

Ans. Pharm., II, (n.º 6), 1961

«Estudio bacteriológico y diferencial de las distintas especies del género *azotobacter*»

ENRIQUE HERNANDEZ GIMENEZ

La fijación biológica del nitrógeno molecular es un proceso fundamental para los ciclos biogénéticos que se desarrollan en el suelo. En la molécula proteínica, el nitrógeno es el componente fundamental; su fuente es la atmósfera, en donde se encontraría en estado inutilizable, para toda forma superior de vida vegetal o animal, sin la existencia de determinados microorganismos capaces de transformar el nitrógeno molecular en nitrógeno asimilable. Salvo pequeñas cantidades de nitrógeno fijado por vía físico-química (por descargas eléctricas), todo el nitrógeno necesario para la vida es fijado por estos microorganismos.

Fué Winogradsky (1) quien, a finales del pasado siglo, dió pruebas sobre la fijación de nitrógeno por cultivos puros de bacterias anaerobias, Beijerinck (2) (3), en 1901, confirmó el mismo descubrimiento en bacterias aerobias, y en los siguientes años se dieron otras muchas noticias sobre las existencias de otras bacterias fijadoras de nitrógeno, la mayoría de las cuales no fueron confirmadas como tales. Los primeros cultivos de bacterias anaerobias efectuadas por Winogradsky pertenecían al género *Clostridium* y las bacterias aerobias de Beijerinck eran *Azotobacter*, ambos géneros son heterótrofos y fijan el nitrógeno de un modo no simbiótico. Por simbiosis con leguminosas, fija el nitrógeno el género *Rhizobium*. También parece haberse demostrado son fijadores, algunas algas microscópicas (Clorofíceas y Cianofíceas) y más recientemente se han descrito ciertas bacterias fotoautótrofas pertenecientes al género *Rhodospirillum* (4) (5), que también presentan dicha propiedad.

La gran importancia económica de la fijación biológica del nitrógeno resalta en los cálculos efectuados por Lipman (6), que la valora en un 60% del nitrógeno recibido por las superficies cultivadas en los Estados Unidos. Gran parte de esta cantidad es fijada por los *Azotobacter* debido a la gran abundancia que existe en suelos y aguas, así como debido a su gran capacidad de fijación.

Han sido publicados una gran cantidad de trabajos dirigidos en su mayoría al estudio de la capacidad fijadora del nitrógeno con miras a su

aprovechamiento en la agricultura; sin embargo hasta el momento no existe desde el punto de vista bacteriológico un estudio bien definido de este género, razón por la que hemos efectuado el presente trabajo dirigido a la bacteriología del mismo y del cual se deducen también resultados para la taxonomía y otros aspectos que pudieran ser de utilidad práctica.

Material y Métodos

Antes de iniciar el estudio bacteriológico del género *Azotobacter*, consideramos como fundamental el tener en nuestro Laboratorio una colección de 135 cepas de *Azotobacter*. Cuatro de ellas son especies tipo cedidas por el Instituto Pasteur de París y corresponden a las especies *Az. chroococcum*, *Az. beijerinckii*, *Az. vinelandii* y *Az. agile*; las restantes son cepas locales procedentes del suelo de la Vega de Granada y que conocemos con un número que corresponde al orden de aislamiento o al número de la muestra de tierra de la cual se aisló

Medios de aislamiento, cultivo y conservación de los *Azotobacter*

Medios de aislamiento.—En el aislamiento de los *Azotobacter* hemos de tener en cuenta la fuente a partir de la cual los vamos a aislar, pues según sea tierra o agua los métodos y medios empleados serán diferentes.

Para verificar el aislamiento a partir de la tierra, el mejor método es el usado por Winogradsky (7), llamado de las placas con tierra mojada.

Si el aislamiento del *Azotobacter* se verifica a partir de las aguas se emplean medios líquidos. El utilizado es la solución nutritiva de Winogradsky (8), en la cual se han tenido en cuenta todas las necesidades minerales de este género, además se le añade la fuente carbonada en la cantidad apropiada.

Medios de cultivo.—El medio que generalmente usamos es el llamado medio base 77 para *Azotobacter* de O. N. Allen (9). La fuente carbonada que se añade puede ser manita al 2 por 100, alcohol etílico al 0,7 por 100 y mejor que esto, una mezcla de glucosa y maltosa, al 1 por 100 que favorece el crecimiento rápido de todos los *Azotobacter*.

