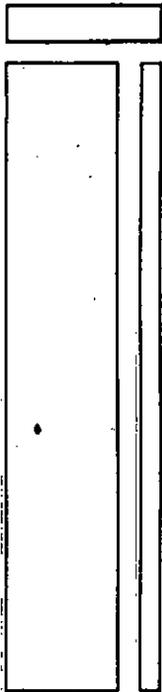




Universidad de la República
FACULTAD DE AGRONOMIA



71



OBTENCION DE MUTANTES DE
Rhizobium meliloti
RESISTENTES A ANTIBIOTICOS

MIRTA LASSAGNO Y LILLIAN FRIONI

BOLETIN DE INVESTIGACION N° 9

MONTEVIDEO

1988

URUGUAY

El 'Boletín de Investigación' es una publicación seriada que recoge los resultados de las investigaciones realizadas por el personal académico de la Facultad de Agronomía, una vez que ellos fueron revisados y aprobada su publicación por la Comisión de Publicaciones Científicas. Las solicitudes de adquisición y de intercambio con este Boletín debe dirigirse al Departamento de Documentación, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevideo - URUGUAY.

Comisión de Publicaciones Científicas:

Martín Buxedas, Primavera Azaguirre, Carlos Bentancourt (profesores),
Pablo Fernández (estudiante),
Roberto Malfatti (profesional).
Alicia Torres (comunicadora rural),

Obtención de mutantes de *Rhizobium meliloti* resistentes a antibióticos/ Mirta Lassagno y Lillian Frioni. -- Montevideo: Facultad de Agronomía, 1988. -- 12 p. -- (Boletín de Investigación; 9)

FIJACION DEL NITROGENO
RHIZOBIUM
RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

Lassagno, Mirta

Frioni, Lillian, coaut.

CDU576.8

OBTENCION DE MUTANTES DE *Rhizobium meliloti* RESISTENTES A ANTIBIOTICOS

MIRTA LASSAGNO* y LILLIAN FRIONI**

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener mutantes resistentes a uno y dos antibióticos entre una población de cepas nativas de *Rhizobium meliloti* de la zona de Río Cuarto o provenientes de centros de colección. Se trabajó con 10 cepas, 5 salvajes y 5 derivadas de ellas, resistentes a 500 µg/ml de estreptomina.

En la evaluación de la resistencia natural de las cepas frente a 6 antibióticos se apreció comportamiento similar entre las cepas madres y las mutantes resistentes a estreptomina. La resistencia a este antibiótico fue muy marcada, sugiriendo producción abundante de estreptomina en los suelos. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue también elevada para el cloranfenicol y la espectinomicina (400 y 900 µg/ml respectivamente).

Se obtuvieron mutantes resistentes naturales a uno y dos antibióticos en kanamicina, cloranfenicol, espectinomicina y gentamicina, solos o en combinación con estreptomina (dos marcas).

En ningún caso se observó dependencia a los antibióticos en estudio.

En la evaluación de la nodulación y la fijación biológica del nitrógeno en plántulas en medio axénico a nivel de cámara climatizada, se observó que ninguna cepa perdió la capacidad de formar nódulos, y éstos aparecieron en periodos de tiempo similares al de las cepas madres. En la acumulación de materia seca, tres cepas se comportaron igual al testigo nitrogenado, dos de ellas resistentes a dos antibióticos. La distribución de las mutantes con una marca y las resistentes a dos antibióticos, fue muy homogénea en el ensayo.

Aparentemente la resistencia a antibióticos y la capacidad para fijar nitrógeno no están relacionadas y se mantienen las propiedades simbióticas de las cepas salvajes, por lo que estas mutantes son recomendadas en ensayos de persistencia y competencia en el suelo.

Recibido el 18 de agosto, 1987

Aceptado el 17 de marzo, 1988

* Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria
de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

** Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, Uruguay.

Palabras claves: resistencia a antibióticos, fijación de nitrógeno y resistencia a antibióticos, *Rhizobium meliloti* y resistencia a antibióticos.

SUMMARY

The aim of this paper was to obtain *R. meliloti* mutants resistant to antibiotics within a native strain population from Río Cuarto region or other collecting centres. We worked with 10 strains, 5 wild ones and 5 derivatives from them, resistant to 500 µg/ml of streptomycin.

