



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

VELOCIDAD DE MUTACION A FORMA NO ENCAPSULADA  
EN CEPAS DE *Azospirillum*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

WILMA RUBI DEL SOCORRO RIVAS SOLIS

Iztacala, Méx.

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CON TODO MI AMOR

A MIS PADRES

ARGELIA Y MIGUEL:

POR SU SABIDURIA, AL GUIARME DURANTE EL  
CAMINO DE LA VIDA.

POR SU DEDICACION, AL ESTAR CONMIGO EN  
LOS MOMENTOS MAS DIFICILES.

POR SU COMPRESION, AL ESCUCHARME SIEM/  
PRE QUE LO NECESITE.

POR SU AMOR, AL DEMOSTRARME EL SIGNIFI/  
CADO DE LA PALABRA.

POR ENSEÑARME A AMAR LA VIDA.

POR CREER EN MI.

A MIS HERMANOS:

FERNANDO, POR SU FILOSOFIA DE LA VIDA.

MIGUEL, POR SU FORTALEZA ESPIRITUAL.

DAVID, POR AMAR LA LIBERTAD.

FREDDY, POR CREER EN LA AMISTAD.

KAREN, POR AMAR LA VIDA.

POR SER COMO SON.

**Agradecimientos.**

Agradezco a mis sinodales Fernando Ectarrachea, Sergio Vaca, Victor Rivera, Jesús Medina y Ramón Moreno, por la revisión del presente trabajo. A la Dra. Aurora Brunner por las facilidades prestadas para transcribir el presente.

A Marcela Zamudio, por su ayuda desinteresada en la elaboración de ciertos experimentos.

## INDICE

Resumen .....	1
Introducción.....	2
Propiedades fisiológicas de <u>Azospirillum</u> .....	4
Morfogénesis .....	6
Modo de asociación de <u>Azospirillum</u> .....	7
Hipótesis y Objetivos .....	9
Material y Métodos .....	11
Resultados .....	14
Discusión .....	31
Conclusiones .....	34
Bibliografía .....	35

## RESUMEN

En el presente trabajo se describe un procedimiento para el aislamiento de mutantes ( $Enc^-$ ) de Azospirillum brasilense y A. lipoferum incapaces de diferenciarse vegetativamente de vibroide a formas encapsuladas (formas-C). El método se basa en una modificación de la prueba de fluctuación de Luria y Delbruck. El procedimiento para aislar las mutantes se logró, gracias a que éstas presentan la característica de poder desarrollarse en colonias incoloras, en un fondo de colonias silvestres ( $Enc^+$ ) que se tiñen de rojo sobre la superficie de placas de Rojo congo. Dicho comportamiento se debe a la incapacidad de las cepas  $Enc^-$  para sintetizar un cierto polisacárido aún no identificado. La frecuencia de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  está dada en función de cada cepa particular y de las condiciones del cultivo empleado. Asimismo se estableció que la condición de aerobiosis resultó tener mayor frecuencia de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$ . Las mutantes  $Enc^-$  de A. lipoferum y A. brasilense fueron al menos tan eficientes como sus ancestros silvestres, en su capacidad para adherirse y causar deformación en los pelos radicales de semillas germinadas de trigo. Por otro lado, también se vió incrementada la frecuencia de mutación al agregar un detergente (SDS) capaz de curar plásmidos.

## INTRODUCCION

Uno de los principales nutrientes que la planta requiere para su crecimiento, es el Nitrógeno, ya que después del Oxígeno, Hidrógeno y Carbono es el principal componente de los seres vivos, constituyendo esencialmente las proteínas, ácidos orgánicos y ácidos nucleicos de los mismos.

A pesar de que el nitrógeno se encuentra en la atmósfera constituyendo el 78%, las plantas son incapaces de absorberlo en forma de  $N_2$ , sólo pueden asimilarlo en forma de amonio, nitratos y urea. Los fertilizantes nitrogenados son elaborados industrialmente mediante un proceso llamado de Harber Bosh, el cual consiste en convertir el nitrógeno atmosférico en amonio. Actualmente el método se sigue utilizando a pesar de su costo elevado. Básicamente el proceso consiste en hacer reaccionar catalíticamente el hidrógeno con el nitrógeno, sometiendo a altas presiones y temperaturas para dar lugar al amonio. La reacción es  $3H_2 + N_2 \rightleftharpoons 2NH_3$  (17 y 42). En la naturaleza sólo algunos microorganismos procariontes son capaces de obtener el nitrógeno atmosférico y reducirlo a amonio, éste también conocido como fijación de nitrógeno. Algunos de ellos se encuentran asociados en las raíces de algunas plantas, existen algunos otros que son de vida libre como por ejemplo Klebsiella pneumoniae y Azotobacter vinelandii, entre los que se asocian a las raíces de las plantas se encuentra Rhizobium, el cual forma nódulos en las raíces de algunas plantas leguminosas, mediante una asociación simbiótica muy específica. La relación Rhizobium-leguminosa, ha sido objeto de numerosos estudios y de ella se ha obtenido la mayoría de la información que hasta la fecha se tiene sobre el fenómeno de fijación de nitrógeno. Otro tipo de asociación que aún no es bien comprendida, se presenta en Azospirillum y en Beijerinckia, éstos se adhieren a la superficie de raíces de pastos y gramíneas y de caña de azúcar respectivamente.

La fijación de nitrógeno es catalizada por la enzima nitrogenasa, cuya fun-

ción como ya se mencionó anteriormente es reducir el  $N_2$  en  $NH_4$ , (32).

Mucho antes que se tuviera conocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno, los agricultor-s ya utilizaban las leguminosas para revitalizar el suelo. En la actualidad se sabe que la importancia de la fijación de nitrógeno por parte de los microorganismos que la llevan a cabo, puede repercutir a nivel mundial, sustituyendo a los fertilizantes nitrogenados. Sin embargo para que esto pueda ocurrir es necesario una mayor investigación sobre el fenómeno. De hecho se ha estimado, que la asociación Rhizobium-leguminosa es responsable de más de  $40 \times 10^6$  toneladas de nitrógeno fijado por año, lo que representa el 30% obtenido anualmente (42). En la actualidad algunos países utilizan fertilizantes biológicos para sus cultivos de leguminosas, como es el caso de Australia, que utiliza este tipo de recurso en el 99% de sus cultivos de leguminosas, mientras que en el 1% restante se utiliza fertilizante inorgánico. Sin embargo, como la relación es sumamente específica para las leguminosas, los demás cultivos siguen siendo tratados con fertilizantes elaborados industrialmente.

El género Azospirillum inicialmente fué descrito como Spirillum lipoferum - por Beijerinck (1922-1925) y no fue objeto de estudio intensivo hasta que Dobreiner y Day (1976) lo aislaron de ciertos pastos tropicales del Brasil. A partir de entonces su estudio ha cobrado cada vez mayor importancia, a pesar de las dificultades que representa abordar la investigación de la fisiología de su asociación, ya que Azospirillum no forma ninguna estructura reconocible que permita el estudio directo del proceso, asimismo existe una gran variabilidad en el establecimiento o funcionamiento de la asociación, además es muy difícil en el campo cuantificar la fijación de nitrógeno. Tarrand y col (1978) a través de experimentos de homología de DNA lo reclasificaron en un nuevo género: Azospirillum, con dos nuevas especies A. brasilense y A. lipoferum posteriormente Magalhaes y col (1983) propusieron una nueva especie A. amazonense, que a diferencia de las

cia de las otras dos es capaz de utilizar la sacarosa como única fuente de carbono y energía para la fijación de nitrógeno y crecimiento (fig 1).

**Propiedades fisiológicas de Azospirillum** .- Azospirillum es una bacteria - Gram-negativa, altamente móvil y medio curvada llamada forma vibroide (fig 2). Las colonias son de un color rosa-roja y tienen un diámetro de 1um, en medio líquido las bacterias presentan un flagelo polar. Otros flagelos ondulados y de longitud corta pueden ser observados sólo en A. brasilense creciendo la cepa en medio con agar. La composición del DNA del género es de 69-71% de guanina-citocina (46).

A. lipoferum difiere de A. brasilense en su habilidad para utilizar glucosa como única fuente de carbono y energía para crecer o fijar nitrógeno y en su requerimiento por la biotina. La galactosa y la arabinosa, también son utilizadas por ambas especies. Los azospirilla son capaces de oxidar ácidos orgánicos y -- crecer bien en ellos. Son organismos preferentemente microaerófilos, ésto es que prefieren las bajas tensiones de oxígeno. Desarrollan una película blanca -- por debajo de la superficie cuando crecen en medio semigelificado (microaerobiosis). Los azospirilla son atraídos quimiotácticamente por el oxígeno (aerotaxis) y por ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares ( 2, 33 y 34).

Azospirillum puede fijar nitrógeno atmosférico como organismo de vida libre o en asociación con las raíces de algunos pastos y gramíneas económicamente importantes (13). Los ácidos orgánicos tales como el malato, piruvato y succinato son las mejores fuentes de carbono y energía para su crecimiento en presencia sólo de  $N_2$  condición microaeróbica, o bien con la presencia de  $NH_4$  condición aeróbica. La adición de  $NH_4$  para enriquecimiento del medio, reprime completamente la fijación de nitrógeno (29).

Okon y col(1977) describieron que Azospirillum presenta actividad de nitrogenasa y que al menos en A. brasilense Sp7 este sistema está compuesto por 3 -

componentes: la proteína Mo-Fe, una proteína Fe y un factor activador para la proteína Fe semejante a la encontrada en Rhodospirillum rubrum. La actividad de nitrogenasa disminuye al incrementarse la  $pO_2$ , siendo la tensión de oxígeno más adecuada para la fijación de nitrógeno entre 0.005 y 0.007 atm (22, 29 y 32).