Medios de conservación.—Una técnica que se puede emplear para la conservación de los *Azotobacter*, una vez aislados, es la del tubo de tierra inclinado. Se humedece la tierra con una solución de manita al 2% y fosfato al 0,2%, se introduce en tubos alisando la superficie con una espátula, de manera que semeje un tubo de agar inclinado. Se esterilizan durante 20 minutos a 120° y se siembra el germen aislado, utilizando el asa de platino o mejor una pipeta Pasteur con una suspensión del germen en solución salina. Se lleva a la estufa a 28° y a los 2-3 días aparecen las colonias típicas del *Azotobacter*. Después se colocan a temperatura ambiente en lugar oscuro en donde poco a poco se desecan la tierra y los gérmenes.

Este método nos ha dado resultados excelentes pues en más de un centenar de cepas aisladas en nuestro laboratorio, a los tres años de conservación, solamente 3 ó 4% dejó de crecer al pasarlas nuevamente a un tubo inclinado de agar 77.

Tinciones

Los *Azotobacter* debido a la abundancia de mucus que poseen y al depósito salino de sus medios de cultivo, no son fáciles de teñir por los métodos corrientes de tinción, pues debido a estas causas el fondo queda coloreado y no se ve bien definida la forma de las células.

Para la tinción, lo mismo de formas jóvenes que de quistes, hemos utilizado un método ensayado por nosotros con el cual hemos obtenido magníficos resultados. En una doble colaboración verificada con la técnica siguiente: una vez fijada la preparación, teñir con Rosa de Bengala al 1% y fenicada al 5% durante 30 segundos, lavar con agua y teñir con violeta de genciana acuosa a la concentración de 1/5.000 durante 15 a 20 segundos. Ambos colorantes deben estar recién filtrados de lo contrario el fondo no aparece nítido. En vez de la solución de Rosa de Bengala da también buen resultado la Eritrosina a la misma concentración.

Con esta técnica podemos observar no sólo la forma de las células sino también su interior. En los quistes se observa claramente la separación de las dos cubiertas externas. Este método tiene además la gran ventaja de teñir las formas jóvenes más intensamente que las viejas.

Concentración de colorantes.—A un matraz conteniendo 50 c.c. de agar 77 estéril y fundido se le añade el 1% de maltosa-glucosa y el colorante necesario para que queda a la concentración deseada. Se agita y se reparte en cuatro placas de Petri, que una vez solidificadas y secas se siembran usando el asa de platino, con una suspensión, hecha en solución salina, de cada una de las cuatro especies tipo (o bien otra cualquiera), crecidas recientemente en agar 77. Se llevan a la estufa a 28° y a las 48 horas ya se puede observar la iniciación del fenómeno de la concentración, aunque debido al pequeño tamaño que presentan las colonias no se aprecian bien las diferencias entre ellas, cosa que se produce claramente a las 72 y 96 horas.

Inhibición de los azotobacter por la técnica del papel impregnado.—Esta técnica consiste en pesar el colorante necesario para obtener una solución de concentración conocida, que en la Pironina es del 1/500, para la Safranina es 1/250 y para el Telurito potásico 1/2.000. Esta solución se coloca en recipientes de gran superficie. En ella se introduce el papel Whatman N.º 4 cortado en trozos apropiados y se tienen introducidos durante un minuto, ayudándose con unas pinzas para que la impregnación sea uniforme. Transcurrido el tiempo se sacan con las pinzas los papeles y se secan brevemente entre papel de filtro para quitar el exceso de colorante, terminándose de secar al aire, procurando que toquen lo menos posible en algún sitio, pues sino no se consigue

una impregnación uniforme. Una vez el papel seco se puede cortar en discos de un diámetro aproximado de 7-8 mm. Estos discos se colocan sobre placas de agar 77 sobre las que se ha extendido uniformemente una suspensión de gérmenes. Se llevan las placas a la estufa a 28° y a las 24 horas ya se puede observar, si los hay, los halos de inhibición alrededor de los discos.

Resultados y Métodos

La morfología del *Azotobacter* en cultivo puro es considerablemente variable, existiendo diferentes tipos de células que no son estados independientes sino formas pertenecientes a un mismo ciclo de vida.

No se puede establecer de un modo rígido la forma y tamaño exacto de las células en sus diversos estados de desarrollo, pues en la marcha del ciclo influyen la fuente de carbono utilizada, las condiciones ambientales y las diferentes especies.