Regarding the natural resistance of strains to six antibiotics a similar behavior was observed in the wild strains and the derived resistant to streptomycin. The minimum inhibitory concentration was high for chloramphenicol and spectinomycin (400 and 900 µg/ml respectively).

We obtained natural mutants resistant to 1 and 2 antibiotics for kanamycin, chloramphenicol, spectinomycin and gentamycin, all these alone or with streptomycin (two targets). No dependence on antibiotics was observed.

No strain lost its ability for nodulation. The nodules were formed at the same time that those in the wild strains.

Three strains showed the same behavior as the nitrogen control, and two of them were resistant to two antibiotics derived from RCA, autochthonous of the region and the other was the RCM₁ which was known as being very efficient in previous essays. The distribution of strains with a target and those resistant to two antibiotics was homogeneous in the trial.

It seems that the antibiotic resistance and the ability for nitrogen fixation aren't related, and the symbiotic properties of the wild strains are maintained. These strains are recommended for persistence and competence trials.

Key words: *R. meliloti* resistant to antibiotics.

INTRODUCCION

En estudios ecológicos de microorganismos en ambientes altamente poblados como el suelo, es necesario contar con métodos que permitan identificar a las cepas introducidas para evaluar su movilidad, persistencia o competencia. En trabajos de inoculación de leguminosas interesa conocer la proporción de los nódulos ocupados por la cepa de rizobio en estudio. Para este reconocimiento se recurre a los análisis serológicos con anticuerpos específicos, a la tipificación con fagos específicos y al empleo de mutantes con algún marcador genético, como el caso de la resistencia a uno o más antibióticos (Schmidt, 1978).

Desde los trabajos de Obatoni (1971) sobre estudios ecológicos de rizobio con cepas marcadas por resistencia a estreptomicina, esta técnica es empleada en evaluaciones de competencia entre cepas de inoculantes y las nativas y en estudios de sobrevivencia (Brockwell *et al*, 1977). Kuykendall y Weber (1978), Gollobin y Levin (1974), Meyer y Pueppke (1980) señalan resultados en estudios con *R. japonicum*; Josey *et al* (1979) en *R. leguminosarum* y *R. trifolii*; Pain (1979) en *R. leguminosarum*; Pankhurst y Craig (1979) en *R. spp.* En estudio con *R. meliloti*, Antoun *et al* (1982) encontraron alta resistencia intrínseca en 49 cepas frente a nueve antibióticos.

Estas sustancias producen interferencias en varios niveles de organización celular, ya sea en la estructura o función de la superficie celular (pared, membrana), en funciones biosintéticas (proteínas, ácidos nucleicos), en la división celular (Kiser *et al*, 1969). Así, estreptomycin, cloranfenicol y espectinomycin interfieren en la síntesis de proteínas, kanamicina inhibe el metabolismo de los ácidos nucleicos y la rifampicina inhibe a la ARN polimerasa en procariotes. En general, la resistencia a antibióticos se localiza a nivel de plasmidios y puede perderse al cabo de varias generaciones. Es aconsejable probar repetidamente las cepas cuando se las emplea en ensayos largos de campo (Cole y Elkan, 1973).

El objetivo de este trabajo fue detectar mutantes resistentes naturales a uno y dos antibióticos presentes en el inóculo original de poblaciones de *Rhizobium meliloti* aisladas de la zona de Río Cuarto o provenientes de centros de colección. Se verificó la independencia de estas mutantes a los antibióticos y la retención de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas de *Rhizobium meliloti* empleadas en este trabajo fueron diez: cinco salvajes, entre las cuales tres fueron aisladas de la región (cuadro 1). Las restantes son derivadas de aquellas resistentes a 500 µg/ml de estreptomycin y fueron cedidas por Sonia Cavaignac (Fundación Campomar, Buenos Aires). En todas las experiencias se empleó como control de la actividad de los antibióticos a la cepa *Escherichia coli* C 137 (cedida por el grupo de Genética Microbiana de la Universidad de Río Cuarto), sensible a los antibióticos usados: cloranfenicol (Cl), espectinomycin (Sp), sulfato de estreptomycin (St), kanamicina (Ka) y rifampicina (Ri) de Sigma Chemical Company y gentamicina (Ge), de Gador.

