

Aislamiento e Identificación de Cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de Suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León.

Isolation and identification of native strains of Rhizobium phaseoli in soil of the dam of the youth of Marin, Nuevo León.

Jorge Miguel Saldaña Acosta

Carrera de Química área Tecnología Ambiental, Universidad Tecnológica Gral. Mariano Escobedo.

3010jmsa@gmail.com

Resumen

En la actualidad el lento desarrollo de la producción de alimentos y fibras, frente a un aumento constante de la población mundial, ha traído como consecuencia la necesidad de establecer programas dinámicos y efectivos que promuevan la utilización más eficiente y sustentable de los recursos del campo, y así aprovechar al máximo su explotación con un inherente aumento en la producción agrícola.

Una de las alternativas con alto potencial en la fertilización del suelo de manera sustentable es la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico que se asocian simbióticamente con leguminosas, de éstas la relación más importante es con el género *Rhizobium*.

Con la finalidad de obtener Cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* eficientes para la fijación de Nitrógeno atmosférico para el cultivo de Frijol, se colectaron muestras de suelo de la presa de la juventud en Marín, Nuevo León, el cual se utilizó como inoculante para plántulas de Frijol. Se aislaron cuatro cepas de *Rhizobium* (JM-1;JM-2;JM-3 y JM-4) infectivas y efectivas para nodular en la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (Frijol).

Palabras clave: *Rhizobium*, Fijación Biológica, Nitrógeno, Leguminosas.

Abstract

Today the slow development of the production of food and fibre, with a steady increase of the world population, has resulted in the need to establish dynamic and effective programs that promote more efficient and sustainable resources for field use, and thus make the most their exploitation with an inherent increase in agricultural production. One of the alternatives with high potential in the fertilization of the soil in a sustainable way is the use of fixing bacteria of atmospheric nitrogen associated symbiotically with legumes, of these the most important relationship is with the genus *Rhizobium*.

We collected soil samples from the dam of youth in Marin, Nuevo León, which was used as inoculum for bean seedlings. Isolated four strains of *Rhizobium* (JM-1; JM-2; JM-3 and JM-4) infective and effective for nodular in the legume *Phaseolus vulgaris* (bean).

Key words: *Rhizobium*, biological fixation, nitrogen, legumes.

Fecha Recepción: Agosto 2016

Fecha Aceptación: Diciembre 2016

Introducción

En la actualidad el lento desarrollo de la producción de alimentos y fibras, frente a un aumento constante de la población mundial, ha traído como consecuencia la necesidad de establecer programas dinámicos y efectivos que promuevan la utilización más eficiente y sustentable de los recursos del campo, y así aprovechar al máximo su explotación con un inherente aumento en la producción agrícola.

Una de las alternativas con alto potencial en la fertilización del suelo de manera sustentable es la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico que se asocian simbióticamente con leguminosas, de éstas la relación más importante es con el género *Rhizobium*.

Justificación: Esta bacteria posee la habilidad de penetrar en los pelillos radiculares de las leguminosas e inducir la formación de nódulos y una vez allí reduce el Nitrógeno atmosférico a amonio (NH_4^+) (una de las formas mejor asimilable por la mayoría de las plantas; Alexander, 1980). La simbiosis *Rhizobium* – leguminosas es interesante debido a disminuye el uso de fertilizantes nitrogenados químicos, su aplicación tiene bajo costo y mantiene una buena

fertilidad del suelo. Mediante el uso de cepas compatibles con su hospedero homólogo en el campo, nos permite aprovechar al máximo el potencial de la interacción *Rhizobium* - leguminosa. Incrementar la producción agrícola de manera sustentable a través del uso de biofertilizantes para mejorar la calidad del suelo y reducir el impacto negativo de la fertilización química en el ambiente, producir de una manera sustentable, conservando así los recursos naturales (FAO, 2011).

Hipótesis: Los microbios son organismos cosmopolitas y los rizobios son microorganismos que forman nódulos radiculares en plantas leguminosas, de suelos con presencia de leguminosas es posible aislar rizobios competentes para nodular frijol.

Antecedentes: Del total de la superficie del planeta solo el 13% es apta para producir alimentos (cultivable) y debido a que la tasa de crecimiento de la producción agrícola ha disminuido en los últimos años por diversas causas: la explotación excesiva e irracional de los suelos cultivables ha ocasionado pérdida de la diversidad biológica, disminución de los recursos forestales, erosión del suelo, cambios climáticos, etc. Situación que ha generado graves problemas ecológicos, económicos y sociales.

La producción de alimentos en los agroecosistemas, está sujeta entre otros factores a las condiciones del suelo, la disponibilidad y aporte de nutrientes en forma natural y/o externa a través de insumos de síntesis industrial; este tipo de fertilización es poco viable desde el punto de vista económico y ambiental.

El uso inadecuado de los fertilizantes de síntesis industrial ha generado un desbalance en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno que conlleva a la degradación de suelos, la eutrofización de ecosistemas acuáticos y la emisión de gases de efecto invernadero con consecuencias sobre el cambio climático (Altieri, Funes y Peterson, 2012; Roekström *et. al.*, 2009).

Diversos estudios demuestran que aproximadamente el 60 % de los fertilizantes de síntesis química se pierde por lixiviación, volatilización y escorrentía que impacta negativamente el agua por NO₂ y NO₃ y el aire por dióxido de nitrógeno (NO₂) (Raun y Johonson 1999, Glass 2003; Davidson *et. al.* 2012).

