

Identificación y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* en la Provincia de Santa Elena. (Avance de investigación)

Blgo. Javier Soto Valenzuela ⁽¹⁾, Gabriela Carolina Borbor T. ⁽²⁾, Verónica Borbor D. ⁽³⁾.

Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) ⁽¹⁾
Facultad Ciencias Agrarias ^(2,3)
Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE)
Campus La Libertad, vía principal Santa Elena-La Libertad
La Libertad-Ecuador
jsotovalenzuela@yahoo.com

Resumen

*En los sistemas agrícolas de subsistencia, el nitrógeno es un macronutriente esencial para el buen desarrollo de las plantas; es utilizado en forma de nitrato o amonio. Las bacterias del género Rhizobium poseen la capacidad de fijar el nitrógeno, mediante una relación de simbiosis con leguminosas e influyen en la producción de sustancias promotoras de crecimiento en las plantas no leguminosas. En la península de Santa Elena no existen evidencias del uso y aplicación de biofertilizantes de origen microbiano nativo, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar y seleccionar cepas del género Rhizobium procedentes de los nódulos de leguminosas de dos zonas de la provincia de Santa Elena. Los experimentos **Aislamiento, identificación y caracterización bioquímica de cepas de Rhizobium encontradas en diferentes zonas de la península de Santa Elena** comprende: a) Estudio de la morfología nodular de leguminosas; b) Presencia de la enzima Leghemoglobina en los nódulos, c) Aislamiento de microorganismos de los nódulos de leguminosas, d) Respuesta de la enzima catalasa ante el peróxido de hidrógeno, e) Crecimiento en diferentes fuentes de carbono, f) Crecimiento en tres porcentajes cloruro de sodio; y e) Producción de 3-ketolactasa en agar LLA para descartar contaminantes frecuentes como Agrobacterium.*

Palabras claves: *Rhizobium*, fijación de nitrógeno, biofertilizante, cultivo de leguminosas, promotores de crecimiento.

Abstract

In subsistence farming systems, nitrogen is a macronutrient essential for good plant growth, is used in the form of nitrate or ammonium. Rhizobios bacteria have the ability to fix nitrogen through a symbiotic relationship with legumes and influence the production of growth promoting substances in non-leguminous plants. In the peninsula of Santa Elena there is no evidence of the use and application of native microbial biofertilizers, so this work is to characterize and select strains of Rhizobium from the nodules of legumes in two areas of the province of Santa Elena. Experiments Isolation, identification and biochemical characterization of Rhizobios strains found in different areas of the peninsula of Santa Elena comprising: a) Study of the legume nodule morphology, b) presence of the enzyme in the lymph Leghemoglobin, c) Isolation of microorganisms the nodules of legumes, d) response of the enzyme catalase to hydrogen peroxide, e) Growth in various sources of carbon, f) Growth in three percentages sodium chloride, and e) Production of 3-ketolactasa LLA agar to rule out common contaminants such as Agrobacterium.

Keywords: *Rhizobium*, Nitrogen fixation, biofertilizer, agricultural legumes, growth promoters.

1. Introducción

El uso del suelo y los sistemas de explotación causan impactos en los organismos vivos del suelo. Los procesos tienen consecuencias sobre la productividad a largo plazo, la fertilidad, estructura, erosión y otros indicadores de la calidad del suelo. A su vez, la biota del suelo y sus interacciones desempeñan un importante papel en el éxito de cualquier decisión de gestión. Por ejemplo, el cultivo intensivo monoespecífico puede afectar negativamente al funcionamiento de la biota edáfica, conduciendo a una pérdida de nutrientes y de la estructura de los agregados del suelo, la contaminación ambiental y la disminución de los rendimientos en las cosechas (1).

Por otra parte, el nitrógeno es muy abundante en la atmósfera; sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso clave en la biosfera, por el cual los microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. El grupo de bacterias que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio (2).