Algunas cepas de A. brasilense producen carotenoides al aumentar la  $pO_2$  y fijan nitrógeno cuando la cepa no está pigmentada, lo cual significa que en condiciones de microaerobiosis no hay síntesis de carotenoides, lo que nos indica que los carotenoides protegen del daño oxidativo a la nitrogenasa (28). Azospirillum posee también una hidrogenasa capaz de utilizar el hidrógeno que se desprende de la reacción de nitrogenasa (10). La síntesis de nitrogenasa es reprimida por la presencia de  $NH_4$ .

La actividad de glutamino sintetasa dependiente de ATP, a partir de amonio y glutamato, fué mucho mayor en células que fueron crecidas en  $N_2$  que en aquellas crecidas en  $NH_4$ . La respuesta de glutamato deshidrogenasa, que cataliza la aminación reductiva de 2-oxoglutarato por amonio en reacción reversible, que utiliza NADPH o NADH fué la opuesta. La actividad de glutamato sintasa que cataliza la transferencia del grupo amino de la glutamina, que reacciona con el 2-oxoglutarato para formar dos moléculas de glutamato en células de Azospirillum crecidas en condiciones adecuadas para la fijación de nitrógeno fué de 1.4 a 2.6, más que en condiciones aeróbicas, o sea con  $NH_4$  como fuente de nitrógeno (50 y 30). Además, los azospirilla pueden llevar a cabo la mayoría de las reacciones que transforman nitrógeno en el suelo, como la fijación de nitrógeno, asimilación de amonio y nitrato, mineralización del nitrógeno orgánico y la desnitrificación ( fig 1). Cuando el nitrógeno combinado es limitante, es incorporado a través de la glutamino sintetasa y la glutamato sintasa, mientras que en presencia de nitrógeno combinado la deshidrogenasa glutámica es más activa (30)

Tanto A. brasilense como A. lipoferum poseen varios plásmidos de amplio -

rango de pesos moleculares (15), y se ha tratado de establecer alguna relación entre los plásmidos y las propiedades fenótípicas, aunque hasta la fecha no se ha encontrado nada en concreto. Singh y Wenzel (1982) sugirieron que los plásmidos en Azospirillum están relacionados con el fenómeno de fijación de nitrógeno. Por otro lado, se ha concluido que la información que codifica para la fijación de nitrógeno se encuentra en el cromosoma (38).

Morfogénesis .- Cuando Azospirillum es crecido en un medio libre de nitrógeno, el organismo se desarrolla como microaerófilico pues de esta manera se proporciona a sí mismo de protección a su nitrogenasa para realizar la fijación de nitrógeno, mientras que cuando se le adiciona nitrógeno combinado su crecimiento es aeróbico. Recientemente se han desarrollado algunos estudios sobre el uso y metabolismo de la fructosa por cepas de A. lipoferum y A. brasilense, crecidos en aerobiosis y microaerobiosis. De estos estudios han concluido que la fructosa es una fuente de carbono que favorece la encapsulación de las bacterias (11, 16, 25 y 53). En condiciones de aerobiosis, particularmente en cultivos envejecidos, las formas vegetativas vibroides sufren una transición a un estado inmóvil, se tornan altamente refráctiles y se encapsulan, formando las llamadas formas-C, las cuales forman agregados de varios cientos de miles llamados flocs. También se encontraron que en presencia de fructosa y nitrato se presenta una intensa floculación (formación de flocs, 41). Las formas-C en los flocs parecen estar entrelazados en una matriz fibrilar cuyas células son altamente refráctiles y resistentes a la desecación. Asimismo fue observado que la actividad metabólica y los patrones de agregación también cambian considerablemente con la edad del cultivo, en condiciones que favorecen y conducen a la encapsulación (fig 2).

Concomitante a la formación de formas-C se observa la síntesis de un material altamente refringente. Las células vegetativas vibroides presentan una --

mínima cantidad de gránulos refráctiles compuestos de poly-B-hydroxibutirato - (35). Las formas-C a diferencia de los vibroides, no presentan movimiento y el cuerpo central tiene abundantes gránulos de poly-B-hydroxibutirato (PHB). El cuerpo central se encuentra rodeado de un grueso material capsular que mantiene unidas a otras formas encapsuladas para formar los flocs (41). Se ha sugerido que las formas-C pueden representar en las bacterias un mecanismo de protección contra el daño oxidativo de la nitrogenasa (5 y 6). El fenómeno de morfogénesis, también lo han relacionado con el proceso infeccioso, sin embargo aún restan experimentos y estudios por realizar que corroboren esto.

Los efectos diferenciales sobre floculación por diferentes fuentes de carbono y nitrógeno no son bien comprendidos, pero se cree están vinculados con la producción del polímero extracelular, particularmente polisacáridos de enlaces beta (47 y 54).

Cuando Azospirillum es crecido en un medio rico en nutrientes y luego transferido a otro con deficiencia en nutrientes, sufre cambios metabólicos y sintetiza el polisacárido necesario para el encapsulamiento durante las condiciones de desecación. Por ello se considera que el polisacárido puede ser importante para el mecanismo de supervivencia de Azospirillum bajo condiciones de "stress" tales como limitación de nutrientes y desecación, lo cual puede repercutir favorablemente en el proceso infeccioso. La producción de polisacárido extracelular en azospirilla puede inducirse manipulando el medio de cultivo (41).

Modo de asociación en Azospirillum .- En la última década, se ha obtenido la mayor parte de la información referente a Azospirillum, particularmente acerca de sus propiedades de fijación de nitrógeno y su asociación con gramíneas económicamente importantes y ha sido aislada de climas tropicales, templados y fríos (20 y 40).

Se ha reportado especificidad de Azospirillum a cierta vía fotosintética, ya sea C-3 o bien C-4. A. lipoferum está presente principalmente en maíz (C-4)

y la mayoría de las cepas aisladas de trigo o arroz (C-3) fueron A. brasilense (2, 7 y 12). Existe una notable preferencia de la absorción de A. brasilense por parte de ciertos cereales a través de sus raíces (4, 8 y 44). Las bacterias se han localizado principalmente en el mucigel. En estudios de campo, se han aislado sustancias de exudados de raíz que promueven la asociación de bacterias a los pelos radiculares y que pueden ser considerados como compuestos parecidos a lecitinas (52).

La quimiotaxis que presenta Azospirillum por aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares, puede ser considerado como un fenómeno importante en el mecanismo de asociación con pastos y gramíneas. Por otro lado, se ha encontrado que en cultivos puros de A. brasilense, se producen giberlinas y sustancias parecidas a citoquininas, además se tienen reportes de que producen auxinas a partir de triptofano (48). Es muy probable que la interacción hormonal sea responsable de ciertos cambios morfológicos en la planta, asociados con la inoculación (19).

También se ha propuesto que Azospirillum realiza actividad pectinolítica sobre las raíces "incrementando la absorción mineral de superficie de las células corticales, en un efecto de tipo de esponja" (34, 49 y 51).

Son éstas algunas de las razones que podrían explicar los beneficios que tiene la inoculación de los pastos con Azospirillum y sin embargo, el principal mecanismo por el cual se obtiene beneficio de la asociación es la fijación de nitrógeno.

En otros aspectos, se tiene el conocimiento de que el detergente SDS (dodecil sulfato de sodio) es un agente curativo de plásmidos (45).

Tomando en cuenta la escasez de fertilizantes nitrogenados, el requerimiento elevado de energía para su manufactura, el costo igualmente elevado (17 y 42) y considerando específicamente que nuestro país se encuentra en una situación cada vez más precaria, es de gran importancia el incremento de la investigación sobre los organismos fijadores de nitrógeno.

Aún no es bien comprendido el significado que puedan tener las formas-C de Azospirillum en el proceso de adherencia a las raíces de pastos y gramíneas, - que aunque como se ha mencionado anteriormente es un mecanismo de protección a condiciones adversas (20). Sería muy interesante poder obtener cepas incapaces de encapsularse, para poder realizar estudios del fenómeno de una manera más directa, a través de experimentos con mutantes deficientes en su habilidad para - encapsularse.

Luria y Delbruck (1943) reportaron una prueba de fluctuación, para demostrar que la aparición en una cepa de *Escherichia coli*-B de mutantes resistentes a un virus Alfa ocurría por mutación espontánea. La prueba consistió en crecer la cepa de *E. coli* -B a partir de pequeño inóculo en una serie de cultivos similares hasta llegar a la saturación posteriormente plaqueaban una muestra de cada cultivo ( $10^{-8}$  -  $10^{-5}$ ) en placas con una gran cantidad de virus Alfa capaces de lisar las bacterias. Esta bacteria presenta una cierta frecuencia de mutación que da por resultado mutantes con fenotipo de resistencia al virus. A partir de un pequeño inóculo se asegura la existencia de sólo bacterias sensibles al virus y por consecuencia las bacterias resistentes obtenidas al final del experimento, - eran resultado de algún cambio ocurrido durante el crecimiento de los inóculos. Finalmente por medio de un procedimiento matemático obtuvieron las frecuencias de mutación, cuenta viable y velocidad de mutación.

#### HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Los objetivos planteados en el presente trabajo son: 1) basándonos en una modificación de la prueba de fluctuación de Luria y Delbruck (1943) estimar la tasa de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* en diferentes condiciones experimentales, en particular en microaerobiosis y aerobiosis, 2) establecer las diferencias en las tasas de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  en

tre microaerobiosis y aerobiosis, 3) determinar cualitativamente la capacidad diferencial entre  $Enc^+$  y  $Enc^-$  para adherirse a raíces de semillas germinadas de trigo y causar deformación en sus pelos radiculares y 4) evaluar el efecto que que presenta el detergente SDS en las tasas de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  creciendo las cepas en 0.002% de SDS.

Basándonos en la observación de que en la superficie de placas de Rojo congo aparecen colonias menos coloreadas en un fondo de colonias rojas de Azospirillum debido a que existe un cierto número de polisacáridos que interactúan directamente con los colorantes Calcofluor y Rojo congo y otro tipo de polisacáridos que presentan poca o ninguna interacción, se sugirió que las colonias con menos color, que aparecen sobre las placas conteniendo el Rojo congo eran indicadores de la presencia de mutantes  $Enc^-$  incapaces de acumular uno o más polisacáridos que son producidos normalmente por las colonias silvestres rojas  $Enc^+$  de Azospirillum. Por lo tanto procedimos a diseñar experimentos, mediante los cuales fue posible estimar la tasa de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  en diversas cepas de Azospirillum spp.

Como una segunda hipótesis y en base al SDS que tiene efectos curativos en plásmidos y si la información necesaria para la diferenciación morfogénica de vibrio a forma-C se encuentra codificada en DNA plasmídico, entonces esperamos una mayor frecuencia de mutación al adicionar a las diferentes condiciones de crecimiento 0.002% de SDS.

Ahora bien, considerando que morfogénicamente hablando, vibrios y formas encapsuladas son diferentes y si la forma-C está involucrada en la capacidad infecciosa del organismo a la raíz, entonces observaremos diferencias al infectar con vibrios o formas-C semillas germinadas de trigo en cuanto a adherencia y deformación de pelos radiculares.

## MATERIAL Y METODOS

Las cepas utilizadas de Azospirillum, fueron las tipo silvestre A. brasilense Sp7 (46) MX2088, la cual tiene los marcadores de resistencia a kanamicina y de auxotrofia a histidina ( $\text{His}^- \text{Kan}^r$ ). Los medios utilizados fueron: Medio Nfb modificado ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  7.86g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 10% 2ml/l, NaCl al 10% 1ml/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1% 2ml/l, solución de micronutrientes 2ml/l, azul de bromotimol al 0.5% en KOH 0.2N 2ml/l y  $\text{FeSO}_4$  0.0005g/l, el pH se ajusta entre 6.8 y 7.0); FNF (Nfb + D-Fructosa al 20% 25ml/l y solución de vitaminas 1-ml/l -biotina y piridoxal-) según medios de Dobereiner y Baldani 1981; y el medio LC (Tryptona 10g/l, Extracto de levadura 5g/l y NaCl 5g/l). Las placas llevan 1.5% de agar mientras que para el medio semigelificado únicamente se utilizó 0.26% de agar. Para crecimiento en aerobiosis (placas y medio líquido), se añadió como fuente de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a una concentración de 2.5g/l y además se utilizó 0.5g/l de extracto de levadura, mientras que en condiciones de micro aerobiosis (semigelificado) sólo se adicionó 0.1g/l de extracto de levadura y sin fuente de nitrógeno. Para el medio de Rojo congo (RC), éste se agregó a una concentración de 1:400 agregándose en lugar del azul de bromotimol 15ml/l. El SDS (dodecil sulfato de sodio) se añadió al 0.002%. Para la cepa A. brasilense MX2088 la kanamicina se añadió a una concentración final de 30ug/ml. En el experimento de adherencia, el medio de Rojo congo utilizado fue similar al anterior excepto por la utilización de D-L ácido málico en lugar de la D-fructosa, el extracto de levadura fué omitido.

Series de 10 tubos conteniendo 3 ml de medio líquido FNF, FNF-SDS y FNF-RC y series de 10 viales también fueron llenados con los mismos medios pero semigelificados. Lo primero fue sembrar por estriado cada cepa en placas con medio rico LC e incubar durante 48 horas a 30°C. Posteriormente, a partir de una cc

ionía aislada que es resuspendida en buffer Nfb y diluida hasta  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . De estas diluciones se plaquearon 0.1ml en medio LC y FNF-RC 3 cajas/ medio/ dilución, de la última dilución se inóculo 0.1ml en cada uno de los tubos y viales.

Los tubos inoculados se incubaron a 30°C en agitación durante 72 horas y los viales alrededor de 144 horas y también a 30°C. Al final, se obtiene una muestra de cada tubo la cual es diluida hasta  $10^{-6}$  para plaquear 0.1ml de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en placas de FNF-RC y 0.1ml de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en placas de medio rico LC. Después de 72 horas de incubación a 30°C se procede a cuantificar la cuenta viable a partir de las diluciones más altas ( $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) y el número de mutantes es obtenido a partir de las diluciones más bajas ( $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ ). El cociente entre el número de mutantes y el número de bacterias totales nos dá por resultado la frecuencia de mutación.

Posteriormente para cuantificar la capacidad infectiva de las formas silvestres y las encapsuladas en raíces de semillas germinadas de trigo, se utilizó un método en la cual es esterilizada la superficie de las semillas germinadas de trigo con etanol al 70% durante 1 min seguido por 20 min en blanqueador comercial al 10%, para luego lavarse 4 veces con agua estéril, en el último lavado permanecen sumergidos durante 2 horas, las semillas tratadas fueron germinadas sobre placas con agar al 1% en la oscuridad a 30°C. Luego de 48 horas de crecimiento fueron suspendidas en matraces de Erlenmeyer con 25 ml de solución de Faraeus ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.15g/l, citrato férrico 0.005g/l y un pH de 7), fueron incubadas a 30°C con  $1 \times 10^7$  CFU (unidades formadoras de colonias) bacterias previamente crecidas por 24 horas en medio líquido LC, luego fueron lavadas y resuspendidas en solución Faraeus.

Las semillas inoculadas fueron incubadas en agitación (60rpm) durante 90 min a 30°C. Las raíces fueron liberadas de las bacterias no adheridas, agitándo

Las cuatro veces a 300 rpm durante 15 min con 25 ml de solución Farraeus, el sobrenadante fué desechado. De las raíces se tomaron 1cm de longitud y se machacaron en un homogenizador de vidrio. Las suspensiones fueron diluidas en 0.01M de buffer fosfatos a pH 7 y plaqueadas sobre medio de Rojo congo y placas de medio sólido LC.

Los experimentos para observar deformación en pelos radiculares, se realizaron de manera similar, excepto que las semillas fueron transferidas de placas con agar a placas conteniendo 25 ml de Farraeus con agar semigelificado (0.35%).

Las placas se inocularon con  $1 \times 10^7$  CFU bacterias y fueron incubadas a 30° C. El tipo de deformación evaluado en este experimento, fué únicamente las diferentes ramificaciones en cuanto a longitud de los pelos radiculares (37). Después de 24 horas de haber sido inoculadas, se cortaron 1cm de longitud de las radículas y se colocaron en un portaobjetos para ser observadas al microscopio de contraste de fases.

La cuantificación de las deformaciones, se realizó por barrido de uno a otro lado de los margenes de las piezas radiculares bajo una sola profundidad de campo, ya que resultó imposible observar las deformaciones de la pieza de 1cm por el número tan elevadísimo (fig 3)

## RESULTADOS

Durante el primer experimento, el cual consistió únicamente en obtener las frecuencias de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  de A. brasilense MX2088, Sp245 y A. lipofe- rum Brl702, en diferentes condiciones de crecimiento (aerobiosis y microaerobiosis), se pudo observar que para el caso de la cepa MX2088, las frecuencias de mutación en ambas condiciones fueron de  $1.1 \times 10^{-3}$  en aerobiosis y  $1.2 \times 10^{-3}$  en microaerobiosis. Sin embargo analizando las frecuencias individuales (tabla 1) es importante observar que en los primeros 24 cultivos en aerobiosis, la cantidad de mutantes encontradas fué considerablemente menor que en el resto de los cultivos mientras que la cuenta viable permaneció más o menos constante a lo largo de todos los cultivos, lo que se nota en la obtención de frecuencias con mucha variación entre los cultivos.

En la cepa MX2088 se observó que en condiciones de microaerobiosis existe una mayor proporción de cultivos sin mutantes (tabla 1) con respecto a la condición aeróbica.

El mismo experimento fué realizado para A. brasilense Sp245 (tabla 2) y lo que observamos fue que en condiciones de aerobiosis la frecuencia de mutación fué de 3.03 veces el valor obtenido en microaerobiosis, pues en el primer caso la frecuencia fué de  $2.4 \times 10^{-4}$  y en el segundo de  $7.9 \times 10^{-5}$ . En aerobiosis la proporción de cultivos sin mutantes fue considerablemente menor que en microaerobiosis. Esto se vió reflejado en la frecuencia final de mutación, al considerarse la suma total de mutantes dividido por la cuenta viable del número de bacterias totales al momento de la muestra.

Para la cepa A. lipoferum Brl702 (tabla 3) se obtuvo una frecuencia mucho menor aparentemente en condiciones de aerobiosis que en condiciones de microaerobiosis, ya que en éste último no pudo ser calculada la frecuencia de mutación. Cuando el organismo crece en condiciones de aerobiosis, no se obtuvo ninguna mutante,

en ninguno de los cultivos, por lo tanto la frecuencia de mutación calculada fué de 0. Ahora bien en presencia de nitrógeno atmosférico (condición microaeróbica) la proporción de cultivos sin mutantes resultó ser muy baja, sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en presencia de nitrógeno combinado, en dos cultivos se pudieron localizar una mutante en cada uno, con una frecuencia final de  $1.1 \times 10^{-5}$ .