Uno de los requerimientos más importantes para lograr soluciones de producción adecuadas es el mantenimiento de la fertilidad del suelo de una manera sustentable.

El nitrógeno (N_2) es quizás el nutriente más importante y limitante en el agrosistema debido a su participación en múltiples reacciones bioquímicas implicadas en el desarrollo crecimiento y producción de cultivos (Rao, 2009).

Desde tiempos muy antiguos se han empleado las leguminosas para mejorar el suelo, representan un gran recurso en la alimentación humana; son cultivadas en todo el mundo tanto en regiones tropicales como en zonas templadas; poseen un alto contenido de proteínas en los granos secos (17 – 25%) y desde el punto de vista energético resulta más económico consumir las leguminosas que son por un lado una fuente económica de proteínas y por otro lado un suministro adicional de fibra dietética (FAO, 1995; Freire J. R. J. 1977; Serrano y Cano 2007).

En México la tecnología de la biofertilización no es conocida por la mayoría de los productores, a pesar de que tiene cientos de años aplicándose y es por ello que no se practica.

La necesidad de disminuir el uso de agroquímicos para aumentar la respuesta de la agricultura en la alimentación humana ha orientado las investigaciones hacia el desarrollo de nuevas biotecnologías como el estudio de los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, que pueden ser de vida libre ó simbiótica; como los del genero *Rhizobium* que se asocian con leguminosas (Tabla 1). Esta relación simbiótica contribuye entre el 33% a 50% del nitrógeno fijado basada en un intercambio de carbono por nitrógeno entre ambos simbioses (Cayo-García Blazquez, Marilí L.Sato, 2015).

Tabla 1 Proporción de nitrógeno atmosférico ganado por las leguminosas

| Leguminosas | Kg de N_2 fijado/Ha/año |
|-------------|---------------------------|
| Alfalfa | 125 – 335 |
| Trébol | 85 – 190 |
| Chícharo | 80 – 150 |
| Soya | 65 – 115 |
| Algarrobo | 90 – 115 |

Fuente: Alexander (1980)

Los inoculantes para leguminosas constituyen una alternativa económica no contaminante, frente a los fertilizantes nitrogenados de síntesis química al establecer una relación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* (Hamdi, 1985).

Los inoculantes más utilizados en la actualidad consisten en cultivos de rizobios incorporados en un material de soporte sólido que mantiene vivas a las bacterias durante su almacenamiento y distribución además de facilitar su aplicación (Willams, 1984).

Las ventajas de utilizar inoculantes son: menor costo de producción, con la inoculación hay un mayor rendimiento de materia seca, mayor concentración de nitrógeno y nitrógeno fijado en el suelo, no contamina por ser producto natural (Cuadro 1).

El inoculante básicamente es un producto a base de bacterias y cuando es puesto en contacto con las plantas (semillas) va a promover un aumento en el crecimiento de la planta (Cayo-García Blazquez, Marilí L.Sato, 2015).

Rhizobium sp infecta y forma nódulos en huéspedes específicos ya que la bacteria posee un plásmido grande que codifica la información requerida para infectar a la planta huésped susceptible (Rincón et. al. 2000 y Bartha 2005).

La formación del nódulo es un proceso inducido por un intercambio de señales entre los dos participantes de la interacción; sustancias con efecto nitrógeno (factores de nodulación).

Entre las leguminosas capaces de asociarse con *Rhizobium* sp están los tréboles, las judías, la alfalfa, los guisantes, el maní, la veza, etc. Estas plantas desarrollan en sus raíces nódulos que contienen internamente bacteroides o rizobios.

Cuadro 1 Ahorro de fertilizante nitrogenado en diversas rotaciones de cultivo debido al empleo de distintos abonos verdes

| Rotación | Abono Verde empleado | Valor de sustitución de fertilizante |
|--------------------------------|--|---|
| AV-Colza de primavera | Colza de otoño | 24% de las necesidades de la colza de primavera |
| AV-Patatas-Trigo-Cebada | Trébol rojo + raygrass inglés (<i>Lolium perenne</i>) | 194 Kg N/ha |
| AV-Patata-Trigo-Avena | Trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>) | 114 Kg N/ha |
| AV-Trigo-Trigo-Avena | Trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>) | 182 Kg N/ha |
| Cebada-AV-Maíz dulce | Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) | 156 Kg N/ha (100% de las necesidades del maíz dulce) |
| Cebada-AV-Maíz dulce | Veza (<i>Vicia villosa</i>) + centeno | 156 Kg N/ha (100% de las necesidades del maíz dulce) |
| Cebada-AV-Maíz dulce | Centeno | 58 Kg N/ha (37% de las necesidades del maíz dulce) |
| Maíz dulce/AV*-Sorgo forrajero | Veza (<i>Vicia villosa</i>) o Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) | Entre 78 y 140 Kg N/ha son empleados por el sorgo forrajero |

Fuente: Guzmán y Alonso, 2008

La simbiosis *Rhizobium* – leguminosa puede fijar de 24 a 584 Kg de nitrógeno por hectárea y absorber en algunos casos hasta el 90% de las necesidades de la planta (Mayz et. al. 2010; Lindström et. al. 2010); la fijación biológica de nitrógeno atmosférico contribuye a reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, a remediar los problemas de contaminación de los suelos y el agua, así como a disminuir los costos de producción de manera sustentable (Granada et. al. 2014; Yadegari y Rahmani 2010).

