



03062  
lej. 12

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**Unidad Académica de los Ciclos  
Profesionales y de Posgrado del  
Colegio de Ciencias y Humanidades**

**"ENSAYO DE INFECTIVIDAD DE Azospirillum brasilense EN  
RAICES DE SEMILLAS RECIENTE GERMINADAS DE TRIGO"**

**T E S I S**

**Que para obtener el Grado de  
Maestría en Investigación Biomédica  
Básica**

**p r e s e n t a**

**Marcela Zamudio Maya**

**México, D, F,**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Sep. 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 está 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.

INDICE.

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	16
DISCUSION	26
BIBLIOGRAFIA	34

## INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento fundamental en la estructura y función de las macromoléculas que constituyen a los seres vivos. Este elemento es abundante en la atmósfera, en el suelo y en el mar, pero no se encuentra siempre en formas asimilables para las plantas y animales.

Los vegetales asimilan compuestos nitrogenados inorgánicos del suelo, los cuales son transformados a formar parte de constituyentes celulares como son, entre otros, las proteínas y los ácidos nucleicos. Las proteínas vegetales son una de las fuentes principales de alimento para los animales. Si las formas nitrogenadas inorgánicas utilizadas por las plantas no son restituidas al suelo, se van perdiendo por procesos como son la desnitrificación, lixiviación y la cosecha de las plantas. Sin embargo, este puede irse restituyendo con la degradación continua de organismos muertos y con la producción de sales de amonio y nitratos por los microorganismos.

En la agricultura la cantidad de nitrógeno que se pierde al cosechar los cultivos es más grande que la que es restituida naturalmente, por lo que se hizo necesaria la introducción de fertilizantes químicos nitrogenados, los cuales han resultado productos que requieren del uso de otras fuentes energéticas muy costosas. De ahí que se hayan buscado formas naturales para restituir el nitrógeno del suelo.

En el suelo existen microorganismos que llevan a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico, la cual consiste en la transformación del  $N_2$  a  $NH_4^+$ , el cuál ya es asimilable por las

plantas.

La transformación de  $N$  a  $NH_2$  es llevada a cabo por la enzima nitrogenasa que se encuentra presente en este tipo de microorganismos fijadores de  $N$ . De los cuales existen algunos como son: *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, que son organismos que fijan nitrógeno en vida libre; y *Rhizobium*, *Anabaena azollae* y algunos actinomicetes que fijan nitrógeno cuando se encuentran en simbiosis con ciertas plantas (9).

La inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico simbióticamente, tales como *Rhizobium* en leguminosas y actinomicetes en árboles, aumenta la producción del cultivo dándole a la planta la mayor parte de sus requerimientos de nitrógeno y por lo tanto reduciendo la necesidad de fertilizantes nitrogenados muy caros. En estos casos, las bacterias infectan y proliferan dentro del tejido de la raíz, evitando así la competencia por nutrientes con otros microorganismos de rrisosfera.

En cualquier medio ambiente planta-suelo existe una población particular de microflora, la cual es seleccionada o enriquecida por los compuestos excretados por las raíces que sirven como fuentes de carbono y energía para los microorganismos. El lugar, densidad y composición de estas poblaciones cambia constantemente dependiendo del estado de desarrollo de la planta, de la profundidad de la raíz, de la humedad del suelo, del flujo diferencial de fotosintatos hacia la raíz durante los periodos de luz y oscuridad, y otros factores (31). Un ejemplo de esto es el caso de las bacterias del genero *Rhizobium* que se encuentran en la

mayoría de los suelos. La cantidad de éstas, así como las especies encontradas, dependen tanto del medio ambiente biótico y abiótico del suelo como de la especie de leguminosa que se desarrolla en estos suelos y de si es cultivada o silvestre (2).

En la rizosfera de raíces de pastos forrajeros y cereales se encuentran bacterias diazotróficas o fijadoras de nitrógeno como Azotobacter paspali, Campylobacter sp., Beijerinckia y microaerofílicos del tipo de pseudomonas.

Beijerinckia se encuentra enriquecida en la rizosfera de caña de azúcar en comparación con otros microorganismos y en comparación con otros pastos (34).

Paspalum notatum y Eragrostis ferruginea son pastos para los cuales existe evidencia, aparte del enriquecimiento de ciertos microorganismos, de fijación de nitrógeno asociada con Azotobacter (34).

Pero aparte de estas asociaciones, no existe ningún reporte sobre un alto grado de especificidad en asociaciones de pastos forrajeros o cereales con bacterias diazotróficas.

Experimentos de campo que se han llevado a cabo en Israel (30, 32, 37) han demostrado que la inoculación con Azospirillum resulta en un aumento en el rendimiento de la cosecha de trigo; sin embargo, en lugares como Florida y Wisconsin en Estados Unidos (9, 40) no se observó ningún beneficio con la inoculación, debido probablemente a la diferencia en las condiciones ambientales del suelo.

Los cereales y pastos forrajeros son plantas muy importantes para el hombre, tanto para su propio consumo como

para alimento de los animales que consume.

Se ha postulado que la fijación biológica de nitrógeno por Azospirillum en asociación con las raíces puede contribuir en cantidades significativas de nitrógeno a la planta. Y, desde luego, se ha detectado mayor actividad de fijación de nitrógeno (30, 37), medida por el ensayo de reducción de acetileno, en plantas inoculadas que en controles no-inoculados.

Se ha podido observar que esa actividad de fijación de nitrógeno es mayor durante la etapa de floración de la planta y bajo condiciones de temperaturas altas y humedad adecuada del suelo (18, 19, 32). Sin embargo, la incubación de plantas en una atmósfera de  $N^{15}$  (un isótopo estable) midiéndose por la incorporación técnica de dilución del isótopo  $N^{15}$  demostró que solamente una pequeña proporción del nitrógeno aparentemente fijado fue incorporado a la planta (31).

Las mediciones antes mencionadas han demostrado que la fijación biológica del nitrógeno por las asociaciones Azospirillum-raíz en el campo contribuyen con algo de nitrógeno a los pastos forrajeros y cereales de verano y al suelo que en sí ya es un fenómeno positivo. Sin embargo, la veracidad de las mediciones permanece en controversia.

La inoculación de raíces de maíz, trigo, sorgo y otros pastos con Azospirillum muestra un efecto muy marcado en la longitud y en el área de superficie de la raíz. Los efectos varían con las concentraciones del inóculo y condiciones ambientales (19, 32).

Se ha demostrado que las plantas inoculadas con Azospirillum toman minerales como N, P, y K de una solución a una

velocidad mayor que los controles y consecuentemente, plantas inoculadas en el campo acumulan peso seco, N, P y K en sus tallos y hojas a una velocidad también más alta (23, 32, 34).

La inoculación con Azospirillum beneficia el crecimiento de la planta y aumenta la producción de pastos forrajeros y granos mejorando principalmente el desarrollo de la raíz y la toma de nutrientes del suelo, ya que la contribución potencial de la fijación biológica de nitrógeno para mejorar el rendimiento es más pequeña que la esperada (31).

Se estima que solamente el 50% del fertilizante nitrogenado aplicado es utilizado por las plantas (32), la mayor parte de lo que queda se pierde por desnitrificación o se lava con las lluvias o el riego; de ahí la importancia de Azospirillum para promover el uso más eficiente del fertilizante aplicado y enriquecer el suelo con nitrógeno fijado en su asociación con la raíz.

#### Fisiología de Azospirillum.

Azospirillum es una bacteria que fija nitrógeno en vida libre y fue originalmente aislada de la rizosfera de un pasto tropical Digitaria decumbens (42). Posteriormente, se le ha encontrado en la rizosfera de otras gramíneas como son los pastos forrajeros, maíz, trigo, caña de azúcar y sorgo.

Existen tres especies de Azospirillum descritas hasta el momento, las cuales son: A. brasilense, A. lipoferum y A. amazonense (24, 32, 42). Las tres difieren fisiológicamente y entre las diferencias más predominantes nos encontramos con que A. brasilense es una bacteria protótrofa y no utiliza glucosa como



fuelle de carbono, mientras que *A. linaferum* es auxótrofa de biotina y si utiliza glucosa como fuente de carbono y *A. amazonense* es también auxótrofa de biotina y, a diferencia de las otras dos, utiliza además sacarosa como fuente de carbono.

En nuestro caso en particular, lo que más nos ha interesado es *A. brasilense*, la cual es una bacteria gram negativa en forma vibroide con un flagelo polar cuando se cultiva en un medio líquido. Utiliza como fuente de carbono ácidos orgánicos como son los ácidos láctico, pirúvico, málico y succínico, y azúcares como son: galactosa, arabinosa, fructosa y gluconato. Es una bacteria que presenta quimiotaxis hacia ácidos orgánicos, aminoácidos y algunos azúcares (6). También presenta aerotaxis (5), es preferencialmente microaerófila, busca activamente condiciones microaeróbicas y desarrolla una película de crecimiento por debajo de la superficie de un medio semisólido cuando se cultiva bajo condiciones de fijación de nitrógeno. Cuando se cultivan en cajas petri en medio rico sólido se desarrollan colonias de color rosa y con una superficie dura y seca después de varios días de incubación. En cultivos líquidos con medio mínimo, principalmente utilizando fructosa como fuente de carbono y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como fuente de nitrógeno a cierta densidad óptica de crecimiento, se empiezan a formar agregados celulares conocidos como "flocs" o formas "C" (38). Observados al microscopio óptico de contraste de fases se ven como agregados de células refringentes embebidas en una matriz extracelular.

Su crecimiento óptimo se encuentra en un rango de temperaturas de 30 a 37 °C y de pH de 6.8 a 7.2 (28, 30).

Como muchos otros microorganismos que se asocian a plantas

produce hormonas vegetales como son: las giberelinas, citoquininas y auxinas (43).

La fijación de nitrógeno se lleva a cabo bajo condiciones de presiones parciales bajas de oxígeno (0.005-0.007 atm.). Su nitrogenasa se encuentra muy poco protegida al daño con oxígeno. Cuando se cultiva con fuentes de nitrógeno como  $\text{NH}_4^+$  son típicamente aeróbicos. Bajo condiciones anaeróbicas utilizan nitrato como el aceptor final de electrones (9, 28, 30).

Pueden llevar a cabo la mayoría de las reacciones transformadoras de nitrógeno que ocurren en el suelo, como son: fijación de  $\text{N}_2$ , asimilación de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , mineralización de nitrógeno orgánico y desnitrificación (9, 11, 30).

La presencia de  $\text{NH}_4^+$  reprime completamente la fijación de  $\text{N}_2$  o la actividad de la enzima nitrogenasa. La adición de metionina sulfoximina (MS) a cultivos que crecen en presencia de  $\text{NH}_4^+$  desreprime la síntesis de la nitrogenasa (28).

En condiciones limitantes de nitrógeno, el  $\text{NH}_4^+$  se incorpora a moléculas orgánicas a través de la vía GS-GOGAT (Glutamino Sintetasa - Glutamato Sintasa), mientras que en altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  la GDN (Glutamato Deshidrogenasa) es más activa (28).

