



**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGROPECUARIA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
RHIZOBIUM NATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOFERTILIZANTE EN LA PROVINCIA DE SANTA
ELENA”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:
INGENIERO AGROPECUARIO

**LILIBETH DEL ROCÍO CRESPO ARÍZAGA.
ALEJANDRA PAZ JULIO JULIO**

LA LIBERTAD – ECUADOR

¡Noviembre de 2012

**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGROPECUARIA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
RHIZOBIUM NATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOFERTILIZANTE EN LA PROVINCIA DE SANTA
ELENA”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

LILIBETH DEL ROCÍO CRESPO ARÍZAGA.

ALEJANDRA PAZ JULIO JULIO

LA LIBERTAD – ECUADOR

Noviembre de 2012

TRIBUNAL DE GRADO

Ing. Antonio Mora Alcívar., M.Sc
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Andrés Drouet Candell
DIRECTOR DE ESCUELA

Blgo. Javier Soto Valenzuela
PROFESOR TUTOR

Ing. Lourdes Ortega Maldonado., M.Sc
PROFESORA DE ÁREA

Ab. Milton Zambrano Coronado, Ms.
SECRETARIO GENERAL - PROCURADOR

AGRADECIMIENTO

A Dios; sin Él nada sería posible.

A mis padres Javier Crespo Suarez y Gladys Arízaga Álava, que con amor, sacrificio y esfuerzo me permitieron llegar hasta este punto de mi carrera estudiantil.

A los miembros del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Facultad de Ciencias Agrarias, en especial al Blgo. Javier Soto Valenzuela, tutor de tesis, quien con paciencia y dedicación supo guiarnos en el transcurso del proyecto.

Al Ingeniero Antonio Mora por la enseñanza brindada y por dedicarnos tiempo en la corrección del documento.

A los Ingenieros Néstor Orrala y Ángel León por ayudarnos a facilitar, de cierta manera, la elaboración de la tesis.

A los técnicos encargados de los laboratorios de Ciencias Biológicas y Ciencias Químicas de la Facultad por brindar su ayuda oportuna en cada una de las labores realizadas.

A mi amiga y compañera de tesis Ale, por cumplir nuestro objetivo de hacer juntas la tesis y llegar hasta el final de la misma, a pesar de los buenos y malos momentos que tuvimos que pasar. A su familia por los buenos consejos y el cariño brindado.

A Esquibel y Denis por su ayuda oportuna y desinteresada.

Lilibeth Crespo Arízaga.

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente a mi madre por todo el amor que me ha dado y el apoyo durante mis estudios y principalmente en esta etapa final de la carrera. Gracias Ma!

Al Centro de Investigaciones Agropecuarias que me brindó la oportunidad de realizar esta investigación bajo la tutela del Biólogo Javier Soto, gracias por el tiempo, la asesoría y los conocimientos entregados.

Así mismo, a todos los miembros de dicho departamento especialmente al Ing. Néstor Orrala y Ángel León quienes también con sus ideas y apoyo facilitaron la elaboración de este documento.

Al Ing. Antonio Mora Alcívar, por todo el apoyo brindado durante la carrera y especialmente en estas últimas semanas.

A los técnicos encargados de los laboratorios de Ciencias Biológicas y Ciencias Químicas de la Universidad.

A la UPSE por haberme brindado la oportunidad de culminar exitosamente mis estudios profesionales

A todo el personal académico y administrativo de la Facultad de Ciencias Agrarias que nos alentó hasta el final para culminar esta etapa.

A las personas que me apoyaron sin condición y siempre que tuvieron la oportunidad, Pelu, René, Kevin, Dany, Ketty, Don Jimmy, Ruth, Tío Javi, Tía Gladys, Denis y los que se quedaron en la memoria y no pude mencionar.

A mi amiga y compañera de tesis Lily (y a su familia); gracias loquilla por la paciencia, la amistad y por todas las cosas que pasamos durante el tiempo que duró esta investigación. Empezamos esto juntas y ya ves, así lo terminamos!

Alejandra Julio

DEDICATORIA

Esta investigación la dedico a mis padres, por confiar en mí y darme la oportunidad de avanzar en mi carrera estudiantil, por los excelentes consejos, por el amor incondicional brindado desde que llegué a sus vidas, por el sacrificio que tuvieron que pasar para que llegase hasta este punto de mi carrera estudiantil, y que han permitido formarme como persona y como profesional.

A mis hermanos, Héctor, Mirla, Miguel y Daniel quienes de una u otra manera colaboraron conmigo durante este proceso investigativo, por la paciencia y la confianza en los momentos más difíciles.

A mis sobrinos Elvis e Ismael por su inocencia y ternura, con su risa alegraron mis días.

A mis amorosas tías Rosita, Tanita, Jakita por estar ahí siempre para mí.

Y a los Tortolitos más tiernos del mundo, Ale y Kevinsote.

Para ellos, con sincero amor.

Lilibeth Crespo Arízaga.

DEDICATORIA

A mi adorada Mamita María y a la Pelu, las mujeres más importantes en mi vida. Gracias Mamita por todo lo que me enseñó, por su amor sin condición y todas las cosas lindas que me unen a Ud. Gracias mamá por todo lo que me has entregado en estos 25 años, por el amor, la confianza y por todo aquello que me hace ser quien soy. Las amo con el corazón.

A mis hermanos Chris, Danny y Spondylus, y a mis sobrinos Martín, Valentina y Lautaro, parte fundamental de mi vida y siempre presentes en mis pensamientos y mi corazón.

A la familia de Chile y Argentina, tíos, tías, primos, primas, sobrinos. Todos han aportado de manera significativa en mi formación personal. Los adoro y siempre los recuerdo.

A Kevin, amore mío, compañero inseparable. Gracias por todo lo lindo que tenemos y tendremos y por el aguante durante todos estos años, sin tu apoyo esto habría sido más difícil. Con el corazón... ^^

A todos ellos dedico esta tesis... Con todo mi amor.

“Y el camino se hizo al andar. . .”

