en un ampli ventall de llocs geogràfics. Tant mateix es poden trobar en regions tropicals, on són més abundants, com en regions més fredes, desèrtiques i temperades (De Coninck et al., 1988). Els bacteris d’aquest gènere han estat aïllats de la superfície de les arrels i de la rizosfera d’una gran varietat de plantes, com de cereals, farratges, plantes cactàcies (cactus)...

¹ La font de carboni és el CO₂ i la font d'energia les reaccions redox.

² La font de carboni és la glucosa i la font d'energia les reaccions redox.

³ Químio taxis: fenomen pel qual els bacteris poden detectar les concentracions de substàncies químiques.

Una característica important d'aquest grup de bacteris és que es troba en el sòl, ja esmentat anteriorment. I aquesta propietat, permet que s'incloguin dins dels **rizobacteris promotors del creixement vegetal** (Taula X, PGPR) jugant un paper molt important. Els PGPR van ser definits per primera vegada per Kloepper i Schroth (1978). Es van referir a els PGPR com a bacteris que es troben en el sòl i colonitzen les arrels de la planta, després de ser inoculades a la llavor, i que provoquen un augment en el creixement de la planta. Tenen la capacitat de sobreviure en la inoculació de les llavors, multiplicar-se en la espermosfera –zona que envolta la llavor- com a resposta de les substàncies secretades per la llavor-, enganxar-se a les arrels i colonitzar el desenvolupament del sistema d'arrels.

Gràcies al continu augment del preu dels fertilitzants artificials (Cordero, 1993) i a l'impacte mediambiental negatiu que causen, contaminant el sòl i l'aigua; s'ha vist un increment en el ús de microorganismes beneficiosos, com els PGPR, en lloc d'utilitzar fertilitzants artificials. En les últimes dècades els PGPR han estat reconeguts com a un grup de microorganismes que actuen com a biofertilizants eficients que milloren el rendiment dels cultius. Els PGPR són una opció que disminueix el cost de producció i és sostenible amb el medi ambient (Motasara, 1995).

En el cas d'*Azospirillum*, és un dels grups de PGPR més estudiat i que pot proporcionar una disminució en la quantitat i cost dels fertilitzants ja que han estat demostrats els efectes beneficiosos del bacteri sobre la planta. Tot i això, l'eficàcia del bacteri no ha estat cent per cent aprovada, ja que hi ha factors externs com les condicions del medi, el genotip de la planta, les condicions climàtiques... que modifiquen la viabilitat del bacteri i com ha conseqüència no hi ha resultats consistents (Bashan i Holguin, 1997).

Segons experiments de camp s'ha pogut comprovar com la inoculació amb *Azospirillum* promou el creixement de plantes en un 10-20% (Okon, 1985). Segons Okon i Kapulnik (1986) la inoculació amb *Azospirillum* augmenta la producció de matèria seca, que pot ser un efecte beneficiós en alguns casos o insignificant en altres.

PGPR	Crop parameters
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Direct growth promotion of canola and lettuce
<i>Pseudomonas putida</i>	Early developments of canola seedlings, growth stimulation of tomato plant
<i>Azospirillum brasilense</i> and <i>A. irakense</i>	Growth of wheat and maize plants
<i>P. fluorescens</i>	Growth of pearl millet, increase in growth, leaf nutrient contents and yield of banana (<i>Musa</i>)
<i>Azotobacter</i> and <i>Azospirillum</i> spp.	Growth and productivity of canola
<i>P. alcaligenes</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , and <i>Mycobacterium phlei</i>	Enhances uptake of N, P and K by maize crop
<i>Pseudomonas</i> , <i>Azotobacter</i> and <i>Azospirillum</i> spp.	Stimulates growth and yield of chick pea (<i>Cicer arietinum</i>)
<i>R. leguminismarum</i> and <i>Pseudomonas</i> spp.	Improves the yield and phosphorus uptake in wheat
<i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. brasilense</i> and <i>A. lipoferum</i>	Improves seed germination, seedling growth and yield of maize
<i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>A. lipoferum</i> , <i>A. brasilense</i>	Improves seed germination, growth parameters of maize seedling in greenhouse and also grain yield of field grown maize

Taula 1. Ventall de beneficis que poden portar les PGPR a les plantes. Font: - Encyclopedia of soils in the environment-

Estudis recents confirmen que el tractament de llavors amb PGPR indueix a efectes beneficiosos en la planta: millorar el creixement, estimular les llavors, millorar la fixació de nitrogen, fòsfor i potassi (Taula 1). En el cas d'*Azospirillum*, els beneficis que aporta són incrementar el desenvolupament de panís, blat i cànula, estimular el creixement de cigrons, millorar la germinació de les llavors de panís tant en camps com en hivernacles. La millora agrícola tant en els camps com en els hivernacles aportat per les PGPR es deu a la producció de fitohormones que estimulen el creixement.

D'altra banda, els PGPR també són agents de biocontrol que es protegeixen elles mateixes de diferents malalties. Per això els PGPR poden protegir a les plantes de patògens externs per inducció de la resistència del hoste. També s'ha pogut demostrar i

provar que els **PGPR poden ser molt eficients** i efectius per enriquir el sòl i incrementar la producció agrícola.

Com s'ha pogut veure, cau molta responsabilitat sobre aquestes bacteris ja que han de protegir-se de patògens externs, ajudar a l'aportació dels nutrients necessaris per a la planta i poder competir i habitar en la rizosfera. Per dur a terme tot aquest seguit de funcions, *Azospirillum* necessita una font d'energia per poder alimentar-se.

Aquest bacteri pot **emmagatzemar grans de poli-B-hidroxibutirat (PBH)** insolubles, que presenten entre el 25 i 50% del pes sec del bacteri. Els grans de PBH ajuden en el seu establiment i supervivència sota situacions crítiques com el contacte amb la llum ultraviolada, les temperatures altes, la pressió osmòtica i la falta d'aigua. En les condicions que més acumula grànuls és quan les fonts de carboni i energia són limitades, com les que es troben en el sòl i la rizosfera. En aquestes condicions els grans de PBH actuen com a font de carboni i energia, intentant suplir la falta de carboni i energia en la cèl·lula (Steenhoudt i Vanderleyden, 2000). Per tant els bacteris que continguin més grans de PBH tenen més possibilitats de sobreviure en la lluita per la convivència en la rizosfera.

El PBH també desenvolupa un paper molt important impedit la dessecació del bacteri. El gènere *Azospirillum* en un principi té forma de bacil, però degut a diverses condicions com grans concentracions de metalls en el sòl o el envelliment cel·lular, canvia de forma morfològica a la d'un quist "en forma de C", produint l'agregació cel·lular i formant grumolls visibles (Bashan i Holguin, 1997). Es pensa que el canvi morfològic permet al bacteri sobreviure durant més temps en la rizosfera; com per exemple, quan hi ha una falta de nutrients, abans de que s'uneixi amb les arrels de la planta (Okon, *et al.* 1985).

Tot i això, *Azospirillum* també es pot identificar per la presència de plasmidis en els bacteris. Cada espècie té un perfil plasmídic únic i diferent a les demès, format entre 1 i 6 plasmidis amb mesures que varien entre 6 i 550 kb. Les espècies d'*Azospirillum* a més a més contenen gran quantitat de guanina i citosina en la seva composició genètica, aproximadament entre un 64 i 70% (Holguin, 1999).

S'ha arribat a aïllar molts gens involucrats en rutes metabòliques (com la fixació de nitrogen, l'adhesió a l'arrel, la síntesi de fitohormones) del gènere *Azospirillum*. Fins i tot s'ha pogut identificar el model del operó⁴ corresponent a la ruta metabòlica del PBH (Kadouri, 2002).

2.2. Relació *Azospirillum*-planta

La relació *Azospirillum*-planta es basa en una relació simbiòtica beneficiosa per ambdues parts (Balandreau i Knowles, 1978). Aquesta relació simbiòtica és tant simple com que, la planta proporciona al bacteri un lloc amb les condicions òptimes per poder viure, i mentrestant, el bacteri facilita a la planta els nutrients necessaris per tenir un millor desenvolupament.

La unió d'*Azospirillum* a superfícies és una part essencial de la vida del bacteri, es poden unir tant al sòl, com a matèria inerta, poliestirè hidrofòbic o bé en les arrels de les plantes (Castellanos, 2000). Tot i que s'uneixin en les arrels de les plantes, no significa que qualsevol lloc sigui vàlid; sinó que s'uneixen per uns llocs determinats.

Però abans s'ha de tenir en compte quines són les diferents parts de les arrels i quina funció desenvolupa cadascuna d'elles (Figura 2).

⁴ Un operó s'utilitza com una unitat genètica funcional formada per un grup o complex de gens capaços d'exercir una regulació de la seva pròpia expressió mitjançant dels substrats amb què interaccionen les proteïnes codificades pels seus gens. Aquest complex està format per gens estructurals que codifiquen per a la síntesi de proteïnes (generalment enzims).

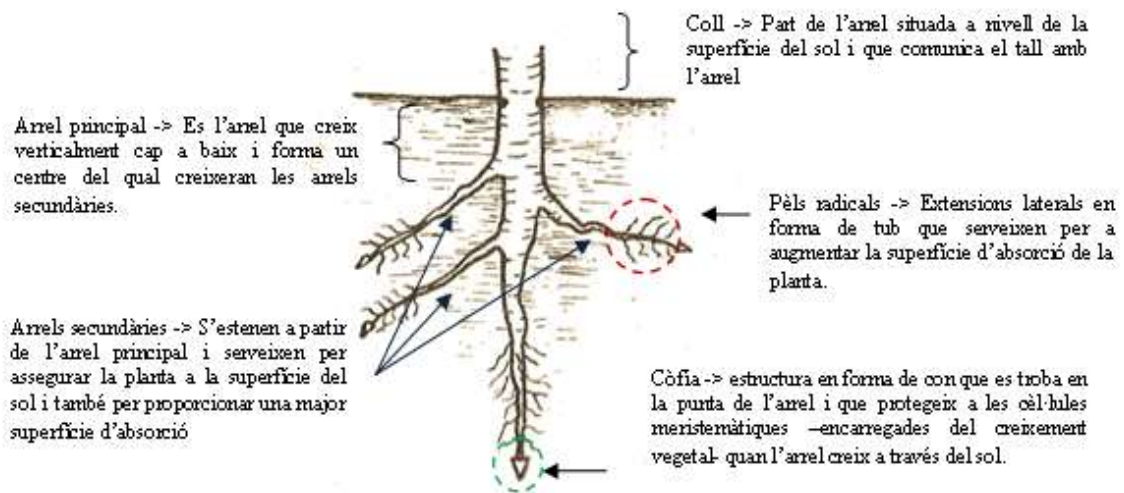


Figura 2. Parts d'una arrel.

Gràcies als assaigs in vitro s'ha pogut demostrar que perquè el bacteri pugi sobreviure en la rizosfera és important que tingui una bona superfície d'anclatge a les partícules del sòl. Aquest procés està dividit en dues fases (Figura 3). La primera consisteix en l'adhesió dels bacteris a les arrels, d'una forma senzilla, simple i reversible, la qual depèn de algunes proteïnes de la superfície bacteriana i del flagel polar. La segona part del procés, ja més complex, lent i irreversible, consisteix en que la major quantitat de la població d'*Azospirillum* s'enganxa en les arrels mitjançant una **xarxa de proteïnes**, que fa de pont entre les partícules dels bacteris i les arrels; a part de la xarxa de proteïnes, també hi contribueix un material fibril·lar, que és essencial, ja que contribueix en l'anclatge d'*Azospirillum* a les arrels de les plantes. (Steenhout i Vanderleyden, 2000).

Encara avui en dia, el material fibril·lar no ha set descrit, tot i que tot apunta a que és d'origen bacterià.

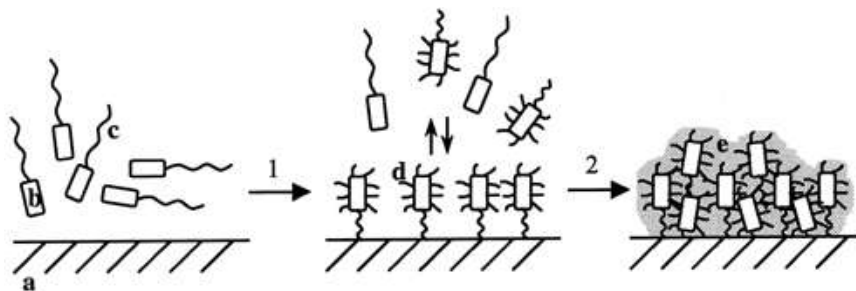


Figura 3. Fixació del bacteri mitjançant un procés bifàsic a la superfície de l'arrel. El pas 1 representa una fixació fràgil i reversible on intervé el flagel polar. El pas 2 representa una fixació ferma i irreversible, on els polisacàrids externs juguen un paper important. [a. superfície d'anclatge, b Cèl·lules d'*A. brasilense*, c. Flagel polar, d. Flagels laterals, e. polisacàrids externs]. – Font: Microbiology Reviews volume 24, issue 4-.

El bacteri està totalment anclat al sòl una vegada han passat 16 hores des del moment en que s'han inoculat (posat en contacte) els bacteris amb el sòl. Una vegada té un suport ferm s'adhereix a les cèl·lules, i els principals llocs per on s'enganxa són les elongacions cel·lulars i les bases dels pèls radiculars. Només algunes cèl·lules d'*Azospirillum* arriben a adherir-se a la còfia i als pèls radiculars (Kapulni, *et al.* 1985). Tot i que es va observar la presència d'*Azospirillum* en el mucígel⁵ que s'acumula en la còfia (Umali-García, *et al.* 1980).

La invasió d'aquest bacteri es duu a terme pels pèls radiculars o bé per les arrels secundàries i d'aquí s'estén cap a les arrels principals (Krieg i Döbereiner, 1984). Es creu que aquesta invasió es deu a la formació d'enzims que deshidraten la pectina de la paret cel·lular que és la que manté unides les cèl·lules entre elles (Umali-Garcia, 1981).

Una vegada el bacteri entra a la planta es pot trobar tant en espais intercel·lulars, dins dels teixits radiculars, com intracel·lularment en cèl·lules mortes (Krieg i Döbereiner, 1984) i també pot habitar diferents zones de l'arrel. Es creu que els factors que controlen la colonització amb èxit són el flagel polar, les proteïnes que estan involucrades al procés de colonització i la superfície de polisacàrids (Katupitiya, 1995).

Azospirillum té un flagel polar quan es troba en medi líquid que li permet tenir una mobilitat en espiral i desplaçar-se del lloc on ha estat inoculat a l'arrel. A més a

⁵ Substància viscosa formada per polisacàrids que protegeix l'arrel.

més, aquest bacteri pot desenvolupar flagels laterals quan es troba en medi sòlid que li permeten mantenir l'estabilitat, però aquests flagels són més prims i més curts que el flagel polar (Döbereiner, *et al.* 1978). Per tant els flagels faciliten la mobilitat del bacteri, però els factors que més afecten a la mobilitat són la humitat i la textura del sòl (Bashan, 1999).

La relació *Azospirillum*-planta està acompanyada per una sèrie de canvis bioquímics en les arrels que donen lloc al creixement de les plantes. S'ha observat que la inoculació d'*Azospirillum* indueix canvis morfològics en els pèls radiculars de les plantes del panís; sent aquests canvis significativament majors que causats per altres microorganismes (Jain i Patriquin, 1985). Aparentment, l'increment del sistema radical es deu al augment de la divisió cel·lular i al intens creixement de les elongacions de les arrels. Mitjançant experiments s'ha pogut observar que si s'inoculen de 10^3 a 10^6 cèl·lules del bacteri provoca l'elongació i l'augment de la superfície total de l'arrel. I quan s'inoculen de 10^8 a 10^9 cèl·lules causa la inhibició del desenvolupament de l'arrel. Per tal, la concentració dels bacteris determina el seu efecte.

2.3. Fisiologia

2.3.1. Fixació de nitrogen

Una de les característiques més interessants del gènere *Azospirillum* és que té la capacitat de fixar nitrogen en la planta. En la fixació de nitrogen intervé el complex enzimàtic anomenat nitrogenasa, format per un enzim que té un grup prostètic amb àtoms de ferro (Fep) i un altre grup prostètic amb àtoms de ferro i molibdè (MoFep). La font d'electrons per la reducció de nitrogen atmosfèric pot ser el coenzim NADH⁶. Els

⁶ Els coenzims són enzims que per ser actius necessiten de la unió d'un cofactor orgànic o coenzim. Dins dels coenzims trobem el NADH (nicotin adenin dinucleotid) que forma part dels coenzims d'oxidació-reducció.

electrons es transfereixen a la ferredoxina, que els transfereix a la nitrogenasa. És una cadena de transport d'electrons que els va cedint. (Figura 4).

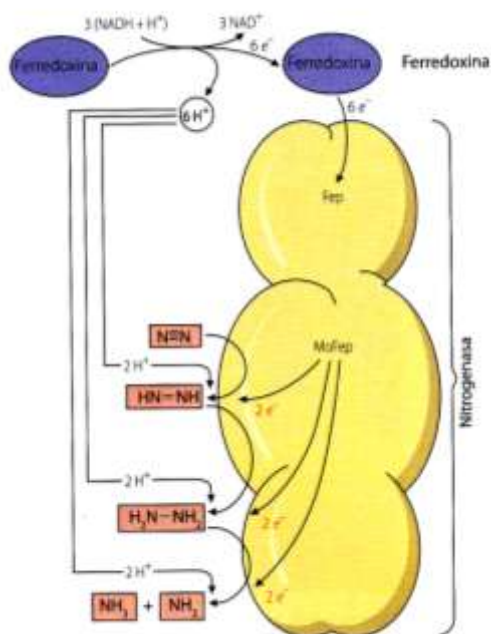


Figura 4. Fixació de nitrogen a través de l'enzim nitrogenasa. –Font: text de Biologia 2 Batxillerat–.

Aquests enzims treballen molt bé en quantitats baixes d'oxigen, inactivant-se irreversiblement quan hi ha un excés de nitrogen en el medi (Kathleen i Vanderlayden, 2000).

Hi ha molts organismes procarïotes dotats amb la capacitat de reduir el nitrogen atmosfèric (N_2) a amoníac (NH_4) per poder absorbir-lo, ja que el nitrogen és molt important per a la planta però en estat gasos no és assimilable per a la planta. Per duu a terme aquest procés es requereix molta energia, ja que el triple enllaç que uneix els àtoms de nitrogen és difícil de trencar.

Alguns fixadors lliures de nitrogen necessiten fins a 100 unitats de glucosa per unitat de nitrogen fixat, per tant és un gran esforç per la planta. En canvi els rizobacteris disminueixen fins a 12 unitats de glucosa per unitat de nitrogen fixat. A més a més, els rizobacteris utilitzen com a font d'energia compostos carbonatats que subministra la

planta derivats de la fotosíntesi; en canvi en els fixadors lliures s'han d'alimentar del sòl, on a vegades no hi ha les quantitats necessàries (Olivares, 2002).

El primer mecanisme en el que es va apostar per explicar el augment de les plantes, va ser la fixació de nitrogen; però estudis posteriors van demostrar que la fixació de nitrogen de part del bacteri a la planta només corresponia al 5-18%, fet que feia caure la teoria de la fixació de nitrogen (Soto i Baca, 2001). Aquesta quantitat de nitrogen fixat és insuficient com per explicar el creixement del sistema d'arrels i de la planta.

2.3.2. Biosíntesi d'hormones de creixement

Azospirillum pot metabolitzar hormones vegetals (fitohormones). Les fitohormones són substàncies sintetitzades per les cèl·lules vegetals que són capaces de promoure i modificar els fenòmens fisiològics de les plantes, és produeixen petites quantitats en el teixit vegetal i poden actuar en el lloc on s'han generat o a distància. Aquest rizobacteri es capaç de produir tres tipus diferents de fitohormones, auxines (influeixen en la floració i fructificació), gibberel·lines (augmenten el desenvolupament cel·lular) i citoquinines (intervenen en la divisió cel·lular i influeixen en la germinació de les llavors).

