

Infectividad y efectividad de rizobios aislados de suelos de la Costa Caribe colombiana en *Vigna unguiculata*

Infectivity and effectiveness of isolated rhizobia from colombian Caribbean Soils in *Vigna unguiculata*

Jonathan Alberto Mendoza Labrador*, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago*

Resumen

Es el primer estudio en Colombia que abarca una evaluación de rizobios nativos asociados a frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en los departamentos del Cesar y la Guajira. En esta investigación, se demostró que la utilización de aislamientos de rizobios nativos aislados a partir de nódulos, mejoraron el desarrollo del frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.), siendo estas bacterias más eficientes que los tratamientos químicos y absolutos (sin inóculo ni fertilización) y que las cepas inducidas mejorando además, la fijación biológica de nitrógeno y la tasa fotosintética. Como aportes del estudio, se determinó que en condiciones de invernadero la fertilización biológica fue más eficiente que la química y que, de acuerdo a los resultados obtenidos de las diferentes variables agronómicas evaluadas, esto podría influir positivamente en los rendimientos nutricionales del cultivo, base alimentaria de los sistemas ganaderos de estas regiones del país y fuente alimenticia de la comunidad indígena y de bajos recursos económicos.

Palabras clave: Nodulación, fijación Biológica de Nitrógeno, Fertilización, Tasa Fotosintética.

Abstract

This is the first study in Colombia which covers an evaluation of native rhizobium associated to the Caupí bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in the departments of Cesar and Guajira. In this research it was demonstrated that the use of native rhizobium isolated from nodes, improved the development of the Caupí bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.), being this bacteria more efficient than the chemical and absolute treatments (without inoculum and fertilization) also improving the biological nitrogen fixation and the photosynthetic rate. As contribution of the study, it was determined that in greenhouse conditions and according to the results obtained from different measured agronomic variables, this could influence positively in the nutritional performance of the crop, basis of food of the cattle system of this regions of the country and the food source of the indigenous community of low economic income.

Key words: Native *Rhizobium*, biological nitrogen fixation, fertilization, photosynthetic rate.

Recibido: febrero 3 de 2014

Aprobado: octubre 10 de 2014

Introducción

Los suelos de los departamentos del Cesar y La Guajira (Colombia), han sufrido un proceso de deterioro, debido al mal manejo al cual fueron sometidos al realizar actividades agrícolas y ganaderas, derivando, entre otros efectos, en un aumento de la erosión, compactación, disminución de la fertilidad y biodiversidad (Garrido, 2007).

Algunos de los problemas que se presentan son ocasionados por el uso indiscriminado de fertilizantes minerales, principalmente fuentes de nitrógeno, por la necesidad de suplir este nutriente que es limitante.

Por otra parte, el nitrógeno atmosférico (N_2) es la reserva más abundante en la biosfera y aunque es prácticamente ilimitada, ésta no es directamente utilizada por plantas y animales pues para que el N_2 pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido por el rompi-

* Ingeniero Biotecnológico. Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigación Tibaitatá, Corpoica Km 14 Mosquera. jonathanmendoza@hotmail.com. B., PhD. Laboratorio de Microbiología de Suelos rbonilla@corpoica.org.co
Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigación Tibaitatá, Corpoica, Mosquera Cundinamarca Colombia.

miento del triple enlace que une los dos átomos de N, dando lugar a la formación del amonio. Sin embargo, los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción están presentes en los dominios Bacteria y Archaea gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa (Baca *et al.*, 2000).

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) que se lleva a cabo en las plantas por dichos microorganismos constituye la principal vía de incorporación de nitrógeno. Para mitigar el impacto ambiental causado por los fertilizantes minerales, se deben aplicar prácticas agrícolas sostenibles que aumenten la eficiencia y la sostenibilidad de la producción de cultivos de necesidad alimentaria, tales como el frijol, al maximizar la fijación biológica de nitrógeno mediante la incorporación de cultivos de leguminosas capaces de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno conocidas como rizobios (Burow *et al.*, 2004).

Esta investigación se realizó con el objetivo de demostrar la posibilidad que existe de mejorar la producción de frijol caupí, evaluando el efecto de la inoculación de los rizobios aislados de los departamentos del Cesar y la Guajira; evidenciando que se puede llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, dando resultados positivos en el desarrollo de la leguminosa, dicha información preliminar es de gran importancia para establecer la posibilidad de una mayor utilización de biofertilizantes para leguminosas en Colombia.