Para su estudio, nosotros hemos partido de una fase de su ciclo claramente definida y hemos seguido la evolución de las diversas formas hasta llegar nuevamente al estado inicial. El estado más claramente definido y con caracteres más fijos consideramos que es el enquistamiento, por ser un estado de reposo. Los quistes presentan una forma esférica perfecta, de un tamaño aproximado de tres micras con dos membranas perfectamente delimitadas, y una parte central que se tiñe más intensamente.

Se ha tenido en cuenta la influencia que puede tener la naturaleza de la fuente carbonada, por lo que hemos empleado en el estudio del ciclo seis compuestos de carbono diferentes en medio líquido con solución nutritiva de Winogradsky. Ellos fueron: glucosa, manita, alcohol etílico, alcohol butílico, acetato cálcico.

A las 10 horas de cultivo se puede observar ya que aproximadamente la mitad de los quistes han germinado por rotura de su membrana exterior dando lugar a células jóvenes en forma de bastón muy pronunciado y que presentan una ligera escotadura central. Tienen un tamaño aproximado de 2 por 4 micras siendo el tamaño del *Az. chroococcum* un poco menor que el de los *Az. beijerinckii* y *Az. vinelandii*. En este tiempo la germinación no se ha iniciado en todos los medios, estando los quistes en alcohol butílico y en benzoato sin germinar.

A las 18-24 horas podemos afirmar que en todos los medios los quistes han desaparecido, en su lugar aparecen las células jóvenes descritas anteriormente y en algún medio las hay también ovales.

A partir de este tiempo aparece un período que suele durar de dos a tres días más en el cual las células jóvenes van acortando su longitud haciéndose cada vez más cortas y gruesas, terminando por ser ovales o esféricas.

Sobre el sexto día de cultivo las células son todas cocoideas, apareciendo su interior no uniformemente teñido sino semejando un mosaico de inclusiones refringentes, llamado por Winogradsky estado

prequístico, suele tener poca duración y al final del mismo el protoplasma se contrae y aparece la doble membrana características del quiste, con lo cual se ha formado el estado inicial del cual partimos.

Este esquema general del ciclo tiene lugar, salvo pequeñas variaciones, en medios con alcohol etílico, butílico, acetato y benzoato.

El ciclo descrito presenta variaciones sustanciales en los cultivos con glucosa y manita. La principal desviación del ciclo en estos medios se refiere a la producción de quistes. Estos se encuentran en pequeña proporción aún en cultivos viejos no encontrando un carácter fijo para su producción, ya que ésta parece que es más bien esporádica. Nosotros hemos observado cultivos de 20 días sin que en ellos hayamos encontrado la presencia de quistes.

Generalmente el ciclo de vida descrito es el que, salvo las variaciones señaladas, siguen las especies *Az. chroococcum*, *Az. beijerinckii* y *Az. vinelandii*, no habiéndose observado ningún ciclo en el *Az. agilis*. Este permanece siempre en forma ovalada o redonda y únicamente en cultivos muy recientes hemos podido observar algunas formas alargadas que rápidamente se vuelven redondeadas. Ni las diferentes fuentes de carbono, ni los cultivos de más o menos edad producen variaciones claramente notables en la morfología de esta especie.

En la taxonomía de la familia Azotobacteriaceae se describe el género *Azotobacter* indicando en el mismo la ausencia de esporas. Bisset (10) señala que en un medio de agar a las 2-3 semanas la mayoría de las células se transforman en quistes con todas las características aparentes de las esporas, como demuestra por su dificultad a la tinción y su resistencia al calor. El admite como ciertas la formación de esporas en el *Az. chroococcum*.

Nosotros hicimos a una preparación de un cultivo de *Az. vinelandii* de tres meses que estaba totalmente enquistado, una tinción de esporas por el método de Moeller y observamos que algunos quistes aparecían teñidos en rojo, es decir, eran ácido-alcohol resistentes como aparecen las verdaderas esporas. En cultivos enquistados, pero recientes, no encontramos formas teñidas en rojo.

Nuestros cultivos con formas teñidas en rojo se calentaron a 85° durante 5 minutos y nunca obtuvimos crecimiento al sembrarlas nuevamente. Por esto y en contra de Bisset nosotros no admitimos la formación de verdaderas esporas como tienen lugar en la familia Bacillaceae y hemos adoptado el nombre de formas ácido-alcohol resistentes para denominar las formas teñidas en rojo.