Resistencia natural a los antibióticos.

Se trabajó con medio EMA (extracto de levadura-manitol-agar) con azul de bromotímol (Vincent, 1975), al que se le incorporaron alícuotas de soluciones madres de los antibióticos (30 mg/ml) esterilizados por filtros millipore de 0,22 micras (el cloranfenicol se solubilizó previamente con etanol). Las concentraciones estuvieron comprendidas entre 0 y 200 µg/ml (Ka), 0 y 900 (Sp), 0 y 600 (Cl), 0 y 250 (Ri), 0 y 100 (Ge) y 0 y 3000 (St).

Las cajas de Petri se dividieron en diez partes y cada una se sembró en superficie con 5 µl de inóculo (ansa calibrada), a partir de una suspensión de cultivos de 6 días a 28 °C en EMA inclinado y llevados a una concentración de 1.10^8 células/ml con solución de sales del EMA al 25% (escala de Mc Farland). Se incubaron tres días a 28 °C y se evaluó la concentración inhibitoria mínima (CIM)

que previene totalmente el crecimiento. Las lecturas se confirmaron a los cinco días. Se trabajó por triplicado.

Obtención de mutantes resistentes naturales.

Se procedió como precedentemente, pero la siembra en las cajas de Petri se realizó con 0,2 ml de cultivo bacteriano con ayuda de espátula de Drigalsky, en medio EMA con rojo Congo. Las combinaciones de cepas y antibióticos fueron las siguientes:

SB₂ y SB₂ St en 150-300-450-600-800 µg/ml de espectinomicina

RCM₃ y RCM₃ St en 100-200-500-1000 µg/ml de cloranfenicol

RCA₅ y RCA₅ St en 0,5-2-4-6-8-15 µg/ml de gentamicina

B₃₁₀ y B₃₁₀ St en 80-100-150-200 µg/ml de kanamicina

Se observó la aparición de colonias resistentes, se contaron y se tomó en cuenta la máxima concentración que permitió el desarrollo. Las colonias fueron numeradas en las cajas originales las que se cerraron con cinta plástica y parafina y se conservaron en heladera. Los estudios de eficiencia se realizaron con tres mutantes de cada tratamiento.

Para calcular la frecuencia de mutación (número de mutantes naturales/total de la población) se determinó la concentración del inóculo por recuento en medio sólido, sin antibiótico (siembra en superficie de 0,2 ml de cada suspensión-dilución).

Independencia de las mutantes a los antibióticos

Se sembraron dos cajas de Petri con medio EMA y rojo Congo, una con antibiótico a la dosis a la cual la mutante fue aislada y la otra, sin antibiótico, con la técnica de replicación con palillos estériles. Las mutantes independientes del o de los antibióticos se seleccionaron para proseguir el estudio.

Infectividad y eficiencia de las cepas

Se evaluó la capacidad de nodulación y eficiencia en la fijación de N₂ a nivel de cultivos axénicos con alfalfa (*Medicago sativa*, L) ecotipo local, según Vincent (1975), con 30 tratamientos: 4 cepas salvajes, 24 mutantes y 2 testigos, uno sin inocular ni fertilizar y el otro con 70 ppm de N-NO₃K, con 8 repeticiones.

Se evaluó la velocidad de aparición de los nódulos, su número y el peso seco de la parte aérea a 65 °C. Los resultados se analizaron estadísticamente por la prueba F y el test de Duncan para evidenciar diferencias entre medias (Snedecor y Cochran, 1977). Se efectuaron aislamientos del endofito a partir de nódulos de dos tubos al azar de cada tratamiento, a los efectos de verificar la estabilidad de las mutaciones.

RESULTADOS

El cuadro 2 presenta los resultados de la evaluación de la resistencia natural de las cepas a los seis antibióticos. Los valores de la CIM variaron desde 25 a 75 $\mu\text{g/ml}$ para gentamicina, de 40 a 250 para rifampicina, de 100 a 200 para kanamicina, de 100 a 400 para cloranfenicol, de 700 a 900 para espectinomicina y de hasta 3000 $\mu\text{g/ml}$ para estreptomycinina.