Durante el segundo experimento el método utilizado fué el mismo y se realizó debido a que existía la posibilidad de que el Rojo congo estuviera actuando como un agente mutagénico. Para ello se tomó una serie de cultivos control y otra añadiendo el R.C. (12mg/l) para que éste estuviera presente durante el crecimiento de cultivos. Tanto en aerobiosis como en microaerobiosis los resultados en Rojo congo y el experimento control fueron muy similares.

En la tabla No. 4 se presentan los valores de las frecuencias totales de mutación de la cepa MX2088 dadas en presencia de nitrógeno combinado. En el experimento control la frecuencia  $2.5 \times 10^{-2}$  es sólo 1.6 veces el presente en el experimento con Rojo congo, que tuvo un valor de  $1.6 \times 10^{-2}$ .

Para la condición de microaerofilia también de la cepa MX2088, los datos que se tienen tanto en Rojo congo como en el experimento control, es que las frecuencias totales son exactamente las mismas, es decir que ambas presentan una frecuencia de mutación de  $5.6 \times 10^{-3}$  (tabla 5).

En el caso de la cepa A. brasilense Sp245, se realizaron tres experimentos uno en donde estuviera presente el Rojo congo, otro de experimento control y por último en donde estuviera presente el SDS. Los resultados en microaerobiosis (tabla 6) indican que el RC no afecta la frecuencia de crecimiento, y el añadir el SDS, la frecuencia de mutación se incrementa considerablemente como fue observado en las frecuencias totales:  $2.5 \times 10^{-5}$  en el control y  $1.5 \times 10^{-3}$  con SDS, lo que significa es que el SDS aumenta la frecuencia de mutación de  $\text{Eno}^+$  a  $\text{Enc}^-$  y es igual a 60 veces el experimento control. En presencia del RC la frecuencia de

mutación fue de  $4.9 \times 10^{-5}$ , o sea 1.6 veces el control.

Luego entonces se prosiguió con la cepa A. brasilense MX2088, y verificó su frecuencia de mutación cuando es crecida con SDS, (tabla 7) Como se esperaba la frecuencia obtenida fue mucho mayor con la presencia del SDS, dicho valor es de  $3.2 \times 10^{-1}$ , en contraste con el control de  $3.0 \times 10^{-2}$ , esto significa 10.8 veces el control, esto tuvo lugar en condiciones aeróbicas.

En la tabla No. 8 la cepa A. brasilense Sp245, se presentó que en el control la frecuencia total fue de  $9.2 \times 10^{-3}$  y en Rojo congo de  $1.7 \times 10^{-3}$ , el cual es menor 5.4 veces que el control. Y en presencia de SDS la frecuencia fue de  $1.6 \times 10^{-2}$ , y significa 1.7 veces el control, aunque si se considera con respecto a los cultivos crecidos en Rojo congo, la frecuencia presente en SDS sería de 9.4 veces la frecuencia presente en RC.

Ahora, tomando en cuenta las 3 cepas de Azospirillum incluidas en el trabajo, es notable la observación, de que las más altas frecuencias se presentaron en la cepa A. brasilense, mientras que en la de A. lipoferum fueron considerablemente menores. También es notable el hecho de que dentro de la misma especie, la MX2088 tuvo mayor tasa de mutación que la Sp245. (tabla 9).

También es importante observar que en presencia de SDS las tasas de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  en las diversas cepas de Azospirillum es mayor que sin la presencia de éste. También se pudo ver que el Rojo congo no altera las frecuencias de mutación con respecto a los experimentos control. (tabla 9).

Las mutantes obtenidas fueron caracterizadas morfológicamente. En las silvestres A. brasilense y A. lipoferum, la coloración presente en cajas de Rojo congo incubadas a  $30^\circ C$  incubadas entre 72 y 120 horas es roja y miden de 1.5 a 2 mm de diámetro las colonias, y presentan formas irregulares, orillas onduladas, superficie rugosa y en ocasiones canales radiales a partir del centro (9) mientras que la caracterización de las mutantes  $Enc^-$  denominadas Sp7W1 para la

cepa mutante  $Enc^-$  de A. brasilense MX2088 y Sp245W1 presentan la misma talla, circulares, convexas, translúcidos y con márgenes completos. Por otro lado, se obtuvieron otras mutantes también consideradas como  $Enc^-$ , aunque presentan coloración intermedia entre las  $Enc^+$  y las  $Enc^-$ , sus matices van desde rosa-pálido hasta rosa-naranja. Sin embargo una gran cantidad de ellas, revirtieron a la forma silvestre a muy elevadas frecuencias, esto tuvo lugar durante la purificación de las mutantes. Las menos coloradas como la Sp7W1 y la Sp245W1 aparentemente no revirtieron y no presentan deficiencia alguna con respecto a las silvestres, en cuanto a características bioquímicas, excepto en su habilidad para hacer formas-C. Además para mantener vivas las cepas mutantes, es necesario sembrarlas más frecuentemente que las silvestres, es decir cada 15 días, en lugar de cada 30 días. La cepa derivada de la MX2088 retiene su auxotrofia a histidina y su resistencia a kanamicina.

En la determinación de la capacidad infectiva y grado de adherencia de las cepas tipo silvestre y las mutantes  $Enc^-$ , fué notorio que tanto la cepa  $Enc^+$  como la  $Enc^-$  son capaces de adherirse a las raíces con igual habilidad, (tabla 10). En cuanto al incremento de pelos radiculares con inoculación de Azospirillum en raíces de semillas germinadas de trigo, fué muy similar tanto en las mutantes  $Enc^-$  como en las silvestres  $Enc^+$ . La deformación de pelos radiculares fué la misma en las mutantes  $Enc^-$  que en las que todavía son capaces de encapsularse  $Enc^+$  (fig 3).

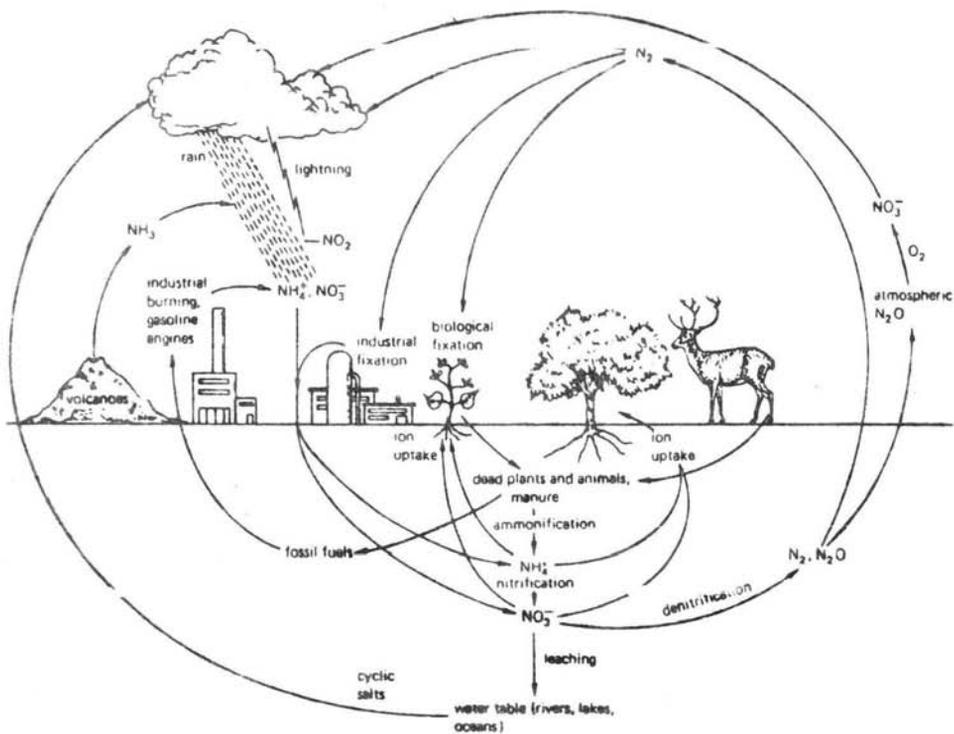
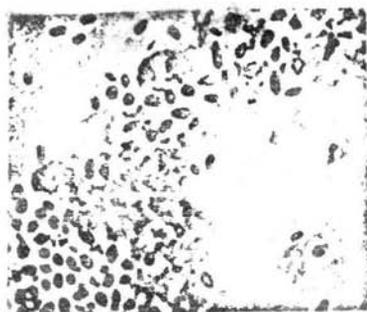


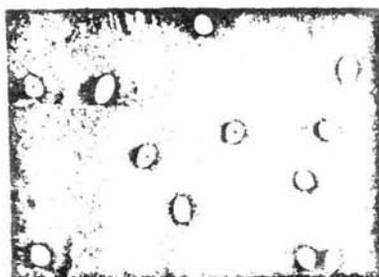
FIG.1 Ciclo del nitrógeno. (Tomado de Salisbury F.B. y CW Ross. 1978. Plant Physiology, 2a edición Wodsworth Publishing Company, Inc.)