Para lograr el aislamiento efectivo de cepas nativas de *Rhizobium*sp a partir de nódulos aislados y desinfectados se siembran sobre medios de cultivo específicos como: Levadura Manitol Agar (LMA), Agar XLD y Hectock, Levadura Manitol Agar Rojo Congo, en LLA, etc.

Las bacterias del genero *Rhizobium*son bacilos, móviles, Gram-negativos, flagelados (1 – 6), aeróbicos miden 0.5 – 0.9 x 1.2 – 3.0 µm; sus colonias sobre agar extracto de levadura manitol rojo congo (LMA + RC) son blancas o color beige ligeramente rosadas, circulares, convexas, lisas, semitranslucidas y opacas; miden de 2 a 4 mm de diámetro a 5 días de incubación (Abd – Alla et. al. 2012).

La caracterización morfológica de las cepas de *Rhizobium* incluye las variables de velocidad de crecimiento, color, apariencia, tipo de borde y elevación de las colonias.

En la IX región de las zonas agroecológicas de precordillera andina, Chile el trébol rosado representa un 50% del total de las praderas sembradas (Ortega, 1990); otra forrajera de amplia distribución en el secano de los suelos rojos, es el trébol encantado ampliamente aceptado por los agricultores de estas áreas (Demagnet, Contreras y García 1991).

Estudios previos señalan que *Rhizobium* puede asociarse con tréboles nativos de comportamiento anual como el trébol blanco y el trébol rosado, y realizar su actividad fijadora de nitrógeno atmosférico.

Una de las leguminosas que establece asociación con bacterias simbióticas es el maní; la población bacteriana asociada con el maní es heterogénea involucra rizobios de crecimiento rápido (*Rhizobium*) como de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*). Una colección de aislamientos bacterianos obtenidos de suelos agrícolas representa una fuente potencial de numerosas cepas que podrían ser empleadas como inoculantes biológicos en la agricultura; la selección de las cepas más eficaces, así como una eficiente combinación hospedero – rizobio puede mejorar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico en estos cultivos (Popple y Carswell 1992; Nava Juárez, cols. 1997).

De acuerdo a estudios de Date 1976 sobre la relación simbiótica Rizobios – leguminosas para seleccionar cepas de *Rhizobium* a partir de aislamientos de suelo y utilizarlos para inocular cultivos de leguminosas es necesario tomar en cuenta ciertas características de los Rizobios, entre otras están: a) efectividad en la fijación de nitrógeno atmosférico; b) habilidad competitiva en la rizósfera, formación de nódulos y capacidad de sobrevivencia sin la leguminosa hospedera; c) crecimiento y sobrevivencia en el medio de soporte; d) Tolerancia a cambios de pH, Temperatura, aireación y pesticidas; e) conservación del genotipo de infectividad y efectividad.

Se conoce que la gran diversidad de condiciones que tienen los diferentes tipos de suelo como: salinidad, incremento de temperatura y acidez tal como sucede en las zonas de climas tropicales pueden disminuir la viabilidad de los microorganismos en el suelo, entre ellos *Rhizobium* y con ello reducir o anular la nodulación de leguminosas (Méndez-Castro et. al. 1977).

Aun cuando no se tenía conocimiento de las bacterias hasta que en 1683 Von Leeuwenhoek las descubrió, su utilización para estimular el crecimiento de plantas remonta siglos atrás. Teofrasto (287 a.c.) y Virgilio (30 a.c.) sugerían mezclar suelo donde se habían cultivado leguminosas con

suelo donde no se habían cultivado, para remediar sus defectos y adicionarles fuerza (Tisdale y Nelson, 1975).

Desde el siglo XVIII se inocularon hongos en plántulas de encino para incrementar la producción de trufas; esto ocurrió mucho antes de que en 1885 se acuñara el vocablo “micorriza” (Smith y Read, 1997). A fines del siglo XIX la práctica de mezclar suelo con semillas, se convirtió en un método recomendado para inocular leguminosas en los Estados Unidos; poco después Nitragin registró la primer patente para inocular plantas con bacterias del género *Rhizobium* spp. En los años 1930's y 1940's la inoculación con bacterias rizosféricas asociativas con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* fue utilizada a gran escala en Rusia y Europa del Este. Esta práctica no tuvo éxito y fue abandonada durante la segunda guerra mundial (Barea et. al. 2005; Bashan 2008).

Entre los años setenta y noventa la tierra de cultivo en el mundo creció 11% mientras que la población mundial casi se duplicó; como resultado la tierra de cultivo “per cápita” disminuyó 40% pasando de 0.43 ha a solo 0.26 ha.

En las últimas décadas se ha tomado conciencia del agotamiento de los recursos naturales debido a la sobreexplotación de los mismos. En el ámbito agrícola la meta es obtener altos rendimientos por unidad de superficie para satisfacer la creciente demanda de alimentos sin tomar en cuenta la sostenibilidad de la producción (viabilidad técnica, rentabilidad económica y sin contaminar).

Estos éxitos logrados a través de una agricultura muy ineficiente y altamente contaminante que ha ocasionado la pérdida de biodiversidad biológica, disminución de los recursos forestales, erosión del suelo, cambios climáticos, etc. Esta situación ha disminuido la superficie apropiada para la agricultura causando graves problemas ecológicos, económicos y sociales; debido a esto es necesario encontrar soluciones de producción adecuadas.