Materiales y métodos

Aislamiento de rizobios nativos de frijol Caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Se recolectaron raíces noduladas de frijol Caupí en las fincas Campo Alegre del departamento de la Guajira (*Latitud* (° n):10, 88904, *longitud* (° w):72, 87864, *altura* (m): 215, *presión* (mm/hg): 741, *edad del cultivo* 36 días) y El Paraíso del departamento del Cesar (*latitud* (° n): 10, 38755, *longitud* (° w):73, 17681, *altura* (m):158, *presión* (mm/hg):746, *edad del cultivo* 36 días). Para el aislamiento se realizó una muestra compuesta por 12 raíces para cada una de las fincas. Las raíces fueron tomadas en forma de zig-zag de tres lotes diferentes seleccionados de acuerdo a su homogeneidad.

Se retiraron los nódulos de las muestras compuestas de cada una de las fincas y se rehidrataron en solución salina estéril (NaCl 0,85 %) durante una hora. Posteriormente, se desinfectaron sumergiéndolos en etanol (95 %) durante 1 min, se hizo un enjuague con agua estéril y después se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (70 %) con el fin de desinfectarlos por 2 min y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril para retirar los residuos de las soluciones desinfectantes (Beck *et al.* 1993).

Los nódulos fueron puestos en condiciones de esterilidad en un crisol con 1 ml de solución salina (NaCl 0,85 %) y macerados mecánicamente para liberar los bacteroides. La solución bacteriana obtenida se sembró en placas con medio de cultivo YMA (levadura-manitol) (Vincent, 1970) suplementado con rojo congo y se incubó a 30 ± 2 °C por un periodo de 15 días. Posteriormente, se realizaron siembras por agotamiento de las colonias obtenidas en nuevas placas con medio YMA con el objetivo de tener cultivos puros verificados con tinción de Gram.

Caracterización fenotípica de los aislamientos

Los aislamientos obtenidos fueron sembrados en YMA con azul de bromotimol para observar la formación de ácido o alcalinización del medio. Además, en este medio se determinó el tiempo de crecimiento, color, diámetro, transparencia, elevación, forma, formación y elasticidad de la mucosidad de las colonias. Se realizó tinción diferencial de Gram para validar la morfología bacteriana característica de los rizobios (Valero, 2002).

Efecto de los aislamientos sobre el desarrollo del frijol Caupí

Se utilizaron semillas sanas provenientes de cada una de las fincas donde se realizaron los muestreos. Las semillas fueron desinfectadas usando el protocolo propuesto por (Beck *et al.* 1993). En el invernadero se realizaron pruebas de nodulación por triplicado en materas de icopor de 24 oz, empleando como sustrato vermiculita y arena en una relación (2:1) (v/v) con tres ciclos de esterilización consecutivos y tiempo de esterilización de 2 h a una temperatura de 120 °C. Las condiciones del invernadero fueron 32 °C y una humedad relativa de 60 %.

Se aplicó un diseño completamente al azar con 27 tratamientos: uno por cada aislamiento realizado, un testigo absoluto (sin fertilizar), un testigo químico (suplementado con 200 ppm de KNO₃) y dos cepas de referencia (UFLA 1 y UFLA 2). Las cepas de referencias fueron aisladas de frijol caupí por Marra 2011 de la Universidad Federal de Lavras de Brasil.

Para el inóculo se preparó una suspensión celular de los aislados obtenidos en 5 ml de YMA líquido y se incubó a 30° C y 120 rpm durante 7 días hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0,5 que equivale a 1×10^8 UFC/ml. Después de 60 días de la inoculación se midió la longitud de la parte aérea, longitud de la raíz principal, peso fresco y peso seco de la parte aérea, peso fresco y peso seco de la raíz, número de nódulos y tasa fotosintética de las plantas. La medición de la tasa fotosintética se realizó mediante el uso de un fotosintetizador portátil TPS- 2, que da una unidad de medida de la asimilación de CO₂ (fotosíntesis y respiración) (Clesceri, *et al.*, 1998).

Prueba de reducción de acetileno (ARA) para la determinación de la actividad nitrogenasa

Se tomó una única muestra de raíces noduladas por cada uno de los aislamientos evaluados y se introdujeron en frascos de 280 ml. Los frascos se cerraron herméticamente y se les retiró por completo todo el oxígeno con una jeringa. Se substituyó el 10% del volumen, correspondiente a 28 ml de la atmósfera del frasco con acetileno y se incubó durante 1 hora a 32° C. Posteriormente, con el fin de medir la concentración de etileno, 1 ml de gas fue tomado como muestra e inyectado en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, USA) con detector de ionización de llama y una columna Poropak N con malla de 200/300 de 1.82 m y 3 mm de diámetro (Eckert *et al.*, 2001). Las condiciones del cromatógrafo para realizar esta prueba fueron, nitrógeno en el tanque y el equipo de 30 psi, aire en el tanque 40 psi y el equipo 30 psi y el hidrógeno en el tanque 30 psi y el equipo 22 psi.