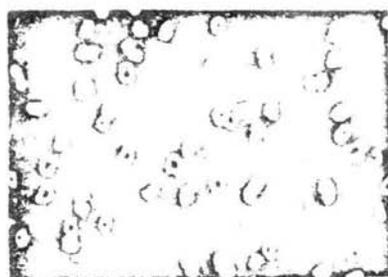
A



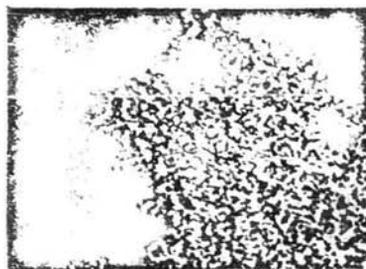
B



C



D

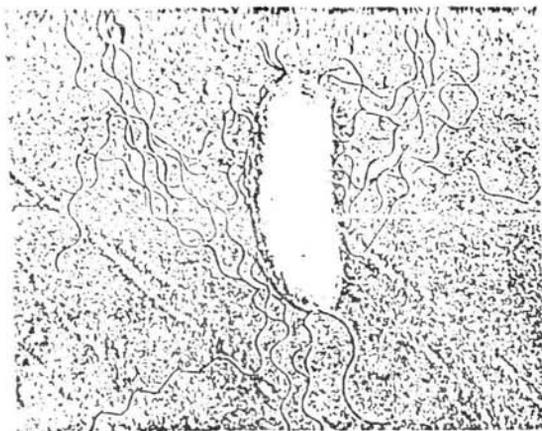


E

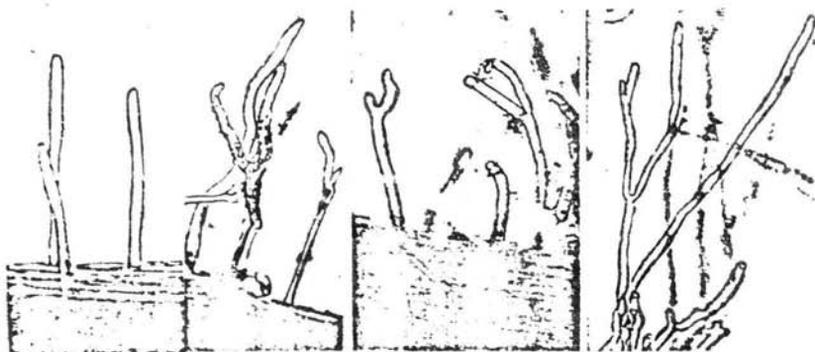


F

Fig. 2 Se muestran las células vegetativas vibroides(A), agrupamiento de las mismas células vegetativas(B), C, D y E, muestran el encapsulamiento progresivo para la formación de flocs, y F, es una célula en capsulada después de 6 meses de desecación de los flocs con los granulos de PHB.



A



B

C

D

E

FIG. 3 En A se encuentra una microfotografía, un vibrio en *Azospirillum*, con su gran cantidad de flagelos ondulados y su flagelo polar. En B, se muestra los pelos radiculares de semillas germinadas de trigo y en C, D y E están dadas tres figuras de las deformaciones producidas por la inoculación con *Azospirillum*

FRECUENCIAS DE MUTACION  
EN Azospirillum brasilense MX2088

AEROBIOISIS			MICROAEROBIOISIS		
M. $10^4$	/ C.V. $10^7$	FRECUENCIAS	M. $10^3$	/ C.V. $10^6$	FRECUENCIAS
2	/ 6.4	$5.1 \times 10^{-4}$	0	/ -	0
3	/ 4.1	$7.3 \times 10^{-4}$	0	/ 1.3	0
10	/ 18	$5.6 \times 10^{-4}$	0	/ 0.4	0
6	/ 16	$1.7 \times 10^{-4}$	0	/ 1.5	0
2	/ 12	$3.7 \times 10^{-4}$	0	/ 0.1	0
2	/ 22	$9.0 \times 10^{-5}$	0	/ 0.3	0
7	/ 28	$2.5 \times 10^{-4}$	0	/ 1.6	0
1	/ 33	$3.0 \times 10^{-5}$	0	/ 1.7	0
1	/ 23	$4.5 \times 10^{-5}$	0	/ 0.5	0
4	/ 29	$1.7 \times 10^{-4}$	0	/ 0.7	0
2	/ 16	$1.3 \times 10^{-4}$	0	/ 2.6	0
2	/ 15	$1.4 \times 10^{-4}$	0	/ 1.0	0
4	/ 27	$1.5 \times 10^{-4}$	0	/ 1.8	0
3	/ 21	$1.4 \times 10^{-4}$	0	/ 1.0	0
2	/ 12	$1.8 \times 10^{-4}$	0	/ 0.4	0
7	/ 14	$5.1 \times 10^{-4}$	0	/ 2.6	0
2	/ 21	$9.7 \times 10^{-5}$	0	/ 1.4	0
2	/ 22	$9.1 \times 10^{-5}$	0	/ 1.2	0
0	/ 23	0	0	/ 1.6	0
0	/ 13	0	0	/ 1.3	0
0	/ 22	0	3.7	/ 4.3	$8.6 \times 10^{-4}$
0	/ 6.8	0	2	/ 1.0	$1.8 \times 10^{-3}$
0	/ 15	0	0	/ 2.1	0
0	/ 26	0	0	/ 1.0	0
37	/ 17	$2.2 \times 10^{-3}$	0	/ 0.4	0
250	/ 14	$1.7 \times 10^{-2}$	0	/ 0.4	0
0	/ 3	0	0	/ 0.3	0
150	/ 6.4	$2.4 \times 10^{-2}$	0	/ 0.8	0
29	/ 7	$4.1 \times 10^{-3}$	0	/ 0.6	0
40	/ 17	$2.3 \times 10^{-3}$	0	/ 1.3	0
20	/ 14	$1.4 \times 10^{-3}$	3	/ 4.2	$7.1 \times 10^{-4}$
40	/ 11	$3.6 \times 10^{-3}$	10	/ 4.5	$2.2 \times 10^{-3}$
10	/ 20	$5.4 \times 10^{-4}$	10	/ 18	$5.5 \times 10^{-4}$
10	/ 4	$2.5 \times 10^{-3}$	10	/ 7.5	$1.3 \times 10^{-3}$
0	/ 5	0	3	/ 2.5	$1.2 \times 10^{-3}$
			2	/ 5.0	$4.0 \times 10^{-4}$
			2	/ 4.3	$4.6 \times 10^{-4}$
			0	/ 4.0	0
			35	/ 4.0	$8.7 \times 10^{-3}$
			13	/ 2.4	$5.4 \times 10^{-3}$
			30	/ 4.6	$3.1 \times 10^{-3}$
648	/ 563.7	$1.1 \times 10^{-3}$	121	/ 101.2	$1.2 \times 10^{-3}$

Tabla No. 1 M. significa el número de colonias mutantes elevado a la a la potencia que se indica. y C. V. es la cuenta viable, o sea el número de bacterias totales.

FRECUENCIAS DE MUTACION

EN Azospirillum brasilense Sp245

AEROBIOSIS			MICROAEROBIOSIS		
M. 10 <sup>4</sup>	/ C.V. 10 <sup>7</sup>	FRECUENCIAS	M. 10 <sup>3</sup>	/ C.V. 10 <sup>6</sup>	FRECUENCIAS
2	/ 3.7	5.1x10 <sup>-4</sup>	0	/ 0.8	0
5	/ 3.7	1.3x10 <sup>-3</sup>	0	/ 86	0
1	/ 5.2	1.2x10 <sup>-4</sup>	0	/ 2.7	0
2	/ 0.8	2.5x10 <sup>-3</sup>	0	/ 7.4	0
1	/ 4.2	2.3x10 <sup>-4</sup>	1	/ 3.8	2.7x10 <sup>-4</sup>
10	/ 11	9.1x10 <sup>-4</sup>	1	/ 11	9.1x10 <sup>-5</sup>
23	/ 13	1.8x10 <sup>-3</sup>	0	/ 58	0
10	/ 113	7.7x10 <sup>-4</sup>	0	/ 0.8	0
2	/ 32	6.2x10 <sup>-5</sup>	0	/ 1.3	0
0	/ 43	0	0	/ 17	0
1	/ 24	4.2x10 <sup>-5</sup>	0	/ 9.2	0
2	/ 33	6.1x10 <sup>-5</sup>	1	/ 1.9	5.3x10 <sup>-4</sup>
0	/ 27	0	0	/ 4.4	0
1	/ 5.5	1.8x10 <sup>-4</sup>	0	/ 1.8	0
0	/ 6.3	0	0	/ 4.1	0
5	/ 6.7	7.5x10 <sup>-4</sup>	0	/ 4.4	0
10	/ 6.5	1.5x10 <sup>-3</sup>	0	/ 7.3	0
1	/ 3.1	3.2x10 <sup>-4</sup>	0	/ 18	0
0	/ 5.6	0	0	/ 3.6	0
1	/ 7.2	1.4x10 <sup>-4</sup>	0	/ 7.2	0
10	/ 24	4.2x10 <sup>-4</sup>	0	/ 8.7	0
1	/ 3.4	2.9x10 <sup>-4</sup>	0	/ 4.8	0
0	/ 6.0	0	0	/ 5.9	0
0	/ 16	0	0	/ 13	0
0	/ 15	0	0	/ 2.9	0
1	/ 3.3	3.0x10 <sup>-4</sup>	0	/ 13	0
10	/ 7.3	1.4x10 <sup>-3</sup>	0	/ 2.5	0
0	/ 7.7	0	0	/ 5.0	0
1	/ 7.0	1.4x10 <sup>-4</sup>	0	/ 1.7	0
0	/ 27	0	20	/ 3.4	5.9x10 <sup>-3</sup>
0	/ 22	0	0	/ 7.5	0
0	/ 8.0	0	1	/ 3.4	2.9x10 <sup>-4</sup>
0	/ 4.8	0	2	/ 7.4	2.7x10 <sup>-4</sup>
0	/ 5.9	0	0	/ 5.0	0
3	/ 13	2.3x10 <sup>-4</sup>	0	/ 1.4	0
2	/ 21	9.6x10 <sup>-5</sup>			
2	/ 11	1.8x10 <sup>-4</sup>			
0	/ 3.6	0			
20	/ 8.6	2.3x10 <sup>-3</sup>			
0	/ 13	0			
1	/ 20	4.9x10 <sup>-5</sup>			
0	/ 9.4	0			
1	/ 11	8.8x10 <sup>-5</sup>			
1	/ 8.9	1.1x10 <sup>-4</sup>			
0	/ 18	0			
130	/ 549.4	2.4x10 <sup>-4</sup>	26	/ 336.3	7.9x10 <sup>-5</sup>

Tabla No. 2 C.V. = cuenta viable M= No. de metantes.