Desde hace algún tiempo el interés por estudiar *Rhizobium* ha ido aumentando, pues existe la posibilidad de utilizarlo como biofertilizante. Además se conoce que el uso de fertilizantes químicos nitrogenados ha ocasionado un aumento de la contaminación ambiental, pues el fertilizante no utilizado por la planta acaba en lagos o lagunas (3).

Las poblaciones microbianas rizosféricas son capaces de ejercer efectos específicos sobre el crecimiento vegetal como la producción de fitohormonas, disoluciones y mineralización de fosfatos, FBN y producción de sideróforos y antibióticos (4).

En la península de Santa Elena no existen evidencias del uso y aplicación de biofertilizantes de origen microbiano, empleando cepas nativas fijadoras de nitrógeno y generadoras de compuestos benéficos a las plantas y que estén a disponibilidad de los agricultores, pues las cepas aisladas para este fin han sido a partir de los estudios en otras localidades ajenas a la realidad edafoclimática de la región.

En los últimos años las investigaciones sobre la comunidad microbiana endófitas, se han centrado en especies de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno molecular en plantas de interés agrícola, por la importancia que esto tiene en la nutrición nitrogenada de los cultivos y se han publicado

numerosos trabajos relacionados con la comunidad endófitas en gramíneas. En las variedades estudiadas se ha informado de la presencia de microorganismos endófitos fijadores de nitrógeno, que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y la productividad del cultivo con la consecuente reducción de fertilizantes químicos (5).

El presente trabajo se realizó con el fin de aislar e identificar cepas nativas de *Rhizobium* a partir de plantas leguminosas de tres zonas de la península de Santa Elena; esto permitirá realizar estudios posteriores sobre selección de cepas capaces de fijar nitrógeno (en leguminosas conocida como fijación biológica de nitrógeno FBN) y, mediante la aplicación de Biofertilizantes (Inoculantes Microbianos), promover el crecimiento y/o proteger cultivos agrícolas.

2. Materiales y métodos

Para el estudio de las bacterias tipo *Rhizobium*, fue necesario realizar experiencias en el campo y laboratorio, con el fin de obtener nódulos de las raíces de leguminosas y aislar las colonias con características fenotípicas y bioquímicas determinadas por los protocolos establecidos actualmente.

Lugares de muestreo: Centros de Producción y Prácticas Rio Verde y Manglaralto de la UPSE, ubicados en el cantón Santa Elena.

2.1. Aislamiento e identificación bioquímica de cepas de *Rhizobium* encontradas en diferentes zonas de la Península de Santa Elena.

2.1.1. Estudio de la morfología nodular de leguminosas.

a) Presencia y peso promedio de los nódulos. Las leguminosas muestreadas en Rio Verde fueron *Phaseolus vulgaris* L. (frejol vainita); *Cajanus cajan* (frejol de palo) y *Vigna sp.*(tumbe). En Manglaralto, un solo tipo de leguminosa, *Cajanus cajan* (frejol de palo) que está asociada con *Coffea canephora*. Se logró ubicar 321 nódulos en total, con un peso total de 182,78 gramos y 0,56 gramos de peso promedio por nódulo. Cabe destacar la presencia de mayor peso nodular en las raíces de leguminosas de Manglaralto (cuadro 1).

b) Presencia de la enzima Leghemoglobina en los nódulos.

Los nódulos de las leguminosas muestreadas (figura 1) fueron procesados en el laboratorio de Biología de la Universidad Estatal Península de Santa Elena. La coloración roja-rosada (observada en fresco) indica presencia de la Leghemoglobina, a su vez indicativo de actividad bacteriana en el test de Gram de los nódulos macerados inmediatamente.

Cuadro 1: Características morfológicas de las bacterias consideradas sospechosas de *Rhizobium*.