Análisis estadístico

Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el software SPSS 17.0 y posteriormente se realizó la prueba de comparación de medias empleando la prueba de Tukey.

Resultados

Aislamiento y caracterización fenotípica de rizobios a partir de nódulos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Se obtuvieron 23 aislamientos rizobianos: 11 a partir de los nódulos de las muestras de la Guajira y 12 del César. Del total, 9 presentaron crecimiento lento (crecimiento en medio YMA sólido en 7 días), los cuales también presentaron alcalinización en el medio de cultivo YMA más azul de bromotimol y 14 presentaron crecimiento rápido (crecimiento en medio YMA en 2 días), presentando acidificación en el medio de cultivo. En la tabla 1, se muestran los diferentes diámetros de la colonia que presentan los 23 aislamientos. Las características culturales de las colonias rizobianas como lo son el tiempo de crecimiento (rápido, intermedio, lento y muy lento), cambios de pH (acidificación y al-

calinización) y el diámetro de la colonia, son importantes para suponer que los aislamientos pueden de diferentes géneros y especies de rizobios.

Los cambios de pH en el medio de cultivo se deben a la utilización preferencial de azúcares por las especies de crecimiento rápido seguida de la excreción de ácidos orgánicos. Ciertas combinaciones de aminoácidos y azúcares (en general glutamina y galactosa) promueven una acidificación del medio después del crecimiento de dichos microorganismos. Mientras que los microorganismos de crecimiento lento alcalinizan el medio, ya que sintetizan compuestos nitrogenados y liberan cationes. Además con relación a las fuentes de nitrógeno, estos microorganismos metabolizan más glutamato y α -ceto-glutarato que los microorganismos de crecimiento rápido, en cuanto que el manitol es utilizado del mismo modo por ambos (Tan *et al.*, 1981).

Prell *et al.*, (2006), estudiaron el metabolismo del nódulo observando diferencias en la utilización de carbohidratos por diversas especies de rizobios, así como diferencias enzimáticas entre especies rápidas y lentas asociadas a las más importantes enzimas de las cuatro principales vías metabólicas de los carbohidratos. Estos autores concluyeron que especies de crecimiento rápido poseen enzimas correspondientes al ciclo de la hexosa monofosfato, se hace referencia a lo anterior por las diferencias presentadas de los aislamientos en el tiempo de crecimiento y los cambios de pH en el medio de cultivo YMA con azul de bromotimol.

Pruebas de Nodulación

Los resultados del análisis estadístico presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en los siguientes parámetros evaluados en condiciones de invernadero, longitud de la parte aérea, peso fresco de la raíz, número de nódulos, peso seco de la raíz y medición de la tasa fotosintética. En la Figura 1, se puede observar el comportamiento positivo de los aislamientos G58A, CC01, CB02, CD01 donde se presentaron diferencias significativas y se compararon con los testigos químico, absoluto y la cepa de referencia UFLA 1.

Los resultados de la variable tasa fotosintética, coinciden con los aislamientos que presentaron un mejor crecimiento de la planta *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Tabla 1. Característica cultural de las colonias de los 23 aislamientos del departamento de la Guajira y del Cesar.

Cepas Guajira	G51A	G52A	G53A	G53B	G54A	G54B	G56A	G56B	G57A	G57B	G58A	
DDC	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	
Cepas Cesar	CA01	CA02	CB01	CB02	CC01	CC02	CD01	CD02	CE01	CE02	CF01	CF02
DDC	0,4	≤ 1	0,6	≤ 1	0,5	≤ 1						

DDC – Diámetro de las colonias en cm medido después de 7 días de crecimiento en el medio de cultivo YMA con azul de bromotimol.