El mecanisme més estudiat fins a l'actualitat ha sigut la producció d'auxines, concretament la del àcid indolacètic (AIA). Al 1991 Yahalom se'n va adonar que els efectes de AIA sobre la planta depenien de la seva concentració. Si la concentració era de 10^{-8} M, s'estimulava la elongació. En canvi, si era més gran de 10^{-6} inhibia l'elongació de les arrels i el creixement de la planta.

Aquesta hipòtesi va ser recentment estudiada per German (2000) creant mutants que no tenien la capacitat de produir auxines, d'aquesta manera es va poder comprovar com sense auxines hi havia una reduïda capacitat de promoure l'elongació dels pèls radiculars i de les arrels en general.

En els cultius d'*Azospirillum* a part de AIA també s'han trobat altres compostos indol⁷. En diferents estudis es va tractar de sintetitzar un mutant incapaç de metabolitzar AIA, però van ser intents sense cap resultat. Tot i així, es va aconseguir un mutant que produïa AIA en excés. Aquest fet va suggerir que hi hagués més d'una via per sintetitzar AIA. Actualment se n'han trobat tres: dues dependents i una independent del triptofà. (Abdel-Salam *et al.*, 1983-1987).

Els beneficis que porta la síntesi d'AIA a la planta són obvis, i és evident que la participació d'*Azospirillum* beneficia la regulació hormonal de la planta, però per afirmar que la producció de fitohormones són el principal mecanisme pel qual *Azospirillum* promou el creixement de la planta, s'han de fer estudis addicionals. Ja que hi ha altres factors relacionats, com és el nítric, que com a producte del metabolisme d'*Azospirillum* també provoca un increment en la formació d'arrels laterals (Bothe, 1992).

2.3.3. Més absorció de nutrients

S'ha suggerit que gràcies a que *Azospirillum* promou l'elongació d'arrels secundaries això fa que hi hagi més superfície d'absorció, d'aquesta manera la planta és capaç d'absorbir més nutrients augmentant la matèria seca foliar i l'acumulació d'aquests tant en el tall com en les fulles (Barton, 1986).

D'altra banda també es suggereix que la inoculació amb *Azospirillum* provoca que l'absorció de ions sigui més eficaç, fet que explicaria l'acumulació de compostos de nitrogen en la planta que agafaria del sòl de manera més eficient.

⁷ Molècula formada per un anell benzè unit a un anell pirrol, és una molècula aromàtica que es pot trobar en plantes.

2.4. *Azospirillum brasilense* sp245

Azospirillum és un gènere que inclou a sis espècies entre les quals trobem *A. brasilense* que és una de les més estudiades i objecte del present estudi. És un rizobacteri gram negatiu amb metabolisme aeròbic⁸.

Tot i que el gènere *Azospirillum* mostra una gran distribució geogràfica, *A. brasilense* es troba en major abundància quan el pH del sòl tendeix cap a la neutralitat. Quan el pH és per sota de 5 es troba esporàdicament i quan el PH es menor a 4,5 no es pot aïllar (Döbereiner, *et al.* 1976).

En un estudi on es van analitzar més de 23 tipus de sòls diferents es va arribar a la conclusió que el percentatge de fang, la quantitat de matèria orgànica, la capacitat de retenció d'aigua i la quantitat de nitrogen afavoreixen a la supervivència d'*A. brasilense* (Bashan 1991), però la mida de les partícules de sorra i l'alta concentració de carbonat de calci l'afecten negativament. El bacteri intenta arribar a llocs on hi ha més quantitats de nutrients, aigua i oxigen per tal de mantenir els nivells d'energia òptims i poder dur a terme la fixació de nitrogen (Alexandre, 2000), per aquest motiu presenta un flagel polar, mitjançant el qual s'impulsa.

A part, *A. brasilense* també és característic per la mida del seu genoma que és de 7Mb, mostrant set megareplicons que varien de mida, sent un dels replicons un cromosoma (Martin-Didonet, 2000). Wood (1982) va poder observar la presència de minicromosomes, amb una mida molecular major a 2,8Mb. Hi ha estudis que confirmen la complexitat del genoma d'aquesta espècie ja que està constituït per múltiples cromosomes tant circulars com lineals (Martin-Didonet, 2000).

Segons Holguin (1999) els bacteris d'*A. Brasilense* contenen un plasmidi de al voltant de 135kb el qual es creu que codifica per a funcions cel·lulars essencials com l'absorció a l'arrel, la morfologia de la colònia i el creixement en medi.

⁸ Conta amb un metabolisme que utilitza l'oxigen com a últim acceptor d'electrons. w

La millor característica d'aquesta espècie, és que pot modificar l'arquitectura de les arrels, i fins i tot, en algunes plantes pot augmentar el sistema d'arrels secundàries, de pèls radiculars i augmentar el seu diàmetre (Hadas i Okon, 1987). Aquest fet proporciona una major superfície d'absorció a la planta, i per tant pot absorbir major quantitat de nutrients.

A part, el gènere *Azospirillum* és capaç de fixar nitrogen, ja esmentat anteriorment, però *A. brasilense* només fixa nitrogen en condicions microaeròbiques⁹ on el nitrogen està en condicions limitades, ja que s'ha vist que si hi ha amoni, glutamina, nitrat o nitrit en el medi, indueix la repressió de l'absorció de nitrogen (Gallori i Bazzicalupo, 1985).

L'efecte que té *A. brasilense* Sp245 sobre les plantes està comprovat. Les plantes inoculades amb aquest bacteri són més verdes que les no inoculades degut a que experimenten un increment en els pigments fotosintètics, com és la clorofil·la, i en els foto-protectors, com els carotens¹⁰ (Deka i Dileep, 2002). L'augment de clorofil·la, i per tant l'augment fotosintètic està conegut com a una conseqüència de la inoculació amb PGPR, incloent *Azospirillum*. El bacteri també indueix el augment de carotenoids a través de la producció d'àcid abscísic (ABA). L'ABA és una fitohormona que produeix *A. brasilense* Sp245, i augmenta quan hi ha NaCl en el medi (Cohen,2008). A part l'ABA també retarda la pèrdua d'aigua en les parts aèries de la planta (tija, fulles) (Berdi,2010).

⁹ Quan la quantitat d'oxigen a l'ambient es menor que la concentració de l'aire.

¹⁰ Els carotens són pigments que es troben en els cloroplasts dels vegetals verds, però en més abundància en arrels, fruites i flors donant-los color.

3. Objectius i hipòtesi

Aquest treball de recerca consta de capítols on, en cadascun d'ells, s'inclou una hipòtesi o un objectiu específic de cada pràctica. No obstant els objectius generals d'aquest treball de recerca són:

- I. Comprovar els aspectes taxonòmics d'*A. brasilense* a partir de tècniques de microscòpia.
- II. Comprovar el paper del bacteri com a promotor del creixement d'arrels.
- III. Aprendre a utilitzar diferents mètodes d'avaluació de la implantació d'*A. brasilense* en arrels.
- IV. Aprendre a utilitzar diferents tipus de microscopis.

El treball també està vertebrat per una hipòtesi general:

- I. El bacteri té efectes positius sobre les arrels de les plantes de panís, tomàquet cv. Boludo i tomàquet cv. San Pedro; tal com l'augment de la superfície d'absorció, dels pèls radiculars i de les arrels secundàries.

4. Material i medis

A continuació es descriuen els materials i medis de cultiu emprats en quasi tots els experiments realitzats.

4.1. Material comú

En la Figura 5 es mostra el material de laboratori utilitzat. Els números de la fotografia corresponen al número que va seguit del nom en la llista que es detalla a continuació.



Figura 5. Il·lustració del material utilitzat en els assajos del treball.

- **Guants de làtex. (1)**
- **Envasos.**

- **Etanol absolut (99%). (2)**
- **Etanol 70% (per desinfectar-se les mans).**
- **Fogó o encenedor Bunsen. (3)**
- **Plaques de Petri®. (4)**
- **Parafilm®.** És una cinta adhesiva que està formada per una pel·lícula de parafina amb un suport de paper. Quan és el moment d'utilitzar-lo, es separa el paper de la làmina de parafina. Aquesta làmina és semitransparent i flexible i serveix per tancar hermèticament els utensilis del laboratori (vasos de precipitats, plaques de Petri®...) i impedeix que hi entri cap mena de partícula. **(5)**
- **Nansa de vidre.** És un instrument que el trobem al laboratori i s'utilitza per estendre un líquid sobre una superfície sòlida o semi sòlida. Abans de ser utilitzada sempre ha de ser esterilitzada aplicant alcohol i passant-la pel foc. **(6)**
- **Nansa de sembra.** És un instrument que s'utilitza per poder agafar una colònia de bacteris d'un medi i sembrar-la en un altre medi. **(7)**
- **Pipeta de 200 µl (equival a 0,2 mL) i pipeta de 1000 µl (equival a 1 mL). (8)**
- **Puntes de pipeta de 200 µl (grogues) i 1000 µl (blaves). (9)**
- **Vas de precipitats de diferents capacitats. (10)**
- **Pinces.**
- **Paper filtre. (11)**
- **Porta objectes.**
- **Cubeta d'espectrofotometria.** És un tub petit, tancat per un costat. Fet principalment de plàstic, vidre o quars, que són materials transparents a la llum ultraviolada, i serveix per mantenir les mostres quan es mesura la densitat òptica

de les mostres comparades amb un blanc, que en aquest cas és el medi de cultiu sense els bacteris (medi OAB).

- **Capses de CD.** Pels assajos posteriors es necessitaran caps de CDs buides, les quals s'han de preparar. Primer de tot es recopilen les caps de CDs necessàries i se'ls hi extreu la part interior on acostuma ha anar el CD. A continuació es fixen tots els costats amb Parafilm®, excepte la part superior del casset que es mantindrà oberta. (12)

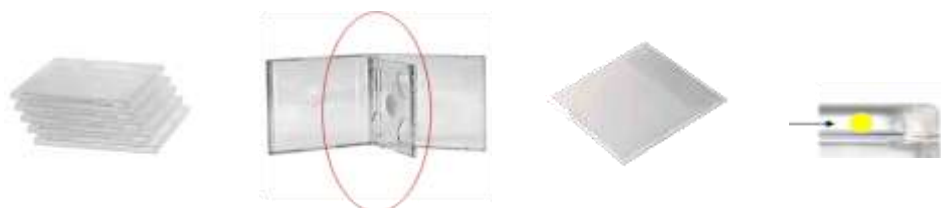


Figura 6. Preparació dels CDs pels assajos posteriors.

- **Tubs Eppendorf® (13)**
- **Tubs Falcon® (14)**

4.2. Maquinària comú

- **Autoclau:** És un recipient metàl·lic que treballa a altes pressions, gràcies que té unes parets gruixudes i un tancament hermètic. Aquest aparell arriba a temperatures superiors als 100°C (temperatura d'ebullició de l'aigua). Per aquest motiu, utilitza el vapor d'aigua per a esterilitzar el material del laboratori. Que aquesta màquina arribi a temperatures superiors a 100°C, permet que no sols pugi matar bacteris, sinó que també espores bacterianes que pel general són més resistents. Per a esterilitzar el material generalment es programa perquè a l'interior es mantinguin temperatures al voltant de 121 °C durant 20 minuts (Figura 7).



Figura 7. Sala d'autoclaus.

- **Campana de Flux Laminar:** És una màquina que proporciona una zona lliure de partícules. Això es gràcies a que canalitza l'aire perquè passi a través de uns filtres. Aquests filtres són HEPA (High Efficiency Particulate Air), tenen molta eficàcia i poden retenir partícules més grans de 3 micròmetres. Aquestes cabines estan especialment fabricades perquè hi hagi un continu corrent d'aire i evitar la suspensió de partícules en l'aire que podrien contaminar les mostres. De campanes de flux laminar en podem trobar tant de verticals com horitzontals, però en el "Laboratori d'ús comú" en el que he pogut accedir només he treballat amb Campanes de Flux Laminar horitzontal (Figura 8)



Figura 8. Laboratori d'ús comú. Les campanes de flux laminar al fons.

- **Cambra Frigorífica** (a 4 °C).
- **Estufa** (a 32 °C).
- **Espectrofotòmetre:** És un aparell que mesura la densitat òptica il·luminant la mostra amb llum blanca i calculant la quantitat de llum que reflexa la mostra en una longitud d'ona preestablerta. La primera mostra que agafa la considera 0 i a partir d'aquí fa una comparació amb les següents i permet saber la quantitat de solut d'una mostra respecte una altra (Figura 9)

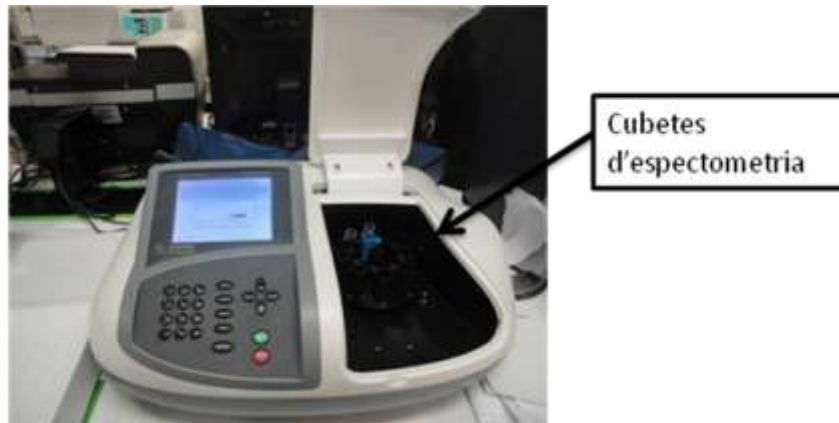


Figura 9. Espectrofotòmetre del laboratori de virologia.

- **Centrífuga:** És un aparell que ha través de la força centrífuga separa els components de la mostra del medi. (Figura 10).



Figura 10. Centrífuga del laboratori de virologia.

- **Cambra de cultiu:** És una cambra on es poden simular condicions ambientals amb variables com la temperatura i la humitat, però no tant sols això, sinó que també les hores amb radiacions solars. Per tant, és un aparell que garanteix les condicions òptimes perquè germini i creixi la planta (Figura 11).



Figura 11. Càmera de cultiu.

- **Agitador:** És un aparell que té una superfície mòbil que oscil·la horitzontalment on es posa els vasos de precipitats o tubs d'assaig. I s'utilitza per barrejar líquids, preparar solucions o suspensions (Figura 12).



Figura 12. Agitador.

- **Agitador magnètic:** Només varia en que té un iman de tefló que es col·loca en la dissolució i s'utilitza per fer dissolucions molt diluïdes. A més a més, no es mou horitzontalment (Figura 13).

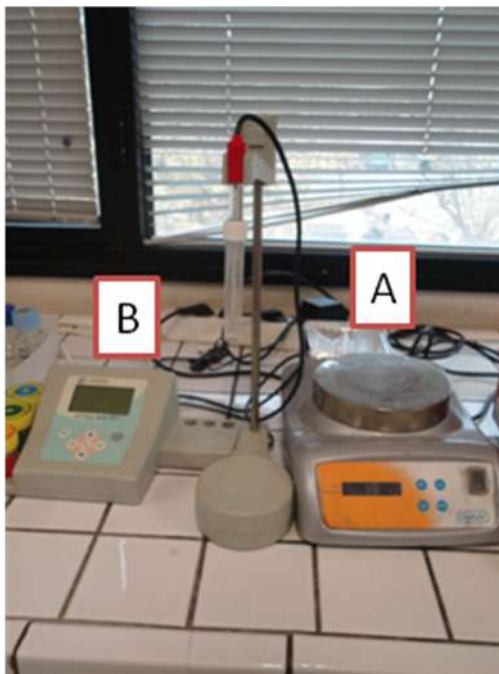


Figura 13. Agitador magnètic (A) amb un pHmetre –mesura el pH de la mostra- (B).

4.3. Medis de cultiu

El medi de cultiu conté un gel o solució que reuneix les condicions necessàries perquè pugui créixer en ell microorganismes.

- **Medi roig de cultiu d'agar nutritiu (també anomenat roig Congo).** En aquest cas, el medi que s'utilitzarà s'ha tenyit de color roig per poder veure de manera senzilla el creixement bacterià.

El medi roig d'agar nutritiu està compost per 5g d'àcid màlic, 5ml de K_2HPO_4 (fosfat dipotàsic), 2ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sulfat de magnesi heptahidratat), 1ml de NaCl (Clorur de sodi), 0,5g d'extracte de llevat, 1,5ml de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Clorur fèrric hexahidratat) i 4,7g de KOH (hidròxid de potassi sòlid) i es posa aigua destil·lada fins arribar a 500ml. Posar-ho en el agitador orbital i ajustar el pH a

6.8-7 introduint KOH (hidròxid de potassi) . S' autoclava i després s'ha de posar 15mL de roig Congo en la cambra de flux i es deixa incubar tota la nit a 32°C. Aquest protocol, ens dona les mesures necessàries per fer 1L del medi roig.

- **Medi OAB (Okon Albrecht Burris).** La composició del medi OAB és 6g de K₂PO₄ (Fosfat dipotàsic), 4g de KH₂PO₄ (Fosfat monopotàsic) es dissolen cadascun en 50ml d'aigua d'estilada i s' autoclava. Quan ja està fred s'introdueix 5g d'àcid màlic, 2ml de MgSO₄ 7H₂O (Sulfat de magnesi heptahidratat al 10%), 1ml de NaCl (Clorur de sodi), 0,2ml de CaCl₂H₂O (Clorur càlcic hidratat), 0,2 ml de NaMoO₄ 2H₂O (Molibdat de sodi dihidratat), 1ml de Cl₃Fe (Clorur fèrric), 1 g de NH₄CL (Clorur d'amoníac), 0,1g d'extracte de llevat, 1ml de la solució de micronutrients i 3g de NaOH (Hidròxid sòdic). S'afegeix aigua destil·lada fins a 900ml. S' autoclava i es deixa incubar 24h a 32°C.
- **Solució del bacteri amb medi líquid OAB.** És una solució que es fa agafant una colònia, amb la nansa de vidre, de bacteris formada en el medi de cultiu roig d'agar nutritiu i introduint-la dins del medi OAB. D'aquesta manera, ja podem disposar d'un medi líquid amb els bacteris d'*A. brasilense* Sp245. Aquest medi es deixa tota la nit a l'estufa a temperatura òptima (32°C) perquè els bacteris es reproduïxin.
- **Aigua destil·lada estèril.** L'aigua destil·lada estèril és aigua a la que se li ha eliminat les impureses mitjançant la destil·lació, la composició de la qual està formada només per la molècula H₂O. S'esterilitza a l'autoclau a 121°C i 20 minuts per lo que no té cap microorganisme viu, està lliure de bacteris i de cap tipus de solut.
- **Aigua "milliQ".** És una aigua purificada mitjançant diverses destil·lacions i desionitzada. L'aigua passa per uns filtres de resina de 0.22 micres, i això permet que la resistència elèctrica de l'aigua augmenti, disminuint així la càrrega de ions.

5. Capítols

El present treball es configura en set capítols que constitueixen la part pràctica d'aquest projecte.

Capítol 1. Comprovació del medi Roig Congo.

Objectiu

Observar que el medi Roig Congo fa que al créixer *A. brasilense* es produeixi una reacció de color i les colònies de bacteris es tenyeixin de roig.

Procediment

- ❖ Posar el medi roig de cultiu d'agar nutritiu en plaques de Petri®

S'introdueix l'envàs tapat que conté el medi roig d'agar, prèviament fet seguint el protocol, i s'autoclava a 121°C durant 20 minuts. Una vegada passat el temps quan la temperatura baixa de 100 °C s'extreu l'envàs. Perquè la mostra no es solidifiqui s'introdueix en el bany maria a uns 50°C fins al moment d'utilitzar-lo.

En el moment d'utilitzar-lo es treu del bany maria i sense obrir-lo es porta al laboratori. Aleshores s'obra la campana de flux laminar, que conserva l'esterilitat, i es renten les mans amb alcohol per desinfectar-les. Una vegada ja està l'envàs a la campana de flux ja es pot obrir i es passa la boca del envàs pel foc per assegurar l'esterilitat.