Las nuevas tecnologías deben estar orientadas a mantener la sostenibilidad del sistema mediante la explotación racional de los recursos naturales y aplicación de medidas adecuadas para preservar el ambiente.

En México la agricultura se practica en ca. 2.19×10^7 ha (SAGARPA, 2010). El consumo de fertilizantes sintéticos data desde 1950 y ha crecido ininterrumpidamente hasta llegar al consumo de 4.0×10^6 Mg/año.

Prácticamente 80% de la superficie agrícola se fertiliza en diversas dosificaciones dependiendo de la capacidad económica del productor; en la mayoría de los casos se aplican sin el rigor

técnico requerido, lo que se ha reflejado en que muchos productores apliquen cantidades exageradas e innecesarias de fertilizantes. La baja rentabilidad de la actividad agrícola impulsa la investigación para desarrollar nuevos insumos, con el fin de proveer innovaciones tecnológicas que tiendan a maximizar el ingreso; bajo estas condiciones, se presenta la alternativa de utilizar tecnologías compatibles con la actividad de los microorganismos para favorecer la nutrición de las plantas.

La importancia que tienen los microorganismos en la naturaleza y en sus relaciones con el hombre es cada día más evidente. Cuando la agricultura tiene la necesidad de adoptar medidas conservacionistas los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un papel sustancial. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa.

Los beneficios que representa el uso de microorganismos en la agricultura pueden concretarse de la siguiente manera: a) Fito reguladores, estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias. b) Biofertilizantes, incrementan el suministro de nutrientes por acción sobre los ciclos biogeoquímicos tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos; c) Mejoradores, mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables, d) Agentes de control biológico de patógenos, desarrollan fenómenos de antagonismo microbio – microbio; e) bio remediadores, eliminan productos cenobíticos tales como herbicidas, pesticidas, fungicidas; f) Mejoradores ecofisiológicos, incrementan la resistencia al estrés tanto biótico como abiótico (Bowen y Rovira 1999). En la agricultura la fijación biológica de nitrógeno representa 9.38 millones de toneladas de N_2 /Ha/año, de los cuales a través de la fijación simbiótica *Rhizobium* – leguminosa se aporta al suelo 5.46 millones de N_2 /Ha/año, que representa un 28% del nitrógeno total presente en el suelo; frecuentemente la población de Rizobios es más grande en suelos donde existe una adecuada rotación de cultivos incluyendo leguminosas y más bajas cuando no están presentes; Tuzimura y Watanabe (1959) observaron que *R. japonicum* era abundante en suelos donde hubo soya años anteriores; sin embargo Weaver et. al. (1974) no encontraron correlación entre el número de *R. japonicum* y el número de años desde que la soya fue sembrada antes en esa área o el número de veces que la soya estuvo presente en ese suelo, de igual

manera no observaron correlación entre el número de *R. japonicum* y la textura del suelo, su pH o los niveles de materia orgánica.

Material y Método:

1.- **Colección de muestras de suelo.**- La muestra de suelo fue obtenida de la presa de la juventud en el Municipio de Marín, Nuevo León a un nivel de 0 – 30 cm de profundidad, conforme a lo establecido en el numeral 7 de la norma oficial mexicana 021 SEMARNAT, 2000 y almacenado en bolsas de polietileno oscuras a una temperatura de 30 a 32 °C y baja humedad durante la realización de la investigación.

1.2.- **Análisis fisicoquímico del suelo.**- La determinación de pH, Temperatura, Humedad, contenido de Materia Orgánica se realizaron de acuerdo a la norma oficial mexicana 021 SEMARNAT, 2000 y métodos establecidos (Aguirre Cossio, 1978).

2.- **Técnica y condiciones de aislamiento de microorganismos.**-

- a) **Montaje de las jarras de Leonard.**- (Figura 1) Una botella ámbar de 800 ml de poca capacidad sin fondo, es montada sobre un contenedor inferior (reservorio) sobre la cual sella perfectamente; en esta se deposita la solución nutritiva de White (1 ml de K_2HPO_4 1 M, KH_2PO_4 1 M 1ml, $CaCl_2$ 1 M 1ml, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 M 1ml, trazas de $FeSO_4$, solución de elementos menores: H_3BO_4 2.68 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22 g, KCl 0.09 g, $NaMoO_4$ trazas, agua destilada 1000 ml, se ajusta el pH a 7.0) para plantas, la cual se hace ascender por capilaridad hacia la botella por medio de una mecha de algodón, en la botella se agregó arena sin sales (4 Kg) hasta 7 cm del borde superior; se cubre con papel el fondo abierto de la botella con arena y se esteriliza la jarra sin solución nutritiva a 121 °C por 3 h; la solución nutritiva solo se hirvió antes de adicionarla al reservorio.
- b) **Preparación de las semillas.**- Las semillas fueron sanitizadas por inmersión en $HgCl_2$ al 0.2% y lavadas de 5 a 8 veces con agua destilada estéril, antes de colocarlas en las jarras de Leonard; una vez sembradas las jarras se conservaron en invernadero a 28 °C
- c) **Inoculación de plántulas de frijol.**- Se preparó una dilución concentrada del suelo colectado para el estudio, con esta se regaron las plántulas desarrolladas en sistema hidropónico de jarras de Leonard (Figura 1) a partir de semillas de frijol sanitizadas en el momento en que presenten 2 o 3 hojas, para inducir la formación de nódulos en ellas, al aparecer los nódulos se seleccionaron aquellos que presentaron las características propias de estos, de acuerdo a su posición, forma y color.

d) **Obtención de las cepas nativas a partir de los nódulos.**- Los nódulos fueron procesados utilizando la metodología sugerida por Somasegaran y Hoben, 1985. La desinfección de los nódulos se realizó por inmersión sucesiva en alcohol al 95% por un minuto e hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril (ADE) hasta que no se perciba el olor a lejía.