La foto 1 muestra los resultados en el estudio de la resistencia natural de las cepas a la rifampicina. Se aprecia la siembra de las 10 cepas en estudio y se señala la 116 por la aparición de mutantes resistentes a 150 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de este antibiótico. La CIM fue de 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

El cuadro 3 resume los resultados en la obtención de mutantes resistentes naturales a 1 y 2 antibióticos con la técnica de inoculación en bañado con espátula, y el cuadro 4 muestra los resultados en la determinación del número de nódulos y el 5 en la acumulación de materia seca de la parte aérea.

DISCUSION

En el cuadro 2 se aprecia un comportamiento similar frente a los antibióticos entre las cepas madres y las mutantes resistentes a 500 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycinina, indicando que la resistencia entre estos antibióticos no está relacionada. No se evidenció una separación neta de las cepas por su resistencia natural, a excepción del caso de la estreptomycinina, que fue muy marcada, hecho ya observado por otros autores (Gollobin y Levin, 1974 y Döbereiner *et al.*, 1981). Las cepas presentaron también elevado nivel de resistencia a cloranfenicol y espectinomicina.

Los niveles de la CIM para kanamicina y gentamicina no superaron 200 y 75 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, valores superiores a los descritos por Meyer y Pueppke (1980) para *R. japonicum*,

Nuestras cepas de *R. meliloti* presentaron mayor sensibilidad a rifampicina que las señaladas por Kuykendall y Weber (1978) para *R. japonicum* (CIM superior a 500 $\mu\text{g/ml}$).

En el cuadro 3 se señalan los niveles de antibióticos a partir de los cuales se aislaron las mutantes resistentes naturales. En gentamicina se logró mutantes a bajo nivel de antibiótico (8 $\mu\text{g/ml}$), con baja frecuencia de mutación; datos coincidentes con los de Meyer y Pueppke (1980) en *R. japonicum*.

La probabilidad de obtener mutantes resistentes a un antibiótico fue mayor que la de mutantes resistentes a dos antibióticos, como era de esperar. En ningún caso creció la cepa *E. coli* C 137 usada como control de la actividad de los antibióticos.

Se observó que la determinación de la CIM fue en todos los casos algo superior a los valores a partir de los cuales se obtuvieron las mutantes resistentes. Fue comprobada la independencia de las cepas aisladas a los antibióticos (crecimiento normal en medio con y sin el antibiótico).

En la evaluación de la nodulación y eficiencia de las cepas salvajes y mutantes (cuadro 4 y 5), se apreció nodulación abundante, con escasas diferencias entre las cepas salvajes y las derivadas resistentes a uno o dos antibióticos (20 tratamientos no presentaron diferencias entre sí). Ninguna cepa perdió la capacidad de nodulación, a diferencia de lo observado por Zelazna-Kowalska (1971). La velocidad de aparición de los primeros nódulos tampoco fue alterada: 21 días en promedio para las cepas salvajes, 20 días para las mutantes con una y dos resistencias.

En la evaluación de la materia seca se aprecia que tres cepas se comportaron igual que el testigo nitrogenado: RCA₅ St Ge (2) RCM₃ y RCA₅ St Ge (1). Dos de ellas son mutantes con dos resistencias y la RCM₃ es nativa y se comportó como muy eficiente con el ecotipo local de alfalfa (Frioni y Boaglio, 1986), y en la variedad Scatamburlo acumuló mayor nivel de materia seca, entre 20 cepas de *R. meliloti* (Frioni, Olmedo, 1982). Estas tres cepas superaron, en promedio, 113% en relación al testigo.

Luego las diferencias son menos marcadas, como era de esperar en un ensayo con alto número de tratamientos. La distribución de las mutantes con una y dos marcas fue muy homogénea a través de la experiencia. Aparentemente la resistencia a antibióticos y la capacidad para fijar nitrógeno no están relacionados y las cepas resistentes a altas concentraciones mantienen las propiedades simbióticas de las cepas salvajes. Hecho evidenciado por Gollobin y Levin (1974).