Ale ^^

ÍNDICE

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 General	3
1.3.2 Específicos	3
1.4 Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Taxonomía de los rizobios	4
2.2 Los rizobios y la endosimbiosis.	4
2.3 Género <i>Rhizobium</i>	5
2.3.1 Morfología del género <i>Rhizobium</i>	5
2.3.2 Taxonomía del género <i>Rhizobium</i> .	6
2.4 Cultivo y aislamiento de rizobios.	7
2.5 El nitrógeno	8
2.5.1 Absorción y asimilación del nitrógeno (N) por las plantas	8
2.5.2 Ciclo biogeoquímico del nitrógeno	9
2.6 Fijación de nitrógeno	10
2.6.1 Fijación biológica del nitrógeno (FBN)	11
2.6.2 Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas	11
2.7 Etapas de infección y formación de nódulos	13
2.8 Influencia del ambiente sobre la fijación biológica de nitrógeno	14
2.9 Asociaciones fijadoras de nitrógeno	15
2.10 Efecto de <i>Rhizobium</i> en plantas no leguminosas	16

2.11	Pruebas morfológicas y bioquímicas para la purificación de cepas de <i>Rhizobium</i> .	18
2.12	Medios de cultivo	20
2.12.1	Requerimientos para el crecimiento microbiano	21
2.12.2	Componentes de un medio de cultivo	23
2.12.3	Clasificación de los medios de cultivo	24
2.13	Inoculantes	25
2.13.1	Características de un buen inoculante	26
2.13.2	Tipos de inoculantes	27
2.13.3	Producción de inoculantes y control de calidad	28
2.14	Formas para evaluar una población bacteriana	29
2.15	Factores que afectan la calidad de la inoculación	32
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1	Localización y descripción del lugar de ensayo	34
3.2	Material vegetativo	35
3.3	Materiales, herramientas y equipos	35
3.3.1	Materiales de laboratorio	35
3.4	Experimento	36
3.4.1	Recolección de la muestra	36
3.4.2	Aislamiento de cepas de rizobios.	37
3.4.2.1	Lavado y selección de nódulos	37
3.4.2.2	Desinfección del nódulo	37
3.4.2.3	Preparación del medio para aislamiento	38
3.4.2.4	Técnica de tinción de Gram en fresco (macerado)	38
3.4.2.5	Siembra	39
3.4.3	Caracterización morfológica y bioquímica del <i>Rhizobium</i>	39
3.4.3.1	Pruebas morfológicas del <i>Rhizobium</i>	39
3.4.3.2	Pruebas bioquímicas del <i>Rhizobium</i>	40

3.5	Selección de cepas para preparación de inoculante	42
3.6	Conteo bacteriano	43
3.7	Preparación del inóculo	43
3.8	Etapa de desinfección y esterilización del material biológico	44
3.8.1	Esterilización de la turba	44
3.8.2	Desinfección de las semillas	44
3.9	Diseño experimental	44
3.10	Siembra, inoculación y riego	45
3.11	VARIABLES A EVALUAR	45
3.11.1	Pruebas de caracterización morfológica del <i>Rhizobium</i>	45
3.11.2	Pruebas de caracterización bioquímica del <i>Rhizobium</i>	46
3.11.3	Prueba de germinación y estado de emergencia del maíz	46
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1	Pruebas morfológicas del <i>Rhizobium</i>	48
4.1.1	Prueba diferencial de Gram (en fresco)	48
4.1.2	Velocidad de crecimiento y caracterización morfológica de las colonias	48
4.1.3	Prueba diferencial de Gram (UFC)	49
4.1.4	Prueba de catalasa	49
4.2	Pruebas bioquímicas del <i>Rhizobium</i>	49
4.2.1	Producción de ácido o álcali	49
4.2.2	Crecimiento en peptona, glucosa, agar, purpura de bromocresol (PGA)	49
4.2.3	Crecimiento en diferentes concentraciones de cloruro de sodio	50
4.2.4	Prueba de 3-ketolactosa: (LLA = Levadura-Lactosa-Agar)	51
4.2.5	Prueba ANTIMIC con pesticidas	51
4.2.6	Prueba de resistencia a Co^{+2}	52
4.3	Prueba de germinación y estado de emergencia del maíz	52

4.3.1	Porcentaje de germinación al día 8	52
4.3.2	Longitud de plántula desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la hoja más larga	54
4.3.3	Peso verde de la raíz	55
4.3.4	Peso seco de la raíz	56
4.3.5	Porcentaje de pérdida de agua en raíz	57
4.3.6	Peso verde de la parte aérea	58
4.3.7	Peso seco de la parte aérea	59
4.3.8	Porcentaje de pérdida de agua en parte aérea	60
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5.1	Conclusiones	62
5.2	Recomendaciones	63
6.	BIBLIOGRAFÍA	64
	ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Caracterización de cultivos seleccionados	38
Cuadro 2. Sistema de tratamientos	45
Cuadro 3. Grados de libertad	45
Cuadro 4. Análisis de la varianza, porcentaje de germinación al día 8	53
Cuadro 5. Análisis de la varianza, longitud de plántula desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la hoja más larga.	54
Cuadro 6. Análisis de la varianza, peso verde de la raíz	55
Cuadro 7. Análisis de la varianza, peso seco de la raíz	56
Cuadro 8. Análisis de la varianza, porcentaje de pérdida de agua en raíz	57
Cuadro 9. Análisis de la varianza, peso verde de la parte aérea	58
Cuadro 10. Análisis de la varianza, peso seco de la parte aérea	60
Cuadro 11. Análisis de la varianza, porcentaje de pérdida de agua en parte aérea	61

ANEXOS

Cuadros, figuras y tablas

Cuadro 1A.	Prueba diferencial de Gram en fresco
Cuadro 2A.	Velocidad de crecimiento
Cuadro 3A.	Caracterización morfológica de las colonias
Cuadro 4A.	Prueba diferencial de Gram (UFC)
Cuadro 5A.	Prueba de catalasa
Cuadro 6A.	Producción de ácido o álcali
Cuadro 7A.	Crecimiento en peptona glucosa Agar púrpura de bromocresol (PGA)
Cuadro 8A.	Crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio
Cuadro 9A.	Prueba de 3-Ketolactosa
Cuadro 10A.	Prueba ANTIMIC con pesticidas
Cuadro 11A.	Prueba de resistencia a Co^{+2}
Cuadro 12A.	Conteo bacteriano
Cuadro 13A.	Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas
Figura 1A.	Raíz nodulada de <i>Leucaena leucocephala</i>
Figura 2A.	Nódulo con presencia de leghemoglobina
Figura 3A.	Técnica de aislamiento de cepas
Figura 4A.	Desarrollo morfológico de colonias en medio ELMARC
Figura 5A.	Prueba diferencial de Gram
Figura 6A.	Crecimiento en medio PGA
Figura 7A.	Prueba de 3-ketolactosa
Figura 8A.	Medida de halo de inhibición en prueba ANTIMIC
Figura 9A.	Preparación del biofertilizante
Figura 10A.	Ajuste de pH del biofertilizante

- Figura 11A.** Siembra de semillas de maíz
- Figura 12A** Inoculación
- Figura 13A.** Plántulas de maíz al día 8
- Figura 14A.** Toma de datos

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Las leguminosas son fundamentales en la alimentación humana y animal, su aporte de proteínas oscila entre 20 y 40 %. Al igual que la mayoría de los cultivos, requieren principalmente de compuestos nitrogenados para el desarrollo de sus funciones, se destacan particularmente por su capacidad de entrar en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* para fijar el nitrógeno del aire. La simbiosis ocurre a nivel radicular, formando nódulos a manera de tumoraciones que son el producto de asociaciones de bacterias con capacidad efectiva e infectiva presentes en la raíz.