Les plaques de Petri® que s'utilitzaran a continuació són estèrils. Aleshores s'introdueix 25 ml del cultiu d'agar en cada placa i s'espera 15-20 minuts a que es solidifiqui. En pic s'ha abocat tot el contingut de la dissolució de medi roig a les plaques, es convenient netejar el pot com més aviat possible per impedir que l'agar es quedi pegat.

Es tanquen hermèticament les plaques amb el paper de Parafilm®, es tanca la Campana de Flux, i s'introdueixen en la cambra frigorífica per conservar-les i garantir que no es contaminin.

❖ Passar el bacteri del medi líquid a la placa amb agar. Sembrar el bacteri.

Es prepara la dissolució del bacteri amb medi líquid OAB i es deixa reposar tota la nit a 32°C perquè el bacteri continuï viu i es reproduïxi.

Abans de començar amb aquesta part de la pràctica es posa tot el material necessari dins de la Campana de Flux Laminar i s'obra l'opció U.V. (significa que emet raigs ultraviolats) i es deixa actuar durant uns 10 minuts, d'aquesta manera tot el material queda esterilitzat. Passats els 10 minuts es tanca l'opció U.V. i s'obra el ventilador i la llum normal. S'agafen les plaques de Petri® que es van fer el dia anterior i s'anota a la tapa la quantitat que es sembrarà de la dissolució “bacteri més medi OAB”, quin tipus de bacteri es sembrarà (*A. Brasilense* Sp245) i la data de la sembra (4/7/2013).

Es treu la làmina de Parafilm® que envolta les plaques i mitjançant una pipeta s'introdueixen 150 µL a cadascuna. Tenint en compte que cada funda de la pipeta s'utilitzarà només una vegada.

Una vegada fet aquest pas, s'escampa la dissolució per la superfície de la placa amb una nansa de vidre. La nansa de vidre ha d'estar esterilitzada, i per estar-ho s'ha d'impregnar d'alcohol de cremar i passar-la pel foc.

Quan ja s'ha escampat bé la dissolució per damunt del medi d'agar, es tanquen les plaques amb Parafilm® i s'introdueixen en l'estufa a 32°C durant 24-48 hores perquè els bacteris es repliquin.

Una vegada es té ja la sembra del bacteri *A. brasilense* Sp245 en les plaques de Petri®, aquestes es poden utilitzar per formar el medi “OAB + bacteri”. És tant senzill com agafar una colònia de bacteris de la placa i diluir-ho en el medi OAB, aleshores es

deixa reposar un mínim de 24h en l'estufa perquè el bacteri pugui multiplicar-se i ja tenim el medi "OAB + bacteri".

Resultats

Es comprova que el medi de cultiu Roig Congo dona una reacció de color quan es sembra amb *A. brasilense* (Figura 14). En la Placa de Petri® A, es pot observar la placa de Petri® amb el Medi Roig Congo, però sense ser cultivada amb el bacteri. En la placa B, *A. brasilense* s'ha cultivat en el medi Roig Congo amb una nansa de sembra, formant estries, mentre que en la placa C amb una nansa de vidre. La diferència, de quan es sembra amb una nansa de sembra i amb una nansa de vidre, és evident, ja que la nansa de vidre té una superfície més gran que la nansa de sembra, per tant, les colònies de bacteris queden més escapades per tota la superfície de la placa.

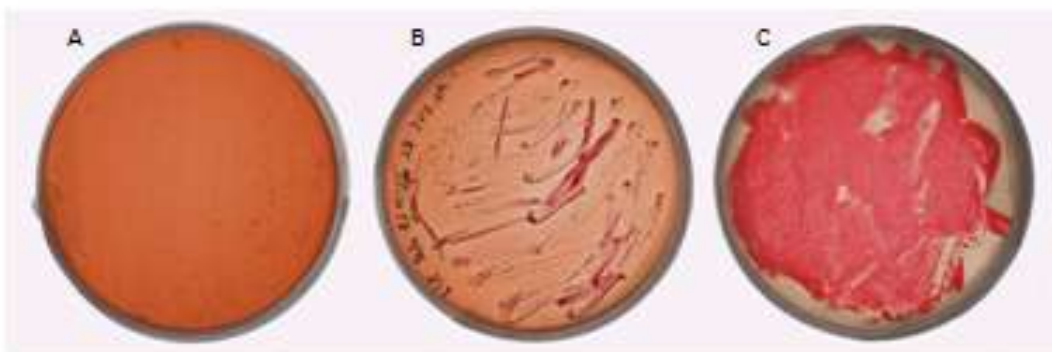


Figura 14. En la Placa A s'observa el medi Roig Congo, en la placa B ens mostra el cultiu d'*A. brasilense* amb una nansa de sembra, anomenat sembra per estries, i la placa C el cultiu del bacteri amb una nansa de vidre.

Conclusions

Es pot utilitzar el medi per als següents assajos ja que és fàcil d'utilitzar i veure quan creix el bacteri ja que absorbeix el colorant. Aquest medi fa que creixi el bacteri amb les condicions òptimes i no l'afecta negativament.

Capítol 2. Microscopi de rastreig I: Tinció de contrast.

Objectiu

Observar que l'espècie *A. brasilense* té forma de bacil.

Material específic

- **Glutaraldehyd 2,5% en tampó fosfat 0.1M** i de pH 7,2. Aquesta solució s'utilitza perquè l'activitat cel·lular pari i la estructura cel·lular es conservi el millor possible mantenint la superfície intacta. Aquest fixador és millor preparar-lo al moment, ja que sinó es fa malbé; per preparar-los s'ha de diluir el glutaraldehyd al 25% amb tampó fosfat. I perquè aquesta substància pugui fixar la mostra es recomanable que cobreixi la mostra amb un volum de 40 vegades més.
- **Alcohol progressiu o cetona.** S'utilitza per remoure l'aigua dels teixits i així anar deshidratant la mostra. Ja que en pic entri al microscopi de rastreig, haurà d'estar completament deshidratada.
- **Tetròxid d'osmi OsO₄.** És un sòlid cristal·lí volàtil que sublima a temperatura ambient. És soluble en un ampli ventall de dissolvents orgànics i aigua. Actua com segon fixador, fixant principalment els lípids.

Material inventariat

- **Assecador de punt crític.** És un aparell d'assecat que té lloc per damunt del punt crític del líquid, on el límit entre la fase líquida i gasosa no existeix. El punt crític és aquell estat en que el gas encara es pot liquar i convertir en líquid. Aquest procés ve determinat per la pressió crítica i la temperatura crítica, una vegada s'ha superat el punt crític el gas ja no podrà liquar. Per aquesta raó, la mostra es seca sense tenir efectes secundaris com podria experimentar en el assecat a l'aire lliure. En el procés del assecat de punt crític s'afegeix CO₂ a la màquina per rentar les restes d'alcohols o cetones que ha quedat en la mostra. El CO₂, té la particularitat de que a 37,5°C i 70 bar de pressió sublima sense tensió superficial i per tant no deformarà la mostra.

- **Microscopi electrònic de rastreig.** La microscòpia electrònica de rastreig utilitza un feix d'electrons per a formar imatges d'alta resolució, les mostres poden ser examinades a molts augments i la resolució d'aquest microscopi pot arribar de 3 a 20nm. Com que s'ha substituït el feix de llum per un feix d'electrons, les lents d'augment s'han substituït per electroimants, i les mostres han de ser conductores elèctricament. En cas que la mostra no ho sigui se li afegeix una capa molt fina d'or o carboni (grafit). Quan incideix el feix d'electrons a la mostra, interactuen i es generen senyals que proporcionen informació topogràfica de la mostra, reconeixen la composició superficial i faciliten informació analítica. D'aquesta manera podem obtenir una imatge nítida i tot tipus d'informació de la mostra (Figura 15).



Figura 15. Microscopi electrònic de rastreig de la Universitat de Lleida.

Procediment

- ❖ Primer assaig amb microscopi de rastreig.

S'agafa una colònia d' *A. brasilense* de la placa de cultiu en agar nutritiu roig i es posa dins d'un vas de precipitats i se li afegeix una solució fixadora. Aquest procediment és un primer pas per a fixar el bacteri. Perquè quedi ben fixat, s'haurà de deixar de 4 a 24 hores dins de la nevera. Aleshores es farà una segona fixació amb el

segon fixador i és deixarà 2 hores més a la nevera. Aquest procés de fixació es durà a terme dins de la campana de flux laminar per mantenir estèril la mostra.

Com que el procés de fixació del bacteri conté molta aigua s'ha de deshidratar la mostra. Es fa una deshidratació profunda o bé amb alcohols progressius o amb cetona, i es deixa actuar durant uns 30 minuts.

Després de la deshidratació profunda, es posa la solució en un assecador de punt crític perquè s'assequi, s'ha d'evitar que contingui aigua i humitat. El assecador de punt crític el que fa és passar el líquid en gas líquid i després en gas, d'aquesta manera s'extreu tota la humitat continguda.

Perquè la mostra pugui entrar al microscopi de rastreig no pot contenir ni humitat ni aigua, fet que ja queda resolt; però també ha de ser conductora elèctricament, per aquest motiu es posa una capa metàl·lica molt fina d'or pur i grafit (carboni) de 200 Armstrongs.

❖ Segon assaig.

Es repeteix l'assaig, aquesta vegada agafant una gota del medi OAB més el bacteri en lloc de agafar un tros de la placa de Petri®.

La gota del medi OAB més bacteri es posa a la centrífuga a velocitat baixa, per impedir que es trenquin els flagels dels bacteris. Una vegada tenim el "pellet", s'extreu tot el líquid sobrant i es posa glutaraldehyd per fixar els bacteris. La mostra només s'ha posat a la centrífuga per calcular bé quina quantitat de fixador s'ha d'introduir, ja que el fixador ha de cobrir la mostra en un volum de 40 vegades més.

Després la mostra es deshidrata amb el secat de punt crític i s'afegeix una capa fina d'or pur i grafit per damunt.

❖ Tercer assaig.

Es decideix tornar a repetir l'assaig amb l'objectiu d'obtenir una imatge molt més clara i nítida.

En aquest cas s'agafa una mostra d'OAB més el bacteri, però aquesta vegada no es centrifugarà ja que s'ha deduït que ha causa de la centrifugació es van trencar la majoria de cilis i flagels. Al no centrifugar-ho es calcula a ull la quantitat de fixador necessari i es deixa reposar un màxim de 24h en la nevera.

Al deixar-ho reposar durant un dia a la nevera s'ha format com un "pellet", tots els bacteris s'han dipositat al fons del tub i amb molta cura, s'extreu el líquid sobrant. El "pellet" de bacteris es posar damunt d'un portaobjectes (prèviament esterilitzat amb àcid i després submergit en un líquid que porta gelatina i que fa que quedi una capa molt fina perquè s'empegui la mostra). El portaobjectes s'introdueix en una cambra líquida. Que consisteix en introduir-lo dins d'una placa de Petri® que conte unes gotes d'aigua destil·lada.

Resultats

Per millorar la qualitat de les imatges al microscopi de rastreig i per intentar que no es trenquin els flagels del bacteri es fa un segon assaig. Gràcies a aquests canvis s'han obtingut imatges més nítides. Els resultats assajos es mostren en la les Figures 16, 17 i 18.

En la primera imatge del primer assaig (Figura 16) es pot visualitzar la colònia de bacteris. Com que la mostra es va agafar del cultiu de bacteris en una Placa de Petri® amb el medi Roig Congo, era una mostra que estava molt condensada i per aquest motiu els resultats no van ser bons. En la segona imatge es pot veure la forma de bacil d'un bacteri d'*A. brasilense*. Es va poder trobar un bacteri que estigués dispersat i d'aquesta manera vam poder visualitzar millor la seva forma.

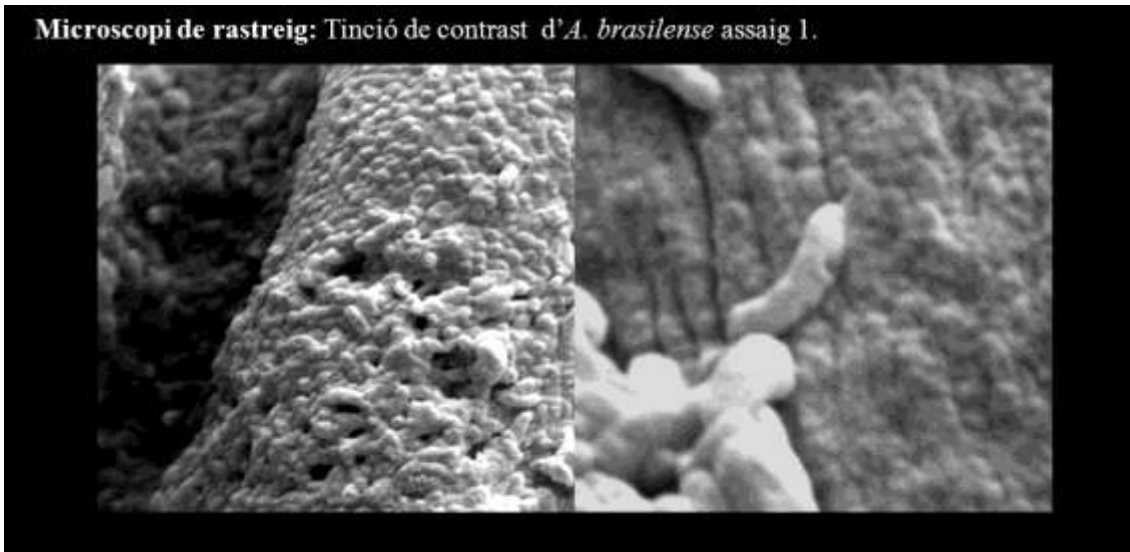


Figura 16. Primer assaig en el microscopi de rastreig.

En el segon assaig en el microscopi de rastreig (Figura 17), al utilitzar el medi OAB amb el bacteri, la concentració de bacteris ja no era tant gran i ja es podien visualitzar concentracions més petites. En aquestes imatges del segon assaig ja es percep molt millor la forma del bacteri i són unes imatges molt més nítides.

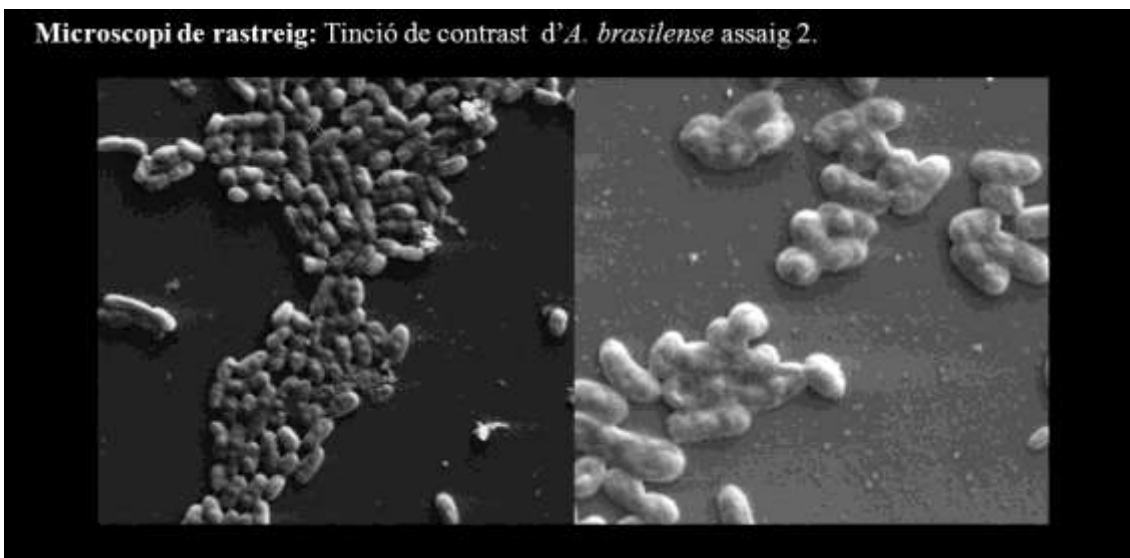


Figura 17. Segon assaig en el microscopi de rastreig.

Es torna a fer un tercer assaig per intentar obtenir imatges encara més nítides. Els resultats finals de l'assaig es mostren en la Figura 18. En aquest tercer i últim assaig ja es va poder obtenir unes imatges molt més nítides i a més a més es van poder veure els bacteris amb molts més augments.

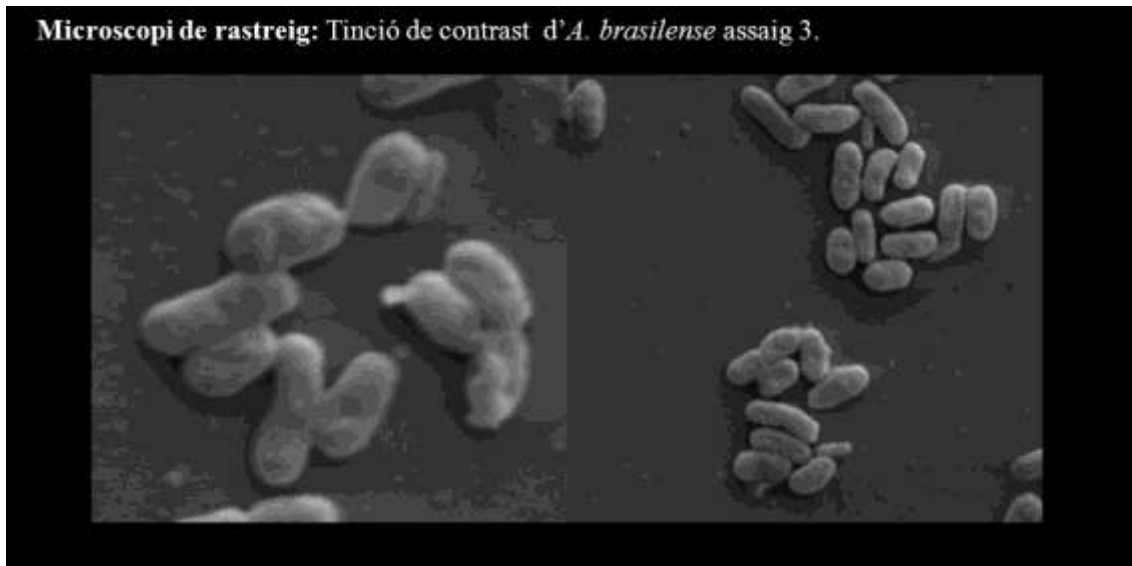


Figura 18. Tercer assaig en el microscopi de rastreig

Conclusions

S'ha arribat a la conclusió que per visualitzar de manera més nítida la forma dels bacteris la mostra s'ha d'agafar del medi OAB i no de la placa de Petri® i a més a més si no es posa a la centrifuga es poden visualitzar millor els flagels.

D'altra banda s'ha pogut confirmar que les cèl·lules de la espècie *A. brasilense* són bacils, gràcies a les imatges obtingudes del microscopi de rastreig.

Capítol 3. Microscopi de transmissió: Tinció senzilla.

Hipòtesi

El gènere *A. brasilense* consta només d'un flagel polar i aquest és més llarg que el propi. A més a més, aquest bacteri no té cap tipus de flagels laterals, ja que no ha crescut en un medi sòlid i per tant no requereix de flagels laterals per mantenir l'estabilitat.

Material específic

- **Dos reixetes de coure.** Són reixetes que mesuren uns 2 o 3 mm i tenen aproximadament 200 forats. Tenen dues cares, una d'aquestes més fosques degut a que té una pel·lícula molt fina de plàstic reforçada amb àtoms de carboni.
- **Acetat d'uranil 0,5% en aigua** $[\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$. És un marcador negatiu, tòxic si s'inhala o es ingesta i és àmpliament utilitzat. Aquesta solució d'acetat d'uranil al 0,5% s'utilitza per tenyir substàncies, ja que els àtoms d'urani es fixen en tota mena de molècula de la mostra i desvia els electrons (en el microscopi electrònic de transmissió), quedant així de color fosc en la imatge. Es recomanable no deixar que li toqui la llum ja que sinó precipita el solut.
- **Glutaraldehyd.** És un dels fixadors més utilitzats ja que té la capacitat de preservar l'estructura cel·lular. S'utilitza tant per fixar cèl·lules eucariotes, procariotes com organismes invertebrats... A més a més les mostres es poden deixar durant hores en glutaraldehyd sense deteriorar-se i sense que es desnaturalitzin les proteïnes.