Se verificó la estabilidad genética de las mutaciones, que crecieron normalmente a las concentraciones de antibióticos en las que fueron aisladas, al ser reaisladas en este ensayo.

CONCLUSIONES

Las cepas salvajes y las mutantes resistentes a estreptomycin presentaron resistencia natural alta a los antibióticos en estudio, reflejando la presencia de microorganismos productores de estos antibióticos en los suelos donde fueron aisladas.

Se obtuvieron mutantes naturales resistentes a uno y dos antibióticos: a 600 µg/ml de espectinomicina, aproximadamente 100 µg/ml para cloranfenicol y kanamicina, mientras que sólo se lograron mutantes resistentes a 8 µg/ml de gentamicina.

La frecuencia de mutación fue superior para mutantes con una marca. Las mutantes fueron en todos los casos independientes del antibiótico.

Ninguna cepa perdió su capacidad de nodulación ni de fijación biológica del nitrógeno, por lo que son recomendadas para trabajos de competencia y sobrevivencia en los suelos.

Agradecimientos

A Sonia Cavaignac y a María C. de Franzoni por la provisión de cepas resistentes a estreptomycin y de algunos antibióticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Antoun, H.; L. M. Bordeleau y D. Prevot 1982 Strains identification in *Rhizobium meliloti* using the antibiotic disk susceptibility test. *Plant and Soil* 66: 45-50.
2. Brockwell, J; E.A. Schwinghamer y R.R. Gault 1977 Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. V-A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 9: 19-24.
3. Cole, M. y G. Elkan 1973. Trasmissible resistance to Penicillin G, Neomycin and Chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 4: 248-253.
4. Döbereiner, J.: M.R.MM.L. Scotti; N.M.H.S.Ä. y M.A.T. Vargas 1982 resistance to streptomycin of *Rhizobium* isolates from Cerrado and Amazon soils. En: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation* Proc. fourth Intern. Symp. on Nitrogen Fixation, Canberra, Australian Acad. of Sci., Canberra: 434 pág.
5. Frioni, L. y C. Olmedo. 1982 Estudio de cepas de *Rhizobium meliloti* en alfalfa. *Rev. UNRC* 2 (2): 245-249.
6. Frioni, L. y a. M. Boaglio 1986. Simbiosis rizobio-alfalfa. *Rev. UNRC* 6 (1): 53-58.
7. Gollobin, G. S y R.A. Levin 1974 Streptomycin resistance in *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* 101: 83-90.
8. Josey, D.P.; J. L. Beynon; A.W.B. Johnston y J.E. Beringer 1979 Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 46 (2): 343-350.

9. Kiser, J. S.; G.O. Gale y G.A. Kemp 1969. Resistance to antimicrobial agents. *Ad. App. Microbiol.* 11: 77-100.
10. Kuykendall, L. D. y D. F. Weber 1978. Genetically marked *Rhizobium* identifiable as inoculum strains in nodules of soybean plants grown in fields populated with *Rhizobium japonicum*. *App. Env. Microbiol.* 36 (6): 915-919.
11. Meyer, M. C. y S. G. Pueppke 1980. Differentiation of *Rhizobium japonicum* strains derivates by antibiotic sensivity patterns, lectin binding and utilization of biochemicals. *Can. J. Microbiol.* 26: 606-612.
12. Obaton, M. 1971. Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D* 272: 2630-2633
13. Pain, A.N. 1979 Symbiotic properties of antibiotic resistance and auxotrophic mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. App. Bacteriol.* 47: 53-64.
14. Pankhurst, C.E. y A.S. Craig 1979 Morphology and nitrogenase activity of agar cultures and root nodules formed by D-cycloserine resistant mutants of *Rhizobium* sp strains 32 HL. *J. Gen. Microbiol.* 110: 117-184.
15. Schmidt, E.L. 1978. Ecology of the legume root nodule bacteria. En: *Interactions between non pathogenic soil microorganisms and plants*. Domergues y Krupa (eds), Elsevier, Amsterdam: 269-303.
16. Snedecor, G. W. y W. G. Cochran 1977. *Métodos estadísticos*. Cia. Editorial Continental, Méjico.
17. Vincent, J. 1975. *Manual Práctico de Rizobiología*. Ed. Hemisferio Sur., Buenos Aires.
18. Zelazna-Kowalska, I. 1971 Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil, special Vol*: 67-71.