TABLA DE FRECUENCIAS DE MUTACION

EN *Azospirillum lipoferum* Br1702

AEROBIOSIS			MICROAEROBIOSIS				
M. $10^4$	/	C.V. $10^7$	FRECUENCIAS	M. $10^3$	/	C.V. $10^6$	FRECUENCIAS
0	/	1.1	0	0	/	0.8	0
0	/	10	0	0	/	2.6	0
0	/	7.0	0	0	/	1.5	0
0	/	5.5	0	0	/	3.9	0
0	/	3.7	0	0	/	21	0
0	/	3.9	0	0	/	10	0
0	/	6.2	0	0	/	11	0
0	/	0.3	0	0	/	3.3	0
0	/	1.0	0	0	/	1.0	0
0	/	2.6	0	0	/	5.4	0
0	/	12	0	0	/	12	0
0	/	5.6	0	0	/	7.3	0
0	/	8.6	0	0	/	1.9	0
0	/	9.6	0	0	/	3.4	0
0	/	10	0	0	/	0.2	0
0	/	6.2	0	0	/	2.9	0
0	/	4.3	0	0	/	1.4	0
0	/	4.3	0	0	/	0.8	0
0	/	8.4	0	0	/	1.9	0
0	/	4.5	0	0	/	1.1	0
0	/	30	0	1	/	2.7	$3.7 \times 10^{-4}$
0	/	33	0	0	/	2.0	0
0	/	45	0	0	/	1.3	0
0	/	26	0	0	/	1.2	0
0	/	0.9	0	0	/	0.9	0
0	/	57	0	0	/	3.9	0
0	/	17	0	0	/	3.3	0
0	/	30	0	0	/	11	0
0	/	40	0	1	/	3.0	$3.3 \times 10^{-4}$
0	/	15	0	0	/	4.5	0
0	/	33	0	0	/	2.0	0
0	/	26	0	0	/	12	0
0	/	32	0	0	/	10	0
0	/	21	0	0	/	19	0
0	/	14	0	0	/	3.9	0
0	/	4.8	0	0	/	5.7	0
0	/	4.4	0				
0	/	16	0				
0	/	16	0				
0	/	11	0				
0	/	3.5	0				
0	/	4.7	0				
<hr/>							
0	/	601	0	2	/	179.8	$1.1 \times 10^{-5}$

Tabla No. 3 C.V. = Cuenta viable

M= No. de mutantes.

FRECUENCIAS DE MUTACION  
 EN Azospirillum brasilense MX2088  
 EN AEROBIOISIS.

Cultivos que durante el crecimiento  
 estuvo presente el Rojo Congo.

Cultivos sin adición alguna

FRECUENCIAS	FRECUENCIAS
1.8x10 <sup>-2</sup>	1.6x10 <sup>-1</sup>
5.3x10 <sup>-3</sup>	9.7x10 <sup>-2</sup>
1.4x10 <sup>-3</sup>	1.3x10 <sup>-2</sup>
1.1x10 <sup>-2</sup>	1.7x10 <sup>-2</sup>
3.0x10 <sup>-2</sup>	1.3x10 <sup>-2</sup>
7.5x10 <sup>-3</sup>	4.1x10 <sup>-3</sup>
3.7x10 <sup>-2</sup>	7.6x10 <sup>-3</sup>
2.2x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>
1.3x10 <sup>-2</sup>	3.5x10 <sup>-3</sup>
1.3x10 <sup>-2</sup>	1.7x10 <sup>-2</sup>
Total 1.6x10 <sup>-2</sup>	Total 2.5x10 <sup>-2</sup>

\* Los valores de las frecuencias totales se obtuvieron sumando el total de las bacterias mutantes, dividiendolo entre el total de bacterias mutadas y no mutadas.

En presencia de Rojo congo los valores arriba mencionados fueron  $108 \times 10^5 / 68.7 \times 10^7$  y para el control fué de  $171 \times 10^5 / 68.3 \times 10^7$ .

Tabla No. 4.

FRECUENCIAS DE MUTACION  
 EN *Azospirillum brasilense* MX2088  
 EN MICROAEROBIOSIS

CONTROL (sin adición)

Con adición de Rojo congo

FRECUENCIAS

2.1x10<sup>-3</sup>  
 4.5x10<sup>-3</sup>  
 3.0x10<sup>-2</sup>  
 1.0x10<sup>-2</sup>  
 1.0x10<sup>-2</sup>

FRECUENCIAS

1.5x10<sup>-2</sup>  
 4.4x10<sup>-3</sup>  
 7.3x10<sup>-4</sup>  
 7.5x10<sup>-3</sup>  
 6.6x10<sup>-3</sup>  
 5.0x10<sup>-3</sup>  
 2.3x10<sup>-2</sup>  
 2.8x10<sup>-3</sup>

---


$$22 \times 10^3 / 3.9 \times 10^6 = \underline{5.6 \times 10^{-3}}$$

$$42 \times 10^3 / 7.5 \times 10^6 = \underline{5.6 \times 10^{-3}}$$

Tabla No. 5

FRECUENCIAS DE MUTACION  
 EN Azospirillum brasilense Sp245  
 EN MICROAEROBIOISIS

CONTROL	Adición de Rojo congo	Adición de SDS
FRECUENCIAS	FRECUENCIAS	FRECUENCIAS
0	0	$7.8 \times 10^{-4}$
0	$1.4 \times 10^{-3}$	$5.0 \times 10^{-4}$
0	$4.3 \times 10^{-4}$	$7.9 \times 10^{-4}$
0	0	$2.6 \times 10^{-4}$
$2.4 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-2}$	$4.4 \times 10^{-3}$
0	0	$2.0 \times 10^{-4}$
0	0	$2.9 \times 10^{-4}$
0	0	$1.3 \times 10^{-3}$
0	0	$3.2 \times 10^{-3}$
$1.8 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-5}$	$1.7 \times 10^{-4}$
Total <u><math>2.5 \times 10^{-5}</math></u>	Total <u><math>4.9 \times 10^{-5}</math></u>	Total <u><math>1.5 \times 10^{-3}</math></u>

Las frecuencias totales fueron obtenidas de la división del número total de mutantes y el número total de bacterias en la cuenta viable.

Tabla No. 6

FRECUENCIAS DE MUTACION  
 EN Azospirillum brasilense MX2088  
 EN AEROBIOSIS .

CONTROL	Adición de Rojo congo	Adición de SDS
FRECUENCIAS	FRECUENCIAS	FRECUENCIAS
$3.4 \times 10^{-2}$	-	$4.5 \times 10^{-2}$
$3.4 \times 10^{-2}$	-	0.24
$3.4 \times 10^{-2}$	-	$3.8 \times 10^{-2}$
$4.9 \times 10^{-2}$	-	0.52
$6.9 \times 10^{-2}$	-	0.25
$9.4 \times 10^{-3}$	-	0.49
$2.2 \times 10^{-2}$	-	0.43
0.1	-	0.61
$8.9 \times 10^{-3}$	-	0.27
$2.9 \times 10^{-2}$	-	0.12
Total <u><math>3.0 \times 10^{-2}</math></u>	-	Total <u>0.324</u>

Las frecuencias en rojo congo no se realizaron debido a que ya teníamos calculadas sus frecuencias en la tabla No. 4. Como en los otros casos las frecuencias totales son calculadas dividiendo el total de mutantes entre el total de bacterias.

Tabla No. 7.

FRECUENCIA DE MUTACIONES  
EN Azospirillum brasilense Sp245  
EN AEROBICIS

CONTROL	Adición de Rojo congo	Adición de SOS
FRECUENCIAS	FRECUENCIAS	FRECUENCIAS
$2.9 \times 10^{-3}$	0	$5.2 \times 10^{-4}$
$4.3 \times 10^{-3}$	0	$5.8 \times 10^{-3}$
$1.3 \times 10^{-2}$	0	$4.4 \times 10^{-3}$
$1.3 \times 10^{-2}$	0	$6.3 \times 10^{-3}$
$2.3 \times 10^{-2}$	0	$3.9 \times 10^{-3}$
$4.3 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-2}$	0.17
$8.0 \times 10^{-3}$	$3.7 \times 10^{-3}$	$2.2 \times 10^{-2}$
$4.8 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-2}$
$4.4 \times 10^{-3}$		$2.2 \times 10^{-3}$
		$1.4 \times 10^{-3}$
Total <u><math>9.2 \times 10^{-3}</math></u>	Total <u><math>1.7 \times 10^{-3}</math></u>	Total <u><math>1.6 \times 10^{-2}</math></u>

Tabla No. 8.

FRECUENCIAS DE MUTACION DE ENC<sup>+</sup> a ENC<sup>-</sup> de LAS DIFERENTES CEPAS DE Azospirillum.