Material inventariable

- **Microscopi electrònic de transmissió (TEM).** És un instrument que utilitza un feix de electrons per visualitzar un objecte. Aquest feix d'electrons quan entra en

col·lisió amb la mostra, depenent del gruix, s'anirà dispersant selectivament. Així es poden obtenir imatges nítides ja que els augments oscil·len entre 200 i 1.000.000x, gràcies a les lents electròniques que utilitza. El TEM fa el buit, això significa que la mostra no pot tenir humitat ja que sinó trencaria el buit (Figura 19)



Figura 19. Microcopi electrònic de transmissió de la Universitat de Lleida.

Procediment

❖ Primer assaig

S'agafa una mica de Parafilm® i es fixa a la superfície de treball. Amb una pipeta es pipeteja 1 ml de la solució de OAB i *A. brasilense*, i es posen dues gotes de la solució damunt del Parafilm®. Damunt de cada gota es posa la reixa de coure, preferentment deixant la part més fosca en contacte amb les gotes de OAB i *A. brasilense*. I es deixa reposar de 10-15 minuts.

Una vegada passat el temps esmentat, els bacteris ja s'han quedat enganxats en les reixes. S'agafa una mica de paper fil i suaument s'elimina el líquid de més que s'ha quedat.

Aleshores, s'agafen les reixetes amb les pinces, i damunt de cada reixa es tira, delicadament, unes gotes d'aigua destil·lada estèril i s'eixuga posteriorment. Així es treu la brutícia que contenen les reixes, deixant només els bacteris enganxats.

Es pipeteja acetat d'uranil i es posen dues gotes damunt del Parafilm®. Ràpidament es posen les reixetes damunt i es tapa, per evitar que el acetat d'uracil precipiti. Ho deixem durant 30-60 segons.

Passats els 30 segons es treuen les reixes amb pinces i s'eixuguen amb paper. Aquest contacte amb l'acetat serveix perquè els bacteris es tenyeixin, si es volen tenyir més s'ha de deixar actuar l'acetat durant més temps.

S'asseca la quantitat d'acetat sobrant i es posen les reixes de coure en una placa. Finalment, es posen les reixes de coure al microscopi (assegurant-se de que no estan humides) i s'observa el resultat obtingut.

❖ **Segon assaig**

Es repeteix el procediment, aquesta vegada aplicant-hi menor quantitat d'aigua i deixant la mostra només cinc segons damunt de l'acetat d'uranil per evitar que es tenyeixi tant.

❖ **Tercer assaig**

Per intentar obtenir una mostra més neta, es repeteix el procediment afegint unes gotes de glutaraldehyd després de posar les reixes en contacte amb el medi líquid i el bacteri.

En lloc de posar les reixetes damunt de les gotes es posen a dins, per tal de que es fixin més quantitat de bacteris; també es neteja millor les reixetes després d'estar en contacte amb la suspensió de bacteris i en contacte amb acetat d'uranil, introduint-les dins de gotes d'aigua.

Resultats

Els resultats del primer i del segon assaig es mostren a les Figures 20 i 21. Al no obtenir la definició desitjada es va tornar a fer un tercer assaig (Figura 22). No obstant, ja s'observa la forma de bacil del bacteri i del flagel.

En el primer assaig (Figura 20) les mostres estaven molt brutes i per aquest motiu no es va poder apreciar el contorn del bacteri i tampoc es distingia molt bé el flagel polar.

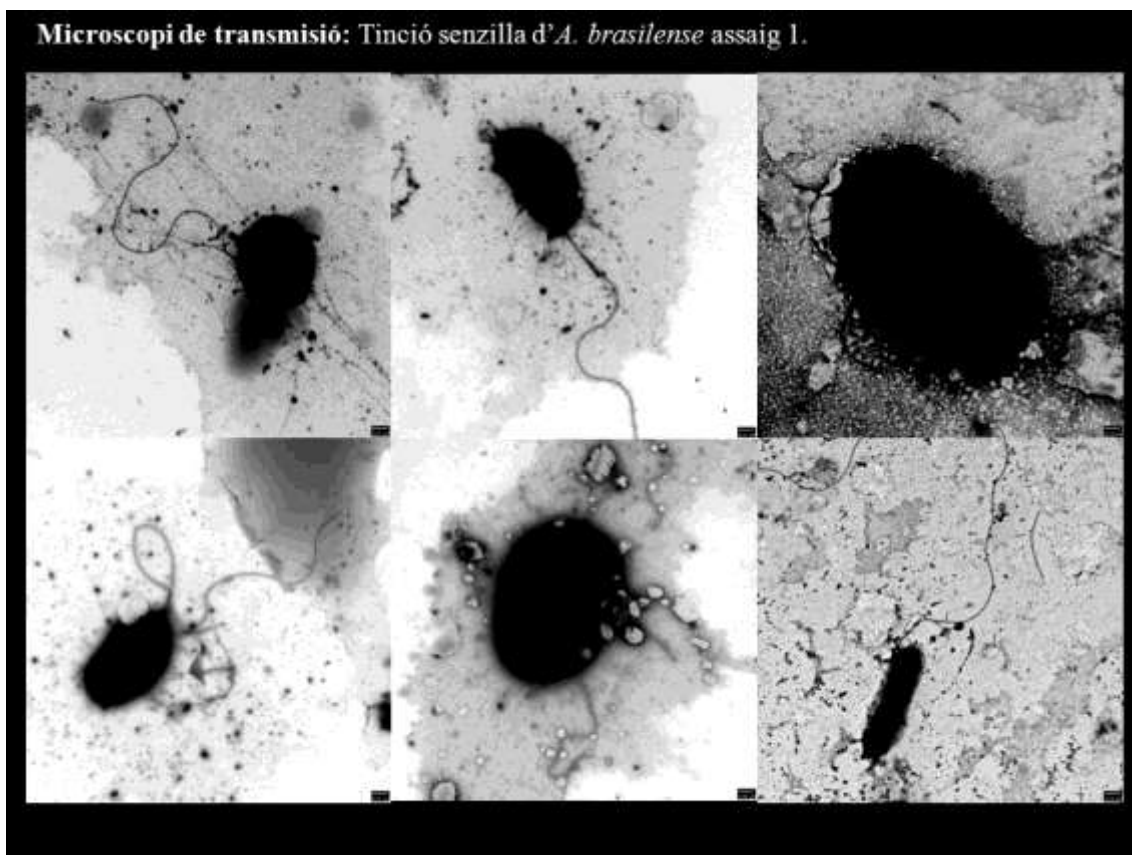


Figura 20. Assaig 1 al microscopi de transmissió.

En el segon assaig (Figura 21) al microscopi de transmissió ja es van poder apreciar molt millor els bacteris. En aquest assaig ja es pot diferenciar perfectament la

forma del bacteri i el flagel polar es veu clarament. Tot hi haver millorat la qualitat de la mostra encara es pot millorar més.

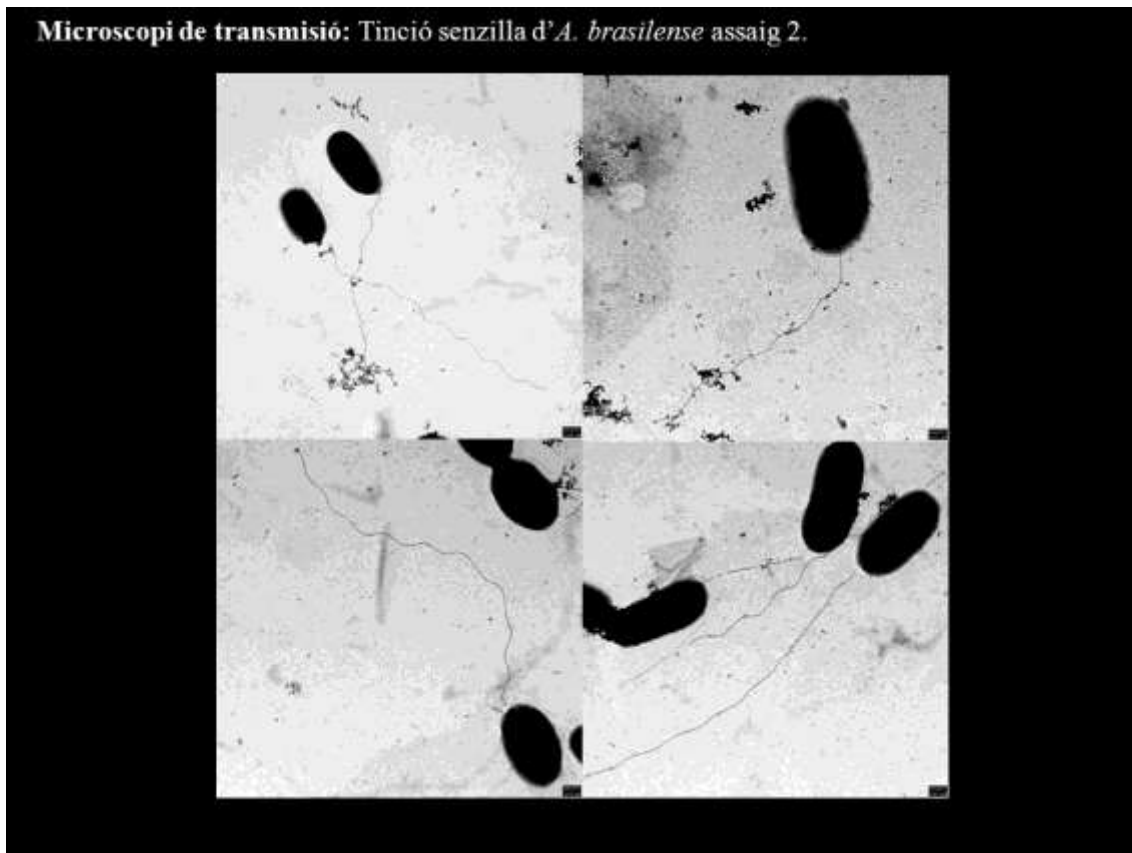


Figura 21. Assaig 2 al microscopi de transmissió.

Les imatges obtingudes del tercer assaig es mostren en la Figura 23. En aquest assaig ja es van obtenir les imatges molt més nítides. El fons de la mostra no estava gens bruta i d'aquesta manera es diferenciaven perfectament els bacteris. En aquesta prova es van fotografiar bacteris on es veu perfectament la llargada del flagel polar.

No obstant, en algunes imatges obtingudes es pot veure com si algun bacteri tingui més d'un flagel, fet que s'haurà de discutir i aclarir. Però en un principi, cada bacteri només té un flagel polar, i els altres que es troben al seu voltant podrien ser trossos de flagel trencats d'altres bacteris.

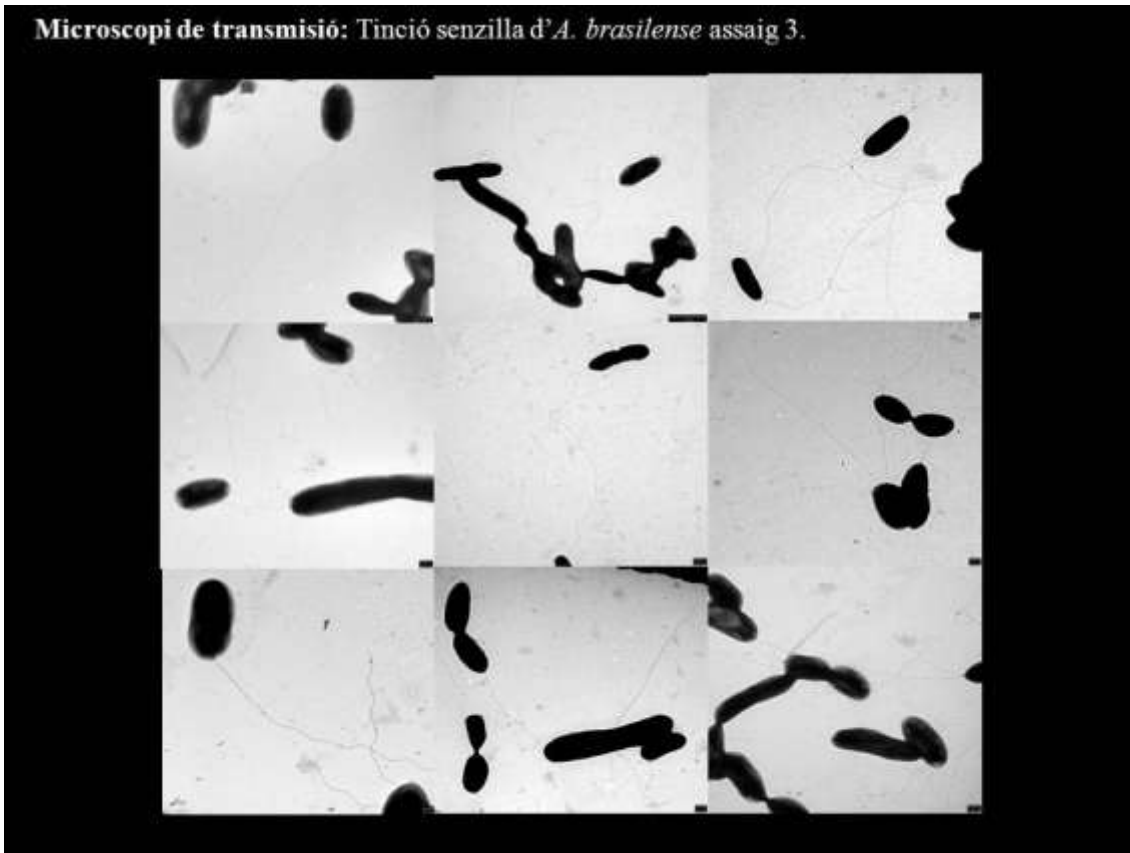


Figura 22. Assaig 3 al microscopi de transmissió.

En la Figura 23 es mostra la longitud del flagel a mida real i també la del bacteri. A simple vista ja es pot apreciar que el flagel és molt més llarg que el bacil del bacteri i que és molt prim en comparació amb el bacteri.

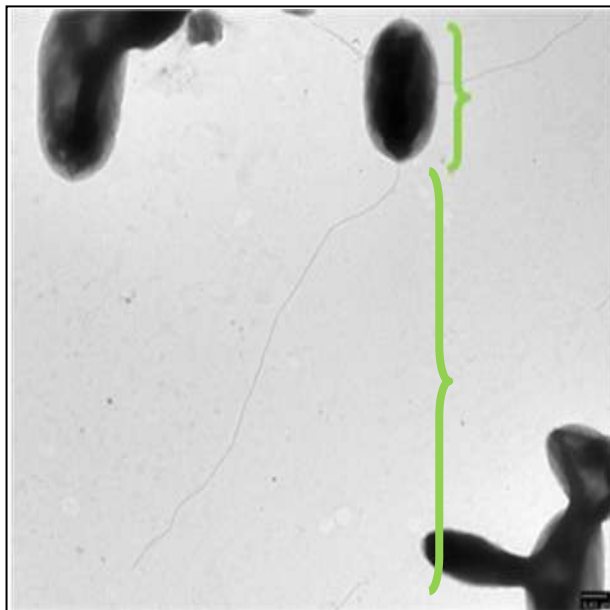


Figura 23. Bacteri d'*A. brasilense* al microscopi de rastreig

La longitud aparent del bacteri és de $2 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}$ (2cm). Tenint en compte que cada 0.3cm de la imatge corresponen a $0,43 \mu\text{m}$; la mida real del bacteri és de $2,8 \mu\text{m}$.

$$2\text{cm} \times \frac{0,43 \mu\text{m}}{0,3 \text{cm}} = 2,8 \mu\text{m}$$

La llargada aparent del flagel 6,5cm. Tenint en compte els paràmetres que relacionen la mida real amb la aparent, la mida real del flagel és de aproximadament $9,3 \mu\text{m}$

$$6,5\text{cm} \times \frac{0,43 \mu\text{m}}{0,3 \text{cm}} = 9,3 \mu\text{m}$$

Conclusions

Després dels assaigs s'ha arribat a la conclusió de que els bacteris s'han de fixar millor a les reixetes, per això s'ha optimitzat la preparació de la mostra segons el protocol seguit al tercer assaig.

Respecte a la hipòtesi inicial, s'afirma ja que s'ha pogut comprovar que els bacteris tenen un flagel polar per desplaçar-se i que aquest és molt més llarg que la cèl·lula en sí; aproximadament els flagels són tres vegades més llargs que el bacteri.

Capítol 4. Mètode per avaluar la implantació d'*A. brasilense* a arrels de tomàquet i panís.

Hipòtesi

A. brasilense s'implanta en les llavors de tomàquet i panís un cop inoculades i es pot saber mitjançant el cultiu de les arrels triturades en una solució de medi OAB en Roig Congo. Ja que les arrels d'aquestes llavors inoculades tenen una major longitud radicular, fet que li aporta a la planta major superfície d'absorció.

Objectius

- I. Seguiment de la germinació de les llavors per conèixer la viabilitat d'aquestes.
- II. Comparació del cultiu de llavors amb CDs i amb bosses Whirl Pak®.
- III. Mesurar la longitud de les arrels de tomàquet i panís als pocs dies de la germinació per observar diferències en el creixement entre llavors inoculades i no inoculades.
- IV. Saber si realment el bacteri està present en les arrels inoculades.

Material específic

- **Solució de lleixiu (NaClO) al 80%** per esterilitzar les llavors de tomàquet i de panís.
- **Solució d'alcohol al 70%** per esterilitzar les capsas de CD, s'ha de preparar introduint 96ml d'alcohol en 200ml d'aigua destil·lada.
- **Medi Fitogel© (Phytogel©)**. El medi Fitogel© està compost de Murashige & Skoog (4,4g), MS Fe-EDTA (5ml), sucrosa (30g) i Gelzan o Phytogel (4g). Abans

d'introduir el Phytigel® s'ha d'ajustar el pH del medi amb KOH (hidròxid de potassi líquid) a 5,8. Després s'ha d'autoclavar a 121°C i 20 minuts.

- **Whirl Pak®:** Les Whirl Pak® són bosses estèril que principalment s'utilitzen al laboratori per transportar mostres de laboratori entre altres funcions.
- **Lupa binocular:** Una lupa binocular és un instrument amb un joc fix de lents. El augment que proporciona és molt menor al d'un microscopi però el camp visual de treball és molt més gran.

Procediment

Cultiu amb CDs: 60 llavors, 30 de tomàquet cv. Boludo i 30 de panís B-73.

❖ Esterilització del material necessari

Abans de dur a terme l'assaig s'han d'esterilitzar les capsas de CD, en total es necessitaran uns 25 perquè per les llavors de tomàquet se'n necessitaran 10 (3 llavors per cada casset) i de les de panís 15 (dos llavors per cada CD) . Per esterilitzar-los es rentaran en alcohol al 70% , s'eixuguen i després es deixen a la campana de flux amb l'opció U.V. durant 20 minuts.

Les llavors també s'han d'esterilitzar. Es deixaran durant un quart d'hora en lleixiu i després s'hauran de rentar tres vegades amb aigua destil·lada i deixar-les eixugar a l'estufa a 32°C durant aproximadament una hora. Una vegada seques s'introduiran a la nevera per quan s'hagin d'utilitzar.

❖ Preparació dels capsas de CDs.

Els CD seran el lloc on s'introduiran les llavors germinades i on es podrà observar el creixement de les llavors i les seves arrels (Figura 24); però per que les llavors puguin créixer i obtenir aliment, els cassets s'hauran d'omplir d'un medi

anomenat Phytogel© que és ric en minerals i que permet a la planta absorbir tot l'aliment necessari.