#### Asociación de *Anaspirillum* a raíces de gramíneas.-

Se han aislado bacterias de raíces de pastos (esterilizadas superficialmente), y las más comúnmente aisladas de partes C-4 como maíz y sorgo pertenecen a la especie *A. limofarum*, mientras que las aisladas de pastos C-3 como trigo pertenecen a la especie de *A. brasilense* (34). Y en ambos tipos

de plantas predominan las cepas resistentes a estreptomycin (Sm<sup>r</sup>) y las nir<sup>-</sup> (que no producen nitrato reductasa, es decir que no reducen el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub>) (3). Estas diferencias de cepas encontradas dependiendo de si el pasto es C-3 o C-4 ocurrieron aún donde había otras especies más comunes en el suelo. de ahí que se ha sugerido que el fenómeno podría ser una forma de selección para la asociación planta-bacteria. Además estas preferencias se observaron en regiones tropicales y subtropicales y no en regiones templadas.

Recientemente se ha definido al reconocimiento celular como un paso inicial en la comunicación célula-célula resultando de ésta una respuesta bioquímica, fisiológica o morfológica.

Un ejemplo de esto es la especificidad mostrada en la asociación leguminosa-Rhizobium implica una asociación física entre el microsimbiente y la superficie de la raíz del hospedero. Un alto grado de especificidad en el reconocimiento debe existir con el fin de que resulte en un proceso infectivo y consecuentemente en el desarrollo del nódulo.

La bacteria se une a la planta por un polo, es decir, con el eje mayor de la bacteria perpendicular al rizoplaneo (1). La adsorción ocurre en pelos radiculares y en células epidérmicas, así como, en ciertas otras superficies. Este tipo de adsorción polar ha sido reportada para diferentes especies de Rhizobium con su planta huésped como son: R. japonicum, R. leguminosarum, R. meliloti, R. trifolii, y Rhizobium spp..

Se han encontrado que a estos polos se le unen anticuerpos fluorescentes y lectinas, por lo que se le ha atribuido la unión de Rhizobium a la superficie de la raíz a las lectinas presentes

específicas producidas por la planta (8). Desde entonces han aparecido una gran cantidad de datos de la correlación entre infectividad y la unión lectina-Rhizobium así como, otros reportan unión no-específica. Hasta el momento no ha sido reportado que existan interacciones superficiales de los tipos involucrados en Rhizobium en el reconocimiento de diferentes especies y cepas de Asospirillum.

Se ha observado que las células de Asospirillum se adhieren a un material granular de los pelos radiculares y a uno fibrilar en la superficie de las células epidérmicas (44); mientras que muy pocas bacterias se adhieren a superficies de células no-diferenciadas o en raíces laterales emergentes. También se ha observado que se adhieren muy pocas bacterias a los pelos radiculares cuando las raíces fueron crecidas en una solución hidropónica (Fahreaus) suplementada con  $KNO_3$  5mM (44), lo mismo que se observó en la adherencia de R. trifolii a raíces de trébol. Parece ser que el  $KNO_3$  inhibe la aparición de ese material granular en los pelos radiculares. La adherencia a los pelos radiculares de "pearl millet" (pasto forrajero), pero no a las células epidérmicas, fue promovida al preincubar las células de A. brasilense con el exudado de raíz de este pasto.

En los ensayos anteriores se sugirió la presencia de lectinas que promueven la adherencia ya que los autores encontraron una sustancia en el exudado de raíz que se une a Asospirillum y promueve la adherencia selectiva a pelos radiculares, que es sensible a proteasas y no dializable.

Con ayuda del microscopio óptico de contraste de fases se

encontrarán las células de Azoospirillum adheridas a los pelos radiculares de trigo y se observarán diferencias fundamentales en la adherencia de las cepas Sp7 (aislada de la rizosfera de Digitaria decumbens) y Sp245 (aislada del interior de raíces de trigo) de A. brasilans a las raíces de trigo (15). Las células de la cepa heteróloga Sp7 se adherirón en mayor número que las de la cepa homóloga Sp245 a los pelos radiculares y las células epidérmicas de las raíces de trigo. La adherencia más alta de la cepa heteróloga Sp7 y la adherencia más baja de la cepa homóloga Sp245 recuerdan el comportamiento de la interacción patógeno-planta con cepas no-virulentas y virulentas. En donde el no-virulento es reconocido e inmobilizado en la superficie de la raíz, mientras que el patógeno virulento evade el reconocimiento y adherencia dejándolo libre para la infección.

La inoculación de plantas de trébol crecidas axénicamente con fluidos de cultivos libres de células de cepas homólogas de R. trifolii o de suspensiones de células de cultivo en slant provocó la deformación de los pelos radiculares y estas deformaciones han sido descritas como dobladas, bifurcadas, moderadamente enrolladas, helicoidales, bulbosas y espatuladas (10).

La inoculación de raíces de trigo con Azoospirillum brasilans también induce la deformación de los pelos radiculares, solamente que son principalmente del tipo de bifurcación y se ha podido observar que las cepas homólogas de Sp245 y Sp107 producen mayor número de bifurcaciones en comparación con las no-homólogas Sp7 y Sp242 (15).

Las cepas que causaron mayor número de bifurcaciones en

experimentos llevados a cabo en el laboratorio también provocaron un aumento mayor en el contenido de nitrógeno en un experimento de campo llevado a cabo por separado.

La interacción Azospirillum-pastos no produce estructuras visibles en las raíces, como en el caso del nódulo en la asociación Rhizobium-leguminosa.

La inoculación de Zea mays (maíz) con A. brasilense cepas heterólogas Cd o Sp7 promovió el aumento de absorción de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (30-50% sobre los controles) dentro de los segmentos de raíz después de 2, 3 y 4 semanas de inoculadas. Cortes transversales de estas raíces revelarán cambios en el arreglo celular en las 4-5 capas de células de la corteza, probablemente aumentando la superficie activamente involucrada en la absorción de iones (23,32).

Se sabe que Azospirillum produce poligalacturonasas y pectinasas, las cuales se cree participan suavizando la lámina media de las células del tejido epidérmico facilitando así la absorción de minerales, además de que quizás le permitan penetrar a los espacios intercelulares de los tejidos de la corteza de la raíz. Ya que por medio de microscopía óptica, de inmunofluorescencia y electrónica se han podido observar células de Azospirillum en estos espacios intercelulares, en la lámina media, en xilema y stele (?).

A. brasilense produce hormonas vegetales como son: gibberelinas, citoquininas y auxinas (43). Estas sustancias que las plantas producen normalmente ayudan a su desarrollo y crecimiento. Como habíamos dicho anteriormente, Azospirillum

promueve el crecimiento de la raíz, aumento en el número de raíces laterales y pelos radiculares; y como plantas de "pearl millet" inoculadas con estas hormonas resultaron con el mismo efecto. parece probable que estas hormonas vegetales producidas por Agrospirillum y las gramíneas, y que en ocasiones parece haber una especificidad de asociación entre éstas; sin embargo, aún no se sabe qué tan específica es la asociación, o si solamente se debe a que por las condiciones bióticas y abióticas del lugar en el momento en que se hicieron los experimentos favorecieron la asociación de Agrospirillum sobre los otros microorganismos del suelo con las gramíneas y que quizás si las condiciones fueran otras, otro microorganismo hubiera sido el favorecido. De ahí que nosotros decidiéramos estudiar la asociación entre Agrospirillum y gramíneas al nivel de la interacción bacteria-planta para saber que está sucediendo y qué condiciones son las necesarias para que esta asociación sea efectiva.

Como habíamos mencionado anteriormente para que exista una asociación específica, es de esperarse que exista una comunicación entre el huésped y el hospedero, y que como paso inicial exista un reconocimiento celular; el cual se ha observado que en bacterias como Agrobacterium y Rhizobium se encuentra representado por la adherencia de sus células a las células de los tejidos vegetales que infectan. Es por esto, que decidimos comenzar estudiando la adherencia de Agrospirillum brasiliense a las raíces de trigo, las condiciones en las que se lleva a cabo y por medio de competencias con otros microorganismos, determinar si ésta es específica y se encuentra relacionada con el proceso de infección.

## MATERIAL Y METODOS.

### Cepas bacterianas. -

Las cepas de Ascopirillum fuerón obtenidas de: Sp7 de American Type Culture Collection (ATCC29145). Sp245 fué donada por el Dr. David Patriquin. Las cepas Sp7w1 y Sp245w fuerón aisladas como mutantes espontáneas que producen colonias blancas en un medio con rojo congo y carecen de la capacidad de producir formas "C" (Enc). Ascopirillum linofarum Br1702 y la cepa Cd6117 A. brasiliense fuerón donadas por el Dr. Krieg.

Las cepas de R. malloti TAL380 y R. leguminosarum TAL638 fuerón donadas por Jake Malliday, y las cepas de R. japonicum 143, R. phaseoli RCR3644 y R. trifolii 2063 por Harold N. Keyser.

Las semillas de trigo cultivar Zacatecas VT-74 fuerón obtenidas de Pronase.

### Medios de cultivo. -

Medio Rico. - Medio LC: 10g. de bactotripton, 5 g. de extracto de levadura, 5g. de NaCl por litro.

Medio Rojo Congo (RC). - 0.5g. de  $K_2HPO_4$ , 0.2g. de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1g. de NaCl, 0.5g. de extracto de levadura, 0.015g. de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 5g. de ácido DL málico, 4.8g. de KOM, 15ml. de solución de rojo congo 1:400 por litro.

Solución Fahreus (12). - 0.1g. de  $CaCl_2 \cdot H_2O$ , 0.12g. de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1g. de  $KH_2PO_4$ , 0.15g. de  $Na_2HPO_4$ , 0.005g. de Citrato Férrico por litro de  $H_2O$ .

Medio PY. - 5g. de peptona de caseína, 3g. de extracto de levadura por litro y  $CaCl_2$  7mM.

PNF. - 5g. de fructosa, 6g. de  $K_2HPO_4$ , 4g. de  $KH_2PO_4$ , 2



ml. de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  al 10%, 1 ml. de NaCl al 10%, 2ml. de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  al 1%, 2 ml. de solución de micronutrientes, 2 ml. de azul de bromotimol al 0.5% en KOH 0.2N, 0.0005g. de  $FeSO_4$ , 4.5g. de KOH, 1 ml. de solución de vitaminas.

Solución de micronutrientes.- 0.2g. de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.235g. de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.28g. de  $H_3BO_3$ , 0.008g. de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.024g. de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  en 200 ml. de  $H_2O$ .

Solución de vitaminas.- 10mg de biotina, 20mg. de piridoxal.HCl en 100 ml. de  $H_2O$ .

#### Esterilización y germinación de las semillas de trigo.-

Las semillas de trigo se lavarón una vez durante un minuto en alcohol etílico al 70% y 3 veces con agua destilada estéril y se dejarón durante 20 min. en una solución de blanqueador comercial (Cloralex) al 10%, se lavarón 4 veces con agua y en la última lavada se dejarón 2 hrs. en agua, después se pasarón a cajas de petri con agar al 1% y se incubaron a 30 C en oscuridad.

#### Ensayo de la cuantificación de la adherencia.-

Las bacterias se cultivaron en medio rico (Azoospirillum en medio LC y Rhizobium en PY) hasta 45 unidades Klett ( $2 \times 10^8$  bacterias/ml.), se centrifugarón y lavarón 2 veces con solución Fahreaus. Se tomarón semillas germinadas durante 48 hrs. con raíces de aproximadamente 2 cm. de largo, se colocaron en matraces con 25 ml. de solución Fahreaus y se inocularón con 0.1ml. de la suspensión de bacterias. Se incubaron en agitación

lenta (60 r.p.m.) a 30 ° C durante 2 hrs.; se lavarón con la misma solución Fahreaus 4 veces, incubando durante 15 min. en agitación rápida (300 r.p.m.) en cada lavada. Partiendo de la base de la raíz, se cortarón fragmentos de 1 cm. y se homogenizarón en tubos de Potter-Elvehjen. Se hicieron diluciones y se plaquearón en cajas de medio rico y rojo congo. Se incubarón a 30 ° C durante 48 hrs. y se determinó el número de cuentas viables que corresponde al número de bacterias que permanecieron adheridas después de las lavadas en agitación rápida.