CHABOT R. *et al.* (1996) y COYNE M. (2000) afirman que las bacterias de este género no solo viven en simbiosis con leguminosas, sino que también subsisten en el suelo como heterótrofos o saprófitos al desarrollarse en ausencia de la planta hospedera. Según GARCÍA P. *et al.* (2012), las rizobacterias también colonizan las raíces de plantas no leguminosas como arroz, maíz, cebada, remolacha, colza, lechuga y caña de azúcar, estimulando la producción de sustancias promotoras del crecimiento y favoreciendo el desarrollo del cultivo.

Investigaciones actuales se centran en producir inoculantes microbianos que estimulen el proceso de fijación de nitrógeno, profundizando en el tema del *Rhizobium* como bacterias promotoras del crecimiento y sus efectos sobre la salud y rendimiento de los cultivos.

La presente investigación centra su atención en el género *Rhizobium*, y su empleo como inoculante en cultivos no leguminosos como el maíz. Se espera que actúe

positivamente sobre la germinación, la emergencia de las plántulas, desarrollo del sistema radicular y demás órganos.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El cultivo de maíz tiene preponderante importancia para la alimentación humana y animal, teniendo al mismo tiempo importancia para la industria; son aprovechables tanto el grano como la parte vegetativa; su influencia en la economía nacional es cada vez más grande, por lo que constantemente se busca mejorar el rendimiento y calidad del producto. Se ha logrado resultados positivos mediante dosis óptimas de fertilización, sistemas y densidad de siembra, mejoras genéticas, sistemas de riego adecuados, entre otros.

En las últimas décadas se ha incursionado en investigaciones conducentes a la obtención de inoculantes microbianos para plantas no leguminosas, con la finalidad de mejorar la germinación, las condiciones de crecimiento y desarrollo de las plántulas, por medio de sustancias como auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido-indol-acético y ACC diaminasa, entre otros, *Rhizobium* estimula la producción de las mencionadas sustancias, especialmente en condiciones óptimas de sustrato, por lo que despierta el interés en investigar la asociación de estos microorganismos con un cultivo no leguminoso como el maíz.

Este experimento forma parte de la investigación “ESTUDIO DEL GÉNERO *RHIZOBIUM* PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTE DE USO AGRÍCOLA EN LA PROVINCIA DE SANTA ELENA.”, que realiza el Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UPSE.

Se espera que este documento sirva como fuente de consulta a investigadores, profesores, técnicos, estudiantes y personas involucradas en investigaciones microbiológicas. Además que los resultados sean motivo de análisis y nuevas investigaciones.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 GENERAL

Identificar y caracterizar cepas de *Rhizobium* nativo para la producción de biofertilizante en la provincia de Santa Elena.

1.3.2 ESPECÍFICOS

- Aislar bacterias del género *Rhizobium sp*, asociadas a cuatro tipos de leguminosas.
- Caracterizar morfológica y bioquímicamente bacterias del género *Rhizobium sp*.
- Seleccionar cepas para la preparación del inóculo y determinar su efectividad mediante pruebas de germinación.

1.4 HIPÓTESIS

Al menos un inoculante de cepa (s) de *Rhizobium* influye positivamente en las variables de la prueba de germinación y emergencia de las plántulas de maíz.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 TAXONOMÍA DE LOS RIZOBIOS

CARRANZA C. (2004, en línea) argumenta que la taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. Las técnicas que se utilizan para la clasificación de rizobios son el análisis de secuencias de los genes 16S rRNA, y la hibridación de ADN-ADN. Hasta la fecha se han propuesto 6 géneros, que son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*

VARGAS E. (1969), COYNE M. y SPAINK H. (2000) coinciden al afirmar que el rizobio es un habitante natural del suelo que subsiste como heterótrofo, pero no necesariamente existe en todo los suelos, también puede ser saprófito al desarrollarse en ausencia de la planta hospedante; sin embargo, su existencia libre continuada en los suelos, depende de la presencia de una raíz “hospedante” que estimule su proliferación

2.2 LOS RIZOBIOS Y LA ENDOSIMBIOSIS.

DEACON J. (s.f., en línea) señala que los compuestos reducidos de nitrógeno, como el amoníaco (NH_3), los nitratos (NO_3^-) y los nitritos (NO_2^-), son tan importantes para el crecimiento vegetal como escasos en el medio ambiente, y por ello son consumidos rápidamente en cuanto están disponibles. Sin embargo, en la naturaleza existe una importante razón por la cual, estos compuestos reducidos de nitrógeno no se han agotado todavía; son sintetizados continuamente gracias a diversos géneros de microorganismos.

RODRIGUEZ C. *et al.* (1984, en línea) indican que la fijación biológica aparece únicamente en bacterias, algas cianofíceas (algas azul-verdosas) y actinomicetos, microorganismos que a parte de ser procarióticos (sin membrana nuclear) y tener la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico, poco tienen en común. En efecto, entre los más de 60 géneros conocidos se encuentran formas aerobias, facultativas, anaerobias, autótrofas y heterótrofas, con hábitats muy dispares, tanto terrestres como acuáticos, y con requerimientos ambientales de temperatura, aireación, humedad, pH, etc., muy heterogéneos. Para conseguir esto, las bacterias emplean proteínas con la capacidad de facilitar ciertos tipos de procesos químicos, éstas trabajan juntas conformando el llamado complejo nitrogenasa.

DEACON J. (s.f., en línea) afirma que mediante el consumo de energía química las bacterias son capaces de sintetizar amoníaco a partir del nitrógeno. Posteriormente otras bacterias, como por ejemplo *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, oxidan el amoníaco convirtiéndolo en nitritos y nitratos, respectivamente y que pueden ser usados por las plantas.

2.3 GÉNERO *Rhizobium*

Según VARGAS E. (1969), el género *Rhizobium* junto con los géneros *Agrobacterium* y *Chromobacterium* forman la familia *Rhizobiaceae*; este deriva su nombre del griego “Rhiza” = raíz y “bios” = vida. La característica más importante es su habilidad para producir nódulos en las raíces de las leguminosas y vivir en asociación simbiótica con estas plantas mientras fija nitrógeno libre, lo cual no ocurre cuando los organismos están separados de la planta

2.3.1 MORFOLOGÍA DEL GÉNERO *Rhizobium*

AGUILAR O *et al.* (2004, en línea) coinciden al citar que son bacilos Gram negativos que miden 0,5 - 1,0 x 1,2 - 3,0 μm .