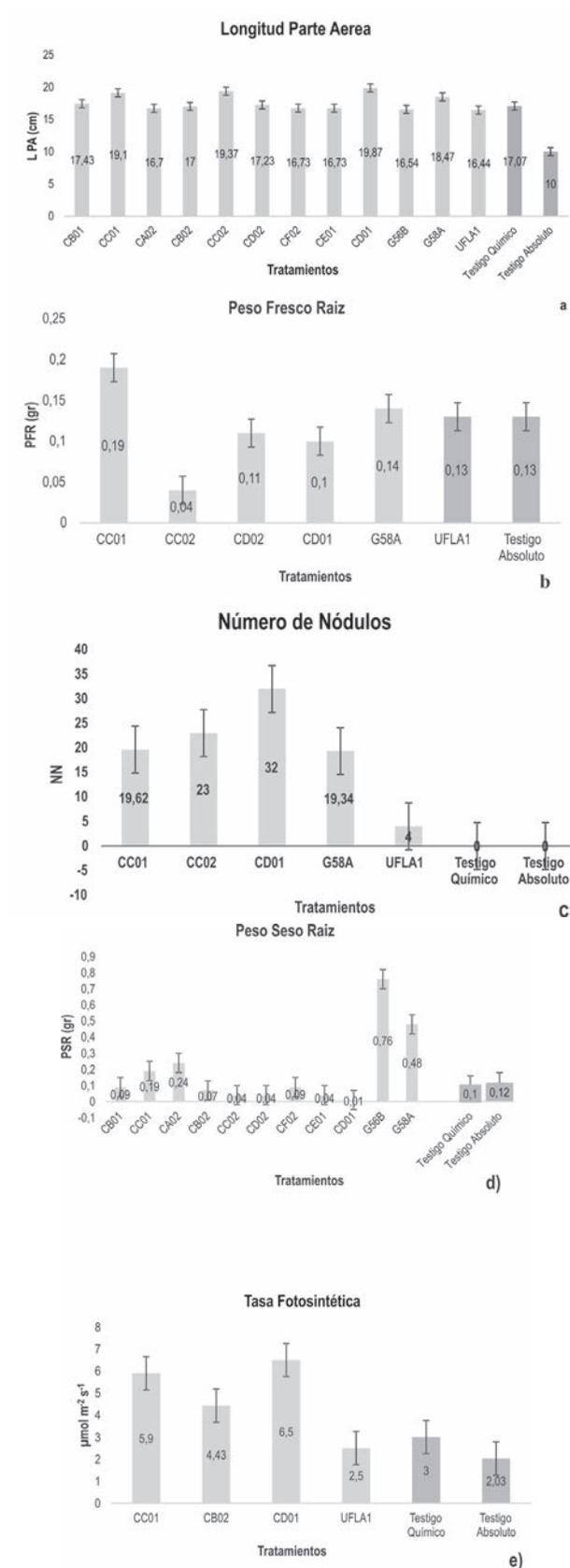


Figura 1. Diferencias estadísticamente significativas en relación a cada parámetro evaluado de acuerdo a la prueba de Tukey HSD, a) Longitud parte aérea b) Peso fresco raíz c) Numero de nódulos d) Peso seco raíz e) Tasa fotosintética.

en las pruebas de nodulación. El aislamiento del Cesar CD01 con una longitud de la parte aérea de 19,86 cm y longitud de la raíz de 19,80 cm presenta un valor en la tasa fotosintética de $6,50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (figura 1), el aislado CD01 duplica los testigos químicos absoluto y la cepa de referencia UFLA 1, esto se debe a que está planta inoculada con la cepa CD01 que obtuvo un mejor crecimiento que pudo ser influenciado por la fijación biológica de nitrógeno.

El aislamiento de la Guajira G58A presentó valores altos comparados con los datos obtenidos del testigo absoluto y evidenció actividad nitrogenasa en la prueba de reducción de acetileno, también mostró valores altos en la medición de la tasa fotosintética $2,83 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que demuestra una relación directa entre la fijación biológica de nitrógeno y el proceso de fotosíntesis, gracias a la relación mutualista que existe entre los rizobios y la leguminosa frijol Caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Prueba Cualitativa de reducción de Acetileno (ARA)

Esta prueba de reducción de acetileno es un método indirecto de medición de la fijación biológica de nitrógeno ya que lo que se mide es la actividad de la enzima nitrogenasa, los resultados de esta prueba cualitativa demostraron que las raíces noduladas por cada uno de los aislamientos obtenidos tanto del departamento del César como de la Guajira presentaron picos de etileno en la lectura realizada por cromatografía de gases, lo cual se podría deducir que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y por ende pueden contribuir a mejorar el crecimiento del frijol Caupí en estos dos departamentos de Colombia.

Aunque se realizó una sola medición, los resultados más altos comparados con los testigos químico y absoluto fueron los siguientes, los aislamientos obtenidos a partir de muestras de nódulos de la Guajira, G56A: $8558.97 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, G54B: $3216.23 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, y los aislados del Cesar fueron CA01: $6082.69 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, CB02: $3211.79 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$.