Aislados	Coloración de UFCs				Morfología de las colonias			
	Blancas	Amarillas	Transp.	Rosadas	Borde	Altura	Forma. Bact.	Gram
VAI RV 1	52%	2%	10%	0	Irregular	Convexa	Bacilos	50% -
FP RV 1	30%	7%	0.3%	0.6%	Irregular	Pulminada	Bacilos	50% -
TUMRV 1	52%	3.6%	0.3%	0	Regular	Pulminada	Bacilos	30% -
FP MG 1	50%	50%	0	0	Regular	Convexa	Bacilos	90% -
FP MG 2	60%	4%	35%	1%	Irregular	Convexa	Bacilos	80% -
FP MG 3	20%	0	0	80%	Irregular	Convexa	Bacilos	90% -
FP MG 4	60%	0	0	40%	Irregular	Convexa	Bacilos	70% -
FP MG 5	60%	0	0	40%	Irregular	Convexa	Bacilos	30% -



Figura 1: Presencia de la enzima leghemoglobina en los nódulos de color rojo.

c) Aislamiento de microorganismos de los nódulos de leguminosas. Para aislar bacterias tipo *Rhizobium*, se empleó el medio de cultivo ELMARC, macerando los nódulos con coloración roja-rosada; luego, sembradas en cajas petri por agotamiento e incubando a 25^o C por 72 horas (5), con tres repeticiones.

En este experimento se diferencian colonias o aislados con altura convexa, pulminada o cónica y con coloraciones desde blanco opaco, hasta translucido acuoso. Los contaminantes comúnmente son de color rojo oscuro.

Además, se realizaron tinciones de Gram de las colonias escogidas (colonias blancas, transparentes y amarillentas) (figura 2 B).

Se descartó las colonias que presenten menos del 50% de colonias de color blancas-transparentes. Para fines de control se siguió trabajando con todas las cepas.

2.2. Caracterización bioquímica de cepas de *Rhizobium* encontradas en diferentes zonas de la Península de Santa Elena. Luego de la identificación observada en los aislados de los nódulos de las leguminosas del campus Rio Verde, en cuanto a su morfología (bacilos), tipo de pared celular Gram negativos (figura 2A), y crecimiento en medio específico (ELMARC), descritos por la ciencia, se procede a verificar las características bioquímicas como: respuesta de la enzima catalasa, crecimiento en

glucosa peptona agar purpura de bromocresol (GPA), producción de ácido o álcali, Producción de 3-ketolactosa en el agar levadura-lactosa (LLA), crecimiento en diferentes fuentes de carbono y a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (5, 6).



Figura 2: Características morfológicas de las bacterias consideradas sospechosas de *Rhizobium*.

c) Respuesta de la enzima catalasa sobre el peróxido de hidrógeno. El agua oxigenada es utilizada en la detección de una enzima bacteriana presente en la mayoría de las bacterias. Es otra prueba que permite la identificación bacteriana.

La enzima catalasa presente en muchas especies bacterianas, desdobra al peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en hidrógeno y oxígeno libre, detectado por la formación de burbujas de aire en contacto con las colonias (figura 3).

Se depositó una colonia sobre una placa de vidrio limpia y seca que contiene una gota de agua oxigenada al 10%, observando un burbujeo, debido a la degradación de H₂O₂ dando reacción positiva a la catalasa.

Todas las muestras aisladas presentaron reacción positiva.

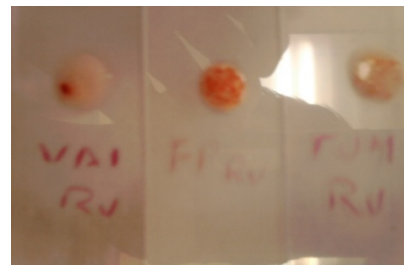


Figura 3: Reacción de la enzima Catalasa en los aislados.

a) Crecimiento en el agar peptona-glucosa o PGA y producción de ácido o álcali. Se sembraron los cultivos en medio PGA (peptona: 10,0 g/L, glucosa: 5,0 g/L, agar: 15,0 g/L, púrpura de bromocresol 1,0% en etanol: 10,0 mL/L, pH: 6,7) y se incubaron a 28 °C por cinco días (cuadro 2).