Hicimos un cultivo de *Az. chroococcum* en un medio desfavorable con lo cual se debía conseguir una rápida deformación de estas formas teñidas en rojo ante las desfavorables condiciones ambientales y pudimos observar que aparecían gran número de formas redondas teñidas en rojo.

Las formas ácido-alcohol resistentes tal vez podrían ser consideradas como un estado de resistencia a condiciones ambientales muy desfavorables. Estado de resistencia que sería más avanzado que los quistes.

Se ha estudiado la formación de estas formas ácido-alcohol resistentes en los *Az. chroococcum*, *Az. beijerinckii* y *Az. vinelandii* y en las cepas locales 1, 10 y 334 (correspondientes a *Az. Beijerinckii*) y 17 (correspondiente a *Az. chroococcum*), en medios con alcohol butílico. En el *Az. agile* nunca hemos encontrado estas formas ácido-alcohol resistentes.

Formación de pigmentos.—Una de las características típicas del género *Azotobacter* es la producción, por sus especies, de diferentes pigmentos que han servido muchas veces de único carácter diferencial entre las mismas.

Su estudio detallado lo hemos verificado empleando medios de cultivo líquidos y sólidos con diferentes fuentes de carbono para observar la influencia de ésta sobre la aparición del pigmento.

Por los resultados obtenidos vemos que los pigmentos se forman en mayor cantidad en medios sólidos, o al menos, aquí es en donde se aprecian más fácilmente por estar más concentrados en un mismo lugar. El *Az. chroococcum* cuando produce pigmentos siempre es pardo oscuro más o menos intenso y débilmente fluorescente a la luz ultravioleta. El *Az. beijerinckii* sólo produce pigmento claro en patata. Los *Az. vinelandii* y *Az. agile* producen pigmentos verde amarillentos fluorescentes a la luz ultravioleta.

Crecimiento a diferentes pH y variaciones del mismo.—El pH óptimo de los *Azotobacter* está entre 7 y 8, salvo el del *Az. beijerinckii* que parece se desarrolla mejor a pH 6,8.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: a pH 4,5 no creció ningún germen de la colección, a pH 5 sólo presentan un ligero crecimiento el *Az. beijerinckii* y el *Az. vinelandii*, éste en muy pequeña proporción, y de las cepas locales crecen a este pH un 15%, siendo una de ellas un *Az. chroococcum* el núm. 55. Generalmente el crecimiento es débil. A pH 6 el crecimiento es total en todas las especies aunque algunas presentan un crecimiento no muy intenso. Crecimiento óptimo se observó claramente entre un pH 6,8 a 8, siendo el *Az. beijerinckii* el que tiene un óptimo más bajo.

En cultivo en medios líquidos y sólidos hemos estudiado las variaciones de pH que tienen lugar durante el crecimiento.

La producción de ácidos en ambos medios es muy débil y en medio líquido no es suficiente para hacer virar al indicador, posiblemente debido a que las sales del medio ejercen en éste una mayor acción amortiguadora que en medios sólidos.

Utilización de las fuentes de carbono

Las fuentes de carbono utilizadas por las especies del género *Azotobacter* han sido también objeto de nuestro estudio. Esto lo hemos efectuado tanto en las cuatro especies tipo como en las 135 cepas locales de nuestra colección.

Hemos estudiado 18 fuentes de carbono distintas. De ellas las más intensamente utilizadas fueron: glucosa, maltosa, manita, levulosa, sacarosa y alcohol etílico. Siendo almidón y benzoato dos fuentes de carbono especialmente estudiadas por el carácter diferencial que presenta su crecimiento en las especies *Az. chroococcum* y *Az. beijerinckii*. El *Az. beijerinckii* no utiliza el almidón, en cambio el *Az. chroococcum* crece intensamente en él. En benzoato crece bien el *Az. beijerinckii* y no crece el *Az. chroococcum*.

Acciones sobre el desarrollo de los *Azotobacter* por diversos compuestos químicos

A.—Concentración de colorantes.