Contiene granos de poli-B –hidroxiburato, y se desplazan por medio de 1 - 6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares.

Investigaciones realizadas por COYNE M. (2000) demuestran que las colonias generalmente son blancas o beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2 - 4 mm de diámetro a los 3 - 5 días de incubación en YMA (Extracto de Levadura Manitol Agar).

Además añade que el crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de gelatina polisacárida extracelular. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Las cepas de este género son rizobios de rápido crecimiento.

2.3.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Rhizobium*.

CARRANZA C. (2004, en línea) afirma que Beijerinck en 1888, obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de raíz de leguminosa y lo llamó *Bacillus radicícola*.

Posteriormente Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados. Basada en la especificidad de los huéspedes, para 1929 ya se habían reconocido seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. En esta clasificación, cada especie se componía de cepas que compartían un grupo de leguminosas huésped.

En 1944 Wilson reportó un gran número de nodulaciones que cruzaban las fronteras de las diferentes especies clasificadas anteriormente. En 1964 Graham y en 1968 Moffett y Golwell sugirieron revisar la taxonomía basándose en resultados de la taxonomía numérica.

2.4 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE RIZOBIOS.

El CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL CIAT (1987), menciona que el proceso de aislamiento de rizobios de los nódulos incluye varios pasos para separarlos de los contaminantes presentes; además, es necesaria una serie de pruebas para caracterizar y autenticar los rizobios aislados; una vez autenticados, se puede evaluar su efectividad potencial: capacidad de fijar N₂ con leguminosas en condiciones óptimas

ALLEN y ALLEN (1981) y CIAT (1987) afirman que el aislamiento del rizobio se inicia esterilizando la superficie del nódulo, macerándolo y estriándolo en cultivos in vitro. Los rizobios por lo general pueden ser fácilmente suplementados con levaduras, una fuente de carbohidratos como el manitol, compuestos nitrogenados y cantidades menores de Magnesio El medio de cultivo comúnmente utilizado para el aislamiento de rizobios es el ELMARC (Extracto de Levadura, Manitol, agar, rojo Congo), que además contiene fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y carbonato de calcio.

Además indican que el extracto de levadura le proporciona a las bacterias productos de degradación de las proteínas, sustratos para la respiración, vitaminas y ciertos elementos; el manitol funciona como fuente de carbono, mientras que el rojo Congo ayuda a diferenciar los rizobios de otras bacterias; en general las colonias de rizobios presentan tinción débil con este colorante, en tanto que las colonias de muchas otras bacterias adquieren un color más intenso; sin embargo esta no es una característica definitiva ya que su expresión varía con la concentración de reactivos, la edad del cultivo, la exposición de la caja a la luz y no es lo suficientemente selectivo.

La temperatura óptima de crecimiento de rizobios en condiciones artificiales es de 25°C y su tolerancia al pH oscila entre 5 - 8.

2.5 EL NITRÓGENO

RODRIGUEZ C. *et al.* (1984, en línea) señalan que cualitativamente, el nitrógeno forma parte de moléculas tan importantes para la actividad biológica como son los ácidos nucleicos, donde se asienta la información genética, o las proteínas y enzimas, componentes estructurales fundamentales en la organización de la materia viva y catalizadoras de los procesos biológicos respectivamente.

El nitrógeno, según EDUCARCHILE.CL (s.f., en línea), es el componente principal de las proteínas presentes en todos los seres vivos, se recicla a través de su incorporación a las cadenas alimenticias y su posterior devolución a la atmósfera por los excrementos.

2.5.1 ABSORCIÓN Y ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO (N) POR LAS PLANTAS

Según ALEXANDER M. (1980), la absorción del nitrógeno por la planta es limitada por ser ésta una molécula inerte (N₂), con una gran estabilidad conferida por su triple enlace. Las plantas son incapaces de asimilar nitrógeno directamente.

GREEN y BLACKMER (1994) argumentan que el nitrógeno en forma natural puede llegar a la planta a través de dos mecanismos principales: transferido por las bacterias que previamente lo han fijado simbiótica o asimbióticamente, o disuelto en el agua de lluvia.

La cantidad de nitrógeno transferido a las plantas proveniente de la fijación simbiótica es variable, del orden de 50 a 70 kg/ha/año, mientras que la cantidad de nitrógeno aportada por la fijación no simbiótica y las lluvias oscila entre 10 y 20 kg/ha/año.

LEWIS M. (1999) indica que el nitrógeno natural del suelo presente en forma orgánica tampoco está disponible para las plantas y para ser absorbido tiene que pasar a formas inorgánicas.

Añade agrega que el nitrógeno inorgánico representa un 2 % del nitrógeno total del suelo, encontrándose en formas de nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y nitrito (NO_2^-). Estas formas inorgánicas son transitorias en el suelo, por lo cual las cantidades de nitrógeno inorgánico del suelo son extremadamente variables, pudiendo existir desde unos pocos gramos hasta más de 100 kg/ha de nitrógeno. Debido a que ésta es la forma en que el nitrógeno es absorbido por las plantas, el nitrógeno inorgánico es muy importante para la nutrición vegetal.

2.5.2 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO

RODRIGUEZ C. *et al.* (1984, en línea) señalan que el nitrógeno, al igual que todos los elementos biológicamente importantes, pasa por cambios cíclicos, de modo que puede ser utilizado y a la vez repuesto dentro de lo que se conoce como ciclo biogeoquímico del nitrógeno, por medio del cual un átomo de nitrógeno pasa del estado orgánico al inorgánico y viceversa, en una secuencia de procesos que implican actividades de organismos vivos y conversiones no biológicas.

EL CENTRO DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN AMBIENTAL DE NORTE AMÉRICA, A.C. CICEANA.ORG. (s.f., en línea) indica que el ciclo del nitrógeno es un conjunto de transformaciones que atraviesa 4 etapas:

- **Mineralización:** formación de nitrógeno inorgánico, como amoniaco, nitrito y nitrato, a partir de nitrógeno orgánico procedente de la desintegración de los organismos y sus excreciones. La mineralización incluye dos procesos:
 - Amonificación:** consiste en la formación de compuestos amoniacaes realizada por microorganismos heterótrofos, entre los que se encuentran bacterias y hongos.

Nitrificación: es la oxidación de amonio a nitrato en dos etapas realizadas por dos tipos de microbios que obtienen de ellas toda la energía que necesitan para su crecimiento.

Según BOSQUESMEDITERRANEOS.COM. (s.f., en línea), en la primera etapa de la nitrificación las bacterias del género Nitrosomona oxidan el amonio a nitrito y en la segunda etapa bacterias del género Nitrobacter convierten el nitrito en nitrato.