El crecimiento acompañado con un cambio de pH indica la presencia de un contaminante, porque los *Rhizobios* no crecen en este medio. Los resultados de esta prueba permiten ubicar a los *Rhizobios* como ácido o álcali productores (6). De lo cual se deduce que los aislados TUM RV, FP MG1, FP MG2, FP MG3, FP MG4 y FP MG5 son ácido productoras (figura 4).

Cuadro 2: Características ácido/álcali/neutro de las bacterias consideradas sospechosas de *Rhizobium*, sembradas en medio PGA.

AISLADO	CRECIMIENTO			PRODUCCION DE ACIDO (Color amarillo)			PRODUCCION DE ÁLCALI (Color purpura-azul)			SIN CAMBIO (Color normal del medio)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
VAI RV 1	no	no	no	no	no	Ligero	no	no	no	si	si	si
FP RV 1	poco	si	si	no	no	si	no	no	no	si	si	no
TUM RV 1	si	si	no	no	no	no	no	no	no	si	si	no
FP MG 1	si	si	si	no	no	no	no	no	no	si	si	si
FP MG 2	poco	si	si	si	no	si	no	no	no	no	si	no
FP MG 3	si	si	si	Ligero	no	si	no	no	no	no	si	no
FP MG 4	si	si	poco	no	no	no	no	no	no	si	si	si
FP MG 5	si	si	poco	no	si	si	no	no	no	si	no	no
Testigo Sin inocular	no	no	no	no	no	no	no	no	no	si	si	si
Testigo agua destilada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

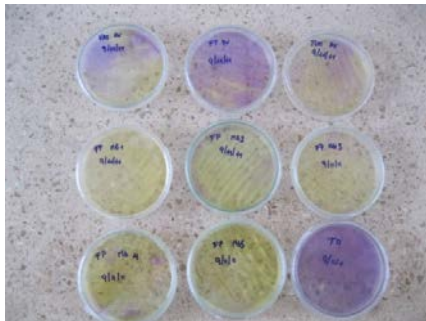


Figura 4: Crecimiento en PGA y producción de ácido (amarillo), álcali o neutro.

c) Producción de 3-ketolactosa en el agar levadura-lactosa o LLA: Se sembraron los aislados en medio LLA (levadura, lactosa, agar) y se incubaron a 28 °C hasta lograr un buen crecimiento de las colonias. Luego se cubrieron las cajas con 15 mL de reactivo de Benedict durante diez minutos. La formación de un color amarillo después de este lapso indica la presencia de *Agrobacterium sp.*, un contaminante frecuente capaz de inducir la nodulación pero no de fijar el nitrógeno en las plantas (7). Se sembraron las ocho cepas aisladas en medio LLA, sin que ninguna cambie de color (figura 5).



Figura 5: Prueba de producción de 3-ketolactosa negativa en medio LLA, para verificar contaminantes como *Agrobacterium sp.*

c) Crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): Fueron sembrados todos los aislados con diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 con asa de platino calibrada de 2 μ L (de bacteria), se tomó 5 μ L de cada dilución con tres repeticiones, obteniendo nueve unidades experimentales por cada cepa. Sembradas en medio ELMARC al 2% (cuadro 3), 3% (cuadro 4) y 5% (cuadro 5) de NaCl respectivamente. Incubadas a 27° C durante seis días y confirmadas con test de Gram.

Cuadro 3: Crecimiento de las bacterias al 2% de cloruro de sodio (NaCl): Ausencia: 1; Presencia:2.