Los nódulos desinfectados fueron colocados en placas Petri estériles y machacados adicionando una gota de ADE por nódulo. Muestras del machacado fueron sembradas por estría en placas conteniendo Agar Manitol Extracto de Levadura-Rojo de Congo (ELMA-RC) con la siguiente composición: K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, extracto de levadura 1.0 g, Manitol 10.0 g, Agar 18.0 g, agua destilada 1000 ml, ajustando a un pH de 6.8 – 7.0 esterilizando a 121 °C por 15 min.; se incubaron a 28°C por 2 a 10 días. Se observó diariamente el crecimiento de las colonias características de rizobios de acuerdo al manual del CIAT (CIAT, 1988).

Las colonias típicas de rizobios fueron resembradas en placas Petri con ELMA-RC en cuadrantes, se incubaron a 28°C por 2 a 10 días. Se verificó la pureza de los cultivos. Los cultivos puros aislados fueron resembrados en tubos conteniendo LMA-RC inclinado e incubados a 28°C.

3.- Selección primaria e identificación de cepas nativas de rizobios.

Los criterios empleados se basaron en Bergey's Manual, 2001; Vicent, 1975; Gibbs y Shapton, 1968 y CIAT, 1987.

Los cultivos seleccionados fueron analizados tanto en sus características macroscópicas y microscópicas y características bioquímicas. Se evaluaron el color, el diámetro, la apariencia y la forma de las colonias, la cantidad de goma producida y la textura. Se realizaron tinciones simple, de Maneval y de Gram (CIAT, 1987).

Además en cuanto a las pruebas bioquímicas se evaluó la utilización de citrato como única fuente de carbono, el crecimiento en agar peptona glucosa (PGA), en agar Luria Bertani (LLA) y agar extracto de levadura manitol (ELMA), reacción en leche litmus o formación de suero, absorción del rojo congo, resistencia a NaCl al 2%, hidrólisis de gelatina y caseína, producción de H₂S en agar sulfito bismuto, producción de la 3 cetolactosa, reacción al Biuret, Después de la incubación a 28°C, se realizaron las lecturas y se identificaron los rizobios (CIAT, 1987).

4.- Conservación de cepas nativas de rizobios.

Las cepas nativas aisladas fueron rotuladas y conservadas en tubos de 18 x 150 mm con agar extracto de levadura manitol (LMA) inclinado en condiciones asépticas de refrigeración, haciendo resiembra periódica mensual.

5.- **Evaluación de la Infectividad y Efectividad de las cepas Aisladas.**- Para la infectividad se inocula la planta y se valoran el número, forma, color y posición de los nódulos. La efectividad se evaluó de acuerdo al color y tamaño de la planta (follaje), contenido de nitrógeno total. Como testigo negativo se emplearon plantas sin inoculas con aplicación y sin aplicación de fertilizante nitrogenado químico.

6.- **Determinación de Proteína.**- La valoración del contenido de proteína en las plantas inoculadas con las cepas de los Rizobios aislados se realizó de acuerdo al método Kjeldhal (A.O.A.C. 1970).

Resultados.-

1.- Características fisicoquímicas del suelo colectado.- De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas mostradas por el suelo del Municipio de Marín, N.L. utilizado como fuente de Rizobios (Tabla2) es muy probable encontrar los microorganismos buscados, dada la cantidad de humedad, pH y materia orgánica presente en el suelo (Peña Cabriales, 1981).

Tabla 2 Características fisicoquímicas del suelo colectado en el Municipio de Marín N. L.

| Característica fisicoquímica | Valor |
|------------------------------|-----------------------------|
| Textura | Migajón Arenoso – arcilloso |
| pH | 7.2 |
| % de Humedad | 73.3 % |
| Nitrógeno Total | 0.28 % |
| Materia Orgánica | 5.14% |

2.- Aislamiento de las cepas nativas de Rizobios.-

De las plantas noduladas *in vitro* inoculadas con la muestra de suelo del Municipio de Marín, Nuevo León se aislaron 4 cepas, estas fueron etiquetadas como JM-1, JM-2, JM-3 y JM-4; fueron evaluadas en relación a su infectividad y efectividad; características morfológicas y bioquímicas.

Al analizar de las características fenotípicas de las plantas de frijol, inoculadas y sin inocular se encontró que las que fueron inoculadas con la solución de suelo tuvieron un buen desarrollo y follaje de color verde oscuro y a nivel de raíz presentaron abundantes nódulos rosados y de varios tamaños; estos resultados confirman la presencia de una alta densidad de rizobios en el suelo bajo estudio; mientras que las plantas sin inocular y sin nitrógeno químico mostraron una menor talla y un follaje verde amarillento y ausencia de nódulos; los testigos sin inocular con nitrógeno externo mostraron una buena talla y un follaje verde claro y ausencia de nódulos radiculares. (Tabla 3) Los resultados encontrados son considerados como un criterio de infectividad y efectividad (Fahraeus, citado por Vincent, 1975) aun cuando para algunos tal criterio es discutible, debido a que se han encontrado cepas incapaces de infectar plantas, por lo que en algunos casos no es posible tomarlo como única alternativa (Francis A.J. and M. Alexander 1974 citado por Alexander M. 1980).