**Ensayo de cuantificación del número de deformaciones de los pelos radiculares.-**

Se tomarón semillas con 24hrs. en germinación, se colocaron en cajas de solución Fahreaus con agar al 0.35%, se inocularón con  $2.0 \times 10^7$  bacterias en fase exponencial de crecimiento previamente lavadas en solución Fahreaus. Se incubarón a 30 ° C durante 24 hrs.. Se cortarón fragmentos de 1 cm. de raíz en la zona de elongación de los pelos radiculares, se observarón al microscopio y se cuantificarón los pelos radiculares bifurcados en ambos lados de la raíz en un solo plano.

**Obtención de Formas "C".-**

Sobre cajas de FNF se colocó papel celofán previamente tratado con acetona, lavado con agua bidestilada y esterilizado, se inocularón con 0.1 ml. de una suspensión de bacterias en fase estacionaria de crecimiento, se extendieron sobre el papel celofán y se incubarón a 30 ° C. Después de 72 hrs. se tomó el

papel celofán y se colocó en solución Fahreus para resuspender los agregados de las formas encapsuladas de Azospirillum brasilense.

Cuantificación de la actividad de reducción de acetileno.-

Para la medición de ARA de las formas vibroides de Azospirillum se cultivarán cepas en tubos de vidrio de 13X100 mm. con 8 ml. de medio semisólido (agar 0.25%) FNF o NFB a 30 ° C durante 48 hrs.. Las formas "C" se obtuvieron como se mencionó anteriormente, y el papel celofán se enrolló y se pasó a los tubos de vidrio de 13X100 mm. con tapón de hule. A los tubos se les inyectó 10X de acetileno (1116 micromolas), se incubarán a 30 ° C durante 1 hr., y se cuantificó la reducción de acetileno a etileno en un cromatógrafo de gases.

Cuantificación de proteínas.-

Se siguió el método modificado de Lowry (14).

Mutagénesis de Azospirillum con Tn5.-

Para la obtención de mutantes resistentes a kanamicina (Kmr) utilizamos un bacteriófago de E. coli P Cm<sup>r</sup>Kmr<sup>r</sup> construido en el laboratorio y que funciona como un vehículo suicida en Azospirillum brasilense y las mutantes se obtienen por transposición del Tn5.

Las bacterias de Azospirillum se cultivarán en medio Luria hasta 40 unidades Klett, se centrifugarán y resuspendieron en 1 ml. de Luria, se agregó 1 ml. de la solución de calcio y magnesio

(MgSO<sub>4</sub> 0.03M y CaCl<sub>2</sub> 0.015M) y 1 ml. de Luria + fago a una multiplicidad de 1:1. Esta mezcla se incubó a 30 °C sin agitación durante 90 min.. Se centrifugó y resuspendió diluyendo 1:10 en Luria. Después de 12 hrs. de dejarse expresando se le agregó kanamicina (30 microgramos/ml.), se dejó crecer hasta exponencial, se lavaron las células 2 veces y se resuspendieron en medio mínimo (FNF) con NH<sub>4</sub>Cl (48mM) y kanamicina (30 microgramos/ml.). Se incubaron en agitación a 30 °C y una vez que alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, se hicieron diluciones y se plaquearon sobre cajas de FNF + NH<sub>4</sub>Cl + Km para obtener colonias aisladas. A las mutantes se les hizo la prueba del color de la colonia sobre medio RC y la formación de la película en condiciones de fijación de nitrógeno en medio semisólido para checar que no fueran contaminantes.

## RESULTADOS.

Ensayo cuantitativo de la adherencia de Agrospirillum brasiliense a las raíces de trigo.-

Un paso importante para poder estudiar la infectividad de A. brasiliense en las raíces de trigo es establecer un ensayo que nos permita cuantificar los parámetros de las variables que pudieran estar rigiendo dicha infectividad.

Si suponemos que la adherencia de Agrospirillum a la raíz es un parámetro importante para la infectividad, entonces resulta necesaria la cuantificación de ésta, así como, estudiar las variables que rigen la adherencia.

Para estudiar la adsorción o adherencia de Acrobacterium tumefaciens a tejidos de papa (20) y de Ehischium y Acetobacter a raíces de cereales (39) se ha utilizado un ensayo que consiste en poner en contacto las bacterias con el tejido al cual se quiere estudiar la adsorción y después de cierto tiempo lavar vigorosamente para eliminar las bacterias que no permanecieron adheridas al tejido y cuantificar las bacterias adheridas, ya sea por un método directo con ayuda del microscopio óptico o uno indirecto cuantificando células viables o utilizando células marcadas radioactivamente.

Para la cuantificación de las bacterias adheridas a la raíz nosotros utilizamos un método indirecto (descrito en Material y Métodos) que consiste en la homogenización de 1 cm. de raíz de trigo, hacer diluciones y plaquear en medios complejos y selectivos para determinar el número de células bacterianas por cm. de raíz.

Utilizando dicha metodología procedimos a estudiar los efectos de distintas variables sobre la adherencia de A. brasilense a la raíz de trigo.

#### Cinética de Adherencia.-

Se utilizaron distintos tiempos de incubación de las bacterias (10<sup>6</sup> bacterias/ml.) con la raíz (10, 30, 60, 90, 120 y 240 min.) y se puede observar en la figura 1 que a partir de los 60 min. se alcanzó un nivel de saturación de 10<sup>4</sup> bacterias/cm. de raíz. Lo que indica que a los 60 min. podemos observar un máximo de células adheridas a la raíz para el número de células inoculadas de 10<sup>6</sup> bacterias/ml. y que este número no aumentó con el tiempo, cuando menos hasta las 4 hrs. que duró el ensayo.

#### Efecto del pH.-

Para poder observar si existía algún efecto del pH sobre la adherencia, utilizamos la misma solución Fahreus a distintos pHs, utilizando los buffers adecuados para cada pH (Tabla 1), para evitar la variación de pH durante el ensayo.

Como podemos observar en la figura 2, existe un punto máximo de adherencia, el cual se encuentra en el rango de pH6 a pH7. A pH ácido menor que 6 o alcalino mayor que 7, el número de bacterias que se adhieren a la raíz disminuye significativamente, lo que sugiere la existencia de un pH óptimo para la adherencia.

#### Efecto de cationes divalentes sobre la adherencia.-

La adherencia de algunas bacterias como R. trifolii a raíces de trébol y P. fluorescens a raíces de rábano se promueve por la presencia de cationes divalentes como son el Ca<sup>++</sup> y el Mg<sup>++</sup> (16).

Por analogía con estos sistemas, quisimos probar si la .FA

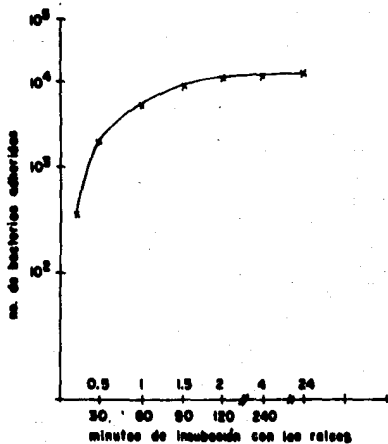


FIG. 1.- Clases de adherencia de *A. brasiliense* a raíces de trigo.

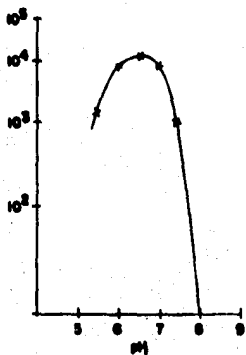


FIG. 2.- Efecto del pH sobre la adherencia de *A. brasiliense* Sp 245 a raíces de trigo.

Tabla 1.- Efecto del pH sobre la adherencia de A.brasiliensis Sp245 a raices de trigo.

Buffer utilizado (0.01M)	pH del medio para adherencia.	# de bacterias adheridas/cm. de raíz. <sup>a</sup>	% de Adherencia
Citrato	5.5	1.20X10 <sup>3</sup>	0.012
Citrato	6.0	1.32X10 <sup>4</sup>	0.132
M.E.S.	6.5	1.20X10 <sup>4</sup>	0.120
Fosfatos	7.0	1.10X10 <sup>4</sup>	0.110
M.E.P.E.S.	7.5	1.20X10 <sup>3</sup>	0.012
Tris	8.0	0.0	0.00

\* Los datos son el resultado del promedio de 3 experimentos por separado.

\*\* % de Adherencia =  $\frac{\# \text{ de bacterias adheridas/cm. de raíz} \times 100}{\# \text{ de bacterias inoculadas}}$   
 $\# \text{ de bacterias inoculadas} = 1.0 \times 10^7$

Tabla 2.- Efecto de algunas sales sobre la adherencia de A.brasiliensis Sp245 a raices de trigo.

	# de bacterias adheridas/cm. de raíz. <sup>a</sup>	% de Adherencia
solución Fahreaus	3.0X10 <sup>4</sup>	0.150
- CaCl <sub>2</sub>	1.3X10 <sup>4</sup>	0.100
- MgCl <sub>2</sub>	2.5X10 <sup>4</sup>	0.120
- Citrato férrico	2.0X10 <sup>4</sup>	0.100
+ 1mM EDTA	4.0X10 <sup>2</sup>	0.002
+ 1mM EGTA	6.0X10 <sup>1</sup>	0.001

# de bacterias inoculadas = 1.0X10<sup>7</sup>

\* Promedio del resultado obtenido en 3 raices.

\*\* % de Adherencia =  $\frac{\# \text{ de bacterias adheridas} \times 100}{\# \text{ de bacterias inoculadas}}$



adherencia de *A. brasilense* es dependiente de cationes divalentes para lo cual utilizamos la misma solución Fahreaus para cuantificar la adherencia, solamente que ahora con la ausencia de iones  $\text{Ca}^{++}$  o de iones  $\text{Mg}^{++}$ . Aunque el número de bacterias adheridas disminuye en la ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  (Tabla 2) esta disminución no parece ser significativa, por lo que decidimos usar agentes quelantes como son el EDTA y el EGTA en caso de que hubiera cationes divalentes asociados a la raíz que fueran solubilizados en el medio de incubación (Tabla 2). El número de bacterias adheridas disminuyó significativamente al agregar los agentes quelantes, lo que sugiere un papel importante de los cationes en la adherencia.

Tamaño del inóculo.-

A concentraciones de  $10^0$  a  $10^5$  células/ml. (fig. 3) el número de bacterias adheridas a la raíz de trigo depende de la concentración inoculada de bacterias, sin embargo, a concentraciones mayores se observa una saturación de adherencia, donde por más que se aumente la concentración de células suspendidas en el medio el número de bacterias adheridas o adsorbidas no aumenta, lo que sugiere la existencia de un número específico de sitios de unión.