El punto de partida para el estudio de la concentración de diversos colorantes por los *Azotobacter* surgió cuando trabajando sobre producción de ácidos en agar 77 con Rojo neutro de indicador, observamos que en algunos tubos y por algunas especies el indicador había sido concentrado en las colonias. Después hicimos la prueba sembrando en placas de agar 77 con Rojo neutro a una concentración mayor que la empleada cuando se usa como indicador y comprobamos que nuestra observación había sido cierta. Pensando que lo mismo que nos ocurrió con el Rojo neutro podría pasar con otros colorantes hicimos la prueba en varios de ellos, obteniendo resultados positivos.

Encontramos que la concentración óptima para observar el fenómeno estaba comprendida entre 1/25.000 a 1/200.000.

Los colorantes empleados fueron numerosos: Azul de metileno, Azul alcalino, Azul BB, Azul Nilo, Verbe brillante, Verde de metilo, Verde malaquita, Rojo neutro, Rojo fenol, Rojo Congo, Pironina, Safranina, Tionina, Violeta cristal, Fuchsin, Fuchsin ácida, Sudán III y Pardo Bismark. De ellos, en donde mejor se puede observar la concentración es en Azul de metileno, Rojo neutro y Verde de metilo, a la concentración de 1/50.000.

La forma de concentrar el colorante es diferente para cada especie. En general, podemos decir que el *Az. chroococcum* presenta colonias uniformemente coloreadas. El *Az. beijerinckii* presenta un botón central más intensamente coloreado, siendo el resto más claro y las colonias son muy grandes. El *Az. vinelandii* presenta en sus colonias cuatro zonas muy delimitadas: exterior incolora, después una franja estrecha coloreada intensamente, sigue otra ancha y débilmente coloreada y el centro es puntiforme e intensamente coloreado. El *Az. agile* sólo concentra un colorante, el Rojo neutro, y presenta un botón central que se va difuminando lentamente hacia el exterior que es incoloro.

Un hecho observado fué que los colorantes a diversas concentraciones producían inhibición del crecimiento, que tienen carácter diferencial entre las diversas especies del género *Azotobacter*.

B.—Reducción e inhibición del telurito potásico.

Siguiendo una técnica semejante a la empleada en la concentración e inhibición de colorantes, se ha efectuado un estudio sobre la reduc-

ción del telurito potásico por las diversas especies del género *Azotobacter*, así como la capacidad de inhibición que presenta sobre las mismas.

El *Az. vinelandii* es el más sensible de todas las especies, siendo inhibido a una concentración de telurito al 1/150.000. Los *Az. beijerinckii* y *Az. agile* se inhiben a concentraciones superiores a 1/20.000. y 1/40.000, respectivamente, siendo el *Az. chroococcum* el más resistente a la acción del telurito, ya que crece a concentraciones de 1/10.000 y 1/5.000.

En concentraciones de telurito que no llegan a tener un efecto inhibidor sobre las especies del género *Azotobacter*, cada una de ellas lo reducen de un modo característico que pueden servir también como carácter taxonómico diferencial.

En el *Az. chroococcum* las colonias aparecen totalmente negras. El *Az. beijerinckii* presenta una morfología muy típica, tiene un punto central negro y casi en la periferia presenta una franja circular discontinua, de puntos negros, semejando toda la colonia una margarita. Las colonias en el *Az. agile* tienen un gran parecido a las de *Az. beijerinckii*, presentando también un botón central de telurito reducido, pero su tamaño es menor.

C. *Inhibición de Azotobacter por la técnica del papel impregnado.*

Esta prueba es una derivación de la técnica de inhibición del crecimiento de las especies del género *Azotobacter* por la acción de diversos colorantes a una concentración determinada.

Los colorantes Pironina, Safranina, así como el telurito potásico, tienen un efecto inhibidor diferencial entre las cuatro especies del género.

El *Az. chroococcum* no se inhibe por ninguno de las tres discos, el *Az. beijerinckii* se inhibe con la Safranina y débilmente con la Pironina, el *Az. vinelandii* es inhibido intesamente sólo por el Telurito y el *Az. agile* es inhibido intesamente por la Pironina.

Por lo sencillo de su aplicación y por su rapidez, esta técnica es de gran aplicación para conseguir prontamente la diferenciación de las diversas especies del género.