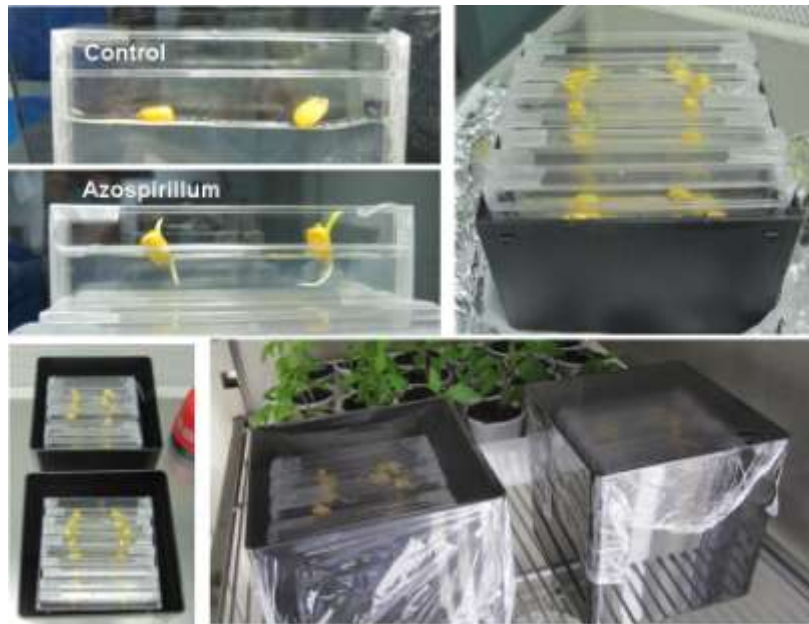


Figura 24. Imatges del desenvolupament de les llavors de panís a les capsas de CD esterilitzades.

Abans d'introduir el Phytogel© als CDs s'han de premsar per evitar que el medi surti per les ranures, per aquesta raó es passen dues capes de cinta adhesiva, prèviament esterilitzada amb raigs ultraviolats. S'ha d'assegurar que estiguin ben tancats per evitar tenir problemes en la introducció del medi.

Es prepara el medi Phytogel© al laboratori, seguint estrictament el protocol i s'autoclava per esterilitzar-lo, com que ja tenim els cassets preparats, en pic es tregui el medi de l'autoclau es porta al laboratori i s'introdueix en els cassets mitjançant una pipeta. Primer de tot s'introdueix una petita quantitat a cada CD per veure si els costats han quedat ben premsats, si no es així es el moment de rectificar i unir-los bé, sinó ja es pot posar medi fins arribar al bocí que està obert.

Una vegada els CD han estat omplerts del medi Phytogel© es deixen reposar fins que es solidifiquin. Passat aquest temps es tapa el bocí que queda obert amb paper

de film i es posen a la nevera perquè no es contaminin (com s'ha vist a la anterior Figura 24). Tot aquest procés es duu a terme a la campana de flux.

Quan el medi Phytogel© ja s'ha solidificat es guarden les capsas dins de la nevera, així s'assegura que no es contaminaran i també es pot garantir que estaran en bon estat per quan sigui el moment d'utilitzar-los.

❖ Preparació de les llavors

Es posa en una cubeta d'espectrometria medi OAB i en un altra medi OAB més el bacteri. Les dues cubetes es posen en el espectrofotòmetre per mesurar la densitat òptica i els resultats obtinguts són 0,000 per el medi OAB i de 0,277 per el medi d'OAB més el bacteri (això ens indica que hi haurà una mica menys que 10^8 bacteris/ml, ja que es troben 10^8 bact/ml quan la densitat òptica és de 0,3.

Una vegada la quantitat de solut està calculada es posen 3ml de la solució d'OAB i bacteri pel panís i 2ml pel tomàquet en la centrífuga a 23°C, 5000rpm i durant 10 minuts. Una vegada passat el temps estimat, es pot percebre que els bacteris han precipitat al fons, formant un "pellet". Mitjançant una pipeta es pot extreure el medi sobrant i aleshores es pot barrejar el "pellet" en 5ml de medi en el cas del panís, en el cas del tomàquet és barreja el "pellet" amb 3 ml de medi. D'aquesta manera, les llavors de panís tindran 5 ml de dissolució amb la quantitat exacta de bacteris, exactament 10^8 bact/ml; el mateix succeeix en el cas de la dissolució per les llavors de tomàquet.

Es reparteixen en dos tubs de Falcon® les 30 llavors de panís i en dos tubs Eppendorf® més les de tomàquet. En un dels tubs es col·loca el medi OAB i en un altre el medi OAB més bacteri. Aquest procés es fa en els dos tipus de llavors.

Es deixen els 4 tubs en el agitador durant 110minuts en el cas de les llavors de tomàquet i 210 en el cas del panís. L'agitador serveix per estimular les llavors i així fer que absorbeixin la major quantitat de medi possible (Figura 25).



Figura 25. Tubs de Falcon® amb les llavors de panís i tubs Eppendorf® amb les llavors de tomàquet.

Mentre les llavors s'estan agitant, s'agafen sis plaques de Petri® grans. Tres d'aquestes seran per les llavors de panís i les tres restant per el tomàquet. En el cas de les plaques del tomàquet, com que són llavors que costen molt en germinar, es posarà cotó mullat amb aigua, per mantenir un ambient més humit, i damunt una capa de paper filtre per evitar que les arrels de les llavors s'enredin amb el cotó. En el cas del panís, com que no tarden tant en germinar, simplement es posarà tres capes de paper de filtre mullades amb "aigua milliQ". Aquest procés s'haurà de fer dins de la campana de flux laminar.

Una vegada passats els 110 i 210 minuts en l'agitador corresponents a cada llavor. S'agafen les llavors i ,dins de la campana de flux, es posen 5 en cada placa. En la tapa de la placa s'ha d'apuntar, la data, amb quin medi estan les llavors (amb medi OAB o bé amb medi OAB més bacteri); i després ja es poden tancar utilitzant Parafilm®.

Les plaques de Petri® ben tancades es col·loquen dins de la cambra de cultiu i s'espera tres dies fins que les llavors de panís comencin a germinar, les de tomàquet tardaran més temps.

❖ Observar el creixement de les arrels

Al cap de tres dies, d'haver posat les plaques de Petri® dins de la cambra de cultius, es treuen per observar si les llavors han germinat o no.

Les llavors germinades, es passaran de la placa de Petri® als cassets prèviament esterilitzats i preparats. Les llavors es situaran en la superfície del medi i intentant que l'arrel quedi recta dins del medi per així poder tenir una major visió del creixement d'aquesta.

A continuació es fan dos forats a la part inferior dels cassets, perquè les llavors puguin absorbir el seu aliment i es posen dins d'un porta cassets on s'ha introduït "aigua milliQ" prèviament esterilitzada.

A partir d'aquest moment, s'ha de mantenir un estudi diari, mirant quines llavors han germinat i passant-les als CDs.

Cultiu amb bosses Whirl Pak®: 32 llavors de panís, 30 de tomàquet cv. Boludo i 30 de tomàquet cv. Sant Pedro.

Degut a que en l'assaig anterior, les llavors es contaminaven molt, s'ha decidit fer el mateix assaig però enlloc de col·locar les llavors en CDs es col·locaran amb bosses Whirl Pak® i sense cap medi.

El procés d'esterilització de totes les llavors es duu a terme seguint el protocol del cultiu amb CDs. En aquest cas 16 llavors de panís, 15 de tomàquet cv. Boludo i 15 de tomàquet cv. San Pedro es col·locaran amb el medi i bacteri, mentre que les llavors restants només aniran amb medi. Cal recordar que les llavors de panís han d'estar 210 minuts a l'agitador mentre que les de tomàquet n'han d'estar només 110 minuts.

Passat aquest període de temps es posen els tubs de Falcon®, que contenen les llavors, dins de l'estufa durant una hora perquè s'expulsi tota la humitat.

A continuació, s'obren les bosses i es posa paper de filtre, prèviament retallat a la mesura de la bossa i autoclavat, i 10 ml d'aigua "milliQ". Seguidament, en el cas del panís es posaran tres llavors en cada bossa, mentre que en el cas del tomàquet se'n posaran cinc en cada cas. Intentant no confondre les llavors de tomàquet cv. Boludo i cv. San Pedro.

Ja només queda esperar a que les llavors germinin per portar un seguiment diari.

Preparació de les arrels per mesurar la longitud i grossor d'aquestes i seguiment del mètode per avaluar la implantació del bacteri a les arrels.

-Cultiu amb CDs.

En el cas de les llavors germinades en els CDs a part de fer un recompte diari, també s'ha de fer un recompte de la longitud de les llavors. Per fer-ho s'extreuen les llavors i les arrels, amb delicadesa, del medi amb Phytogel© i es renten una mica per intentar extreure la major quantitat del medi. Una vegades s'han extret les llavors es posen dins d'una funda, per intentar que es contaminin el menys possible, i s'escanegen.

Les llavors que no hagin sigut inoculades amb *A. brasilense* ja es poden descartar.

Per poder fer el recompte del bacteri de l'exterior simplement s'agafa 1ml de medi OAB i es pipeteja per damunt de l'arrel, d'aquesta manera arrossegà els bacteris que hi hagin per l'exterior. Aquest ml de medi amb els bacteris de la rizosfera es sembra en la placa de Petri® amb el medi Roig Congo. La placa de Petri® s'etiqueta per saber de quina planta s'ha extret la mostra.

Per poder fer el recompte del nombre de bacteris de l'interior, es talla aproximadament 1 cm de l'arrel principal (intentat agafar la mateixa quantitat radicular en cada cas) i es tritura en un morter amb 1 ml del medi. Una vegada desfet el tros d'arrel es pipeteja i es sembra en el medi específic Roig Congo en una placa de Petri® prèviament etiquetada.

Aquest procés del recompte de bacteris de l'interior i l'exterior es duu a terme en totes les llavors inoculades que han crescut en el medi Phytogel©. Així es podrà esbrinar on hi ha més nombre de bacteris, si ha la rizosfera o a l'interior de l'arrel.

-Cultiu amb bosses Whirl Pak®.

Com que el mètode de les bosses és un procés molt més net, no caldrà passar les llavors en altres fundes per escanejar-les. Sinó que es podran escanejar dins de les mateixes bosses on han germinat.

Per a avaluar la implantació del bacteri, les llavors sense *A. brasiliense* ja es poden descartar. Les llavors germinades amb el bacteri s'extreuen de les bosses i es farà un recompte dels bacteris mitjançant el mateix procediment que en el cas de les llavors dels CDs.

Recompte de bacteris

Totes les plaques de Petri®, tant dels CD com de les bosses Whirl Pak® s'han d'introduir a l'estufa a 32°C durant 48 hores per a que els bacteris es multipliquin i poder duu el recompte d'unitats formadores de colònies (UFC), però abans d'introduir-les a la cambra de cultiu s'ha de revisar que les plaques de Petri® estiguin ben tancades i etiquetades (s'ha de poder distingir si una placa correspon a una planta d'una placa o de les bosses i si és de l'interior o de l'exterior de l'arrel).

Resultats

I. Seguiment de la germinació de les llavors per conèixer la viabilitat d'aquestes.

Del cultiu de CDs es pot veure, en el seguiment diari, que la major part de llavors de tomàquet cv. Boludo no van germinar perquè es va intuir que estaven malmeses, no obstant, van germinar més llavors inoculades amb *A. brasiliense* que no pas sense el bacteri. Respecte les llavors de panís es pot veure que quasi totes van germinar, però tot i això va germinar una llavor més de Panís sense el bacteri que amb el medi. També s'ha de remarca que en aquest experiment van sortir molts fongs a les llavors i a les plàntule (Taula 2).

		Data (Juliol del 2013)					Llavors No germinades.
		22.07	23.07	24.07	25.07	26.07	
Tipus de cultiu	Tomàquet cv. Boludo + Azosp.	1	0	0	2	1	11
	Tomàquet cv. boludo	0	0	1	1	0	13
	Panís + Azosp.	8	4	0	0	0	3
	Panís	7*	4	2	0	0	2 **

* Una llavor amb fong de les 7 germinades

** De les dos llavors no germinades una es va descartar el dia 24

Taula 2. Seguiment de les llavors cultivades en els CDs (juliol 2013).

En el cultiu en bosses es pot apreciar que de les llavors de panís amb *A.brasilense* van germinar molt poques, mentre que de les llavors de panís sense el bacteri van germinar més de la meitat. No obstant, de les llavors de tomàquet cv. San Pedro van germinar més les que van ser inoculades amb el bacteri que les que no ho van ser. Finalment, de les llavors de tomàquet cv. Boludo no va germinar cap llavor perquè segurament estaven malmeses (Taula 3).

		Data (Juliol del 2013)			Llavors no germinades
		24.07	25.07	30.07	
Tipus de cultiu	Panís + Azosp.	-	1	3	12
	Panís	-	4	6	6
	Tomàquet cv. San Pedro + Azosp	6	-	7	2
	Tomàquet cv. San Pedro	0	-	11	4

Tomàquet Boludo Azosp.	cv. +	0	-	0	15
Tomàquet Boludo	cv.	0	-	0	15

Taula 3. Seguiment de les llavors cultivades en les bosses Whirl Pak® (juliol 2013).

A continuació es mostra en imatges el seguiment diari del cultiu de bacteri en els CDs. En la primera figura (Figura 26) es mostra només el cultiu de les llavors de panís amb el medi OAB , en la segona (Figura 27) el cultiu de les llavors de panís amb el medi OAB i el bacteri, i la tercera figura (Figura 28) mostra les llavors de tomàquet cv. Boludo.

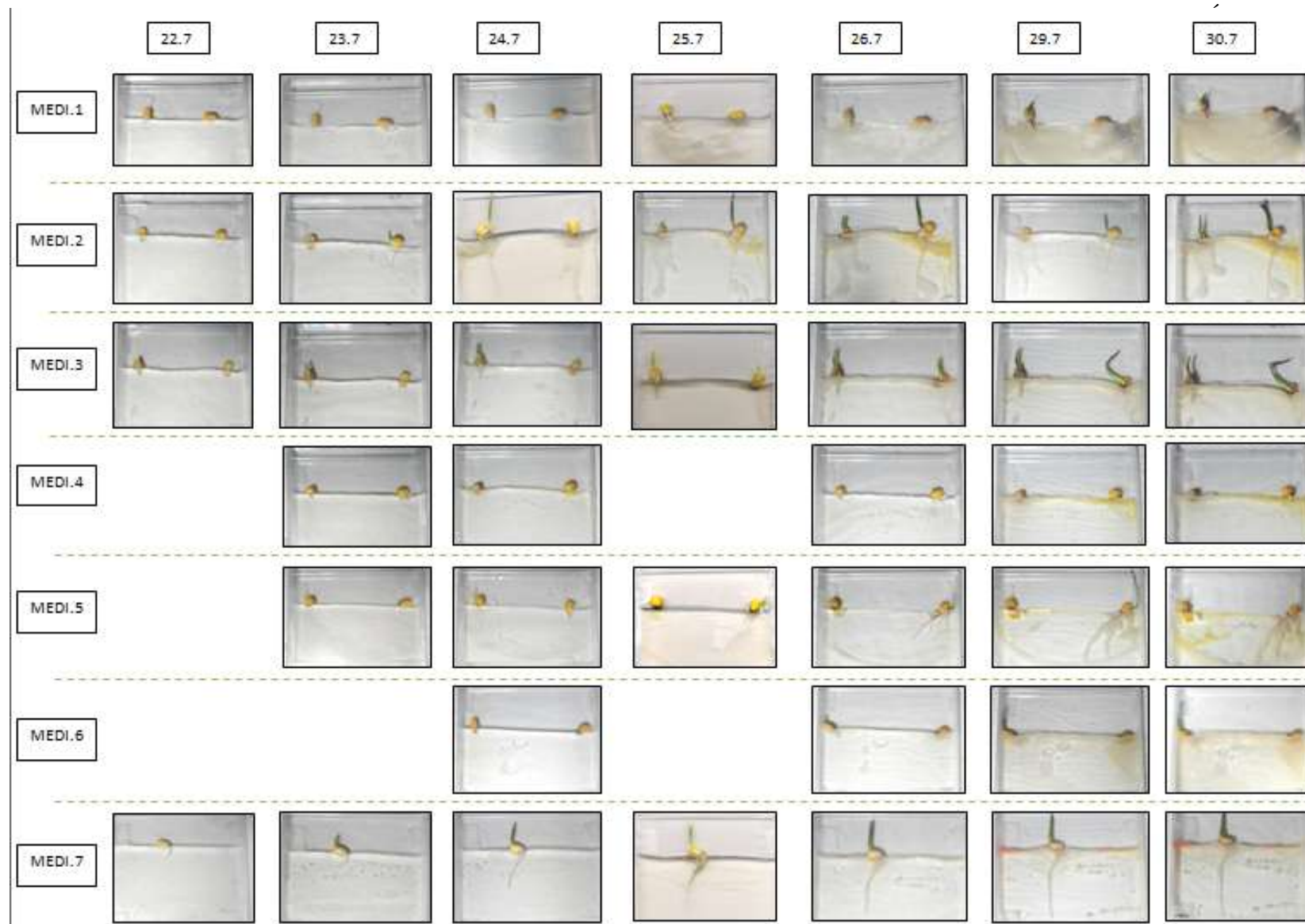


Figura 26. Seguiment del creixement de les llavors de panís sense bacteri en els CDs.

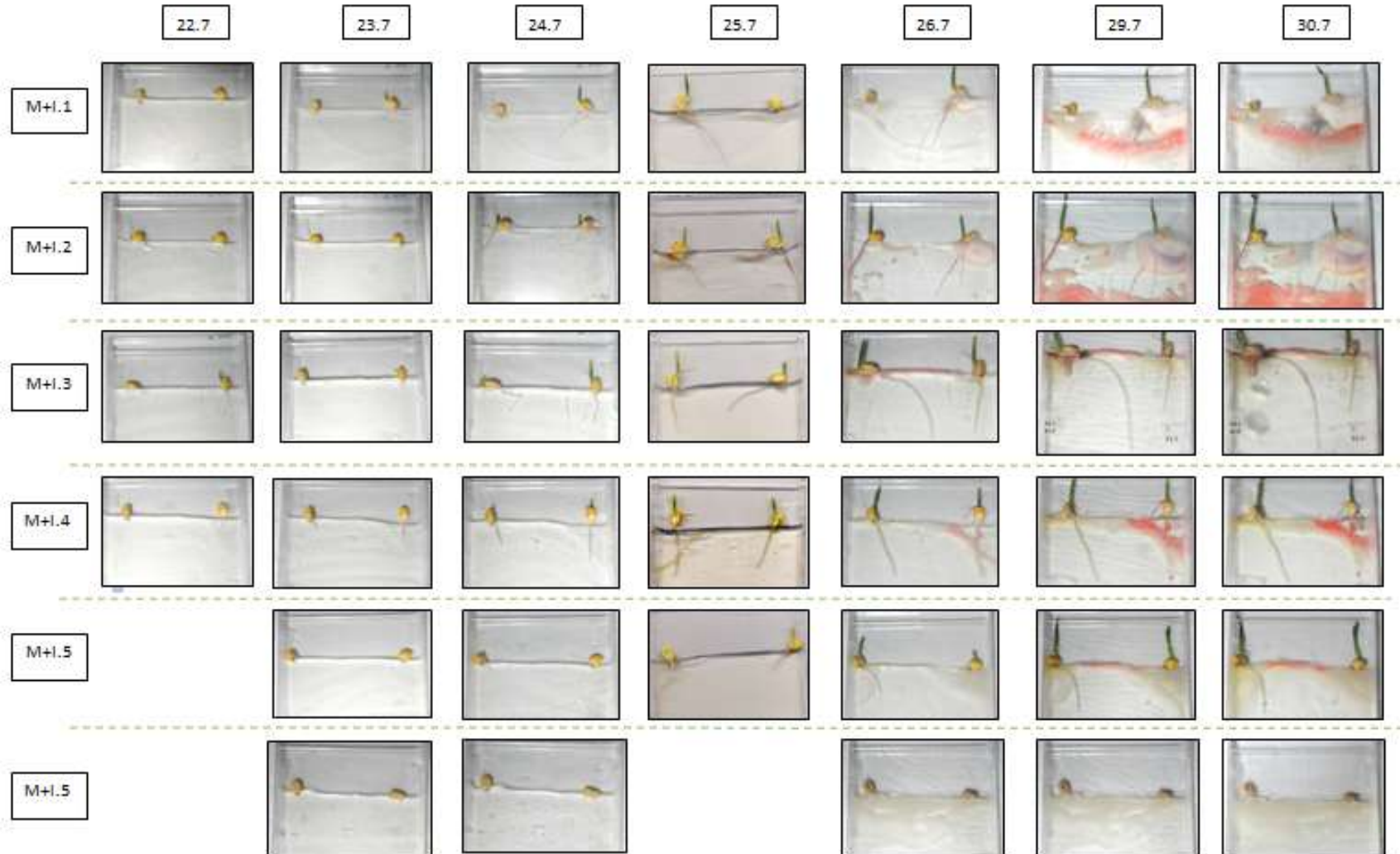


Figura 27. Seguiment del creixement de les llavors de panís amb bacteri en els CDs.