Cuando la suspensión de bacterias en equilibrio con la raíz de trigo fuerón diluidas de  $10^7$  a  $10^6$ , de  $10^6$  a  $10^5$  o de  $10^5$  a  $10^4$  células/ml. (Tabla 3), hubo una reducción coincidente con el número de bacterias adheridas a la raíz. Estos datos sugieren que la adherencia de las bacterias a la raíz es reversible y dependiente de la concentración de éstas en la suspensión cuando

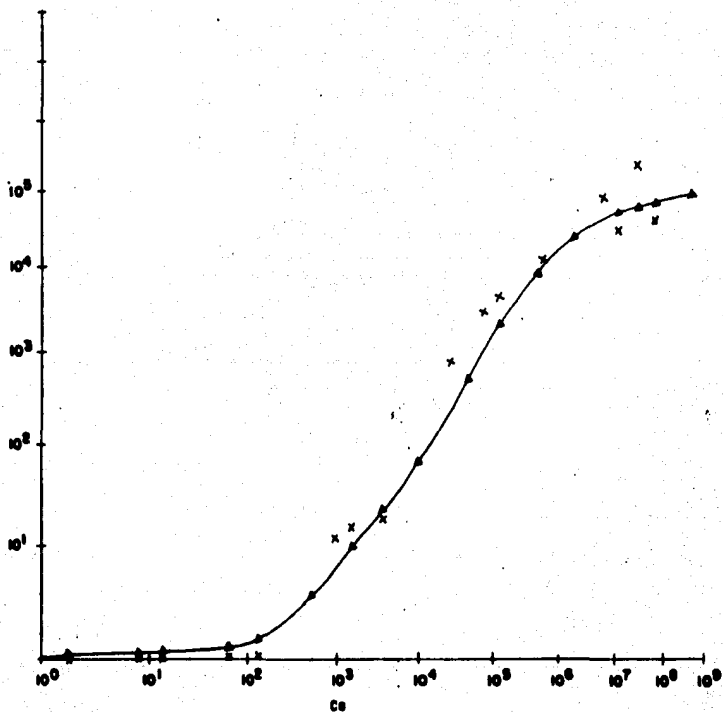


FIG. 3 EFECTO DEL TAMAÑO INOCULO SOBRE LA -  
 ADHERENCIA DE A. BRASILENSE Sp 245 A -  
 RAICES DE TRIGO.

Tabla 3.- Reversibilidad de la adherencia de *A. brasiliana* Sp245 a las raíces de trigo.

# inicial de bacterias Inóculo (cel./ml.)	# inicial de bacterias adheridas/cm. de raíz.	# final de bacterias Inóculo (cel./ml.)	# final de bacterias adheridas/cm. de raíz.
7.4X10 <sup>7</sup>	4	6	4
7.4X10 <sup>6</sup>	2.4X10 <sup>4</sup>	7.4X10 <sup>5</sup>	5.8X10 <sup>4</sup>
7.4X10 <sup>6</sup>	4	7.4X10 <sup>5</sup>	4
7.4X10 <sup>5</sup>	5.8X10 <sup>4</sup>	7.4X10 <sup>4</sup>	2.6X10 <sup>3</sup>
7.4X10 <sup>5</sup>	4	7.4X10 <sup>4</sup>	4
7.4X10 <sup>4</sup>	1.5X10 <sup>3</sup>	7.4X10 <sup>3</sup>	2.7X10 <sup>3</sup>
7.4X10 <sup>4</sup>	3	7.4X10 <sup>3</sup>	3
7.4X10 <sup>4</sup>	2.5X10 <sup>3</sup>	7.4X10 <sup>3</sup>	3.2X10 <sup>3</sup>
2.0X10 <sup>7</sup>	5	6	4
2.0X10 <sup>6</sup>	1.3X10 <sup>4</sup>	2.0X10 <sup>5</sup>	6.1X10 <sup>4</sup>
2.0X10 <sup>6</sup>	4	2.0X10 <sup>5</sup>	4
2.0X10 <sup>5</sup>	6.1X10 <sup>4</sup>	2.0X10 <sup>4</sup>	1.0X10 <sup>3</sup>
2.0X10 <sup>5</sup>	4	2.0X10 <sup>4</sup>	4
2.0X10 <sup>4</sup>	4.0X10 <sup>3</sup>	2.0X10 <sup>3</sup>	8.2X10 <sup>3</sup>
2.0X10 <sup>4</sup>	3	2.0X10 <sup>3</sup>	3
2.0X10 <sup>4</sup>	8.2X10 <sup>3</sup>	2.0X10 <sup>3</sup>	4.3X10 <sup>3</sup>

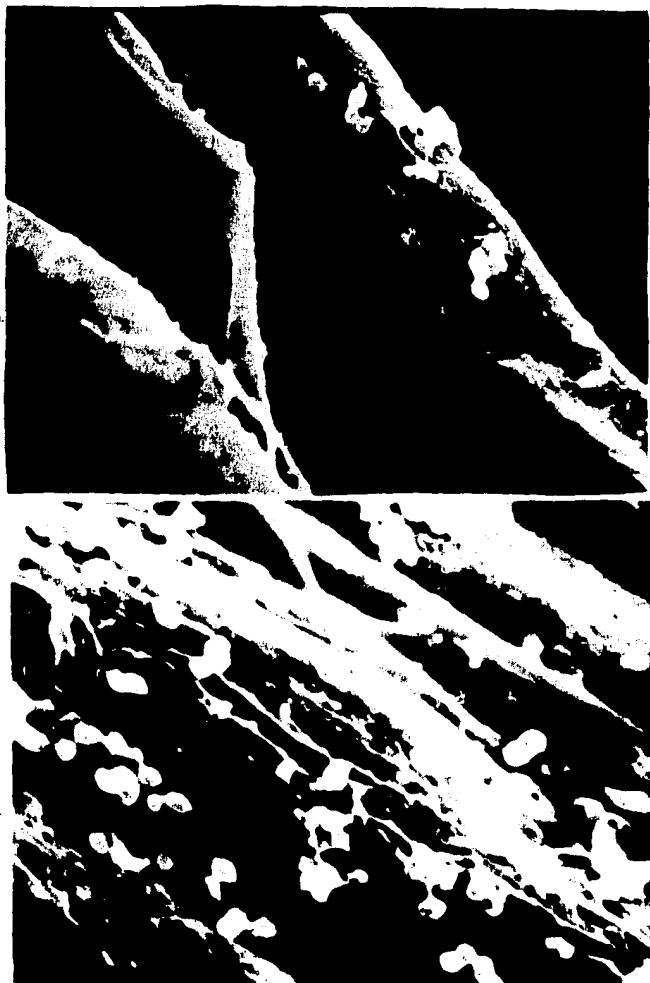
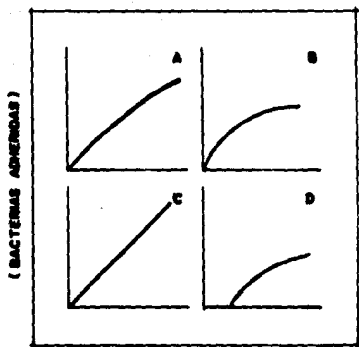


FIG. 4.- Micrografía electrónica de barrido de *A. brasiliense* Sp 245 adherida a los pelos radiculares (a) y las células epidérmicas (b) de la raíz de trigo ( $\times 7500$ ).



( BACTERIAS LIBRES EN SUSPENSION )

FIG. 5.- Gráficas de cuatro isoterms de adsorción A. Freundlich, B. Langmuir, - C. Ley de Henry D. Temkin

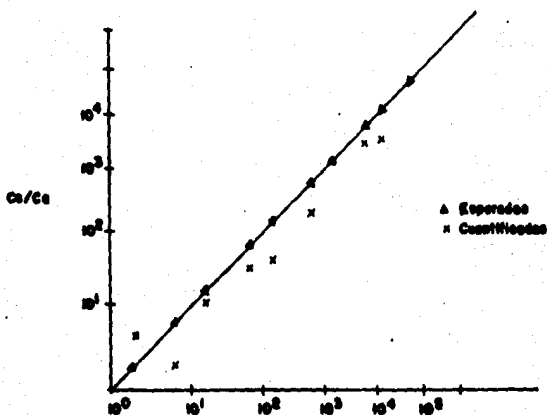


FIG. 6.- Criterio que establece la validez de la isoterma de Langmuir  $C_a/C_e$  vs  $C_e$ .

menos para el rango de  $10^4$  a  $10^7$  células/ml. y con 90 min. de incubación.

Si observamos la figura 4 podemos ver que las células bacterianas de Azospirillum brasilense se adhieren a las células epidérmicas de las raíces de trigo en monocapa y que la adherencia es preferencialmente en estas células y no en los pelos radiculares de éstas.

La adsorción o adherencia de A. brasilense (Sp245) a las raíces de trigo en un medio hidropónico puede ser analizada en términos de un modelo de equilibrio dinámico como son las isotermas de adsorción de gases. Las gráficas de las cuales se encuentran representadas en la fig. 5. Si comparamos la figura 3 con las gráficas de la figura 5, podemos observar que la curva de la figura 3 se asemeja mucho a la curva de la isoterma de Langmuir (fig. 5B). Por lo que decidimos hacer el análisis matemático para comprobar si es válida nuestra suposición de que la adherencia de A. brasilense a las raíces de trigo sigue un comportamiento parecido al descrito por la isoterma de Langmuir para la adsorción de gases.

Si suponemos que existe un número fijo de sitios idénticos y equivalentes de unión a la bacteria por unidad de área, que las bacterias se adhieren en monocapa (fig. 4), y que las bacterias adheridas, así como las que se encuentran en la solución donde está la raíz, están en equilibrio, entonces la unión puede ser descrita cuantitativamente en términos de la isoterma de adsorción de Langmuir que se ilustra en la figura 5.

La ecuación de la isoterma de adsorción de Langmuir (39) para este sistema puede ser escrita como:

$$Ca = nKCs/1 + nKCs$$

dónde Ca es el número de bacterias adheridas/cm. de raíz, Cs es el número de bacterias libres en la solución, n es el número de sitios disponibles de unión a la bacteria/cm. de raíz y K es la constante de equilibrio de unión.

Si se lleva a cabo regresión lineal al graficar Cs'Ca vs. Cs (fig. 6), el coeficiente de correlación es de 0.971 para todo el rango de concentraciones del inóculo. La demostración de la relación lineal entre Cs'Ca y Cs va de acuerdo con el criterio que establece la validez de la isoterma de Langmuir.

Si los datos se tratan de ajustar a las otras tres isotermas (fig. 5), las curvas caen fuera de los niveles aceptables de confianza. La isoterma de Temkin requiere que la relación  $\log Cs$  y Ca sea lineal y nuestros datos dieron un coeficiente de correlación de 0.436. La ley de Henry define una relación lineal para toda la isoterma; sin embargo, nuestros datos claramente muestran una relación no lineal. Para que un sistema pueda ser descrito con la isoterma de Freudlich (20) es necesaria una relación lineal  $\log Cs$  vs.  $\log Ca$ . Nuestros datos muestran un coeficiente de correlación lineal de 0.957 que es bastante alto aunque menor que el coeficiente de correlación para la isoterma de Langmuir. Este coeficiente de correlación de 0.957 resulta ser muy alto debido a que el rango de concentración de  $10^1$  a  $10^7$  cel./ml. el número de bacterias adheridas va de acuerdo con las esperadas para ambas isotermas de Langmuir y Freudlich (Tabla 4); sin embargo, cuando tenemos  $10^8$  cel./ml. las cuantificadas son equivalentes a las esperadas por la isoterma de

Tabla 4.- Efecto del tamaño del inóculo en la adherencia de *A. brasilensa* Sp245 a raíces de trigo.