AISLADO	2% Na Cl Dilución 10^1			2% Na Cl Dilución 10^2			2% Na Cl Dilución 10^3			Testigo Sin inocular
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
VAI RV 1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2
FP RV 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
TUM RV 1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
FP MG 1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2
FP MG 2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
FP MG 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 5	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2

Cuadro 4: Crecimiento de las bacterias al 3% de cloruro de sodio (NaCl): Ausencia: 1; Presencia:2.

AISLADO	3% Na Cl Dilución 10^1			3% Na Cl Dilución 10^2			3% Na Cl Dilución 10^3			Testigo Sin inocular
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
VAI RV 1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2
FP RV 1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2
TUM RV 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2
FP MG 2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2
FP MG 3	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
FP MG 4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2

Cuadro 5: Crecimiento de las bacterias al 5% de cloruro de sodio (NaCl): Ausencia: 1; Presencia: 2.

AISLADO	5% Na Cl Dilución 10^1			5% Na Cl Dilución 10^2			5% Na Cl Dilución 10^3			Testigo Sin inocular
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
VAI RV 1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
FP RV 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
TUM RV 1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
FP MG 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
FP MG 5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2

Los resultados obtenidos son parciales y deben ser evaluados y tabulados en matrices para su respectivo análisis estadístico.

La identificación y caracterización del género *Rhizobium* continuará con varias pruebas como: velocidad de crecimiento, tolerancia a metales pesados y prueba Anti-mic con tres tipos de herbicidas,

plaguicidas y antibióticos con el fin de obtener cepas bacterianas resistentes al uso y empleo de estos productos en los cultivos agrícolas de la península de Santa Elena y su influencia.

Debido a lo incipiente del cultivo de leguminosas en la zona, existe cierta dificultad en obtener nódulos con las bacterias de interés, habiendo realizado varios muestreos en fincas de productores de cultivos agrícolas ubicadas en las comunas de Atahualpa, San Marcos y La Aguadita; no se han obtenido resultados satisfactorios.

Los aislados obtenidos se siguen manteniendo en condiciones de laboratorio a 27⁰ C; cambiando de medio cada 6 a 7 días.

3. Bibliografía

1. Caballa A., Iribarren I., Fernández-Cantelli P. comps.2005. Protección del suelo y Desarrollo sostenible. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España. Serie Medio Ambiente No.6. Graficas Chile. Madrid-España. 260 p.
2. Tao-Wang E, Martínez J., López I. (s.a) El nitrogeno y su destacada simbiosis con las plantas. En línea. Consultado el 10 enero 2012. Disponible en <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>
3. Carranza C. 2004. Aislamiento e Identificación de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli, de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en los Departamentos de Jutiapa y Chimaltenango. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
4. Reyes I., Álvarez L., El-Ayubí H. y Valery A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Revista Bioagro 20 (1): 37-48.
5. Ferrera R. et.al 1993. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas S.A. México. 142 p.
6. García J. C. et al 2008. Obtención de un nuevo método de desinfección de semillas de arroz. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) Cuba. Revista Cultivos Tropicales. (29), No. 4: 55-59.
7. Cuadrado B., Rubio G. y Santos W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Revista Colombiana Ciencia Química y Farmacia (38) 1: 78-104.

Bibliografía no referenciada

1. Bécquer C. 2004. Descripción y Clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. Revista Biología (18) No.1: 9-29.
2. Lloret L., Martínez E., 2005. Evolución y Filogenia de *Rhizobium*. Revista Latinoamericana de Microbiología (47), No. 1-2: 43-60 p.
3. López R., González L. y Ramírez R. 2000.
4. Moreno L. 2010: Caracterización de las cepas ICA L9 E ICA J96, de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y pruebas de estabilidad de inoculantes elaborados para cultivos de arveja y soya. Tesis de grado para optar por el título de Máster en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Bogotá, D.C. Colombia.
5. Nogales B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. Asociación Española de Ecología Terrestre. Revista Ecosistemas 14 (2): 41-51.
6. Santillana N. et.al 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. Revista Ecología aplicada (4) N° 1: 47-51.