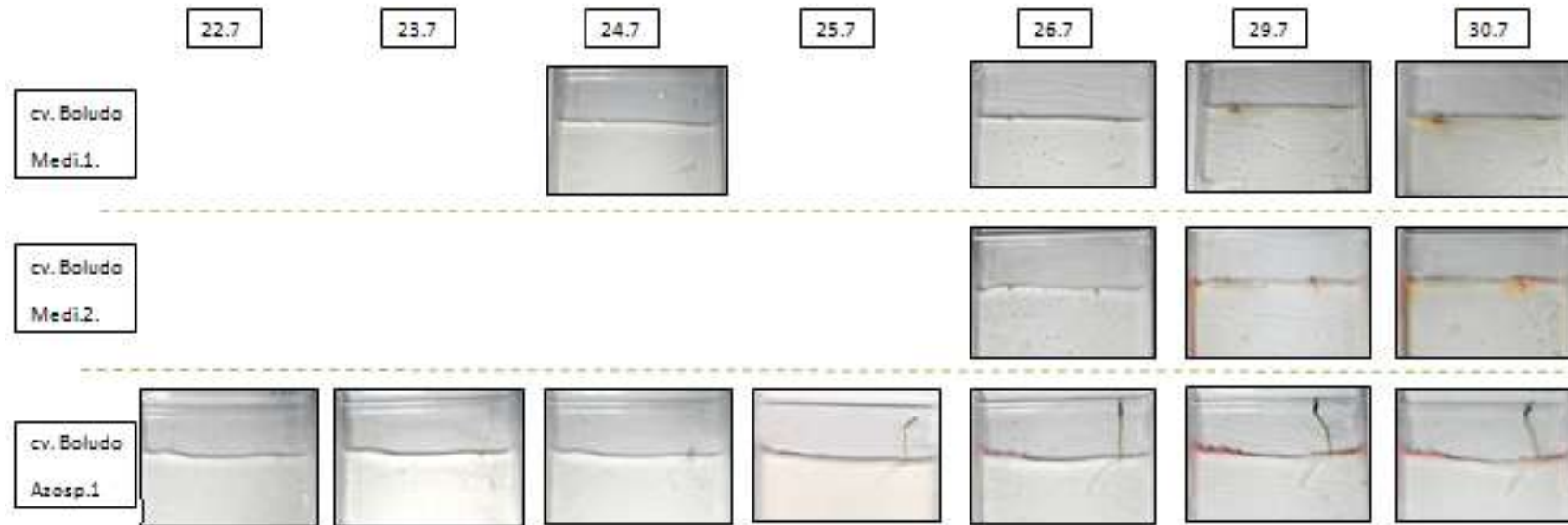


Figura 28. Seguiment del creixement de les llavors de tomàquet en els CDs.

II. Comparació del cultiu de llavors amb CDs i amb bosses Whirl Pak®.

Una vegada s'ha dut a terme el recompte de bacteris tant dels CDs i de les bosses Whirl Pak® es comparen els resultats en una taula per poder presenciar alguna diferència rellevant entre el creixement de les llavors en els CDs i les bosses, a més a més d'aquesta manera es pot saber quin percentatge de llavors de cada tipus han germinat.

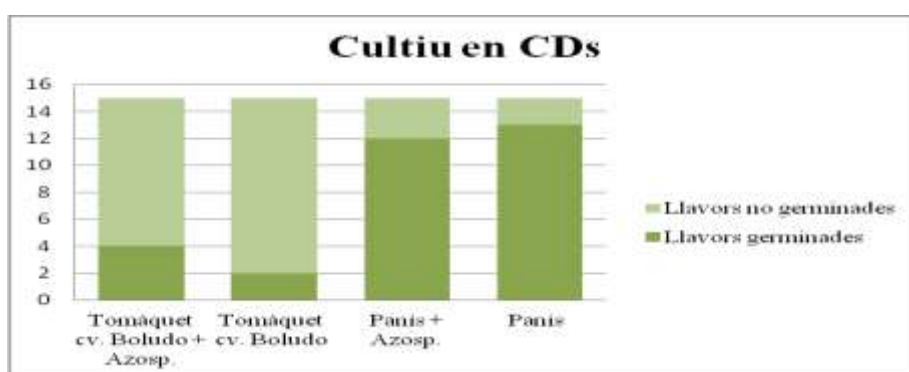
Com mostren els resultats de la Taula 4 i de les Gràfiques 1, 2 i 3 que es presenten a continuació les llavors de panís germinen millor amb el cultiu en CDs que amb el de Bosses i sense inocular millor que inoculades (molta diferència sobre tot al cas de les bosses).

Per altra banda el tomàquet Boludo no germina amb les bosses i quan es sembra en CDs germina millor si s'ha inoculat amb *A. brasilense*. Així mateix, el tomàquet San Pedro (que solament s'ha sembrat en bosses) presenta un percentatge de germinació superior quan s'inocula que quan no.

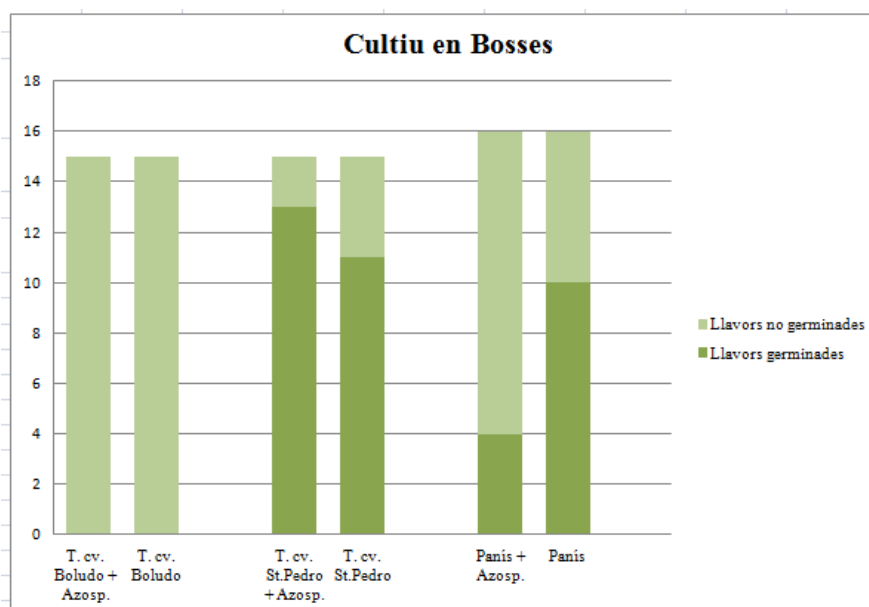
	Tipus de llavors cultivades	Llavors germinades	Llavors no germinades	Percentatge de llavors germinades
CDs	Tomàquet cv. Boludo + Azosp.	4	11	26,6%
	Tomàquet cv. Boludo	2	13	13,3%
	Panís + Azosp.	12	3	80%
	Panís	13	2	86,6%
Bosses	Tomàquet cv. Boludo + Azosp.	0	15	0%
	Tomàquet cv. Boludo	0	15	0%

Tomàquet cv. St.Pedro + Azosp.	13	2	86,6%
Tomàquet cv. St.Pedro	11	4	73,3%
Panís + Azosp.	4	12	25%
Panís	10	6	62,5%

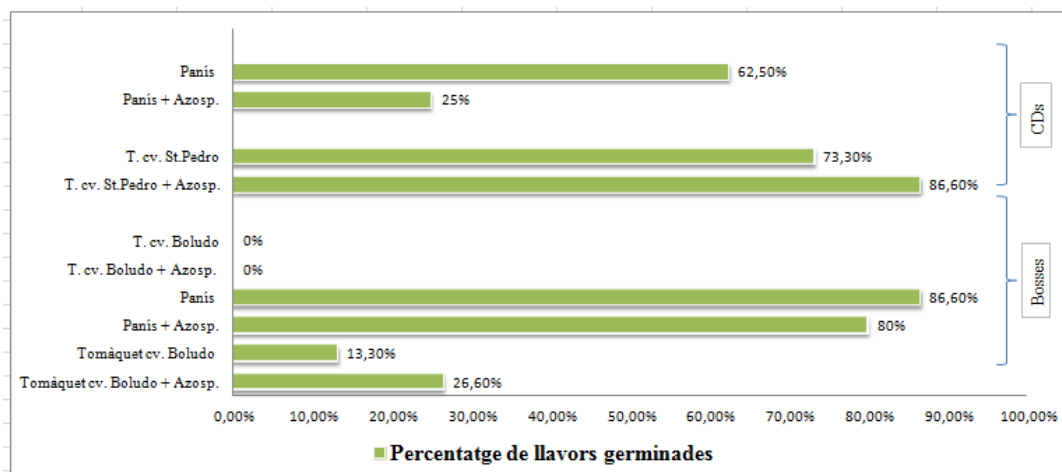
Taula 4. Taula on es mostren els percentatge de les llavors germinades tant en CDs com en bosses.



Gràfic 1. Quantitat de llavors germinades i sense germinar en el cultiu de llavors en CDs.



Gràfic 2. Quantitat de llavors germinades i sense germinar en el cultiu de llavors en bosses.



Gràfic 3. Percentatge global de llavors germinades.

III. Mesurar la longitud de les arrels de tomàquet i panís als pocs dies de la germinació per observar diferències en el creixement entre llavors inoculades i no inoculades.

Es seleccionen les imatges de les arrels, prèviament rentades i escanejades, que s'utilitzaran per calcular la llargada de la arrel i veure els efectes d'*A. brasilense*. Es pot observar com les llavors inoculades amb *A. Brasilense* tenen unes arrels molt més llargues que les llavors sense inocular.

En aquest cas s'han seleccionat les següents imatges:

En la Figura 29 es pot apreciar com les arrels de panís cultivades amb *A. brasilense* són molt més llargues, són el doble o el triple de llargues que l' arrel de la llavor sense el bacteri. A més a més es pot apreciar que les arrels inoculades amb el bacteri són més gruixudes, i tenen més pèls radiculars, per tant, aquestes arrels tenen més superfície per absorbir minerals i nutrients. Finalment també s'observa, que mentre les llavors no inoculades tenen molt poques arrels secundàries (en aquest cas tres), les inoculades amb *A. brasilense* tenen moltes més arrels secundàries i també fa que augmenti la superfície d'absorció.

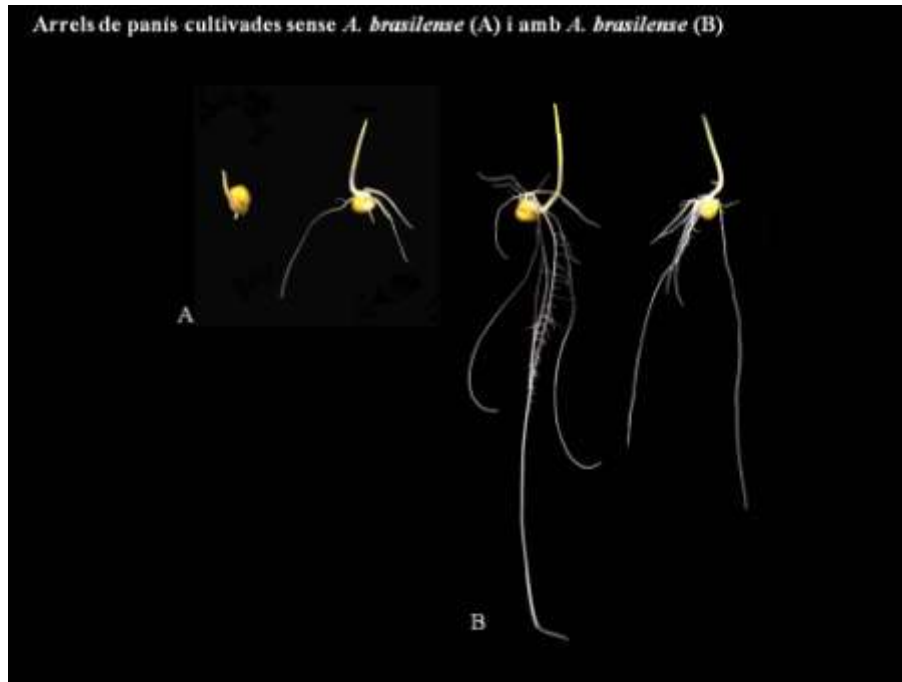


Figura 29. Arrels de panís cultivades sense *A. brasilense* (A) i amb *A. Brasilense* (B).

En la Figura 30 on es mostren les llavors de tomàquet cv. Boludo també es pot observar com les arrels de les llavors que han estat inoculades amb el bacteri són molt més llargues que les no inoculades. No obstant, en les llavors inoculades amb el bacteri no s'observa un augment en el nombre d'arrels secundaries ni de pèls radiculars.

Tot i això, si que es nota que les arrels són més llargues, i per tant tindran més superfície d'absorció. Però els efectes d'*A. Brasilense* no són tan obvis com en les llavors de panís, on els efectes són més clars i es poden observar més fàcilment.

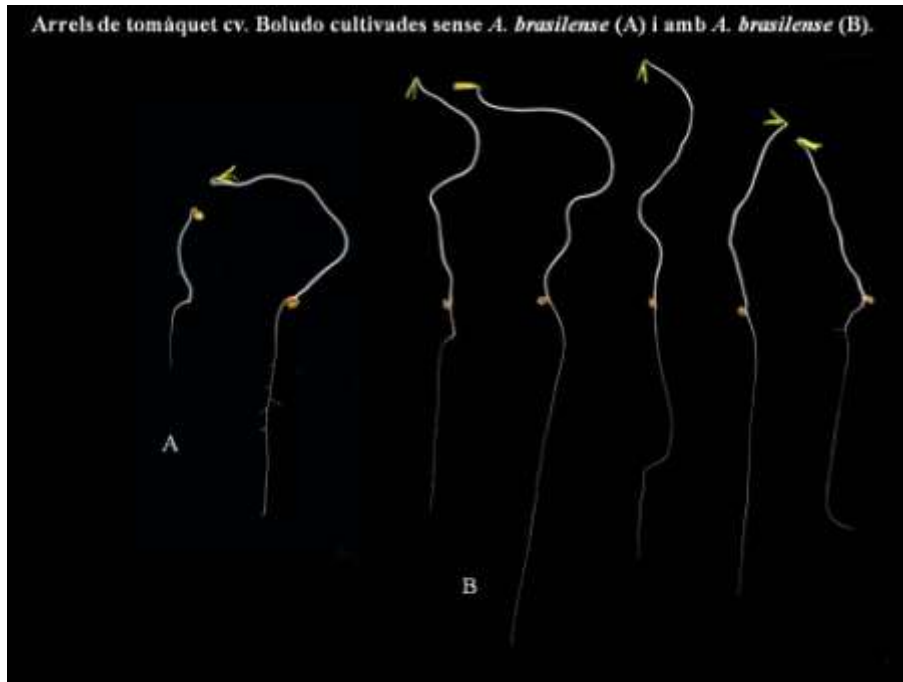


Figura 30. Arrels de tomàquet cv. Boludo cultivades sense *A. brasilense* (A) i amb *A. brasilense* (B).

En el cas de les arrels de tomàquet cv. San Pedro (Figura 31) també es pot apreciar com les llavors inoculades amb el bacteri tenen les arrels molt més llargues que no pas les arrels no inoculades. Tot i això, igual que les llavors de tomàquet cv. Boludo, no s'observa la presència d'arrels secundàries ni de pèls radiculars. No obstant, les llavors inoculades amb *A. brasilense*, presenten més superfície d'absorció.

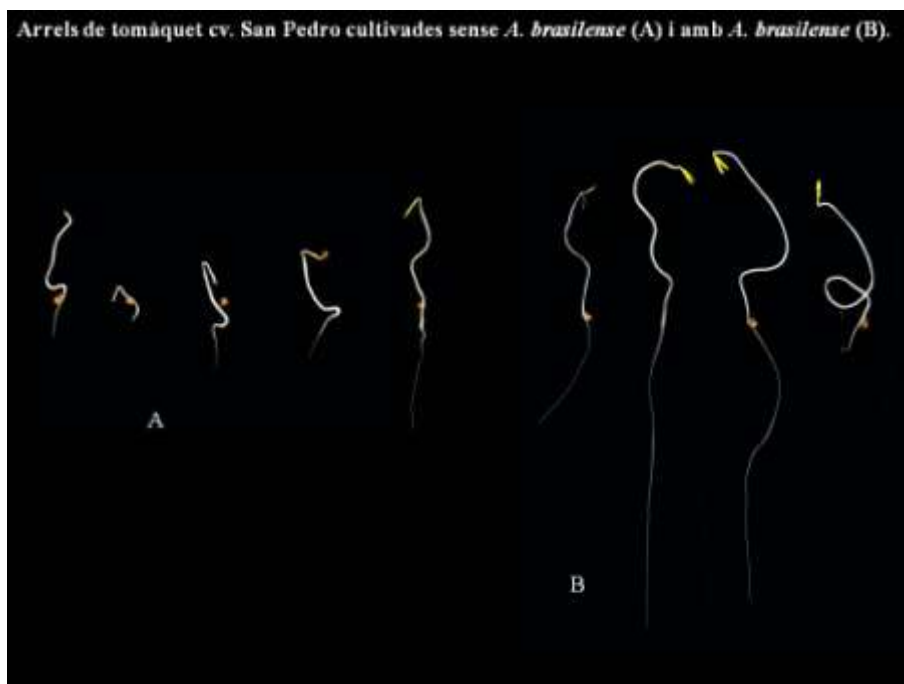


Figura 31. Arrels de tomàquet cv. San Pedro cultivades sense *A. brasilense* (A) i amb *A. brasilense* (B).

IV. Saber si realment el bacteri està present en les arrels inoculades.

En el Gràfic 4 es presència el recompte de bacteris a partir de les plaques de petri amb el medi roig Congo que es van sembrar prèviament. Aquestes plaques unes contenien 1ml de medi OAB amb el que es va rentar la arrel (per tal d'aconseguir arrossegar tots els bacteris de la rizosfera) i unes altres plaques es van sembrar amb 1ml de medi OAB amb l'arrel triturada (per tal d'aconseguir sembrar els bacteris de l'interior de l'arrel). Una vegada passades 24h dins l'estufa, els bacteris ja van germinar.

Per dur a terme el recompte de bacteris s'agafa la referència d'un quadrat 1*1 cm de costats, el qual es va marcar al centre de totes les plaques. Mitjançant una lupa binocular, s'enfoca el quadrat prèviament marcat i es van puntejar les colònies de *Azospirillum* (puntets de color roig) que es poden contemplar, al mateix temps també es puntegen les colònies de altres bacteris, això si, amb un retolador diferent.

Una vegada acabat el recompte del número de colònies al quadrat d'1*1 cm de la placa, el resultat obtingut s'extrapola a la quantitat real de colònies d'*A. brasilense* i d'altres bacteris que té la placa. D'aquesta manera es pot obtindre un resultat estimat del nombre de colònies que hi ha en les plaques.