- **Absorción:** El nitrógeno inorgánico puede ser absorbido por plantas y microorganismos, pasar de nuevo a formar parte de la materia viva y circular a lo largo de las cadenas alimenticias.
- **Desnitrificación:** El nitrógeno puede ser transformado en nitrógeno molecular y sus óxidos, que mediante este proceso pueden escapar a la atmósfera.
- **Fijación:** El nitrógeno molecular atmosférico pasa a forma combinada.

2.6 FIJACIÓN DE NITRÓGENO

RODRIGUEZ C. *et al.* (1984, en línea) indican que la fijación de nitrógeno es la etapa reguladora del ciclo, en la que el nitrógeno atmosférico pasa a forma combinada, compensando así las pérdidas de ésta por desnitrificación y volatilización del amonio. Son tres las rutas:

- **La fijación espontánea** es un proceso natural en que descargas eléctricas de tormentas, radiación ultravioleta, rayos cósmicos, meteoritos, combustibles industriales e incendios, proporcionan momentáneamente la energía requerida para originar óxidos de nitrógeno e incluso amoníaco, a partir de nitrógeno molecular atmosférico, que eventualmente son arrastrados por el agua de lluvia al suelo.

- **La fijación industrial química** es la producción de amoníaco y fertilizantes nitrogenados por la industria a partir del nitrógeno del aire.
- **La fijación biológica** es la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, realizada por microbios libres o en asociación con plantas superiores, microbios que reciben por ello el nombre de diazótrofos (azoe: nitrógeno; trofos: alimentación).

2.6.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

Para TAIZ L. y ZEIGER E. (2006) la fijación biológica del nitrógeno atmosférico consiste en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa, es después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biósfera. Curiosamente, este proceso crucial solo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariontes.

SPRENT J. y SPRENT P. (1990, en línea) indican que a pesar de la abundancia de nitrógeno en la atmósfera, las plantas no lo asimilan de forma directa y se ven obligadas a utilizar las formas combinadas que se encuentran en el suelo en cantidad insuficiente para soportar los cultivos intensivos. La FBN contribuye globalmente de forma importante al suministro del nitrógeno requerido por las plantas.

2.6.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS

De acuerdo a MADIGAN M. y COL. (2000), las *Rhizobiaceae* son un grupo heterogéneo de bacterias que se ha dividido en cuatro familias: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Bradyrhizobiaceae*.

Dentro de estas familias sólo unos determinados géneros son capaces de efectuar el proceso de fijación de nitrógeno: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*,

Bradyrhizobium, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*. Con el fin de simplificar la lectura se denomina a todos estos géneros como *Rhizobium*.

VARGAS G. (2011) menciona que a diferencia de las cianobacterias y las bacterias pertenecientes al género *Frankia*, las *rizobiáceas* no pueden generar un ambiente anaerobio o microaerobio en donde poder realizar la fijación de nitrógeno por sí mismas.

Para llevar a cabo el proceso, estas bacterias deben encontrarse en las inmediaciones de plantas de la familia de las fabáceas e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación.

RODRÍGUEZ C. *et al.* (1984, en línea) describen cuáles las propiedades más importantes que deben existir entre el microbio y la planta, para que haya simbiosis entre ambas:

- **Especificidad**, o propiedad por la que el microbio infecte selectivamente a la planta hospedadora. La magnitud de la misma varía de unas simbiosis a otras, y así, por ejemplo, ciertas leguminosas tienen requerimientos muy concretos para “su rizobio”, mientras que otras aceptan un espectro más amplio, y, viceversa, un determinado rizobio puede infectar una sola especie de leguminosa, un grupo de especies, o incluso miembros de distintos géneros o subfamilias.
- **Infectividad**, o capacidad del microbio para invadir la planta hospedadora.
- **Efectividad**, o capacidad para que en el nódulo se lleve a cabo la secuencia de un proceso que conduzca a la reducción de nitrógeno atmosférico a amoníaco.

Hay una gran variedad entre las razas de un microbio infectivo, que va desde totalmente infectivo, a otras altamente infectivas.

2.7 ETAPAS DE INFECCIÓN Y FORMACIÓN DE NÓDULOS

Según COYNE M. (2000), y REDONDO M. *et al.* (s.f., en línea), la etapa de infección involucra los siguientes pasos:

- Reconocimiento de la combinación adecuada de organismos, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y la adherencia de la bacteria a los pelos radiculares.
- Invasión del pelo radical y formación de un canal o hilo de infección.
- Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través de un canal de infección.
- Diferenciación de las bacterias en un nuevo tipo al que se les llama bacteroides dentro de las células de la planta y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno.
- Proceso continuado de división de las células bacterianas y vegetal y formación del nódulo radical maduro con cinco zonas.

VILLALOBOS E. (2006) manifiesta que los bacteroides al introducirse en las células vegetales son envueltos por una membrana denominada, membrana peribacteroidal o simbiosomal.

Además indica que la membrana peribacteroidal envuelve las bacterias y las aísla del contacto con el citosol de las células de la corteza y regula el intercambio de nutrimentos de las bacterias con la planta.

OBATON M. (1995) describe cinco zonas que se encuentran conformando al nódulo, estas son:

- **Un meristemo:** Formado por pequeñas células no contaminadas por *Rhizobium*, que es la zona de crecimiento del nódulo.
- **La zona del hilo de infección:** Las células en esta zona se multiplican activamente y están contaminadas por *Rhizobium*, pero no ocurre fijación.
- **La zona de fijación:** Donde las células de la planta huésped están llenas con *Rhizobium* y toman forma ensanchada y son llamados bacteroides. Éstos contienen una enzima llama nitrogenasa, que hace posible la fijación del nitrógeno atmosférico, la enzima contiene hierro y molibdeno, metales necesarios para el transporte de electrones para la reducción del nitrógeno.
- **La zona degenerativa:** Son de color verde o marrón, estas células de la planta huésped se degeneran y no ocurre fijación.
- **El sistema vascular:** Derivado de los vasos del cilindro central, irriga el nódulo suministrando los carbohidratos necesarios para la fijación.

2.8 INFLUENCIA DEL AMBIENTE SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

CARRANZA C. (2004, en línea) cita que existe una gran diversidad de factores ambientales que influyen directamente en la eficacia de la simbiosis, estos son:

- **Nitrógeno inorgánico:** La presencia de nitrógeno inorgánico en el suelo, procedente de fertilizantes inhibe la fijación de nitrógeno. El tamaño de los nódulos y su cantidad es menor cuanto existen niveles relativamente altos de nitrato y amonio. Por otro lado bajas concentraciones de nitrógeno inorgánico estimulan la nodulación.
- **pH del suelo:** En la mayoría de leguminosas la infección de *Rhizobium* no ocurre en pH menores a 5.