Concentración inicial de bacterias (cel./ml.)	# de bacterias adheridas a la raíz		
	Cuantificadas*	Esperadas según Isoterma de Langmuir**	Esperadas según Isoterma de Freudlich***
0		0	0
2.0X10 <sup>0</sup>	0	0.01X10	0.07X10
0		0	0
7.7X10 <sup>0</sup>	0	0.05X10	0.22X10
1		0	0
2.0X10 <sup>1</sup>	0	0.13X10	0.49X10
1		0	0
7.7X10 <sup>1</sup>	0	0.51X10	1.56X10
2		0	0
2.0X10 <sup>2</sup>	0	1.32X10	3.51X10
2	1	0	1
7.7X10 <sup>2</sup>	2.0X10	5.11X10	1.10X10
3	1	1	1
2.0X10 <sup>3</sup>	2.5X10	1.32X10	2.48X10
4			
7.7X10 <sup>3</sup>	4.5X10 <sup>1</sup>	5.11X10 <sup>1</sup>	7.80X10 <sup>1</sup>
4	2	2	2
2.0X10 <sup>4</sup>	8.5X10	1.32X10	1.75X10
4	3	2	2
7.7X10 <sup>4</sup>	3.2X10	5.09X10	5.52X10
5	3	3	2
2.0X10 <sup>5</sup>	5.0X10	1.31X10	9.55X10
5	3	3	3
7.7X10 <sup>5</sup>	8.5X10	4.88X10	3.90X10
6	4	4	3
2.0X10 <sup>6</sup>	6.4X10	1.18X10	6.75X10
6	4	4	4
7.7X10 <sup>6</sup>	1.6X10	3.49X10	2.76X10
7	5	4	4
2.0X10 <sup>7</sup>	4.3X10	6.02X10	6.21X10
7	4	4	5
7.7X10 <sup>7</sup>	5.6X10	9.06X10	1.95X10
8	5	5	6
7.7X10 <sup>8</sup>	1.3X10	1.07X10	1.38X10

\* Resultado del promedio de 3 experimentos por separado.

\*\* El número de bacterias esperadas esta basada en la isoterma de adsorción de Langmuir  $C_a = \frac{(6.84 \times 10^3) C_s}{1 + (6.03 \times 10^{-8}) C_s}$

\*\*\* El número de bacterias esperadas esta basada en la isoterma de Freudlich

$$C_a = 0.03981 X C_s^{0.8494}$$



Langmuir, ya que se observa una saturación, que no se puede observar en los datos esperados utilizando la ecuación de la isoterma de Freudlich. Esta última es considerada como una forma no-ideal de la isoterma de Langmuir, de ahí que a concentraciones menores de 10 cel./ml. ambas isotermas sean aplicables.

Vibrios vs. formas "C" en la adherencia.-

Como habíamos mencionado anteriormente, Azospirillum presenta dos formas morfogénicas dependiendo de la presión parcial de  $O_2$ , la edad del cultivo y el medio de cultivo utilizado. Cualquiera de estas dos formas puede ser la que colonice o infecte a la raíz, por lo cual decidimos probar ambas formas. Sin embargo, en los cultivos líquidos siempre tenemos una mezcla de ambas formas por lo que había que buscar el medio óptimo para tener exclusivamente formas "C" (fig.7a) y así poder diferenciar sus efectos con los de los vibrios.

Probando distintas condiciones de crecimiento encontramos que las mejores condiciones para que ocurra la conversión de vibrio a forma "C" son: a) añadir ya sea fructosa o gluconato en lugar de succinato o malato, b) utilizar medios mínimos sólidos, que se dejen secar a temperatura ambiente dos días antes de ser usados y c) eliminar el nitrógeno del medio; ya que la adición de 48mM de  $NH_4Cl$  hizo que la conversión de vibrio a forma "C" fuera menos efectiva.

Bajo estas condiciones, cerca del 100% de las formas vibroides se convierten en formas encapsuladas al incubarlas a 30°C durante 72 hrs.

Estos resultados sugieren, de acuerdo con otros reportes (11), que la falta de nitrógeno y la alta presión parcial de  $O_2$

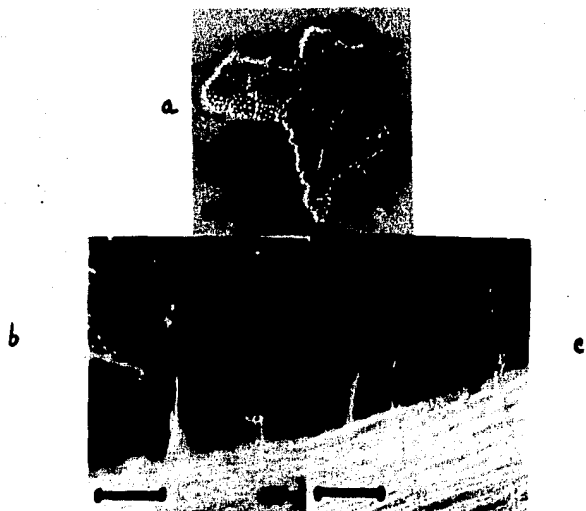


Fig.7.- Micrografias de contraste de fase de, a) formas "C" de *A.brasiliense* Sp245. barra = 20 micras, b) pelos radiculares normales de raíz de trigo. barra = 50 micras y c) pelos radiculares deformados de la raíz de trigo. barra = 50 micras.

Tabla 5.- Actividad de reducción de acetileno de las formas morfológicas de Azospirillum brasilense.

Cepa	Fuente de carbono	-1			
		nmolas de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .min		.mg de proteína	
		medio semisólido*	medio sólido**	-NH <sub>4</sub>	+NH <sub>4</sub>
Sp7	ac. málico	64.0	0***	0	0
Sp7	fructosa	53.6	0	0	0
Sp245	ac. málico	52.5	0	0	0
Sp245	fructosa	48.7	0	0	0
Sp7w1	ac. málico	56.1	0	0	0
Sp7w1	fructosa	40.3	0	0	0

\* Formas vibroides

\*\* Formas "C"

\*\*\*  $\leq 0.03$

Tabla 6.- Efecto de la edad del inóculo de A. brasilense Sp245 sobre la adherencia a la raíz de trigo.

Edad del inóculo (hrs.)	# de bacterias adheridas/cm. de raíz*	% de Adherencia
4	1.50X10 <sup>4</sup>	0.075
24	4.20X10 <sup>3</sup>	0.021
48	4.75X10 <sup>3</sup>	0.023
72	4.12X10 <sup>3</sup>	0.020

\* Los datos son el resultado del promedio de 3 experimentos por separado.

# de bacterias inoculadas= 1.0X10<sup>7</sup>

en este tipo de cultivos, que no conducen ni a crecimiento microaerofílico ni aeróbico, son esenciales para la diferenciación de los vibrios a formas "C".

Se llevaron a cabo ensayos de reducción de acetileno y, como se esperaba no se detectó actividad de nitrogenasa de estas formas (Tabla 5).

La conversión de vibrios de Azospirillum a formas "C" aparentemente requiere de síntesis de novo de proteínas, ya que esta conversión puede ser inhibida con la adición de 20 microgramos/ml. de cloranfenicol al medio.

Debido a que es necesaria la presencia de aminoácidos para la síntesis de novo de proteínas y éstos no pueden ser producidos por las vías de fijación y asimilación de nitrógeno, éstos deben acumularse previamente en pozas o ser proveídos durante el recambio de proteínas o de ambos.

Una vez formados los agregados celulares de las formas "C" es difícil disgregarlos completamente, lo que dificulta su cuantificación ya sea por determinación de cuenta viable o por microscopía directa. Razón por la cual, no pudimos llevar a cabo el ensayo de adherencia, ya que en el caso de las formas "C" no sabríamos cuanto estamos inoculando, ni cuanto se está recuperando. Por lo que decidimos llevar a cabo un experimento utilizando distintas edades de un cultivo en líquido de vibrios.

A lo largo de una curva de crecimiento podemos observar que, durante la fase exponencial, la forma predominante es la de vibrio; en la fase estacionaria podemos observar la aparición de formas encapsuladas que aumentan en número con el tiempo, y empiezan a formar pequeños agregados celulares.

Para poder observar el efecto de la edad del inóculo en el ensayo de la adherencia, inoculamos raíces con bacterias en fase exponencial de crecimiento (4hrs.) y en fase estacionaria con 24, 48 y 72 hrs. de incubación.

Como podemos observar en la tabla 6, la máxima adherencia se observa cuando se utilizan bacterias en fase exponencial de crecimiento como inóculo en el ensayo; sin embargo, cuando el cultivo es viejo, el número de bacterias adheridas disminuye un 50% aproximadamente, lo que va de acuerdo con la aparición de formas encapsuladas. Lo que sugiere que quizás estas formas encapsuladas no jueguen ningún papel en la adherencia.

Competencia de distintas bacterias por la adherencia a la raíz de trigo.-

De la tabla 18 podemos ver que tanto las cepas de Azospirillum como distintas especies de Rhizobium y E.coli se adhirieron a la raíz de trigo lo que sugiere que la adherencia no fuera específica para Azospirillum, por lo cual, decidimos realizar experimentos de competencias entre las distintas especies de bacterias por la adherencia a la raíz.

Suponiendo que para un sitio de adherencia nosotros tenemos una bacteria de Azospirillum y 100 de Rhizobium es de esperarse que si la adherencia es inespecífica, las dos bacterias se pueden adherir, en donde Azospirillum tiene el 1% de probabilidad de adherirse y Rhizobium el 99%. En caso de que la adherencia sea específica la probabilidad de adherencia de Azospirillum será mayor y por lo tanto, la de Rhizobium será

Tabla 7.- Propiedades utilizadas para diferenciar unas bacterias de otras.

Cepa	Propiedades
Sp7 <u>A. brasiliense</u>	colonias rojas en medio RC y Sm <sup>r</sup>
Sp245 <u>A. brasiliense</u>	colonias rojas en medio RC y Sm <sup>r</sup>
Sp245w <u>A. brasiliense</u>	colonias blancas en RC
Sp7w1 <u>A. brasiliense</u>	colonias blancas en RC
Sp7::Tn5 <u>A. brasiliense</u>	colonias rojas y Km <sup>r</sup>
Sp7w1::Tn5 <u>A. brasiliense</u>	colonias blancas y Km <sup>r</sup>
Cd6117 <u>A. brasiliense</u>	colonias rojas en medio RC
TAL380 <u>E. mallioti</u> TAL638	colonias blancas o rosas y Sm <sup>s</sup>
<u>E. laguminoarum</u> 143	colonias blancas, Sm <sup>s</sup> y no crece en Luria
<u>E. japonicum</u>	colonias blancas y Sm <sup>s</sup>
AB1157 <u>E. coli</u>	colonias blancas

Tabla 9.- Competencia de adherencia *G. brasiliense* vs. otras bacterias.