CEPAS	Condición de cultivo	Frecuencias de mutación		
		Adición al medio de crecimiento		
		No adición	Rojo congo	SDS
<u>A. brasilense</u>	Microaerobiosis	1.2x10 <sup>-3</sup>		
MX2088	Microaerobiosis	5.6x10 <sup>-3</sup>	5.6x10 <sup>-3</sup>	
	Aerobiosis	1.1x10 <sup>-3</sup>		
	Aerobiosis	3.0x10 <sup>-2</sup>		3.2x10 <sup>-1</sup>
	Aerobiosis	2.5x10 <sup>-2</sup>	1.6x10 <sup>-2</sup>	
<u>A. brasilense</u>	Microaerobiosis	7.9x10 <sup>-5</sup>		
Sp245	Microaerobiosis	2.5x10 <sup>-5</sup>	4.9x10 <sup>-5</sup>	1.5x10 <sup>-3</sup>
	Aerobiosis	3.8x10 <sup>-4</sup>		
	Aerobiosis	9.7x10 <sup>-3</sup>	1.7x10 <sup>-3</sup>	1.6x10 <sup>-2</sup>
<u>A. lipoferum</u>	Microaerobiosis	1.1x10 <sup>-5</sup>		
Brl702	Aerobiosis	0		

Nota . Con rojo congo y SDS no fue posible realizar el experimento con la cepa de A. lipoferum Brl702, ya que por cuestiones técnicas no creció.

Al igual que las mutantes de Brl702, observamos que fueron demasiado fáciles de perder, a pesar de resembrarlas cada 15 días.

Infectividad de Enc<sup>+</sup> y Enc<sup>-</sup> de Azospirillum en raíces de semillas germinadas de trigo.

Cepa	Fenotipo	No. de bacterias adheridas por cm de raíz	No. de pelos radicales por cm de raíz.
<u>A. brasilense</u> Sp7	Enc <sup>+</sup>	9.5x10 <sup>3</sup>	17.9 ± 5.9 (8)*
<u>A. brasilense</u> MX2088	Enc <sup>+</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	13.4 ± 8.4 (6)
<u>A. brasilense</u> Sp245	Enc <sup>+</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>	20.7 ± 5.1 (29)
<u>A. brasilense</u> Sp7W1	Enc <sup>-</sup>	3.0x10 <sup>5</sup>	15.5 ± 1.3 (13)
<u>A. brasilense</u> Sp245W1	Enc <sup>-</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	43.5 ± 18.4 (25)
<u>A. lipoferum</u> Br1702	Enc <sup>+</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	15.0 ± 5.4 (4)
<u>A. lipoferum</u> Br1702W1	Enc <sup>-</sup>	2.0x10 <sup>4</sup>	15.0 ± 2.0 (3)
<u>Escherichia coli</u> AB1157		1.0x10 <sup>3</sup>	2.6 ± 0.9 (5)

\* significa ± desviación estándar. Y el número entre paréntesis indica las raíces individuales que fueron probadas.

El número de deformaciones de pelos radicales fueron significativamente diferentes (por la prueba t Student's, P\_ 0.01) de controles no inoculados en contraste con raíces inoculadas de E. coli AB1157 las cuales no son significantes.

Tabla No. 10

## DISCUSION

La prueba de fluctuación de Luria y Delbruck (1943), fue diseñada para demostrar que en un cultivo de bacterias creciendo exponencialmente, la aparición de mutantes espontáneas ocurre al azar y que la velocidad de aparición de dichas mutaciones pueda ser medida experimentalmente si los experimentos se inician con un inóculo muy pequeño y el número de cultivos que se utilizan es muy grande. Mientras más grande sea el número de cultivos utilizados, más cercana a la real será la velocidad de mutación obtenida.

Sin embargo, esta prueba sólo es accesible para aquellas características en los cuales es posible diseñar medio selectivos para aislar a las mutantes en condiciones en la que la totalidad de las bacterias no mutantes son inhibidas en su crecimiento o son muertas. Por ejemplo resulta sencillo determinar la velocidad de mutación de una bacteria sensible a un antibiótico o un agente quimioterapéutico, por plaquear los cultivos en medios adicionados del antibiótico o el agente en cuestión.

En nuestro caso esto no fue posible ya que no se cuenta con condiciones selectivas que permitieran inhibir el crecimiento de las bacterias silvestres  $Enc^+$  en las condiciones en las que sólo crecieran las  $Enc^-$ .

Sin embargo, el hecho de que las velocidades de mutación resultaran tan elevadas nos permitió determinar la frecuencia utilizando placas incubadas con 100 a 500 veces más inóculo que aquellas utilizadas para la cuenta viable.

Puesto que las bacterias silvestres no pudieron ser eliminadas, se lograron contar las mutantes en las placas con menor dilución en un fondo conteniendo hasta cerca de 3000 colonias totales (mutadas y no mutadas). Esto pudo ser posible, puesto que resultó sencillo distinguir las colonias blancas (menos coloradas) dentro de un fondo con colonias bastante rojas, además el tamaño de las colonias y lo bien delimitadas que se observan a través de un microscopio

estereoscópico. De esta manera se distinguieron las mutantes de las no mutadas partiendo de un número tan elevado de bacterias.

Por un lado, ésto nos permitió determinar la frecuencia para aquellas cepas que tuvieran frecuencias de mutación de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  mucho muy elevadas como A. brasilense MX2088 y Sp245 pero no para aquella que tuviera frecuencia de mutación menores, tal como ocurrió en A. lipoferum Bri702.

Los resultados obtenidos no nos permitieron calcular velocidades de mutación sino únicamente frecuencias, dado que para la solución de las ecuaciones de Luria y Delbruck se requiere el cálculo de curvas teóricas, calculadas con el manejo simultáneo de ambas incógnitas y en la actualidad dichas curvas sólo se han realizado para velocidades de mutación igual o menor a  $10^{-6}$  bacteria -- por generación y para nuestros resultados no existen curvas previamente calculadas que nos permitan efectuar dicho análisis.

Por otra parte, queda claro que las mutaciones parecen afectar uno o más genes plasmídicos ya que las frecuencias obtenidas resultaron indicativas de mutaciones extracromosomales. En plásmidos las frecuencias de rearrreglos, reiteraciones, inversiones, deleciones, etc, se presentan con más frecuencia dado que son unidades genómicas más dinámicas, genéticamente hablando, por la probabilidad que tienen de recombinarse y por el hecho de que la información en ellas codificada es la mayor parte de las veces información no vital para el crecimiento, división y mantenimiento celular.

Además el hecho de que un agente curativo de plásmidos como el SDS aumente considerablemente la frecuencia de mutación parece favorecer esta hipótesis y por lo tanto la información que codifica para la diferenciación morfogenética de vibrio a forma-C está dada por DNA plasmídico (38). Esto resta por ser corroborado por patrones electroforéticos, en un trabajo posterior.

El hecho de que las mutantes  $Enc^-$  hayan resultado tan o más eficientes que

bacterias  $Enc^+$  para infectar las raíces de semillas germinadas de trigo, nos permite descartar al proceso morfogénico como importante para la infectividad de estas bacterias. Sin embargo, queda aún por demostrarse si las mutantes  $Enc^-$  son más susceptibles a medios ambientales poco adecuados nutricionalmente. Es muy probable que como se ha sugerido anteriormente las formas encapsuladas, sean una respuesta de las bacterias silvestres a condiciones desfavorables de nutrientes y humedad, sobre todo en el nicho ecológico natural tal como lo es el suelo. Estos experimentos quedarían por ser demostrados más adelante.

## CONCLUSIONES

Finalmente, llegamos a la conclusión de que las formas-C no intervienen en el proceso de asociación a las raíces de trigo, al menos durante las etapas iniciales de la sociación, muy probablemente la forma-C esté relacionada con la protección a condiciones adversas nutricionales y de humedad. También es importante señalar que el detergente SDS según nuestros resultados, muy probablemente tengan el mismo efecto curativo en Azospirillum que en el trabajo reportado por Sonstein y col 1972, en nuestro caso el plásmido aislado entre otros es probablemente el encargado de la codificación para la morfogénesis, aunque esto último queda por demostrarse.

El Rojocongo no funciona como un agente mutagénico que incremente las frecuencias de mutación del fenotipo  $Enc^+$  al fenotipo  $Enc^-$ .

Las mutaciones de  $Enc^+$  a  $Enc^-$  ocurren de manera espontánea a una frecuencia muy elevada, al menos en A. brasilense MX2088 y Sp245, mientras que A. lipoferum Br1702 presenta una frecuencia mucho menor, por lo cual no pudo ser calculada por el método modificado de Luria y Delbruck. Probablemente las diferencias de mutación entre la cepa A. lipoferum y A. brasilense se deba a diferencias genotípicas que están relacionadas con el medio en el cual se desarrollan.