Tabla 3.- Características de desarrollo en jarras de Leonard de plantas de frijol inoculadas y sin inocular con la disolución del suelo

| Característica | Plantas Testigo | | Plantas Inoculadas | | |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|
| | Con N ₂ | Sin N ₂ | | | |
| Talla de la planta | 35 cm | 23 cm | 32 cm | 29 cm | 29 cm |
| Color de Follaje | Verde claro | Verde amarillento | Verde oscuro | Verde oscuro | Verde oscuro |
| Tamaño de hoja | 7.5 cm | 3.5 cm | 7 cm | 6.2 cm | 6.3 cm |
| Cantidad de Nódulos | 0 | 0 | 26 | 31 | 35 |

3.- Contenido de proteína y humedad en las plantas inoculadas desarrolladas en las jarras de Leonard.- Para evaluar la cantidad de nitrógeno aportado por las bacterias a la planta se determinó la cantidad de proteína en las plantas tanto inoculadas como no inoculadas (Tabla 4). De acuerdo a Vincent, 1974 es la mejor manera de valorar la efectividad de una cepa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones.

Se puede observar que todas las muestras de plantas inoculadas son mayores en el contenido de proteína que el testigo sin nitrógeno, y la diferencia entre el testigo adicionado con nitrógeno y

las plantas inoculadas es muy pequeña (no significativa), muy probablemente debido a las diferencias de contenido de humedad.

Tabla 4 Contenido de proteína y humedad en plantas desarrolladas bajo invernadero en jarras de Leonard.

| Plantas | % de Proteína | % de Humedad |
|-----------------------|----------------------|---------------------|
| Testigo con nitrógeno | 19.95 | 72.79 |
| Testigo sin nitrógeno | 13.47 | 50.19 |
| Inoculada A | 19.74 | 84.00 |
| Inoculada B | 16.7 | 79.97 |
| Inoculada C | 20.51 | 87.89 |

4.- Identificación y caracterización de las cepas aisladas de los nódulos de las plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas, desarrolladas en las jarras de Leonard.- Las observaciones al microscopio de tinciones simple y de Gram de las colonias crecidas en ELMA + RC mostraron la presencia de bacilos Gram negativos pleomorfos, sus colonias son circulares, rosadas, convexas lisas, húmedas, y miden de 2 a 5 mm de diámetro a 3 – 5 días de crecimiento a 28°C (Tabla 5).

Tabla 5 Características morfológicas de colonia y tiempo de crecimiento de las cepas nativas aisladas de los nódulos de las plantas de frijol inoculadas en jarras de Leonard

| Característica | Cepas nativas aisladas | | | |
|------------------------------|------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | JM – 1 | JM – 2 | JM – 3 | JM – 4 |
| Diámetro (mm) | 3 | 4 | 4 | 3 |
| Forma | circular | circular | circular | circular |
| Borde | Entero | entero | entero | entero |
| Elevación | convexa | convexa | convexa | convexa |
| Superficie | lisa | lisa | lisa | lisa |
| Consistencia | Gelatinosa | Gelatinosa | Gelatinosa | Gelatinosa |
| Color | Blanca rosada | Blanca rosada | Blanca rosada | Blanca rosada |
| Cantidad de goma | abundante | escasa | moderada | abundante |
| Apariencia | Húmeda | Húmeda | Húmeda | Húmeda |
| Tiempo de crecimiento (días) | 3 | 3 | 5 | 4 |

Además a través de la caracterización bioquímica fue finalmente posible identificar a las cepas como de la especie *Rhizobium phaseoli* ya que dio reacción positiva a la prueba de Biuret, ausencia de capacidad de hidrólisis de gelatina y caseína, resistencia a NaCl 2% y no producir H₂S en agar sulfito bismuto características típicas de esta especie de rizobio (Tabla 6) Bergey's Manual 2001; Vincent 1975; Gibbs B.M. and D.A. Shapto 1968).

Tabla 6 Pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas aisladas de nódulos de plantas de frijol inoculadas en jarras de Leonard

| Reacción Bioquímica | Cepas nativas aisladas | | | |
|-------------------------------------|------------------------|--------|--------|--------|
| | JM – 1 | JM – 2 | JM – 3 | JM – 4 |
| Crecimiento en agar glucosa peptona | - | - | - | - |
| Hidrolisis de gelatina | - | - | - | - |
| Hidrolisis de caseína | - | - | - | - |
| Reacción en leche litmus | a | a | a | a |
| Resistencia a NaCl 2% | - | - | - | - |
| Producción de H ₂ S | - | - | - | - |
| Utilización de Biuret | + | + | + | + |
| Absorción de Rojo Congo | - | - | - | - |
| Formación de 3 cetolactosa | - | - | - | - |
| Utilización de citrato | - | - | - | - |

+ Crecimiento; – sin crecimiento; a reacción alcalina; b reacción ácida

Conclusión.- Las cuatro cepas nativas de bacterias aisladas del suelo de Marín, N. L. fueron identificadas como *Rhizobium phaseoli* en base a sus características bioquímicas y morfología de colonia sobre agar extracto de levadura manitol (ELMA-RC), morfología celular bajo tinción GRAM y Maneval.