Cepa de referencia	†		‡‡		
	Cepa de referencia	Cepa competidora	Cepa de referencia	Cepa competidora	bacterias totales
Sp245XTAL380	2.0X10 <sup>7</sup>	5.1X10 <sup>6</sup>	4.7X10 <sup>3</sup>	1.7X10 <sup>4</sup>	2.1X10 <sup>4</sup>
Sp245XTAL438	1.7X10 <sup>7</sup>	1.0X10 <sup>6</sup>	4.3X10 <sup>4</sup>	5.9X10 <sup>4</sup>	1.2X10 <sup>5</sup>
Sp245X143	1.9X10 <sup>7</sup>	4.2X10 <sup>6</sup>	2.7X10 <sup>4</sup>	3.1X10 <sup>5</sup>	3.4X10 <sup>5</sup>
245XAB1157	8.0X10 <sup>7</sup>	1.0X10 <sup>6</sup>	6.5X10 <sup>5</sup>	2.0X10 <sup>4</sup>	6.7X10 <sup>5</sup>
Sp7XTAL380	2.8X10 <sup>7</sup>	7.3X10 <sup>6</sup>	6.0X10 <sup>4</sup>	4.9X10 <sup>5</sup>	5.5X10 <sup>5</sup>
Sp7XTAL438	1.9X10 <sup>7</sup>	4.3X10 <sup>6</sup>	3.1X10 <sup>4</sup>	1.7X10 <sup>4</sup>	4.8X10 <sup>4</sup>
Sp7X143	2.4X10 <sup>7</sup>	3.4X10 <sup>6</sup>	1.1X10 <sup>4</sup>	2.6X10 <sup>5</sup>	2.7X10 <sup>5</sup>
Sp7XAB1157	3.0X10 <sup>8</sup>	1.0X10 <sup>6</sup>	4.7X10 <sup>5</sup>	1.4X10 <sup>4</sup>	4.9X10 <sup>5</sup>

† # total de bacterias inoculadas.

‡‡ Resultado del promedio del # de bacterias adheridas/ cm. de raíz de 3 raíces.

menor.

Cada matraz con raíces de trigo fue inoculado con dos tipos de bacterias en una proporción de 1:100 (cepa de referencia:cepa competidora) y se llevó a cabo el ensayo normal de adherencia, solamente que esta vez al plaqurear se utilizaron además de los medios de Luria, PY y Rojo Congo, medios selectivos que nos permitieran distinguir una cepa de otra. Las características de cada cepa que se tomaron en cuenta para diferenciarlas de las demás se encuentran enlistadas en la tabla 7.

En la tabla 8 aparecen los resultados de las competencias Azospirillum vs. otras bacterias y en la tabla 9 se muestra el porcentaje de inhibición de adherencia ejercida por la bacteria competidora. R.melliloti TAL380 y R.japonicum 143 claramente muestran competencia por los sitios de adherencia de Sp245 y Sp7 ya que inhiben su adherencia en un 90% o más, mientras que Rhizobium leguminosarum TAL638 parece tener menos competitividad y E.coli AB1157 no inhibe en absoluto la adherencia de Azospirillum brasilense a la raíz.

En la tabla 10 se representan los resultados de competencias que se llevaron a cabo entre diferentes cepas de A.brasilense para ver si alguna de éstas son más competitivas, y de ser la adherencia un paso importante para el establecimiento de una interacción entre Azospirillum y la raíz, establecer así un ensayo que nos permita, en un futuro, seleccionar las cepas más adecuadas para el estudio de esta asociación.

Como podemos ver, entre cepas silvestres Sp7 y Sp245 es difícil diferenciar una de otra por las características



Tabla 9.- Porcentajes de inhibición de la adherencia de *O. brucei* en presencia de otras bacterias.

Cepa de referencia	Cepa competidora	% de Inhibición
Sp245	TAL380	95.3
Sp245	TAL638	64.1
Sp245	143	92
Sp245	AB1157	2.9
Sp7	TAL380	89.0
Sp7	TAL638	35.4
Sp7	143	95.9
Sp7	AB1157	4.0

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \frac{(\# \text{ de bacterias adheridas de la cepa de referencia})}{(\# \text{ total de bacterias adheridas})}$$

Tabla 10.- Competencias por la adherencia entre distintas cepas de *S. Braziliense*.

Cepa de referencia X cepa competidora	* Inóculo		** # de bacterias adheridas		
	Cepa de referencia	Cepa competidora	Cepa de referencia	Cepa competidora	bacterias totales
Sp245XSp245u	8.0X10 <sup>7</sup>	5.0X10 <sup>9</sup>	3.3X10 <sup>1</sup>	2.0X10 <sup>1</sup>	5.3X10 <sup>1</sup>
Sp245XSp7u1	8.0X10 <sup>7</sup>	1.5X10 <sup>9</sup>	2.4X10 <sup>4</sup>	3.5X10 <sup>6</sup>	3.7X10 <sup>6</sup>
Sp245XSp7::Tn5	3.0X10 <sup>7</sup>	3.4X10 <sup>9</sup>	1.0X10 <sup>4</sup>	3.1X10 <sup>4</sup>	4.1X10 <sup>4</sup>
Sp245XSp7u1::Tn5	3.0X10 <sup>7</sup>	1.0X10 <sup>9</sup>	1.0X10 <sup>4</sup>	1.0X10 <sup>6</sup>	1.0X10 <sup>6</sup>
Sp7XSp7::Tn5	5.0X10 <sup>7</sup>	3.4X10 <sup>9</sup>	1.1X10 <sup>4</sup>	3.3X10 <sup>5</sup>	4.4X10 <sup>5</sup>
Sp7XSp7u1::Tn5	3.5X10 <sup>7</sup>	5.7X10 <sup>9</sup>	2.1X10 <sup>5</sup>	5.2X10 <sup>5</sup>	6.7X10 <sup>5</sup>
Sp7XSp245w	3.0X10 <sup>8</sup>	5.0X10 <sup>9</sup>	2.4X10 <sup>5</sup>	1.9X10 <sup>5</sup>	4.4X10 <sup>5</sup>
Sp7XSp7u1	3.0X10 <sup>8</sup>	1.5X10 <sup>9</sup>	1.0X10 <sup>5</sup>	1.0X10 <sup>5</sup>	2.0X10 <sup>5</sup>
Sp7::Tn5XSp7	2.0X10 <sup>8</sup>	1.0X10 <sup>9</sup>	9.0X10 <sup>5</sup>	7.2X10 <sup>6</sup>	8.0X10 <sup>6</sup>
Sp7::Tn5XCd6117	1.0X10 <sup>8</sup>	1.5X10 <sup>9</sup>	5.0X10 <sup>6</sup>	1.5X10 <sup>5</sup>	2.0X10 <sup>6</sup>
Sp7u1XSp245	1.5X10 <sup>7</sup>	9.0X10 <sup>9</sup>	1.0X10 <sup>6</sup>	4.0X10 <sup>5</sup>	1.6X10 <sup>6</sup>
Sp7u1XSp7u1::Tn5	1.8X10 <sup>6</sup>	1.1X10 <sup>8</sup>	1.3X10 <sup>1</sup>	1.5X10 <sup>4</sup>	1.4X10 <sup>5</sup>
Sp7u1::Tn5XSp7	3.3X10 <sup>6</sup>	1.0X10 <sup>8</sup>	4.5X10 <sup>1</sup>	5.5X10 <sup>4</sup>	1.0X10 <sup>5</sup>

\* # de bacterias inoculadas.

\*\* Resultado del promedio del # de bacterias adheridas en 1 ca. de rafe de 3 rafes.

Tabla 11.- Porcentaje de inhibición de la adherencia en las competencias entre distintas cepas de *A. brasiliense*.

Cepa de referencia	Cepa competidora	% de Inhibición †
Sp245	Sp7::Tn5	89.0
Sp7	sp7::Tn5	89.0
Sp7::Tn5	Sp7	90.0
Sp215	Sp245u	73.0
Sp7	SP245w	44.0
Sp245	Sp7w1	73.0
Sp245	Sp7w1::Tn5	90.0
Sp7	Sp7w1	90.0
Sp7	Sp7w1::Tn5	79.0
Sp7::Tn5	Cd6117	75.0
Sp7u1	Sp245	37.5
Sp7u1	Sp7w1::Tn5	79.6
Sp7u1::Tn5	Sp7	55.0

† % de Inhibición =  $100 - \frac{(\# \text{ de bacterias adheridas de la cepa de referencia})}{(\# \text{ total de bacterias adheridas})}$

mencionadas en la tabla 7, por lo que decidimos mutagenizarlas con el transposon Tn5, seleccionando colonias protótrofas Km<sup>R</sup>, y así poder llevar a cabo los experimentos de competencia.

Entre las cepas Sp7 y Sp245 se muestran claramente una gran competitividad (Tabla 11), mientras que estas cepas parecen ser más competitivas por los sitios de adherencia que Sp245w.

Para el caso de los experimentos realizados entre Sp7 y Sp245 con Sp7w1 no podemos decir que Sp7w1 compita o no compita por los sitios de adherencia de Sp7 o Sp245, ya que en los experimentos de Sp245 vs Sp7w1, cuando se inoculan en una proporción de 1:100, respectivamente, parece haber competencia por los mismos sitios, ya que Sp7w1 inhibe la adherencia de Sp245 en un 90%, mientras que cuando se inocula en una proporción de 100:1 se esperaría que el porcentaje de inhibición fuera el mismo, pero esto no sucede, sino pareciera que Sp245 no inhibe la adherencia de Sp7w1. En los otros casos parece como si no inhibiera la adherencia de las otras cepas.

Observando la tabla 10 nos dimos cuenta que siempre que en el experimento de competencia se utiliza Sp7w1 o Cd6117 el número de bacterias totales que se adhieren está en el orden de  $10^6$  y no de  $10^5$ , lo que sucede normalmente, lo que nos hace pensar que estas cepas podrían estarse adhiriendo a otros sitios además de los normales a los que se adhieren las otras cepas, razón por la cual, a veces parecen no competir por estos últimos sitios.

Deformación de los pelos radiculares.-

Como habíamos mencionado anteriormente Ascopirillum tiene la capacidad de inducir la deformación de los pelos radiculares (fig.7c), lo cual podría ser el resultado de una asociación

especifica entre Azospirillum y la raíz de trigo. Por lo cual, decidimos establecer un ensayo que nos permitiera cuantificar la capacidad de distintas cepas para deformar los pelos radiculares y poder decidir si esta capacidad es específica de la asociación entre Azospirillum y la raíz de trigo. En la parte de Material y Métodos se describe el ensayo para la cuantificación de estas deformaciones.

Si suponemos que tanto la adherencia como la capacidad de producir deformaciones son procesos relacionados, ya sea que uno sea efecto del otro o simplemente los dos ocurren por separado como resultado de la interacción de la bacteria con la raíz, entonces las mismas condiciones de pH y sales que afectan a la adherencia deberán afectar a la capacidad de producir deformaciones. Por lo que llevamos a cabo experimentos de cuantificación de la capacidad de deformar los pelos radiculares de nuestras cepas a distintos pHs y con la presencia de agentes quelantes como el EDTA y el EGTA. En la tabla 12 podemos observar el número de deformaciones por cm. de raíz de las cepas Sp7, Sp7w1, Sp245, y Sp245w a distintos pHs y pareciera como si cada cepa tuviera un pH óptimo para producir o inducir la deformación de los pelos radiculares, el cual se encuentra en un rango de pH6 a pH7, excepto para la cepa Sp245w, a la cual parece no afectarle el pH.

Los agentes quelantes, aunque este experimento solamente se llevo a cabo una vez, parece tener un efecto de inhibición sobre la capacidad de deformación. Lo que nos hace pensar que para la producción de deformaciones es también necesaria la

Tabla 12.- Efecto del pH y agente quelante en la capacidad de *O. Brasiliense* para inducir la deformación de pelos radiculares raíces de trigo.