Las velocidades de mutación tampoco pudieron ser calculadas, debido a las frecuencias de mutación tan elevadas encontradas en Azospirillum.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baldani, V.L.D. y J. Dobereiner. 1980. Host specificity in the infection of cereals with Azospirillum spp. *Soil Biol. Bioch.* 12:434-439.
2. Barak, R., I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982. Aerotactic response of Azospirillum brasilense *J. Bacteriol.* 152:643-649.
3. Barak, R., I. Nur y Y. Okon. 1983. Detection of chemotaxis in Azospirillum brasilense. *U. Appl. Bacteriol.* 53:399-403.
4. Barber, L.D., J.D. Tjepkema, S.A. Russel, H.J. Evans. 1976. Acetylene reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with Spirillum lipoferum. *Appl. Environm. Microbiol.* 32:108-113.
5. Berg, R.H., Vasil: y J.K. Vasil. 1979. The biology of Azospirillum-sugar cane association. II Ultrastructure Protoplasma. 101, 143-163.
6. Berg, R.H., M.E. Tyler, N.J. Novick, V.Vasio, J.K. Vasil. 1980. Biology of Azospirillum-sugar-cane association enhancement of nitrogenase activity. *Appl. Environm. Microbiol.* 39:642-649.
7. Boodey, R.M. y J. Dobereiner. 1982. Association of Azospirillum and other diazotrophs with tropical gramineae. 12th Int. Congr. on Soil Science Symp. papers 8-16 February. FAO Rome 1:28-47.
8. Burris, R.H. 1980. The global nitrogen budget Science or Sceance? Nitrogen fixation: free living systems and chemicals models W.E. Newton and - W.H. Orme-Johnson (eds). University Park Press. Baltimore. p. 7-16.

9. Cáceres, E.A.R. 1982. Improved medium for isolation of Azospirillum spp. - Appl. Environm. Microbiol. 44:990-991.
10. Chan, J.K., L.M. Nelson y R. Knowelws. 1980. Hidrogen metabolism of Azospirillum brasilense in nitrogen-free medium. Can. J. Microbiol 26:1126-1131.
11. Dobereiner, J. y V.L.D. Baldani. 1981b. Prospects for inoculation of grasses with Azospirillum spp. In. Associative N<sub>2</sub> fixation Vol. II Edited by P.B. Vose y A.P. Rusehel. C.R.C. Press, Boca Baton, F.L. pp. 1-9.
12. Das, A., A.K. Mishra. 1983. Utilization of fructose by Azospirillum brasiliense. Can. J. Microbiol. 29:1213-1217.
13. Dobereiner, J. y J.M. Day. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In. Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation, Held in Pullman, WA, 3-7 june 1974. Edited by W.E. Nexton and C.J. Nyman. Washington State University Press, Pullman. pp.518-537.
14. Dobereiner, J. y H. De-Polli. 1980. Diazotropic rhizocoenoses. Ann. Proc. - Phytochem. Soc. Europe 18 (Nitrogen Fixation) pp. 301-333.
15. Franche, C. y C. Elmerich. 1981. Physiological properties and plasmid content of several strains of Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum. Ann. Microbiol. Paris 132:3-18.
15. Goebel, E.M. y N.R. Krieg. 1984. Fructose catabolism in Azospirillum brasiliense.

lense y Azospirillum lipoferum. J. Bacteriol. 159:86-92.

17. Hardy, R.W.S. y U.D. Havelka. 1975. Nitrogen fixation research a key to world food. Science. 188:633-643.
18. Jain, D.K. y D.G. Patriquin. 1984. Root hair deformation bacterial attachment, and plant growth in wheat-Azospirillum associations. Appl. Environm. Microbiol. 48:1208-1213.
19. Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982. The effect of Azospirillum inoculation on growth and yield of corn. Isr. J. Bot. 31:247-255.
20. Lamm, R.B. y C.A. Neyra. 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolates from selected grasses growing in New Jersey and New York. Can. J. Microbiol. 27:1320-1325.
21. Leigh, J.A., E.R. Signer y G.C. Walker. 1985. Exopolisaccharide deficient mutants of Rhizobium melleotii that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6231-6235.
22. Ludden, P.W., Y. Okon y R.H. Burris. 1978. The nitrogenase system of Spirillum lipoferum. Biochem. J. 173:1001-1003.
23. Luria, S.E. y M. Delbruck. 1943. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 28:491-511.

24. Magalhães, F.M., J.I. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall y J. Dobereiner. 1983. A new acid tolerant Azospirillum species. Ann. Acad. Brasil. Cienc. 55: 417-430.
25. Martínez-Drets. 1984. Catabolism of carbohydrates and organic acids and expression of nitrogenase by Azospirillum. J. Bacteriol. 159:80-85.
26. Martínez-Drets, G., E. Fabiano y A. Cardona. 1985. Carbohydrates, catabolism in A. amazonense. Appl. Environm. Microbiol. 50:183-185.
27. Nelson, L.M. y R. Knowles. 1978. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by Azospirillum brasilense grown in continuous culture. Can. J. Microbiol. 24:1295-1254.
28. Nur, I., Y.L. Steinitz, Y. Henis. 1981. Carotenoid composition and function in nitrogen fixing bacteria of the genus Azospirillum. J. Can. Microbiol. 122:27-32.
29. Okon, Y., S.L. Albretch y R. Burris. 1976a. Factors affecting growth and nitrogen fixation of Spirillum lipoferum. J. Bacteriol. 127:1248-1254.
30. Okon, Y., S.L. Albretch y R. Burris. 1976b. Carbon and ammonia metabolism of Spirillum lipoferum. J. Bacteriol. 128:592-597.
31. Okon, Y., S.L. Albretch y R. Burris. 1977a. Methods for growing Spirillum lipoferum and for counting it in pure culture and in association with plants. Appl. Environm. Microbiol. 33:85-88.

32. Okon, Y., J.P. Houchins, S.L. Albretch y R. Burris. 1977b. Growth of Spirillum lipoferum at constant partial pressures of oxigen and the properties of its nitrogenase and cell free extracts. J. Gen. Microbiol. 98:87-93.
33. Okon, Y., L. Cakmakci, I. Nur y I. Chet. 1980. Aerotaxis and chemotaxis of Azospirillum brasilense. a note. Microb. Ecol. 6:277-280.
34. Okon, Y. 1982. Azospirillum: physiological properties, mode of association with roots and its application for the benefit of cereal and forage grass crops. Isr. J. Bot. 31:214-220.
35. Okon, Y. 1984. The physiology of Azospirillum in relation to its utilization as inoculum for promoting growth in plants. p 165-174. In L.W. Luden and J.E. Burris (eds) Proceeding of the Fourteenth Steinboock Symposium at the University of Wisconsin Madison Elsevier Science Publishing Inc ., New York.
36. Okon, Y. 1985. Response of cereal and forage grasses to inoculation with nitrogen fixing bacteria.
37. Patriquin, D.G., J. Dobereiner y D.K. Jain. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can.J. Microbiol. 29:900-916.
38. Plazinski, J., P.J. Dart y B.G. Rolfe. 1983. Plasmid visualization and -nif gene location in nitrogen-fixing Azospirillum strain. J. Bacteriol. 155:1429-1433.

39. Rao, A.V. y Vencateswarlu B. 1982. Associative symbiosis of Azospirillum lipoferum with difotyledonous succulent plants of the Indian desert. Can J. Microbiol. 28:778-782.
  
40. Reinhold, B.T. Hurek y I. Fendrik. 1985. Strain-specific chemotaxis of Azospirillum spp. J. Bacteriol. 162:190-195.
  
41. Sadasivan, L. y C.A. Neyra. 1985. Flocculation in Azospirillum lipoferum y A. brasilense: exopolisacarides and cyst formation. J. Bacteriol. 163: 716-723.
  
42. Shanmugam, K.T. y R.E. Valentine. 1975. Molecular biology of nitrogen fixation. Science. 187:919-924.
  
43. Singh, M. y W. Wenzel. 1982. Detection and characterization of plasmids - in Azospirillum p.44-51 In W. Klingmüller (ed) Azospirillum genetics, - physiology, ecology. Birkhäuser, Basel.
  
44. Smith, R.L., J.H. Bouton, S.C.Schank, R.H. Quesanberry, M.E. Tyler, M.N. Gaskins y R.I. Littel. 1976. Nitrogen fixation in grasses inoculated with Spirillum lipoferum. Science. 193:1003-1005.
  
45. Sonstein, S.A. y J.N. Baldwin. 1972. Loss of penicillinase plasmid after treatment of Staphylococcus aureus with sodium dodecyl sulfate. J. Bacteriol. 109:262-265.
  
46. Tarrand, J.J., N.R. Krieg y J. Dobreiner. 1978. A taxonomic study of Spirillum lipoferum group, with descriptions of the new genus. Azospirillum

- gen. nov. and two species, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and Azospirillum brasilense sp nov. Can. J. Microbiol. 24:967-980.
47. Teather, R.M. y P.J. Wood. 1982. Use of congo red-polisaccharides interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ., Microbiol. 43:777-780.
48. Tien, T.M., M.H. Gaskins y D.H. Hubbel. 1979. Plant growth substances produced by Azospirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet (Penisetum americanum). Appl. Environm. Microbiol. 37:1026-1024.
49. Tien, T.M., H.G. Diem, M.H. Gaskins y D.H. Hubbel. 1981. Polygalacturonic acid transeliminase by Azospirillum species. Can. J. Microbiol. 27:426-431.
50. Tyler, M.E., J.R. Milan, R.S. Smith, S.C. Schank y D.A Zuberer. 1979. isolation of Azospirillum from diverse geographic regions. Can. J. Microbiol. 25:693-697.
51. Umali-García, M.H. Gaskins, D.H. Hubbel. 1978. Process of infection of Panicum maximum by Spirillum lipoferum. Ecol. Bull. (Stockholm) 26:373-379.
52. Umali-García, M., D.H. Hubbel, M.H. Gaskins y F.B. Dazzo. 1980. Association of Azospirillum with grass roots. Appl. Environm. Microbiol. 39:219-226.
53. Wesby, C.A., D.S. Cutshall y G.V. Vigil. 1983. Metabolism of various carbon sources by Azospirillum brasilense. J. Bacteriol. 156:1369-1372.

54. Wood, P.J. 1980. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. Carbohydr. Res. 85:271-287.