Cuadro No. 1

Procedencia de las cepas y hospedante

SB ₂	Aislamiento en la zona de San Basilio (Cba), <i>Medicago sativa</i>
RCM ₃	Aislamiento a orillas del Río Cuarto (Cba). <i>Melilotus alba</i>
RCA ₅	Aislamiento en Frigorífico AIMAR(R. Cuarto), <i>Medicago sativa</i>
B ₃₁₀	INTA, Castelar, originaria de CSIRO, Australia, CC8
116	Instituto de Pesquisas Agronómicas, P. Alegre, originaria ED 024 USA, <i>Melilotus officinalis</i> .

CUADRO Nro. 2
Antibiograma de las cepas salvajes y derivadas*
Concentración inhibitoria (CIM) en µg/ml

Cepa Anti- biot.	SB ₂ St.	116 St.	RCM ₃ St.	B310 St.	RCA ₅ St.	SB ₂	116	RCM ₃	B310	RCA ₅
Ka	100	150	100	200	100	100	100	100	150	100
Ge	50	50	25	75	50	75	75	75	50	75
Sp	700	700	900	900	700	900	900	900	700	700
Cl	150	400	150	400	200	200	100	150	400	150
St	3000	3000	3000	3000	1200	3000	2500	700	1200	1200
Ri	40	200	40	150	40	40	250	40	40	40

*Control: E.coli C 137 No creció en ningún caso

CUADRO Nro. 3
Obtención de mutantes resistentes naturales

Antibiótico/ Cepa	EMA con antibiótico (µg/ml)/ Nº de colonias/ml	Frecuencia de mutación
Ka	80 100 150 200	2,4.10 ⁹
	+++ 40* 0 0	
B ₃₁₀ St	1500* 0 0 0	9,0.10 ⁷
Cl	100 200 150 1000	1,4.10 ¹⁰
	330* 40 0 0	
RCM ₃₁₀ St	675* 5 0 0	8,0.10 ⁹
RCM ₃₁₀	150 300 450 600 800	5,0.10 ⁹
	+++ +++ +++ 590* 0	
SB ₂ St	+++ +++ +++ 545* 0	6,0.10 ⁸
SB ₂	0,5 2 4 6 8 15	1,0.10 ¹¹
RCA ₅	+++ +++ +++ +++ 30* 0	
Ge	+++ +++ +++ +++ 290* 0	5,0.10 ¹⁰
RCA ₅		

Control: E.coli C 137: no creció en ningún caso

* concentraciones a partir de las cuales se aislaron las mutantes resistentes naturales