El crecimiento de *Rhizobium* también se ve influenciado por pH bajos. Esta inhibición de la simbiosis en suelos ácidos, se debe a la concentración de iones hidrógeno y a la toxicidad resultante del hierro y aluminio principalmente.

- **Temperatura:** La temperatura óptima de crecimiento de *Rhizobium* es de 30° C.
- **Fósforo y potasio:** Son macronutrientes esenciales para el crecimiento de la planta, por lo que su presencia en el suelo se asocia con leguminosas vigorosas y de buen crecimiento.
- **El cobalto:** Estimula marcadamente la utilización de nitrógeno atmosférico por las leguminosas, se cree que esto se debe a que estimula la proliferación y metabolismo de *Rhizobium* dentro de la raíz.
- **Los micronutrientes:** Son necesarios tanto para la leguminosa como para *Rhizobium*, y por ende para una simbiosis efectiva.

2.9 ASOCIACIONES FIJADORAS DE NITRÓGENO

RODRIGUEZ C. *et al.* (1984, en línea) revelan la interdependencia muy elevada que existe entre los organismos asociados, una de ellas es la simbiosis mutualista, que conduce a la formación de estructuras especializadas en las raíces, como en *Sesbania spp.*, que aparecen como respuesta de la planta a su invasión por el microbio.

En efecto, las plantas superiores forman este tipo de simbiosis fijadora de nitrógeno, con bacterias (*Rhizobium*, castellanizado: rizobios), actinomicetos (*Frankia*), y algunas algas azul-verdosas, teniendo todas ellas especial impacto en la producción vegetal de sus respectivos hábitats y/o cultivos.

2.10 EFECTO DE *RHIZOBIUM* EN PLANTAS NO LEGUMINOSAS

SESSITSCH J. *et al.* (2002) indican que un considerable número de especies bacterianas asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de plantas. Este grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incluye el género *Rhizobium*.

HASSAN G *et al.* (1997), ESSALMANI y LAHLOU, (2003) manifiestan que estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta.

Según SESSITSCH J. *et al.* (2002), la estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno; PERRINE F. *et al.* (2004) indican la producción de hormonas, MAYAK S. *et al.* (2004) de enzimas VAN R. *et al.* (1994) y CARSON *et al.* (2000) la producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos según RODRIGUEZ H. y FRAGA (1999).

Investigaciones realizadas por CHAKRAVARTY y PURKAYASTHA (1984), CHABOT *et al.* (1996), HASSAN G. *et al.* (1997), RODRÍGUEZ y FRAGA (1999) coinciden al afirmar que la capacidad PGPR de *Rhizobium* ha sido estudiada por varias décadas, sin embargo, para YANNI Y. *et al.* (2001), ESSALMANI y LAHLOU (2003), DEY R. *et al.* (2004), MHADHBI H. *et al.* (2004) y PERRINE F. *et al.* (2004), en los últimos años este estudio ha sido intensificado porque la agricultura sustentable demanda mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno a través del uso de

bacterias competitivas capaces de extender la ventaja de la simbiosis a otros cultivos no leguminosas.

ANTOUN *et al.* (1998) consideran que los rizobios, rizobacterias conocidas comúnmente como organismos que fijan nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas, pueden colonizar e influir en el crecimiento de otras familias de plantas.

La ciencia ha demostrado el efecto positivo de las bacterias rizosféricas, entre ellas los rizobios, en las gramíneas (SAHIN *et al.* 2004, ANTOUN y PRÉVOST 2005 y ANYA *et al.* 2009).

Se ha comprobado en trabajos previos (PRÉVOST D. *et al.* 2000) que la inoculación de plantas de maíz con rizobios, en condiciones controladas, tiene efectos positivos en los indicadores fisiológicos del vegetal.

CHABOT *et al.* (1996) plantearon que estas bacterias pueden colonizar también las raíces de plantas no leguminosas e influir, significativamente, en su crecimiento mediante la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

ROSENBLUETH M. y MARTÍNEZ R. (2004) refirieron que *Rhizobium etli* es un endófito natural del maíz, y que *R. tropici*, al ser inoculado, se puede convertir en un endófito competitivo en ese cultivo.

2.11 PRUEBAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS PARA LA PURIFICACIÓN DE CEPAS DE *Rhizobium*.

GRAHAM (1964) manifiesta que el conocimiento microbiológico y bioquímico de las especies del género *Rhizobium* permite reconocerlas y agruparlas en base a su actividad y comportamiento en los diferentes medios de cultivo.

Según FERRERA R. *et al.* (1993) las pruebas específicas para aislamiento de *Rhizobium* son:

- **Morfología macroscópica:** Se toma una muestra del macerado del nódulo y se siembra por estría en el medio ELMARC. Las colonias presentan por lo regular morfología convexa, pulvinada o cónica; varían en color, desde blanco opaco, hasta translúcido acuoso. Las colonias opacas tienen desarrollo firme y con algo de goma, mientras que las colonias menos densas son a menudo gomosas y blandas, en ocasiones, las colonias de más edad pueden desarrollar centros oscuros. Los contaminantes comúnmente son de color rojo oscuro.
- **Morfología microscópica:** Colocar una gota de agua destilada en el centro del porta objetos y en ella hacer una ligera suspensión de la cepa a observar, dejar secar la gota a temperatura ambiente y proceder a fijarla con una ligera llama del mechero, una vez fijado el frotis se tiñe con los colorantes de Gram. En este frotis se observará morfología, inclusiones de polihidroxibutirato y la reacción positiva o negativa que da la bacteria a la tinción.
- **Velocidad de crecimiento:** Sembrar por el método de estrías en medio ELMARC las cepas de *Rhizobium* aisladas anteriormente; incubar y observar los cultivos cada 48 horas durante 10 días, anotar el tiempo en que se presente un crecimiento franco. Se consideran de crecimiento rápido aquellos rizobios que crecen en tres o cuatro días y de crecimiento lento de siete o más días.

- **Producción de ácido o álcali:** Sembrar las cepas de *Rhizobium* en forma de “S”, en el medio extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol (ELMABT) incubar de tres a siete días y observar el cambio de color de este medio: si no hay cambio, el medio es neutro, azul indica alcalinidad y amarillo indica acidez; los resultados de esta prueba permiten agrupar a los rizobios como ácido productores o álcali productores.
- **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 llamada catalasa, la misma que desdobla al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en hidrógeno y oxígeno libre.

Es detectado por la formación de burbujas de aire en contacto con las colonias. Se deposita una colonia sobre una placa de vidrio limpia y seca que contiene una gota de agua oxigenada al 10 %, si se observa burbujeo la reacción a la catalasa es positiva.