Aprovechando los resultados que nos brindaron estas nuevas experiencias y haciendo uso de su utilidad taxonómica, hemos clasificado las 135 cepas locales de nuestras colección, procedentes de la vega de Granada, habiendo encontrado que existen 9 cepas de *Azotobacter* tipo *Az. chroococum* que corresponden a los números 2, 17, 55, 103, 331, 3 567, 3.585, 3.658 y 3.658'. Una cepa tipo *vinelandii* la número 3.615 y el resto pertenecen al tipo *Az. beijerinckii*, no habiéndose encontrado ningún *Az. agile*.

Estos resultados fueron nuevamente comprobados por nuestra técnica del papel impregnado con colorantes y Telurito potásico.

Los resultados obtenidos por los nuevos métodos ensayados por nosotros de la concentración de colorantes, de la reducción e inhibición del crecimiento por Telurito potásico, así como de la impregnación de papel,

nos lleva a la conclusión, en contra de la admitida por el Bergey's Manual (11), y por otros autores, de que el género *Azotobacter* presenta cuatro especies perfectamente individualizadas: *Az. chroococcum*, *Az. beijejinckii*, *Az. vinelandii* y *Az. agile*.

RESUMEN

Se hace un estudio bacteriológico del género *Azotobacter*, dando a conocer nuevas técnicas de coloración y de diferenciación de especies. Se pone de manifiesto la existencia de formas ácido-alcohol resistentes. Las técnicas de concentración de colorantes, reducción e inhibición del crecimiento por el telurito potásico, así como la de inhibición por discos impregnados de colorantes, permiten diferenciar las especies del género *Azotobacter* de un modo seguro y rápido, llegando a la conclusión de que existen cuatro especies perfectamente individualizadas: *Az. chroococcum*, *Az. beijejinckii*, *Az. vinelandii* y *Az. agile*.

R É S U M É

On fait une étude bactérienne du genre *Azotobacter*, en faisant connaître des nouvelles techniques de coloration et de différenciation des espèces. On met en évidence l'existence des formes acide-alcool résistantes. Les techniques de concentration des colorants, réduction et inhibition de la croissance par le tellurite potassique ainsi que l'inhibition par disques impregnés de colorants, permettent de différencier les espèces du genre *Azotobacter* d'une façon sûre et rapide, arrivant en somme à la conclusion qu'il existe quatre espèces parfaitement individualisées: *Az. chroococcum*, *Az. beijejinckii*, *Az. vinelandii* et *Az. agile*.

S U M M A R Y

A bacteriological study of the *Azotobacter* genus is being made and new methods of staining and differentiation of strains are shown. The existence of acid-alcohol resistant forms are pointed out. The working techniques of dye concentration, reduction and inhibition of bacterial growth by the potassium tellurite as well as that of bacterial growth inhibition by disks impregnated with staining substances allow to differentiate the strains of the *Azotobacter* genus in a reliable and quick way, reaching to the conclusion that there exist four strains perfectly well defined: *Az. chroococcum*, *Az. beijejinckii*, *Az. vinelandii* and *Az. agile*.

BIBLIOGRAFIA

- (1) WINOGRADSKY, S., *Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes*.—Archf. sci. biol. (St. Petersburg), 3, 295-352. 1895.
- (2) BEIJERINCK, M. W., *Ueber oligonitrophile microben*.—Centr. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 7, 561-582. 1901.

- (3) BEIJERINCK, M. W. AND VAN DELDEN, A.—*Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien.*—Centr. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 9, 3-43. 1902.
- (4) WILSON, P. W., *Biological nitrogen fixation. In bacterial physiology*, pp. 467-499. Edited by Werkman, C. H. and Wilson, P. W. Academic Press, New York 1951.
- (5) WILSON, P. W. *The comparative biochemistry of nitrogen fixation.*—Advances in Enzymol, 13, 345-375. 1952 .
- (6) LIPMAN, C. B. AND MCLEES, E., *Dissociation of Az. Chroococcum (Beijerinck).*—Soil. Ssi. 50, 401-407. 1940.
- (7-8) WINOGRADSKY, S., *Microbiologie du soil. Problemes et methodes.*—Masson Cie., Paris, pp. 585-586 y 753. 1949.
- (9) ALLEN, O. N., *Experiments in Soil Bacteriology.*—Burgess publishing., 58, 1951.
- (10) BISSET, K. A., *Evidence from the citology of Az. Chroococcum ofm a Relationships, with Rhizobium and the Bacillaceae.*—J. Gen. Microbiol. 13, 442-445. 1955.
- (11) BERCEY'S, *Manual of Determinative Microbiology.*— R. S. Bred, 1958.