La sobrevivencia de los rizobios en el suelo utilizado para el estudio fue suficientemente buena como para mantener su población elevada y favorecer la nodulación de las plantas al emplear como inoculante una suspensión de este suelo. Esta elevada sobrevivencia de los rizobios probablemente es debido a la alta humedad, la buena disposición de materia orgánica y el pH de este; ello concuerda con lo expresado por Alexander, 1977; Peña Cabriales, 1981; Date, 1976 ha cerca de la sobrevivencia de *Rhizobium* en suelo en ausencia de su hospedero específico.

Los resultados de caracterización morfológica son similares a los reportados por otros investigadores (López Alcocer y cols. 2017; Granada et. al. 2013; Keneni et. al. 2010; Villanueva y Quintana 2012) donde reportan que las colonias de aislados de *Rhizobium* son de crecimiento rápido, (2 – 3 días), blancas o ligeramente rosadas colonias circulares, convexas, lisas y de

aspecto translucido. Debido a que las 4 cepas aisladas mostraron colonias blancas rosadas, borde liso, convexas, textura gomosa, circulares se puede afirmar que pertenecen al género *Rhizobium*. Las cuatro cepas nativas aisladas no se desarrollaron en presencia de cloruro de sodio al 2% estos resultados son similares los reportados por López-Alcocer *et. al.* 2017; Barrada *et. al.* 2012; Cuadrado *et. al.* 2009; Patilet *et. al.* 2014.

De las pruebas de morfología de colonia, de tinción y bioquímicas realizadas, se puede observar en las tablas 4, 5 y 6 que se aislaron cuatro cepas de *Rhizobiumphaseolinativus* fijadores de nitrógeno, con las siguientes características: bacilos, metabolismo aeróbico, no esporulados, Gram negativos, con capsula, reacción alcalina en leche de litmus (tornasol), reacción de biuret positiva, ausencia de crecimiento en agar glucosa peptona, no productora de 3 cetolactosa; los Rizobios se caracterizaron por tener crecimiento rápido (3 – 5 días) sus colonias son de aspecto mucilaginoso, circulares, lisas y convexas.

Además se puede observar en la tabla 4 que las cepas aisladas fueron infectivas y efectivas para establecer simbiosis con plantas de frijol y fijar nitrógeno atmosférico; La diferencia observada en el contenido de proteína entre el testigo nitrogenado y las plantas inoculadas es realmente mucho menor, ya que el contenido de materia seca en las plantas inoculadas es menor comparada con la testigo nitrogenada, ello se debe a el contenido de humedad que presentan cada una de las plantas estudiadas.

Bibliografía

- Abd-Alla M.H.,F.M.Morsy, A – W E El- Enany and T. Ohyama (2012). Isolation and characterization of a heavy-metals-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* potentially applicable for bioadsorption of Cd²⁺ and Co²⁺ International Biodeterioration and Biodegradation **67**: 48 – 55.
- Aguirre Cossio J. E. (1979). Prácticas de campo y laboratorio para análisis de suelos. Facultad de Agronomía U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- Altieri M. A., Funes F. y Petersen P. (2012). Agroecological efficient agricultural systems for small holder farmers: contributions to food sovereignty. En: J. Agron. Sust. Develop. **32**: 1 – 13.
- Alexander M. (1980). Introducción a la Microbiología del Suelo 2° Ed. John Wiley and Sons. New York pp: 333 – 340.
- A.O.A.C. (1970). Official Methods of Analysis. 11th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. pp 800.
- Barea, J. M.; Pozo, M. J. Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. J. Exp. Bot. **56**: 1761-1778.
- Bashan, Y. (2008). El uso de inoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana. In: Diaz-Franco, A. y Meyek-Pérez, N. (Eds.). La biofertilización como tecnología sostenible. Plaza y Valdéz. México. 17-24 pp.
- Barrientos D. Leticia y Edith Méndez A. (Ene. – Mar. 1995). Aislamiento y Selección de Cepas Efectivas de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii en la IX Región. Agricultura Técnica (Chile) **55** (1): 61 – 66.
- Bergey's manual of determinative bacteriology by American Society for Microbiology; Bergey, D. H. (David Hendricks), 1860-1937; Breed, Robert S. (Robert Stanley), 1877-1956.
- Cayo García-Blasquez, Marilú L. Sato (2015). IMPORTANCIA DE LA INOCULANTES MICROBIANOS PARA LA AGRICULTURA SOSTENIBLE Universidad Federal de Rio Grande del Sur-Porto Alegre Brasil-Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Ayacucho-Perú (UNSC)