- **Crecimiento en glucosa peptona agar púrpura de bromocresol (PGA):** Estriar las cepas en este medio, incubarlas a 28 °C durante 24 horas y anotar cambios. Los rizobios no se desarrollan bien en este medio, por tanto un crecimiento notorio acompañado de un cambio de pH, indica la presencia de un contaminante. Los contaminantes no crecen bien a veces en el LMA lo cual puede entenderse equivocadamente que el cultivo está puro cuando se usa sólo LMA.
- **Crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl):** Hacer tres repeticiones e inocular una asada de las cepas en botellas de dilución que contengan caldo extracto de levadura manitol, con diferentes niveles de NaCl. (2, 3 y 5 %). Incubar agitando a 28 °C por un periodo de seis días y al finalizar observar si hubo crecimiento.

- **Prueba de Ketolactosa: (LLA= Levadura-Lactosa-Agar):** Esta prueba permite diferenciar las bacterias del género *Agrobacterium* de las pertenecientes al género *Rhizobium*. Esta diferenciación se efectúa debido que el *Agrobacterium* es un género de bacterias que también pertenece a la familia *Rhizobiaceae*, y tiene características similares a las de los rizobios de crecimiento rápido. En algunas leguminosas puede formar nódulos, pero que no tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. SOMASEGARAN P. *et al.* (1994).
- **Prueba ANTIMIC:** El uso de pesticidas (fungicidas, insecticidas, acaricidas, herbicidas, etc.), es una práctica común y fundamental en el control de factores biológicos que reducen el rendimiento de los cultivos.

El uso de pesticidas tiene un marcado efecto sobre las poblaciones de microorganismos no patógenos que se encuentran asociados a la rizósfera de las plantas y al suelo, en donde se incluyen tanto las cepas nativas de *Rhizobium*, como las cepas introducidas.

Se ha observado que no todos los pesticidas repercuten negativamente sobre *Rhizobium*, se sabe que algunos de ellos tienen un efecto estimulante en la formación de nódulos de algunas leguminosas. COMITÉ NACIONAL DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (1984, citado por FERRERA *at al.* (1993)

2.12 MEDIOS DE CULTIVO

Según DANIVAL.ORG (2000, en línea), uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio.

El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el Cultivo. Existen más de 10000 medios de cultivo diferentes.

Además añade que las bacterias deben reunir una serie de condiciones adecuadas, (temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno, un grado correcto de acidez o alcalinidad, para crecer en un medio de cultivo. Este medio debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y estar exento de todo microorganismo contaminante.

Investigaciones realizadas por GAMAZO C. *et al.* (2005), indican que medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos. La diversidad metabólica de los medios de cultivo es enorme, por ello la variedad es también amplia. No existe un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos.

2.12.1 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO MICROBIANO

De acuerdo a GERARD J. *et al.* (2007), los requerimientos pueden dividirse en dos categorías: físicos y químicos. Los aspectos físicos comprenden la temperatura, el pH y la presión osmótica. Los químicos incluyen la fuente de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos, oxígeno y factores de crecimiento orgánicos.

a) Factores físicos

Para DANIVAL.ORG. (2002, en línea) la mayoría de los microorganismos crecen bien a temperaturas preferidas por los seres humanos, sin embargo, ciertas bacterias se desarrollan en medios extremos, impidiendo el desarrollo de casi todos los organismos eucariontes.

La concentración de iones de hidrógeno también tiene un papel importante en el desarrollo de los microorganismos. La mayoría de ellos prefieren los medios con pH neutro, aunque hay otros que crecen bien en medios más o menos ácidos.

GERARD J. *et al.* (2007) señalan que casi todos los nutrientes que obtienen los microorganismos se encuentran disueltos en el agua circundante, por ende los microorganismos requieren agua para crecer y están constituidos por un 80 a 90 % de agua. La presión osmótica elevada elimina el agua de la célula.

Cuando un microorganismo se encuentra en una solución que tiene una concentración mayor de soluto que la de la célula, el agua celular atraviesa la membrana plasmática y se difunde hacia la zona de mayor concentración de soluto. Esta pérdida de agua causa plasmólisis inhibiendo el crecimiento de la célula.

b) Factores químicos

Para HERNANDEZ A. *et al.* (2003) el carbono constituye la estructura básica de la materia viva, es necesario para todos los compuestos orgánicos que forman una célula viva. La mitad del peso seco de una célula típica está conformada por carbono. Los quimioheterótrofos obtienen la mayor parte de su carbono (fuente de su energía), de materiales orgánicos como proteínas, hidratos de carbono y lípidos. Los quimioautótrofos y fotoautótrofos obtienen su carbono del dióxido de carbono.

GARCÍA V. (2005) indica que los microorganismos necesitan otros elementos para la síntesis del material celular. Esos elementos son el nitrógeno, azufre y fósforo. La síntesis de proteínas requiere grandes cantidades de nitrógeno así como algo de azufre, lo mismo que la síntesis de ATP, la molécula más importante para el almacenamiento y la transferencia de energía química dentro de la célula.

El nitrógeno constituye cerca del 14 % de la célula bacteriana y el azufre y el fósforo juntos constituyen alrededor de otro 4 %.

Según HERNANDEZ A. *et al.* (2003), los microorganismos requieren muy pocas cantidades de otros elementos minerales, como el hierro, cobre, molibdeno y zinc (oligoelementos). Casi todos son esenciales para las funciones de ciertas enzimas, por lo general como cofactores, aunque en ocasiones estos elementos se agregan al medio de cultivo, se entiende que éstos están presentes naturalmente en el agua corriente y otros componentes del medio. Incluso el agua destilada contiene cantidades suficientes de estos elementos.

QUINTERO R. (1993) menciona que existen microorganismos que crecen en presencia de oxígeno, denominados aerobios estrictos, pero hay otros que no lo hacen, éstos son llamados aerobios facultativos.

Para GERARD J. *et al.* (2007) los factores de crecimiento orgánicos son aquellos compuestos esenciales que los microorganismos no pueden sintetizar y pueden obtenerse directamente del ambiente. Las vitaminas forman parte de este grupo, la mayoría de ellas actúan como coenzimas, también se encuentran los aminoácidos, las purinas y pirimidinas.

2.12.2 COMPONENTES DE UN MEDIO DE CULTIVO

FAGRO.EDU.UY. (2000, en línea) indica que la mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añaden otros ingredientes.

Como agente gelificante generalmente se emplea Agar, se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es

atacado por aquellas que crecen en él. Debe considerarse la pureza del Agar, ya que frecuentemente se haya impurezas de naturaleza variable.

ROCA M. y MIROGINSKI A. (1991) afirman que la gelatina es otro solidificante muy poco empleado porque varias bacterias provocan su licuación. En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc.