Solución Fahreus	Cepas			
	Sp7	Sp7ul	Sp215	Sp245i
pH 5.5	32.0±3.74 <sup>§</sup>	36.3±4.92	6.5±2.05	40.3±7.63
6.0	38.0±6.68	42.0±7.25	30.0±7.78	56.6±16.00
6.5	34.6±7.40	27.3±7.84	30.6±5.90	26.0±9.09
7.0	34.3±4.70	29.0±4.89	40.3±2.09	44.3±9.80
7.5	17.6±5.73	19.0±5.00	30.6±3.29	58.0±17.90
8.0	17.3±4.92	19.0±4.54	7.3±2.05	69.0±15.50
+ 1mM EDTA 7		9	0	1
+ 1mM EDTA 0		0	7	4

Excepto los experimentos con EDTA y ESTA que se llevaron a cabo solamente una vez, todos los otros resultados son el promedio de 3 experimentos por separado.

§  $\bar{x} \pm$  D.S. (desviación standard).

Tabla 13.- Capacidad relativa de las formas morfogenéticas de *O. Brasiliense* para producir la deformación de los pelos radiculares.

Cepas	Forma morfogenética	% de deformaciones de los pelos radiculares en 1 cm. de raíz
Sp245	Vibrío	17.0±13.0
	Forma "C"	1.0±1.0
Sp7	Vibrío	15.0±5.0
	Forma "C"	1.5±0.5
sin bacterias		3.5±2.5

† Promedio de dos raíces.

Tabla 14.- Capacidad de adherencia y deformación de los pelos radiculares de distintas cepas.

Cepa	# de bacterias adheridas/cm. de raíz?	# de deformaciones de los pelos radiculares en 1 cm. de raíz??
Sp215 <i>O. brasiliense</i>	$1.2 \times 10^4$	20.7 ± 3.0 (29)
Sp245 <i>O. brasiliense</i>	$2.5 \times 10^4$	43.5 ± 7.0 (25)
Sp7 <i>O. brasiliense</i>	$2.0 \times 10^4$	17.9 ± 5.3 (8)
Sp7.1 <i>O. brasiliense</i>	$3.0 \times 10^5$	15.5 ± 3.9 (17)
Cd6117 <i>O. brasiliense</i>	$2.7 \times 10^4$	29.0 ± 20.6 (3)
Dr1702 <i>O. lindberghii</i>	$1.0 \times 10^4$	15.0 ± 9.9 (4)
Dr1702w <i>O. lindberghii</i>	$1.6 \times 10^4$	15.0 ± 2.0 (3)
TAL439 <i>O. leucocorymbosus</i>	$2.0 \times 10^4$	17.6 ± 13.5 (3)
143 <i>E. japonicus</i>	$2.0 \times 10^3$	17.5 ± 16.5 (4)
2063 <i>E. trifolii</i>	$1.2 \times 10^4$	18.3 ± 2.2 (3)
PCN3444 <i>E. babingtonii</i>	$1.0 \times 10^4$	17.6 ± 3.4 (3)
TAL380 <i>E. milleti</i>	$1.1 \times 10^4$	30.0 ± 15.0 (5)
AD1157 <i>E. coli</i>	$5.0 \times 10^3$	2.6 ± 1.2 (3)
- sin bacterias	0	3.0 ± 1.3 (11)

? Los datos son el resultado del promedio de tres experimentos.  
?? % ± desviación standard (# de raíces contadas).

presencia de un catión que podría ser el  $Ca^{++}$  como en el caso de la adherencia.

Al igual que para la adherencia quisimos probar cual de las dos formas morfológicas de Azospirillum induce la deformación de los pelos radiculares, y como podemos observar en la tabla 13 la forma vibroide es la responsable de la producción de deformaciones, mientras que la forma "C" parece no tener ningún efecto sobre la deformación de los pelos radiculares.

En la tabla 14 se presenta la capacidad de adherencia y deformación de los pelos radiculares de distintas bacterias, y podemos observar, como ya se había discutido anteriormente, que la adherencia parece ser inespecífica y casi no se observan diferencias significativas entre las distintas bacterias. Para el caso de la capacidad de deformación de los pelos radiculares existe una diferencia notoria entre las bacterias del suelo como son: Azospirillum y Rhizobium y la enterobacteria E. coli, la cual no produce deformaciones. Sin embargo, entre Rhizobium y Azospirillum no existe diferencia, ya que ambas producen deformaciones y en igual cantidad, lo que parece indicar que esta capacidad de producir deformaciones en los pelos radiculares de la raíz de trigo no es específica para Azospirillum.

Entre las cepas de Azospirillum, sin embargo, existen la Sp245w y la Cd6117 que parecen tener una mayor capacidad de producir deformaciones que las demás cepas y quizás este ensayo permita la selección de cepas para estudios posteriores.



## DISCUSION.

La adherencia de *A. brasilense* Sp245 a las células epidérmicas y pelos radiculares de la raíz de trigo, así como su capacidad de producir deformaciones en los pelos radiculares, son dependientes de la presencia de  $Ca^{++}$  y de un rango de pH de 6 a 7.

Se han reportado efectos similares en otros estudios sobre la adherencia de las bacterias a superficies biológicas y no-biológicas. En ejemplo de esto, es la adherencia de *E. fluorescens* E6-22 a las raíces de rábano (16) que es estimulada por 5 a 10 mM de  $Mg^{++}$  o  $Ca^{++}$ . Efectos similares de cationes han sido reportados para la adherencia de *E. coli* a raíces de cebada, la adherencia de pseudomonas a vidrio (25) y la adherencia de *E. aeruginosa* al acero (41).

Estos efectos de cationes divalentes se piensa que indican el papel de fuerzas electrostáticas en la adherencia de las bacterias a las raíces (25). Se piensa que los cationes enmascaran la repulsión de capas dobles eléctricas, permitiendo así que dos superficies que tienen cargas negativas netas se puedan acercar y en ocasiones adherirse una a la otra. Este proceso mediado por cationes y espontáneo no podría involucrar la síntesis de novo de polímeros adhesivos extracelulares como se ha sugerido para mecanismos de la adherencia firme y permanente (25,26).

Aunque las propiedades de la adherencia temprana no pueden ser tomadas como un indicador de la colonización potencial duradera y permanente, es claro que las propiedades de superficie

de cepas bacterianas muy diferentes poseen propiedades físicas similares que son esenciales para la adherencia temprana efectiva.

Las isotermas de adsorción son expresiones empíricas que aproximan razonablemente el comportamiento de sistemas experimentales de adherencia en rangos estrictos de concentración y la adsorción así descrita no implica que sea una unión física o química, sino que la isoterma permite sacar inferencias útiles y establecer parámetros para pruebas posteriores de adsorción bacteriana a las superficies de raíces. Las medidas de constantes de equilibrio que indican la extensión y fuerza de la adherencia pueden también servir como guías para mejorar ya sea química o genéticamente la competencia de los microorganismos que se adhieren.

En el ensayo de adherencia establecido en este trabajo, *A. brasilense* Sp245 se adhiere en 90 min. a las raíces de trigo con 48 hrs. en germinación, y dependiendo de la concentración de bacterias en la solución y el tiempo de incubación de las raíces en presencia de las células bacterianas, la adherencia a las raíces de trigo es un proceso reversible de equilibrio que puede ser descrito en términos de una isoterma de adsorción de Langmuir. Este tipo de isoterma describe un sistema saturable, el cual propone un número específico de sitios disponibles para la adherencia y de alta afinidad.

En otros estudios similares, Fletcher (13) describió la adsorción inicial de pseudomonas marinas a superficies no-biológicas en términos de una isoterma modificada del tipo de

Langmuir. La adsorción de Rhizobium spp. a raíces de cereal (39) fue descrita también en términos de la isoterma de Langmuir e hipotetizada de ser influenciada por eventos de adsorción no-específicos. La adsorción de Agrobacterium tumefaciens a tejidos de papa (20) se describió con una isoterma de Freundlich, la cual se considera una variante no-ideal de la isoterma de Langmuir. A lo largo de las concentraciones de bacterias examinadas no se observó saturación de los sitios disponibles de adherencia y se propone que la adsorción a los tejidos de papa es no-específica.

La adherencia temprana o inicial de bacterias a las raíces de rábano (16) probablemente no involucra eventos específicos de reconocimiento. Este concepto se basa en los resultados de experimentos donde se observa la dependencia del tiempo y la concentración. Todas las bacterias probadas demostraron una adherencia lineal dependiente de la concentración. El nivel de adherencia de E.coli fue diez veces menor que el nivel de adherencia de las otras bacterias de rizosfera probadas, pero fue también lineal y dependiente de concentración.

Nuestros datos sugieren que la forma vibroide de A.brasiliensis es la que se adhiere preferencialmente a la raíz de trigo, sin embargo, esto no es concluyente ya que el 50% de la reducción en el número de cuentas viables al plaquear el homogenizado de la raíz se puede deber a que las células se hubieran agregado entre sí y a su vez adherirse a la raíz; y cada unidad formadora de colonia no representa a una sola célula sino quizás a más células que se encontraban agregadas entre sí.

En el ensayo de la cuantificación de la producción de deformaciones en los pelos radiculares pudimos observar que las

formas "C" no producen deformaciones de los pelos radicales.

Todas las cepas incapaces de producir formas "C" (Enc<sup>m</sup>) como son la Sp7w1, Sp245w y Br1702w fueron tan efectivas en adherirse y producir deformaciones en los pelos radicales como las cepas padres Enc<sup>f</sup> (Sp7, Sp245, Br1702) (Tabla 14).

Esta incapacidad de producir formas "C" parece que está relacionada con la incapacidad de formar un exopolisacárido, el cual se tiñe con rojo congo (datos obtenidos en el laboratorio que están por publicarse). Otros autores han publicado (22), que cepas mutantes Enc<sup>m</sup> de R. malloti que son incapaces de producir un exopolisacárido en particular y nodulos eficientes en su hospedero Mandicago aún se adhieren a las raíces, sin embargo, parece que están afectadas en el enrollamiento de los pelos radicales y formación del hilo de infección.

Lo que sugiere que tanto en Acospirillum como en R. malloti la incapacidad de producir un polisacárido específico no afecta su adherencia.

Todo esto sugiere que la forma "C" no juega ningún papel en la adherencia y en la deformación de los pelos radicales y si estos a su vez son pasos importantes en el establecimiento de una asociación entre Acospirillum y la raíz, además por el hecho de que estas formas no tengan actividad de fijación de nitrógeno y por las condiciones en las que aparecen, pareciera como si su papel fuera solamente el de una forma de resistencia a las condiciones del medio ambiente. Aunque aún no se descarta que tengan algún papel en la asociación quizás en algún paso posterior a la adherencia y deformación de los pelos radicales.

Tanto Azospirillum como Rhizobium presentaron la misma capacidad de adherencia y deformación de los pelos radiculares (Tabla 14). En los experimentos de competencia (Tabla 9) no se distingue a las bacterias de rizosfera (Azospirillum y Rhizobium) ya que parecen competir, unas más que otras, por los mismos sitios de adherencia; sin embargo, si se discrimina a E. coli de las bacterias de rizosfera, la cual parece tener menor afinidad por los mismos sitios, ya que como podemos ver en la Tabla 14 si se adhiere aunque sea en un número menor que las demás cuando se encuentra sola sin la presencia de cepas con mayor afinidad. Sp7w1 y Cd6117 son cepas de A. brasilense que se adhieren en mayor cantidad que las demás bacterias y parecen no competir por los mismos sitios ya que las demás bacterias se siguen adhiriendo en alta proporción aún en la presencia de éstas.

Lo que nos sugiere la existencia de dos tipos de sitios de adherencia. Un número de sitios específicos, por los que compiten las bacterias de rizosfera, y otro de sitios inespecíficos, a los que se adhiere casi cualquier bacteria.