Mostra	Espècie	Tipus de cultiu	Dins de les arrels		Fora de les arrels	
			UFC Azospirillum	UFC Altres bacteris	UFC Azospirillum	UFC Altres bacteris
Bol 1	Tomàquet	CD	0	>200	0	>200
Pan 1	Panís	CD	13	>200	25	50
Pan 2	Panís	CD	150	>200	0	13
Pan 3	Panís	CD	34	>200	0	>200
Pan 4	Panís	Bossa	0	168	0	0
Pan 5	Panís	Bossa	0	>200	0	6
Pan 6	Panís	Bossa	0	99	0	28
SP1	Tomàquet	Bossa	>200	>200	0	>200
SP2	Tomàquet	Bossa	>200	180	150	>200
SP3	Tomàquet	Bossa	>200	23	>200	15

*UFC: Unitats Formadores de Colònies expresades com la mitjana aritmètica de tres repeticions

*Bol: Tomàquet cv. Boludo

*Pan: Panís

* SP: Tomàquet cv. San Pedro

Gràfic 4. Recompte de bacteris.

En el Gràfic 4 el que capta més l'atenció és que en la majoria de plaques de petri no hi havia presència de *A. brasilense* a l'exterior de l'arrel, en canvi, en alguns casos a l'interior d'aquestes hi havia una gran quantitat de bacteris. Aquest fet podria ser degut a que la neteja que es va fer amb medi OAB no va ser eficaç al cent per cent, i per tant al triturar les arrels, també contenien bacteris de la rizosfera que no van poder ser extrets prèviament.

En la majoria de casos es pot apreciar com hi ha una major quantitat de colònies de bacteris que no pertanyen a la espècie *A. brasilense*. Aquest fet es creu que es degut a la contaminació que tenien els CDs i també als diferents tipus de bacteris que podien contenir les arrels (llavors) tot i haver set esterilitzades prèviament.

No obstant, en el cas del tomàquet San Pedro 3 es veu com té moltes unitats formadores de Colònies d'*A. brasilense* tant en l'exterior com a l'interior de la arrel, en canvi de colònies d'altres bacteris en té en quantitats molt petites.

Conclusions

Gràcies al seguiment diari de la germinació de les llavors i als percentatges obtinguts de la quantitat de llavors germinades de cada espècie inoculades o sense inocular. S'ha pogut arribar a la conclusió que, les llavors estiguin inoculades amb *A. brasilense* no es sinònim de que tinguin més probabilitat de que germinin.

No obstant si que es pot afirmar mitjançant les imatges (on es comparen les arrels de les llavors inoculades i sense inocular) que les llavors inoculades amb el bacteri són més llargues, i en el cas de les llavors de panís també presenten molts més pèls radiculars i més arrels secundaries. Fets que fan que la superfície d'absorció sigui més gran i per tant la llavor es capaç d'absorbir més quantitat de nutrients i minerals, i fa que creixi més.

D'altra banda, gràcies al recompte de bacteris de les plaques de petri inoculades amb els bacteris de l'interior i de l'exterior de les arrels. S'ha pogut comprovar que els bacteris han penetrat a l'interior de l'arrel. Tot i això, degut a la contaminació i al fet de que s'ha d'optimitzar el mètode per extreure els bacteris de l'exterior de les arrels, han fet que els resultats no siguin fiables al 100%.

Capítol 5. Microscopi de rastreig II: Visualització de les llavors inoculades.

Objectiu

Observar els bacteris a la superfície de les llavors mitjançant el microscopi de rastreig.

Comprovar si el mètode d'inoculació de les llavors amb *A. brasilense* és efectiu o no.

Material específic

- **Glutaraldehyd al 2%**

- **Tampó fosfat.** El tampó és una solució reguladora que consisteix en una barreja d'un àcid dèbil i una base conjunta. Té la propietat de mantenir estable el pH d'una dissolució en quant se li afegeixen quantitats petites d'àcids o bases fortes. Dins d'una gran varietat de tampons químics es troba el tampó fosfat que està format per hidrogen fosfat i per dihidrogen fosfat, i és un sistema eficaç per amortiguar àcids.

- **Tetròxid d'Osmi**

- **Acetanonitril**

- **Grafit en isopropanol**

Material inventariable

- **Microscopi de rastreig**

- **Secat de punt crític**

- **Tècnica de deposició per evaporació en el buit:** Aquesta tècnica consisteix en l'escalfament fins l'evaporació del material a depositar -en aquest cas carboni i or, que es duran a terme en diferent maquinària i a diferent temps-. El vapor es condensa en una pel·lícula molt prima en la superfície de la mostra i en les parets de la càmera. Aquesta tècnica permet cobrir mostres, però no aconsegueix cobrir aquelles zones que no són accessibles.

Procediment

Inocular les llavors mitjançant el mateix procediment que en el Capítul 4.

Les llavors primer de tot s'han de fixar amb glutaraldehyd al 2%. Per aconseguir aquest fixador es dilueix glutar al 25% en aldehyd; és millor preparar-lo al moment ja que sinó és fa malvé. Perquè la substància pugui fixar el màxim de bacteris possibles, el fixador ha de cobrir la mostra en un volum de quaranta vegades més. Quan ja s'ha posat el fixador, es deixa reposar un màxim de 24 hores a la nevera.

Una vegada extreta la mostra de la nevera és renta bé amb tampó fosfat, les vegades que sigui necessari fins que ja no quedi rastre del glutaraldehyd. Es treu el tampó fosfat i aleshores se li afegeix tetròxid d'Osmi a la mostra, i es deixa reposar durant 1.30h.

Passada l'hora i mitja, es torna a rentar la mostra amb tampó fosfat i finalment se li afegeix acetanonitril durant 30minuts per a deshidratar-la.

A continuació s'extreu tot el líquid de les mostres, i aquestes es col·loquen a l'aparell de secat de punt crític. Aquesta màquina primer de tot ha de baixa la temperatura fins a 5°C negatiu i després s'injecta el CO₂. Aleshores entra nitrogen líquid que sacseja la mostra i permet que el CO₂ agafi el acetanonitril i quan s'obri la comporta, expulsar-lo. Aquest procediment es repeteix dues vegades, per tal de netejar la mostra.

Aleshores s'injecta CO_2 i s'ha d'esperar o bé a que la temperatura pugi a 37°C o a que la pressió dins de la càmera sigui de 87 bars; quan arribi en aquests nivells significarà que la mostra ja ha quedat totalment deshidratada.

Quan la mostra s'ha extret de la màquina del secat de punt crític s'agafa un portaobjectes i s'adhereix una cinta de carboni, que es conductora elèctrica, damunt de la qual aniran subjectes les llavors.

Abans d'evaporar les mostres amb carboni es passa grafit en isopropanol, que és una mostra líquida, per tapar les imperfeccions. I després la mostra s'ha de posar a l'estufa per tal de que s'evapori el isopropanol.

Una vegada fet aquest procés, s'introdueixen les llavors en la màquina d'evaporació de carboni. Aquesta màquina treballa tenint en compte els següents paràmetres: el buit, l'electricitat, el temps i la distància; així permet fer una capa molt fina de 200 \AA sobre la mostra (Figura 32).

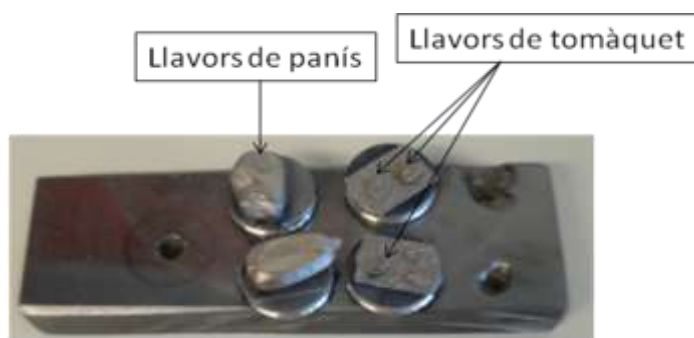


Figura 32. Evaporació de carboni de les llavors de tomàquet i de panís.

En acabar l'evaporació del carboni es passa la mostra per l'evaporació d'or, on gràcies a la diferència de potencial, entre dos pols de la màquina, cau un núvol d'or damunt de la mostra. En aquesta màquina els paràmetres que s'han de tenir en compte són el buit, l'electricitat, l'atmosfera d'argó i l'electricitat.

Resultats

En la Figura 33 es pot apreciar la inoculació de les llavors de panís en el bacteri. No són imatges molt nítides i clares, tot i haver netejat prèviament la llavor amb lleixiu. No obstant es pot apreciar com els flagels dels bacteris penetren dins la llavor (primera fase de l'anclatge del bacteri a la llavor).



Figura 33. Visualització de les llavors inoculades de panís.

La Figura 34 és la inoculació amb *A. brasilense* de les llavors de tomàquet cv. Boludo. En aquestes imatges es pot percebre un gran nombre de precipitats, es poden distingir perquè tenen formes geomètriques tridimensionals. Ben bé no s'ha aclarit que són, però possiblement pertanyen a l'evaporació de carboni i d'or. No obstant es pot percebre en les imatges que es troben més enfocades al bacteri, com el flagel penetra dins de la llavor. En un principi pensava que tenien els flagels més curts perquè s'havien perdut durant el procés de fixació, però després de discutir-ho es va veure que penetraven dins de la llavor.



Figura 34. Visualització de les llavors inoculades de tomàquet cv. Boludo.

En la figura següent (Figura 35) es pot perfectament apreciar com els flagels dels bacteris penetren dins de la llavor. Es veu que els flagels semblen més curts que quan obteníem imatges del bacteri en el microscopi de transmissió, per això es corrobora que el flagel entra dins de la llavors, primer pas de fixació del bacteri en la llavor.

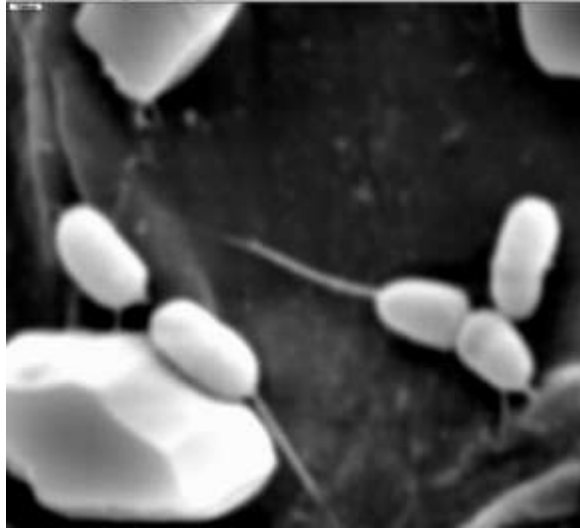


Figura 35. Llavor de tomàquet cv. Boludo amb *A. Brasilense*.

En la Figura 36 es mostra la inoculació del bacteri en les llavors de tomàquet cv. San Pedro. Aquestes imatges són molt més nítides i no hi ha presència de precipitats. I es pot apreciar perfectament la diferència de la llavor de tomàquet cv. Boludo i la de San Pedro. Aquesta llavor és una llavor més llisa i sense tants filaments, i això permet una major visualització dels bacteris, de fet diria que és la figura on es poden distingir millor les llavors i on es més fàcil d'imaginar-se la fixació del bacteri a l'arrel.

Microscopi de rastreig II: Visualització de les llavors inoculades de tomàquet cv. San Pedro.

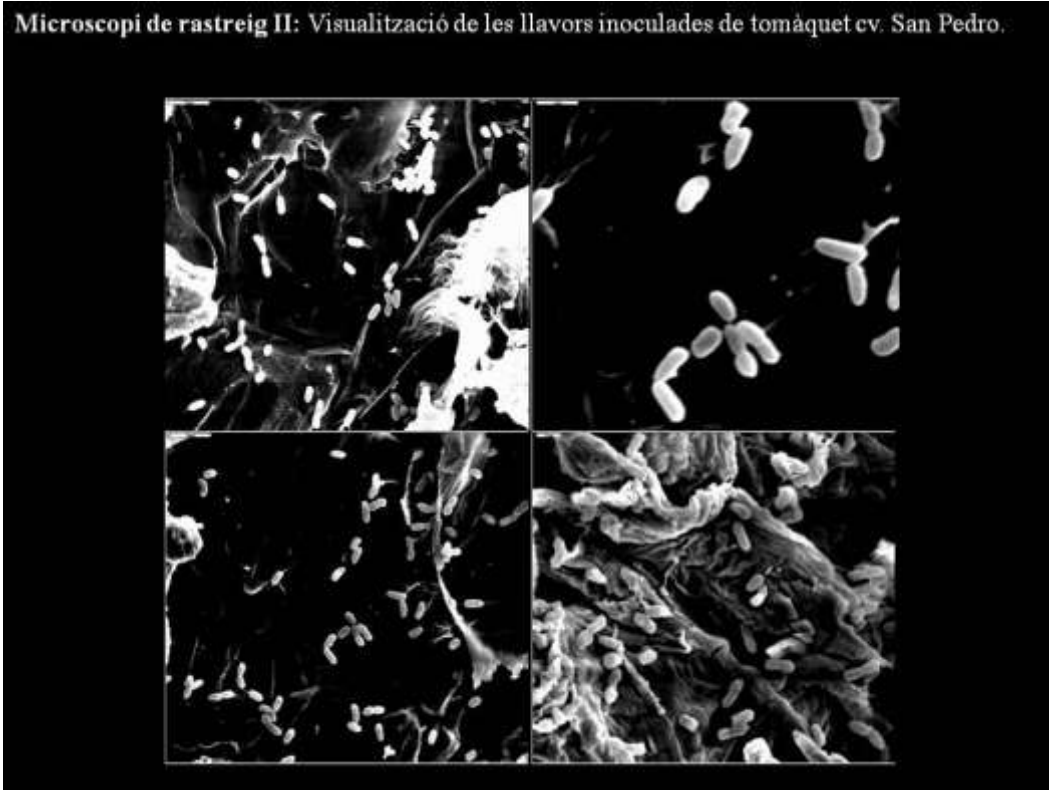


Figura 36. Visualització de les llavors inoculades de tomàquet cv. San Pedro.

Conclusions

Gràcies a aquesta pràctica s'ha pogut concloure el primer pas de la fixació bifàsica del bacteri a la superfície de les arrels. Totes aquestes imatges revelen que una vegada el bacteri està en contacte amb la llavor la primera manera de fixació es mitjançant la penetració del flagel polar a la llavor, aquest resultat s'ha pogut deduir observant que el flagel polar de tots els bacteris era més curt, i en alguns casos fins i tot es veia com s'introduïa dins de la llavor.

Capítol 6. Microscopi de fluorescència I: Funcionament del tints per a bacteris.

Hipòtesi

La tinció dels bacteris amb fluorocroms funcionarà i es podrà observar amb el microscopi de fluorescència.

Material específic

***LIVE/DEAD*® *BacLight*TM *Bacterial Viability and Counting Kit (L34856)*:**

Aquest “kit” permet als investigadors distingir i quantificar cèl·lules vives i mortes amb fiabilitat gràcies al microscopi de citometria de flux.

Aquest “kit” conté:

- SYTO 9 colorant d'àcid nucleic (Component A) , 200 µL d'una solució 3.34 mM en DMSO
- Iodur de propidi (Component B), 200 µL d'una solució 20 mM en DMSO
- Estàndard de microesferes (Component C), 1,0 ml de 6,0 µm de diàmetre microesferes a una concentració de $1,0 \times 10^8$ perles / ml en aigua desionitzada que conté 2 mM d'azida de sodi

Material inventariable

Microscopi de fluorescència: És un microscopi on la mostra està il·luminada per raigs d'una determinada longitud d'ona. La imatge és el resultat de la radiació electromagnètica emesa per l'absorció de les longituds d'ona (Figura 37).



Figura 37. Microscopi de fluorescència. Font: -Wikipedia-.

Procediment

1. Primer assaig

❖ Preparació de les mostres

S'agafen tres matrassos de 100 ml cadascun, i s'introdueix 50ml del medi OAB en cada matràs. A continuació, mitjançant una nansa de sembra, es sembra en el primer matràs poca quantitat del bacteri, en el segon molta quantitat i al tercer matràs no es sembra *A.brasilense*, serà un tub control per assegurar que el medi OAB no està contaminat. Una vegada s'ha sembrat el bacteri es deixen els tres matrassos en l'estufa durant 24 hores a 32°C.

Al dia següent es comproven els matrassos i es veu que ha crescut el bacteri. S'analitza la densitat òptica del matràs on es van inocular més bacteri i dona un resultat de 0,300. Això ens indica que hi ha una concentració bacteriana de 10^8 bacteris/ml.

Per preparar la solució bacteriana primer de tot s'agafen dos Eppendorf® i es posa en cadascun 1ml de la mostra bacteriana i es posen a la centrífuga durant 2 minuts a 10000 rpm i 25°C per tal d'aconseguir un "pellet". Passats els 2 minuts es treu el líquid sobrant i s'introdueix en un "pellet" 1ml de NaCL al 85% per les cèl·lules

mortes, i 1ml d'isopropil alcohol al 70% per les cèl·lules mortes. Es deixen les mostres a temperatura ambient durant 45minuts i sacsejant-les cada 15minuts amb la mà.

Es tornen a posar les mostres a la centrífuga durant 3 minuts a 10000 rpm i a 25°C. Quan s'ha format el "pellet" s'extreu el líquid sobrant i es resuspenen els dos Eppendorf® amb 1ml de NaCl al 0,85% per netejar les mostres.

Es tornen a introduir les mostres a la centrifuga durant 3 minuts a 10000rpm i a 25°C i finalment es tornen a resuspendre en 1ml de Nacl al 0,85%

❖ Tinció dels bacteris

El procés de tinció de bacteris és el mateix tant per les cèl·lules vives com mortes.

Primer s'introdueix 977µl de NaCl 0.85% en un Eppendorf® i ha continuació s'afegeix 1,5µl al 3.34mM de SYTO9 (component A) i 1,5µl 30mM del component B.

Tot seguit s'introdueixen 10µl de la suspensió bacteriana de cèl·lules vives. I es deixa reposar a temperatura ambient i a les fosques durant 15minuts. Passats els 15minuts s'introdueixen 10µl del Component C (Microsphere Standard).

Finalment es deixa la mostra durant 10 minuts al bany maria amb ultrasons "sonification in water".

Tot el procés de tinció dels bacteris després s'haurà de repetir per les cèl·lules mortes.

❖ Microscopi de fluorescència

Per tal de poder mirar les mostres en el microscopi de fluorescència s'han de preparar en portaobjectes. Del Eppendorf® de cèl·lules vives es fan dos portaobjectes, en un d'ells es posen dues gotes de 30µl de la mostra, mentre que en l'altre portaobjectes es posen dues gotes de 20µl. Aquest procés es repeteix per la mostra de cèl·lules mortes.

2. Segon assaig

Per poder arribar a uns resultats més nítids i concentrats es decideix seguir el mateix procediment de preparació de les mostres, però:

- La concentració inicial de bacteris mesura una densitat òptica de 0,532.
- En comptes de posar-les a la centrífuga durant 10 minuts i a 10000 rpm es posa a 5000 rpm i només durant 5 minuts i a 20°C de temperatura.

En procés de tinció continua sent el mateix, no ha sofert cap alteració.

Resultats

En el primer assaig, no s'hi ha vist molta diferència entre les cèl·lules vives i mortes, ja que se esperava observar color verd fosforescent per als bacteris vius i roig brillant per a els bacteris morts. Com es veu a la Figura 38 el resultat són cèl·lules grogues poc definides degut al trencament de membrana principalment. Per això es decideix tornar a fer un segon assaig canviant alguns paràmetres del procés.



Figura 38. Assaig 1 de la tinció amb fluorocroms dels bacteris.

En el segon assaig si que es pot apreciar la diferència entre els bacteris vius i morts, com es pot observar a la Figura 39. A més a més hi ha més concentració de bacteris a la imatge.