+++ crecimiento confluyente

CUADRO Nro. 4
Nodulación de las cepas salvajes y derivadas*

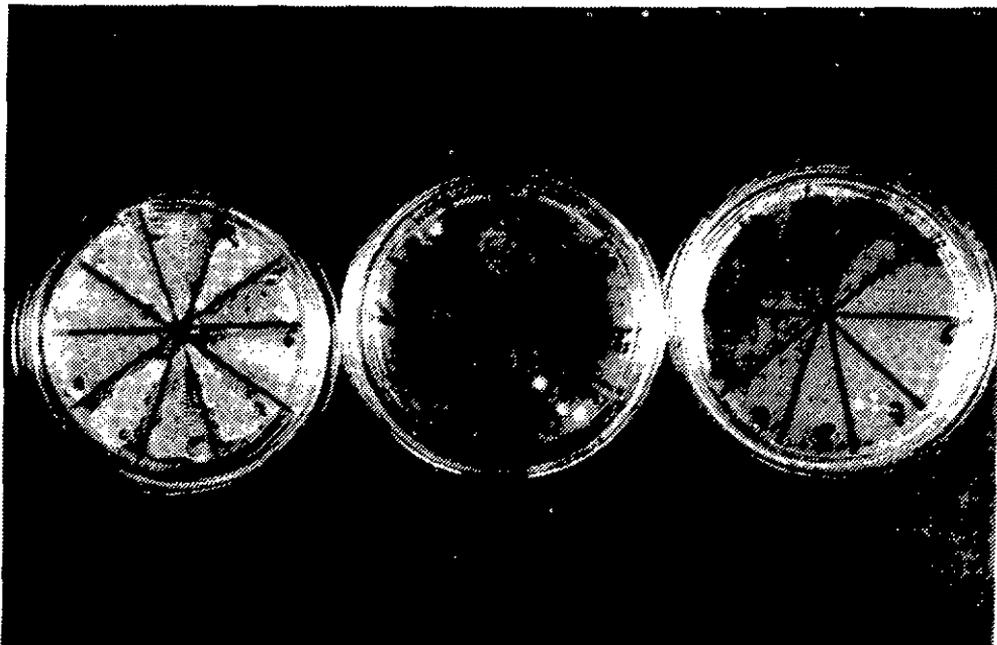
Tratamiento	Promedio de nódulos/tubo
B ₃₁₀ Ka(3)	13,25
B ₃₁₀ St Ka(2)	13,18
B ₃₁₀ Ka(2)	12,04
SB ₂ Sp(2)	11,90
SB ₂ St Sp(3)	11,90
SB ₂ St Sp(2)	11,16
SB ₂ Sp(3)	11,90
RCM ₃ St Cl(3)	10,89
B ₃₁₀ St Ka(1)	9,86
B ₃₁₀ St Ka(3)	9,80
RCA ₅ Ge(3)	9,73
SB ₂ St Sp(1)	9,49
SB ₂ Sp(1)	9,49
B ₃₁₀ Ka(1)	9,12
B ₃₁₀	8,70
RCA ₅ Ge(2)	8,53
RCM ₃ St Cl(1)	7,73
SB ₂	7,67
RCA ₅ St Ge(3)	7,62
RCM ₃ Cl(3)	7,13
RCA ₅ St Ge(1)	6,97
RCA ₅ Ge(1)	6,81
RCM ₃	6,30
RCA ₅	6,30
RCM ₃ St Cl(2)	6,25
RCM ₃ Cl(2)	5,38
RCA ₅ St Ge(2)	4,80
RCM ₃ Cl(1)	4,41

* Dos o más tratamientos subrayados por la misma línea no presentan diferencias por Duncan al 5%.

CUADRO Nro. 5
Eficiencia de las cepas salvajes y derivadas*

Tratamiento	Peso seco de la parte aérea (mg/tubo)
Nitrógeno	32,67
RCA ₅ St Ge(2)	27,96
RCM ₃	27,06
RCA ₅ St Ge(1)	25,79
SB ₂ St Sp(3)	21,91
B ₃₁₀ St Ka(3)	21,87
RCM ₃ Cl(1)	21,46
SB ₂ Sp(2)	21,39
RCM ₃ St Cl(2)	20,76
RCM ₃ St Cl(3)	19,76
RCM ₃ Cl(2)	19,36
B ₃₁₀ Ka(3)	18,79
RCA ₅	18,42
B ₃₁₀	18,15
SB ₂	18,07
B ₃₁₀ St Ka(2)	17,82
RCA ₅ Ge(3)	17,71
RCA ₅ Ge(1)	17,49
RCM ₃ Cl(3)	17,42
B ₃₁₀ Ka(2)	16,76
SB ₂ St Sp(2)	16,47
SB ₂ Sp(3)	16,31
B ₃₁₀ St Ka(1)	15,99
B ₃₁₀ Ka(1)	15,99
RCM ₃ St Cl(1)	14,56
RCA ₅ Ge(2)	13,90
RCA ₅ St Ge(3)	13,62
SB ₂ St Sp(1)	13,55
Testigo	12,67
SB ₂ Sp(1)	12,42

* Dos o más tratamientos subrayados por la misma línea no presentan diferencias por Duncan al 5%.

Foto No. 1 - Resistencia natural de las cepas a rifampicina0 $\mu\text{g/ml}$ 150 $\mu\text{g/ml}$ 200 $\mu\text{g/ml}$ 1 - SB₂St

2 - 116 St

3 - RCM₃St4 - RCA₅St5 - B₃₁₀St6 - SB₂

7 - 116

8 - RCM₃9 - RCA₅10 - B₃₁₀