Conclusiones

Con esta investigación se evidencia la presencia de fijadores de nitrógeno simbióticos en esta región de Colombia. Para conocer otro tipo de microorganismos con potencial biofertilizante, es necesario realizar estudios a nivel molecular, pues existe una gran diversidad de microorganismos que han sido poco estudiados.

Los resultados del análisis estadístico muestran que los mejores aislamientos fueron G58A, CC01, CB02 y CD01, los cuales pueden ser punto de partida para la producción de un biofertilizante mixto que permita mejorar la productividad y rentabilidad por hectárea

del frijol Caupí, y de esta manera contribuir a la seguridad alimentaria de comunidades indígenas y pequeños productores de estos dos departamentos de Colombia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica-, y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural –MADR-, por su financiación. Al señor Mauricio Barón y la señora Inés Roldan por su gran colaboración.

Referencias bibliográficas

- Baca, B.; Soto, L.; Pardo, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*. 38: 39-49.
- Barnet, Y.; Catt, P. 1991. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. *Plant and Soil*. Dordrecht. 135: 109-120.
- Beck, D.; Materon, L.; Afandi, F. 1993. Practical rhizobium-legume technology manual. Icarda. Syria. p. 55.
- Burow, M.E.; Fox, J.E.; Jones, P.; McLachlan, J.; Starcevic, M. 2004. Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*. 112: 672-677.
- Campillo, R.; Urquiaga, I.; Montenegro, A. 2003. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del N15. *Agricultura Técnica* 63:169-179.
- Carreño, R.; Campos, N.; Elmerich, C.; Baca, B. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Molecular General Genetics*. 264: 521-530.
- Clesceri, L.; Greenberg, A.; Eaton, A. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. (APHA, American Public Health Association, Washington D.C.) 6: 467-476.
- De Lima, S.; André, L.; Resende, P.; Andrade, F.; Ademar, P.; Do Vale, M.; Helson, M.; Silva, A.; Messias, B.; De Souza M, F. M. 2006. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (mg). i – caupi. *Seção III - Biologia do Solo*.30:803-811.
- De Souza, A.; Burity, A.; Figueiredo, M. 1999. Eficiência simbiótica de estirpes hup⁺, hup^{hr} e hupde bradyrhizobium japonicum e bradyrhizobium elkanii em cultivares de caupi¹. Centro de citricultura. *Pesq. Agropec. Bras.* 34:1925-1931.
- Eckert, B.; Baller, O.; Kirchhof, G.; Halbritter, A.; Stoffels, M.; Hartmann, A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 17-26.
- EMBRAPA. 1994. Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola.
- Gallardo, I.; Celis, L. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Agrícola y Veterinaria. 45-121.
- Garrido, R.; M, F. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos en dos épocas climáticas del valle y sabana del Cesar. Universidad Militar Nueva Granada. *Biología Aplicada*. 21-65.
- Kahindi, J.H.P. 1997. Agricultural intensification, soil diversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied soil ecology*. 6:55-76.
- Marra, L.; Oliveria, M.; Soares, C.; Moreira, F. 2011. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculating strains from tropical legumes. *Ciencia do solo*. 68:5 603-609.

- Prell, J.; Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 14(4), 161–8. doi:10.1016/j.tim.2006.02.005
- Qué es CORPOICA ? (s.f.). Recuperado el 18 de enero de 2014. De <http://www.angelfire.com/ia/Turipana/queescorp.html>.
- Sosa, A.; Elías, A.; García, O. A.; Sarmiento, M. (2004). Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38:197–201.
- Sprent, J. 1994. Evolution and diversity in the legume- rhizobium symbiosis: Chaos theory. *Plant and soil. Dordrecht*. 161: 1-10.
- Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 487-506.
- Tan, I. K. P.; Broughton, W.J. 1981. Rhizobia in tropical legumes XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. *Soil Biology and Biochemistry Oxford*. 13: 389-393.
- Valarini, M.J.; Gogoy, R. 1994. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). Instituto de zootecnia EMBRAPA. *Sci. Agric., Piracicaba*. 51 (3): 500-503.
- Valero, N. 2002. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Universidad Nacional de Colombia. Maestría Interfacultades en Microbiología. Bogotá, D.C.
- Vincent, J. M. (James Matthew) & International Biological Programme. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. [Published for the] *International Biological Programme [by] Blackwell Scientific*, Oxford.