No obstant la major part són bacteris morts, ja que la solució de partida havia passat la fase exponencial de creixement dels bacteris. Per tant, els bacteris es trobaven en la fase de mort. Aquesta fase es dona quan hi ha més cèl·lules que es moren que no pas que es divideixen, fet que es produeix quan hi ha un exhauriment dels nutrients o una acumulació de tòxics metabòlics. Per aquest motiu, en el imatge es poden observar una gran quantitat de bacteris tintats amb color roig, degut a que estan morts.

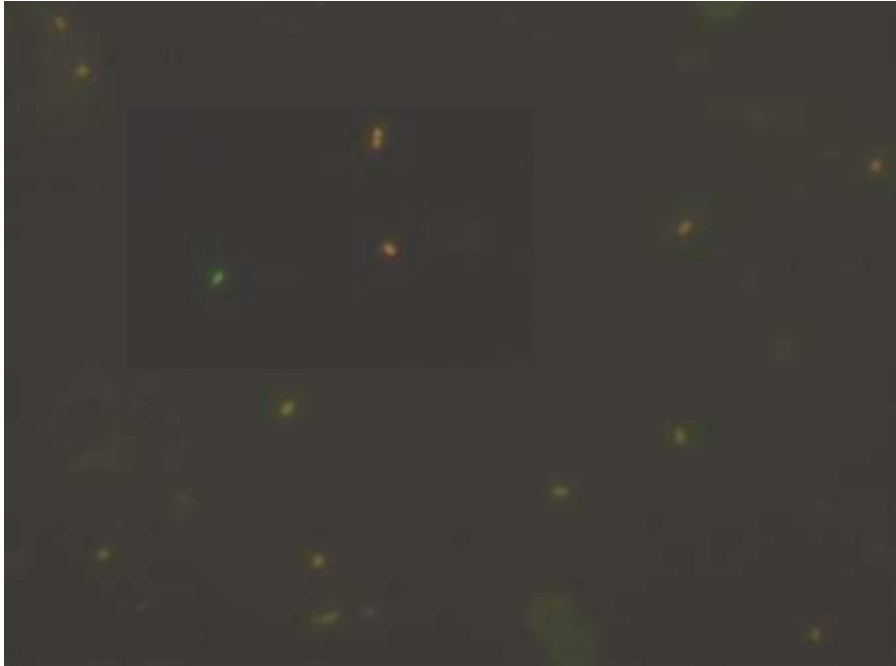


Figura 39. Assaig 2 de la tinció amb fluorocroms dels bacteris.

Conclusions

En el primer assaig es va poder concloure que la membrana dels bacteris estava trencada, degut a la intensitat de la centrifuga i del bany d'ultra sons.

A l'augmentar la concentració de bacteris i amb la disminució del pas de la centrífuga s'ha afavorit positivament als resultats del experiment. Ja que la membrana de la cèl·lula no es va trencar i es van poder obtenir més bacteris per imatge i imatges més nítides.

Capítol 7. Microscopi de fluorescència II: Viabilitat dels bacteris al temps de la inoculació.

Hipòtesi

Els bacteris segueixen vius als 10 dies de la inoculació.

Objectius

Preparar una solució treien els bacteris tant de la rizosfera com del interior de l'arrel i comprovar si estan vius o morts amb els tints del capítol anterior.

Procediment

S'agafen llavors de tomàquet cv. San Pedro ja que són les que van donar més bon resultat en el Capítol 4. En el recompte de bacteris de les plaques de petri, van ser els que tenien més quantitat de colònies d'*A. brasilense*, tant a dins com a fora de l'arrel; i a més a més eren les que tenien menys quantitat de colònies formades per altres bacteris.

Per tant, s'agafen les llavors de tomàquet cv. San Pedro i es segueix el procés d'esterilització i inoculació de les llavors tal i com s'explica en el Capítol 4. També es segueixen els passos ja esmentats per la esterilització dels cassets i finalment aquestes llavors es cultiven en CDs amb el medi Phytogel©.

Passada una setmana, les llavors de tomàquet ja han germinat i aleshores es segueix el procés d'extracció dels bacteris igual que en el Capítol 4. Primer de tot s'han d'extreure les arrels, i netejar-les. A continuació es mullen les arrels amb 1ml del medi OAB, per tal d'extreure els bacteris que s'han quedat a la part de fora de l'arrel. Tot seguit es tritura l'arrel i es pipeteja 1ml del medi OAB. Però en aquests casos els ml del medi d'OAB no es sembraran en una placa de Petri®, sinó, que s'utilitzaran per la tinció amb fluorocroms.

A continuació amb les mostres del medi OAB més els bacteris de dins de les arrels i amb medi OAB i els bacteris de fora de les arrels es tenyeixen. Seguint el protocol de tinció amb fluorocroms explicat en el capítol anterior (Capítol 6).

Finalment, després del procés de tinció s'observa al microscopi les mostres obtingudes.

Resultats

A la Figura 40 es pot observar que a la rizosfera hi ha més bacteris morts que dins de les arrels.

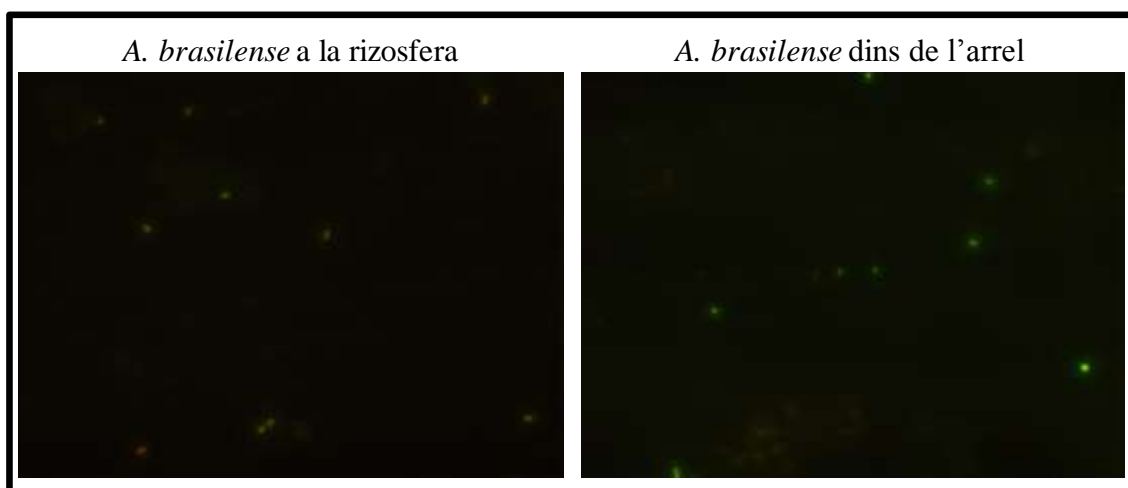


Figura 40. Comparació de les imatges obtingudes al microscopi de fluorescència. Una imatges amb els bacteris de la rizosfera i l'altra amb els bacteris de l'interior de l'arrel.

Aquest fet pot ser perquè el mètode d'extracció de bacteris de l'exterior de l'arrel no estigui optimitzat. I per tant amb el medi OAB només extraiem els bacteris morts que no estan fixat a l'arrel, mentre que els bacteris vius i que estan fixats no queden arrastrats pel medi OAB.

Per tant, possiblement, molts dels bacteris adherits a la superfície radicular es van quedar enganxats i es van contar amb els bacteris de l'interior de l'arrel.

Conclusions

S'ha arribat a la conclusió que el mètode de tinció funciona, i s'ha pogut distingir la quantitat de bacteris vius i morts que hi ha a l'interior i a l'exterior de l'arrel.

No obstant, s'ha d'optimitzar el mètode d'extracció de bacteris de l'exterior de l'arrel, ja que s'ha comprovat que aquest que s'ha utilitzar no es gaire eficaç.

Finalment, el mètode utilitzat no és un mètode quantitatiu, sinó que és un mètode qualitatiu, empíric.

6. Conclusions finals

Al cap de tota la part pràctica del treball de recerca s'ha pogut concloure que el roig Congo és un medi de cultiu específicament per a *Azospirillum*, fet que permet que aquest bacteri tingui els nutrients necessaris per créixer i formar colònies bacterianes.

D'altra banda, si ens centrem en la morfologia del bacteri, gràcies a les pràctiques de microscopia s'ha pogut veure la forma del bacteri. En aquest cas forma de bacil, i també s'ha pogut observar clarament el seu flagel polar, que és molt més llarg que el cos del bacteri en sí. Aquest flagel és el que li permet desplaçar-se i a més a més desenvolupa una funció molt important en la fixació bifàsica del bacteri a les arrels o llavors.

Aquesta mateixa funció del flagel s'ha pogut observar en les pràctiques de microscopia amb llavors, on es podia comprovar com les llavors (prèviament inoculades) contenen els bacteris en la seva superfície, i encara més impressionant va ser poder presenciar com els flagels dels bacteris penetraven dins la llavor per tal de fixar-se i dur a terme un procés de simbiosis.

L'observació de la fixació dels bacteris dins de les llavors en el microscopi de rastreig, s'ha pogut corroborar amb el recompte de unitats formadores de colònies de *Azospirillum* de les plaques de Petri® que es van sembrar amb els bacteris de l'interior de les arrels. I també s'ha pogut verificar amb els resultats obtinguts del microscopi de fluorescència, els resultats dels quals van indicar que hi havia bacteris vius dins de les arrels ja que estaven tintats de color verd.

A més a més, gràcies a aquest treball s'ha pogut veure l'eficàcia del bacteri sobre les plantes de panís i de tomàquet cv. Boludo i cv. San Pedro. De fet, en tots tres casos les arrels de les llavors inoculades amb el bacteri eren molt més llargues que sense inocular. Aquest fet, juntament amb el desenvolupament d'arrels secundàries i de més pèls radiculars en el cas de les llavors de panís, permet que les llavors tinguin més superfície d'absorció.

Finalment, es podria dir que com que el bacteri es troba dins de les llavors o arrels inoculades prèviament. Aquest fet fa que augmenti la seva massa radicular, per tant, poden obtenir més minerals i nutrients del Sòl fet que afavoreix en el creixement de les plantes i en el rendiment d'aquestes. A més a més, *A.brasilense* , ajuda a la planta a protegir-se de agents patògens i altera el seu organisme, formant més quantitat de pigments, fitohormones i afavorint a la fixació de nitrogen.

7. Bibliografia

Articles

- (2000). "Effect of inoculation with *Azospirillum Brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation conditions ". DINS: *Polish Journal of Environmental Studies*. ,vol. 9,num.5: [S.l.] [s.n.]
- (2003). "Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato". DINS: *Journal of Applied Microbiology*. [S.l.] [s.n.]
- (March 2008). *Azospirillum brasilense Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants*. ,vol. Volume 54 [S.l.] [s.n.] p.97-103.
- "Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum Brasilense Sp7*". DINS: *Journal of Bacteriology* . ,vol. 177,num.19: [S.l.] [s.n.]
- Agronomía costarricense*. [S.l.] San José, Costa Rica : Universidad de Costa Rica. ISSN: 0377-9424.
- FAVE. Sección ciencias agrarias*. [S.l.] Esperanza, provincia de Santa Fé, Argentina : Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral,. ISSN: 1666-7719.
- Revista fitotecnia mexicana [8Elektronische Ressource] publicada por la Sociedad Mexicana de Fitogenética*. [S.l.] Chapingo, Mex. ISSN: 0187-7380.
- ALEXANDER ZAMBRANO, J. *Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus sp.* en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero* . ,vol. 13,num.2: [S.l.] [s.n.]
- BACILIO-JIMENEZ, M. "Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*". DINS: *Soil Biology and Biochemistry*. [S.l.] Elsevier.
- BASHAN, Y.; GONZALEZ, L.E. *Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant*. [S.l.] [s.n.]
- BASHAN, Y.; HERNÁNDEZ, J.; ESTHER PUENTE, M.; DE-BASHAN, L.E.; LUIS A., Y.L. "Inoculantes microbianos sintéticos: son el futuro para la agricultura?". DINS: [S.l.] [s.n.]
- CABALLERO-MELLADO, J. "El género *Azospirillum*". DINS: *Programa de Ecología Molecular y Microbiana*. [S.l.] [s.n.]
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A. *Phyostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat*. ,vol. Volume 212 [S.l.] [s.n.] p.153-162.
- FELICI, C. "Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community". DINS: [S.l.] Elsevier.
- FERLINI, A. -, H.A.; C. -, S.C.; O., C. *Beneficios del uso de inoculantes sobre la base de *azospirillum brasilense* en cultivos extensivos de granos y forrajes*. [S.l.] [s.n.]
- HILL, S.A. (1984). "Electron Microscopy". DINS: *Methods Plant Virology(mpp 1)*. Oxford [Oxfordshire]: Blackwell Science Incorporated. p.130-163. ISBN: 9780632009954.
- HOLGIN, G. *Interaction between plants and beneficial microorganism*. [S.l.] [s.n.]

- KLESSIG, D.F. "Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense". DINS: *Colloquium*. [S.l.] [s.n.]
- L. OJEDA, J.L. (1997). *Métodos de microscopía electrónica de barrido*. [S.l.] Universidad de Cantabria.
- LEYVA, A. (2005). *Microorganismos benéficos como fbioertilizantes eficientes para el cultivo del tomate*. [S.l.] [s.n.]
- Molina-Favero, C. [et al.] *Aerobic Nitric Oxide Production by Azospirillum brasilense Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato*. ,vol. 21,num.7: [S.l.] [s.n.]
- OKON, Y.; HEYTLER W., P.H. *Nitrogen Fixation by Azospirillum brasilense and its incorporation into Host Setaria italica*. ,vol. 46,num.3: [S.l.] American Society for Microbiology. p.694-697.
- PEREYRA , M. *Root Colonization vs. Seedling Growth, in two Azospirillum-inoculated Wheat Specie*. [S.l.] [s.n.]
- PEREYRA , M.; ZALAZAR , C.; BARASSI , C. *Root phospholipids in Azospirillum-inoculated wheat seedlings exposed to water stress*. [S.l.] Elsevier.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. [S.l.] Médica Panamericana.

Webgrafia

1.1.2.2. *Microscopia electronica de barrido*. [S.l.] Edu.365. Disponible a Internet: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/melecbarrido.htm>

(2000). *SPI-DRY™ Secadores de Punto Crítico*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://www.2spi.es/catalog/instruments/dryers_technique.html.

(2008). *Uranilo Acetato 2-hidrato PA-ACS* . [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.analytika.com.mx/spanish/FDS/U/131752.htm>.

(2009). *Camaras para cultivo de plantas*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://cci-calidad.blogspot.com.es/2009/07/camaras-para-cultivos-de-plantas.html>.

(2010). *Microscopio Electrónico de Barrido*. [S.l.] Biología Sur. Disponible a Internet: <http://www.biologiasur.org/microscopio-sem.html>.

(2012). *Microscopia electrónica de transmisión*. Universitat Politècnica de València: [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.upv.es/entidades/SME/info/753329normalc.html>.

(2013). *Acetato de Uranilo marca SPI-Chem™ para Microscopía Electrónica*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://www.2spi.es/catalog/chem/Uranyl_Acetate.shtml.

(2013). *El tetróxido de osmio, Propiedades físicas, Estructura y configuración electrónica, Síntesis, Reacciones, Utiliza, Consideraciones de seguridad*. [S.l.] WebAcademia . Disponible a Internet: http://centrodeartigos.com/articulos-para-saber-mas/article_41255.html.

(2013). *El uso de los agitadores en los laboratorios*. [S.l.] Quiminet. Disponible a Internet: <http://www.quiminet.com/articulos/el-uso-de-los-agitadores-en-los-laboratorios-3437780.htm>.

(2013). *Microscopio electrónico de transmisión*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_transmisi%C3%B3n.

(2013). *Organismo aerobio*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: https://es.wikipedia.org/wiki/Organismo_aerobio.

A better water status in wheat seedlings induced by Azospirillum under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile . [S.l.] WorldWideScience.org. Disponible a Internet: <http://worldwidescience.org/topicpages/a/azospirillum+brasileense+sp245.html>

Autoclave. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <https://en.wikipedia.org/wiki/Autoclave>.

Centrífuga. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Centr%C3%ADfuga>.

El tetróxido de osmio, Propiedades físicas, Estructura y configuración electrónica, Síntesis, Reacciones, Utiliza, Consideraciones de seguridad. [S.l.] WebAcademia. Disponible a Internet: http://centrodeartigos.com/articulos-para-saber-mas/article_41255.html.

Espectrofotómetro. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofot%C3%B3metro>.

Fitohormonas naturales. [S.l.] Daymsa . Disponible a Internet: http://www.daymsa.com/fitohormonas-naturales_producto_165.html.

Género: Azospirillum. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://es.scribd.com/doc/113998882/AZOSPIRILLUM>.

Inoculación con Azospirillum spp. en la Región Semiárida-Central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1850-20672006000100002&script=sci_arttext.

La microscopía electrónica de barrido SEM (I) Concepto y usos. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.patologiasconstruccion.net/2012/12/la-microscopia-electronica-de-barrido-sem-i-concepto-y-usos/>.

Metabolismo oxidativo. [S.l.] Instituto Nacional de la Salud EE.UU. Disponible a Internet: <http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=44071>.

Post-fijación en tetróxido de osmio. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://www.euita.upv.es/varios/biologia/tecnicas_de_histologia_vegetal/Documentos/Postfijacion.htm.

Rizobacteria. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://cyt-ar.com.ar/cyt-ar/index.php/Rizobacteria>.

Rizobacterias, Fijación de Nitrógeno, Las relaciones simbióticas, Roles patógenos, Biocontrol. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://lasaludfamiliar.com/caja-de-cerebro/conocimiento-1805.html>.

Usos y aplicaciones del papel Parafilm. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-del-papel-parafilm-2732778.htm>

CABALLERO-MELLADO, J. *El género Azospirillum.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>.

CASÁN, F.; *Producción de fitohormonas por Azospirillum. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.bashanfoundation.org/cassan/cassancapitulo4.pdf>.

COHEN, A.C.; (2007). *Azospirillum brasilense Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10725-007-9232-9/fulltext.html>.

COLLADOS CLARES, C. (2006). *Impacto de Inoculantes basados en Azospirillum modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizosfera de trigo i maíz.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://hera.ugr.es/tesisugr/16160009.pdf>.

FRANCO CORREA, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas rizobacterias en Hongos formadores de Micorrizas.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf>.

ISMAEL HERNÁNDEZ, W. (Enero,2003). *Aislamiento e identificación de cepas de Azospirillum, y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en plantas de arroz.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/xmlui/bitstream/handle/2238/217/Informe%20pr%C3%A1ctica%20final%20-%20LISTA%20PHRONESIS.pdf?sequence=1>.

LEVANONY, H. *Active attachments of Azospirillum brasilense to root surface of non-cereal plants and to sand particles.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.bashanfoundation.org/publications/activeattach.pdf>.

MARTÍN, I. *Diversidad microbiana y taxonomía.* [S.l.] Universidad de Granada. Disponible a Internet: http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=145&Itemid=105

MICHIELS, K.W.; *Two different modes of attachment of Azospirillum brasilense Sp7 to wheat roots.* [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://mic.sgmjournals.org/content/137/9/2241.short>.

OJUEZ, C. (2004-2005). *Efecto de la fertilización fosfada y la utilización de Azospirillum sobre el rendimiento del cultivo de trigo*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://www.nitrasoil.com.ar/docs/trigo/inta_bolivar_04.pdf.

RIVERA BOTÍA, D. *Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en Azospirillum Brasilense C16*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r66049.PDF>

ROSSI DEVIVO, L. *Campanas de Flujo Laminar y Gabinetes de Seguridad Biológica*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Campanas_de_flujo_laminar.pdf.

SAURA LARIA, G. (2003). *Fijación de Nitrogeno, Azospirillum*. San Salvador : Fiagro . Disponible a Internet: <http://www.umoar.edu.sv/biblio/agricultura/fertilizantes/fijador%20de%20nitrogeno.pdf>.

WESTLAND, S. (2001). *Cómo funciona un espectrofotómetro de reflectancia*. [S.l.] [s.n.] Disponible a Internet: http://gusgsm.com/funciona_espectrofotometro_reflectancia.