- Centro Internacional de Agricultura Tropical(CIAT) (1987). Simbiosis leguminosa – Rhizobio. Manual de evaluación, selección y manejo agronómico. Cali, Colombia.
- CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical (1988). Simbiosis leguminosa – rizobio: Manual de métodos de evaluación selección y manejo agronómico. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia 194 p.
- Cuadrado B., G. Rubio y W. Santos (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 de Ciencias Químico Farmacéuticas **38**: 78 – 104.
- Davidson, E.A.; David M. B.; Galloway J.N. (2012). Exceso de nitrógeno en el medio ambiente de EU: Tendencias, riesgos y soluciones. Sociedad de Ecología de América. Revista Tópicos en Ecología 15: 19 p.
- Demaret F. R.; Contreras D. R. y García D. J. (1991). Trébol encarnado: normas técnicas para mejorar su productividad. Investigación y Progreso Agropecuario Carillanca **10** (1): 3 – 6.
- FAO, (1995). Manual Técnico de Fijación de Nitrógeno. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- FAO. (2008). Tendencias y perspectivas mundiales de los fertilizantes hasta 2011/2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Italy, Rome. 171 p.
- FAO, 2011. “Ahorrar Para Crecer” .Guía para los responsables de las políticas públicas de instituciones de la producción Agrícola en pequeña escala. ISBN 978-925-306871-5, 112p.
- Freire JRJ. (1997). Inoculation of soybeans in: Vincent JM.; Whitney, A.S.; Bose J. Exploiting the legumes-rhizobium symbiosis in tropical Agriculture NIFTAL, p 335.379.
- Gibbs S. M. and D. A. Shapton (1978). Identification Methods for Microbiologist, W. & Mackary & Co. LTD., Chatan, Kent, New York, USA, 240 pp.
- Glass A.D. (2003). Nitrogen use efficiency of crop plants: Physiological contains upon nitrogen absorption. Crit. Rev. Plant Sci. **22**: 453 – 470.

- Granada M. K., M. Ochoa, V. Ruilova V., F. Guzmán D. y R. Torres G. (2014). Evaluación de cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos en frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Centro de Biotecnología **3**: 25 – 37.
- Guzmán Casado Gloria I. y Antonio M. Alonso Mielgo (2008). Buenas Prácticas en Producción Ecológica Uso de Abonos Verdes. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 28
- Hernández Jorge L., Juan G. Cubillos Hinojosa y Pablo E. Milian (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de Microbiología Tropical. **2** (2): 50 – 62.
- Keneni A., F. Assefa and P.C. Prabu (2010). Characterization of acid and salt tolerant Rhizobial strains isolates from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. Journal of Agricultural Science and Technology **12**: 365 –376.
- López – Alcocer José de J., Rogelio Lépiz Ildelfonso (2017). Caracterización Morfológica y Bioquímica de Cepas de *Rhizobium* Colectadas en Frijol Común Silvestre y Domesticado. Rev. Fitotec. Mex. Vol. **40** (1): 73 – 81.
- Mayz J., A. Láres & N. Alcorcés (2010). Efectividad de cepas rizobianas nativas de sabana en *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. C4A-3. Revista Colombiana Biotecnológica **12** (2): 194 – 202.
- Ortega K. F. 1990. Que pasa con el trébol rosado “Quiñequeli”. Investigación y Progreso Agropecuario Carillanaca (Chile) **9** (4): 25 – 27.
- Patil S.M., D.B. Patil, M.S. Patil, P.V: Gaikwad, S.B. Bhamburdekar and P.J. Patil (2014). Isolation characterization and salt tolerance activity of *Rhizobium* spp root nodules of some legumes. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences **3**: 1005 – 1008.
- Peña-Cabriales, J. J. (1981). Sobrevivencia de *Rhizobium* en el suelo. Tesis doctoral. Universidad de Cornell, New York.
- Rao I. M. (2009). Essential plant nutrients and their functions. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Working Document N° 36.
- Raun W. R. y Johnson G. V. (1999). Improving nitrogen use efficiency for cereal production. Agron. J. **91**: 357 – 363.

- Rincón J., T. Clavero, R. Razz, S. Pietrosoli, F. Méndez, N. Noguera (2000). Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*) ((lam) de Wit). Revista Facultad de Agronomía **17**, 342 -357
- Rockström J.; Steffen W.; Noone K. y Persson A. (2009). Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity. Ecol. Soc. **14**:32.
- SAGARPA. 2010, <http://www.siap.gob.mx>.
- Smith, S. E. and Read, D. J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. 2nd Edition. Academic Press. San Diego.
- SEMARNAT-(2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.
- Serrano Altamirano, Víctor; Cano García, Miguel Ángel 2007. LEGUMINOSAS DE COBERTURA PARA REDUCIR LA EROSIÓN Y MEJORAR LA FERTILIDAD DE SUELO DE LADERA .Terra Latinoamericana, vol. **25**, núm. 4, pp. 427-435
- Somasegaran P. and H. J. Hoben (1994). Methods in Legume – *Rhizobium* Technology. NIFTAL Projectanad MIRCEN..University of Hawaii. USA. 450 P.
- Sosa Areadne, A. Elías, Olga A. García y Mariela Sarmiento (2004). Aislamiento y Caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, **38** (2): 197 – 201.
- Sosa Rodríguez Breno Augusto, Mariana Sánchez de Prager y Oscar Eduardo Sanclemente Reyes (2013). Influencia de abonos verdes sobre la dinámica de nitrógeno en un TypicHaplustert del Valle del Cauca, Colombia. Acta Agronómica **63** (4): 343 – 351.
- Tuzimura K. & Watanabe I. (1962). The effect of rhizosphere of various plants on the growth of *Rhizobium*. Part III. SoilSci. Plant. Nutr. **8**: 153 – 157.
- Weaver R. W. et. al. (1972). Effect of soybean cropping and soil. Properties on numbers of *Rhizobium japonicum* in Iowa soils. SoilSci. **144**: 137 – 141.
- Villanueva Tarazona Eva E. y Quintana Díaz Aníbal Ene. – Junio (2012). Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. REBIOL. Revista Científica de la Facultad de Ciencias biológicas. **32** (1) : 24 –30.
- Vincent J. M. (1975). Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 200 p.

Yadegari M. and A. Rahmani (2010). Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. African Journal of Agricultural Research **5**: 792 – 799.