Se han reportado datos parecidos por otros autores, donde se observa competencia de A. brasilense con R. trifolii por los mismos sitios de adherencia en raíces de trébol. La inoculación con mezclas de cultivos de Rhizobium trifolii ANU794 y distintas cepas de Azospirillum brasilense a raíces de trébol (35) provocó el crecimiento anormal de la raíz, formación de más raíces laterales, así como, el aumento en el número de pelos radiculares; sin embargo, se inhibió el enrollamiento de los pelos radiculares y la nodulación que se presentan normalmente

con la inoculación de R. trifolii. Sin embargo, cuando se inoculó con una mezcla de R. trifolii ANU1030 y A. brasilense Sp245 también se inhibió el enrollamiento de los pelos radiculares, pero se formaron nodulos inefectivos, lo que sugiere que los sitios de infección en los pelos radiculares están bloqueados por células de Agrospirillum y que los nodulos pueden ser formados solamente por la cepa ANU1030, que es capaz de invadir la raíz por rutas alternativas, como son espacios abiertos en la epidermis.

La capacidad de producir deformaciones en los pelos radiculares de la raíz de trigo no es específica de Agrospirillum como sugería Patriquin (15). Si se observan diferencias entre las distintas cepas probadas, pero cuando menos entre Sp245 y Sp7 no existen diferencias significativas de adherencia y capacidad de deformación utilizando los ensayos propuestos en este trabajo.

Pero todo esto no nos habla de una asociación o colonización inespecífica. La adherencia inicial o temprana es solamente uno de varios eventos en el proceso de infección o colonización, que puede que también incluya taxis hacia o a lo largo de la raíz, adherencia firme o permanente a la superficie mediada por la producción de polisacáridos, tales como celulosa (26) o estructuras, tales como fibras (21) y penetración a los espacios intercelulares de los tejidos de la raíz. Las condiciones que promueven el crecimiento de las bacterias a la superficie de la raíz son también importantes para una colonización exitosa y proliferación de la bacteria en un sistema radicular. Barbara Reinhold (35) reportó que las cepas de Agrospirillum presentan una quimiotaxis específica a sustratos de

bajo peso molecular dependiendo del origen de las especies más que de la especie a la que pertenecen, es decir, encontró que las diferentes respuestas quimiotácticas ácidos orgánicos de algunas cepas coinciden con la exudación de estos ácidos orgánicos de la planta de la cual fueron aisladas. El malato es uno de los ácidos orgánicos dominantes en el exudado de raíz del pasto Kallar (C-4) y del maíz (C-4), y fue además el atrayente más fuerte para las cepas ER-15 *A. lipoferum* y JM6A2 *A. brasiliana* que fueron aisladas de las mismas plantas, respectivamente. Y la cepa SpT60 *A. brasiliana* aislada de raíces de trigo (C-3) fue atraída más fuertemente por oxalato, el cual es uno de los componentes dominante del exudado de trigo.

De ahí que, además de las limitaciones descritas anteriormente, la complejidad del proceso de colonización en la naturaleza restringe la capacidad de nuestro ensayo de adherencia a predecir si una bacteria podrá colonizar una superficie radicular.

En otros estudios, se ha observado que en dos cepas bacterianas, WD13 y una de *Serratia* (ambas buenas colonizadoras bajo condiciones estériles) (16) no fueron colonizadoras efectivas en suelos no estériles. Asimismo, la cepa RF24 de *R. meliloti* altamente competitiva en la formación de nódulos en *Medicago sativa* en ensayos llevados a cabo en suelos estériles es incapaz de competir en ensayos llevados a cabo en medios líquidos (17). Lo que nos recuerda que las conclusiones de una prueba estéril de colonización no pueden ser extendidas a el invernadero o a pruebas de campo. Sin embargo, aquí se establecen ciertas bases que pueden ser tomadas en cuenta para estudios posteriores.

en el campo o en el invernadero, además de que es un principio al estudio de los posibles procesos de infectividad de A. brasilense a las raíces de trigo.



#### BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alexander, M. 1984. Specificity in the legume-Rhizobium symbiosis. Biological Nitrogen Fixation, ed. Martin Alexander, Plenum Press, New York, pp 99-125.
- 2.- Amarger, M. 1984. Evaluation of competition in Rhizobium spp. Current Perspectives in Microbial Ecology, ed. M.J. Klug y C.A. Reddy, A.S.M. Press, pp 300-305.
- 3.- Baldani, V.L.D., y J. Dobereiner. 1980. Host plant specificity in the infection of cereals with Azoospirillum spp. Soil Biol. Biochem. 12:433-439.
- 4.- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani y J. Dobereiner. 1983. Effects of Azoospirillum inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Can. J. Microbiol. 29: 924-929.
- 5.- Barak, R., I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982. Aerotactic response of Azoospirillum brasilense. J. Bacteriol. 152:643-649.
- 6.- Barak, R., I. Nur y Y. Okon. 1983. Detection of chemotaxis in Azoospirillum brasilense. J. Appl. Bacteriol. 53: 399-403.
- 7.- Berg, R.H., M.E. Tyler, M.J. Novick, V. Vasil y I.K. Vasil. 1980. Biology of Azoospirillum-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. Appl. Environ. Microbiol. 39: 219-226.
- 8.- Dazzo, F.B. 1984. Attachment of nitrogen-fixing bacteria to plant roots. Current Perspectives in Microbial Ecology, ed. M.J. Klug y C.A. Reddy, A.S.M. Press, pp 130-135.
- 9.- Eimerich, C. 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants.

Bio/Technology. 1:967-978.

- 10.- Ervin, S.E. y D.H. Hubbell. 1985. Root hair deformations associated with fractionated extracts from Rhizobium trifolii. Appl. Environ. Microbiol. 49: 61-68.
- 11.- Eskew, D.L., D.D. Focht y I.P. Ting. 1977. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented Spirillum lipoferum. Appl. Environ. Microbiol. 34: 582-585.
- 12.- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J.Gen. Microbiol. 16: 374-381.
- 13.- Fletcher, M. 1977. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. Can. J. Microbiol. 23: 1-6.
- 14.- Herbert, et.al. 1971. Chemical analysis of microbial cells. Methods in Microbiology, ed. J.R. Norris y D.W. Ribbons, Academic Press, vol. 5B, pp 209-344.
- 15.- Jain, D.K. y D.G. Patriquin. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment and plant growth in wheat-Azoospirillum associations. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1208-1213.
- 16.- James, D.W. Jr., T.V. Suslow y K.E. Steinback. 1985. Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 50: 392-397.
- 17.- Jansen van Rensburg, H. y B.W. Strijdom. 1982. Competitive abilities of Rhizobium mellioti strains considered to have potential as inoculants. Appl. Environ. Microbiol. 46: 870-

873.

- 18.- Kapulnik, Y., M. Feldman, Y. Okon y Y. Henis. 1985. Soil. Biol. Biochem. 17:509-515.
- 19.- Kapulnik, Y., R. Gafny y Y. Okon. 1985. Can. J. Bot. 63: 627-631.
- 20.- Kluepfel, D.A. y S.G. Pueppke. 1985. Isotherm for adsorption of Aerobacterium tumefaciens to susceptible potato (Solanum tuberosum L.) tissues. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1351-1355.
- 21.- Korhonen, T.K., E. Tarkka, H. Ranta y K. Hahtela. 1983. Type 3 fimbriae of Klebsiella sp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. J. Bacteriol. 155: 860-865.
- 22.- Leigh, J.A., E.R. Signer y G.C. Walker. 1985. Exopolysaccharide deficient mutants of Rhizobium mellioli that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 6231-6235.
- 23.- Lin, W., Y. Okon y R.W.F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by Zea mays and sorghum bicolor roots inoculated with Asospirillum brasiliense. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1775-1779.
- 24.- Nagaihaas, F.M., J.I. Saldani, J.M. Santo, J.R. Kuykendall y J. Dobreiner. 1983. A new and tolerant Asospirillum species. Ann. Acad. Brasil Cien. 55: 417-430.
- 25.- Marshall, K.C., R. Stout y B. Mitchell. 1971. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. J. Gen. Microbiol. 68: 337-348.
- 26.- Napoli, C., F. Dazzo y D. Hubbell. 1975. Production of

- cellulose microfibrils by Rhizobium. Appl. Microbiol. 30: 123-131.
- 27.- Nelson, L.M. y R. Knowles. 1978. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by A. brasilense grown in continuous culture. Can. J. Microbiol. 24: 1395-1403.
- 28.- Okon, Y., S.L. Albrecht y R.H. Burris. 1976. Carbon and ammonia metabolism of Spirillum lipoferum. J. Bacteriol. 128: 592-597.
- 29.- Okon, Y., J.P. Houchins, S.L. Albrecht y R.H. Burris. 1977. Growth of Spirillum lipoferum at constant partial pressures of oxygen, and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. J. Gen. Microbiol. 98: 87-93.
- 30.- Okon, Y. 1982. Azospirillum: physiological properties, mode of association with roots and its application for the benefit of cereal and forage grass crops. Isrl. J. Bot. 31: 214-220.
- 31.- Okon, Y., P.G. Heytler y R.W.F. Hardy. 1983. Nitrogen fixation by Azospirillum brasilense and its incorporation into host Sesuvia italica. Appl. Environ. Microbiol. 46: 694-697.
- 32.- Okon, Y. 1985. Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology. 3: 223-228.
- 33.- Patriquin, D. y J. Dobereiner. 1978. Bacteria in the endorhizosphere of maize in Brazil. Can. J. Microbiol. 24: 734-742.
- 34.- Patriquin, D.G. J. Dobereiner y D.K. Jain. 1983. Sites and

- processes of association between diazotrophe and grasses.  
Can. J. Microbiol. 29: 900-915.
- 35.- Plazinski J. y B.G. Rolfe. 1985. Interaction of Azospirillum and Rhizobium strains leading to inhibition of nodulation. Appl. Environ. Microbiol. 49:990-993.
- 36.- Reinhold, B., T. Huřek y I. Fendrik. 1985. Strain-specific chemotaxis of Azospirillum spp. J. Bacteriol. 162: 190-195.
- 37.- Reynders, L. y K. Vlassek. 1982. Use of Azospirillum brasilense as biofertilizer in intensive wheat cropping. Plant and Soil. 66: 217-273.
- 38.- Sadasivan, L. y C.A. Neyra. 1985. Flocculation in Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum: exopolysaccharides and cyst formation. J. Bacteriol. 163: 716-723.
- 39.- Shimshick, E.J. y R.R. Herbert. 1979. Binding characteristics of nitrogen fixing bacteria to cereal roots. Appl. Environ. Microbiol. 38: 447-453.
- 40.- Smith, R.L., S.C. Schank, J.R. Milam y A.A. Baltensperger. 1984. Responses of Sorghum and Pennisetum species to the nitrogen fixing bacterium Azospirillum brasilense. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1331-1336.
- 41.- Stanley, P.M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of Pseudomonas aeruginosa to stainless steel. Can. J. Microbiol. 29: 1493-1499.
- 42.- Tarrand, J.J., N.R. Krieg y J. Dohereiner. 1978. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, A. lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and A. brasilense nov.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Can. J. Microbiol. 24: 967-980.

43.- Tien, T.M., M.H. Gaskins y D.H. Hubblell. 1979. Plant growth substances produced by Azospirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet (Pennisetum americanum L.). Appl. Environ. Microbiol. 37: 1016-1024.

44.- Umali-Garcia, M., D.H. Hubblell, M.H. Gaskins y F.B. Daszo. 1980. Association of Azospirillum with grass roots. Appl. Environ. Microbiol. 39:219-222.