Los hidratos de carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras (el Rojo Fenol se usa como indicador ya que es rojo en pH básico y amarillo en pH ácido. La Violeta de Genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram-positivas).

2.12.3 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

PERSO.WANADOO.ES (s.f., en línea) clasifica a los medios de cultivo según:

a) Las cualidades físicas

- **Líquidos:** Son los que se presentan en este estado, denominándose por esta razón caldos.
- **Semi-sólidos:** Se preparan a partir de los medios líquidos, agregando a éstos un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus usos es la investigación de la movilidad de las bacterias

- **Sólidos:** Se preparan a partir de los medios líquidos, agregándoles un agente gelificante. Los más utilizados son la gelatina y el agar.

b) La formulación

- **Medios químicamente definidos,** cuando se conoce exactamente la cantidad de cada uno de los compuestos que contiene.
- **Medios complejos** según HERNANDEZ A. *et al.* (2003) se realizan a partir de extractos naturales (extracto de levadura, sangre, etc.).

c) De acuerdo al uso, GARCÍA V. (2005) los clasifica en:

- **Medio General:** Es aquel medio donde crecen todo tipo de microorganismos, excepto aquellos que necesitan de unas condiciones especiales.
- **Selectivos:** permiten seleccionar el crecimiento de una especie o grupo determinado (hongos, bacterias entéricas, protozoos).
- **Diferenciales:** Permiten identificar una especie o grupo por su crecimiento ya sea por su metabolismo, respiración, etc.
- **De enriquecimiento:** Son medios diseñados para permitir el crecimiento del máximo número de especies posible. Pueden usarse, por ejemplo, para estudiar todos los microorganismos presentes en una muestra.
- **Mínimo:** Contienen la mínima cantidad de nutrientes posible que permite el crecimiento de una especie.
- **De transporte:** Está preparado para servir de almacenamiento temporal a especímenes transportados manteniendo su viabilidad y su concentración.

2.13 INOCULANTES

Según LABZA.COM.AR. (s.f., en línea), un inoculante es un concentrado de bacterias específicas, que aplicado convenientemente a la semilla poco antes de su sembrado, mejora el desarrollo del cultivo.

Su empleo es una práctica agronómica reconocida en el mundo por sus beneficios productivos y económicos (principalmente en gramíneas y leguminosas), a tal punto que desde hace algunas décadas se lleva a cabo en países de los cinco continentes (México, Holanda, Brasil, Japón, Bulgaria, Colombia, Australia, Canadá, Estados Unidos, República Checa, Argentina, etc.)

2.13.1 CARACTERÍSTICAS DE UN BUEN INOCULANTE

Para VINCENT M. (1970) un buen inoculante debe contener un número alto de bacterias viables. Los estándares mínimos de calidad de inoculantes varían según el país. Es importante que el inoculante no sea expuesto a temperaturas mayores a 30 – 35 °C durante el transporte y almacenamiento.

Para que un inoculante se considere de alta calidad, debe estar, en la medida de lo posible, libre de contaminantes, para evitar relaciones competitivas de supervivencia por sitio y sustrato en el recipiente que lo contiene.

BASHAN Y. (1998) indica que los inoculantes se deben poder esterilizar fácilmente y en lo posible deben ser uniformes en cuanto a sus características químicas y físicas. También deben tener una calidad constante, una capacidad de retención de agua (para los soportes húmedos) y ser adecuados para el mayor número de especies y cepas bacterianas como sea posible.

De acuerdo a STEPHENS J. y RASK H. (2000), uno de los grandes retos para la producción de biofertilizantes (inoculantes) ha sido el encontrar un soporte que cumpla las siguientes características:

- Que se encuentre fácilmente disponible, teniendo una composición uniforme y con un precio asequible.
- Que no sea tóxico para la bacteria.
- Que tenga una alta capacidad de retención de agua.

- Que sea fácilmente esterilizado.
- Que se pueda corregir fácilmente su pH a valores de 6,5 a 7,3.
- Que favorezca el crecimiento inicial de la bacteria utilizada, y que mantenga un alto número de células hasta su uso.

SMITH S. (1992) manifiesta que la turba es el soporte sólido más ampliamente utilizado en la preparación de inoculantes, y que está dando mejores resultados.

2.13.2 TIPOS DE INOCULANTES

Existen varios tipos de inoculantes, OBATON M. (1995) los clasifica de la siguiente forma:

- **En polvo:** Es el tipo más común en el mercado. El cultivo de *Rhizobium* se mezcla con un soporte finamente molido (pH, cercano a 6,5), que protege al *Rhizobium* durante el periodo de almacenamiento y provee mejor adhesión a la semilla.
- **Granulado:** El producto consiste en microgránulos producidos a partir de inoculante en polvo y gránulos de arcilla. Este tipo de inoculantes se aplica en el surco de siembra, permitiendo separar los rizobios de las semillas que han sido tratadas con pesticidas o fungicidas. SCRIBD.COM.ES, (s.f., en línea).
- **Líquidos:** En base oleosa (suelen tener fungicidas en la formulación) o acuosa. Esta última es la tecnología más avanzada. Se mezclan con la semilla o se aplican en el surco junto con ella y se logra una adherencia mucho mayor que otras formulaciones sólidas. VINCENT M. (1970).
- **En medios de Agar:** Esta formulación está en total desuso por el bajo nivel de sobrevivencia de *Rhizobium* sobre la semilla.

2.13.3 PRODUCCIÓN DE INOCULANTES Y CONTROL DE CALIDAD

RODRÍGUEZ C. (1984) y FERRERA R. (1993) recomiendan los siguientes pasos para la producción de inoculantes de calidad.

1. **Producción del Inóculo:** Para la producción del inóculo se usa una cepa de *Rhizobium* que ha pasado la selección de invernadero y campo, con base en infectividad, efectividad en la fijación de nitrógeno y competencia al ser inoculada. Con un cultivo joven de *Rhizobium* de crecimiento rápido y mediante tres asadas se inoculan dos botellas de dilución con 25 ml de CELM cada una, que se utilizarán para inocular el fermentador.
2. **Preparación del fermentador:** Se prepara un fermentador de un litro que contenga medio litro del CELM esterilizado, se inocula con 15 ml de inóculo antes preparado. Ya listo el fermentador suministrar aire filtrado. El proceso de fermentación dura de dos a cinco días.
3. **Se cuantifica *Rhizobium*** al medir la turbiedad por la escala Mc. Farland o dilución en placa; además se mide el pH. Cuando se obtenga una población aproximada de 10^9 bacterias por mililitro, el inóculo estará listo para ser aplicado.
4. **Neutralización de la turba.** Se pesan 10 g de turba y se colocan en un vaso de precipitado que contiene 20 ml de agua destilada neutra, se agita por cinco minutos con un agitador magnético y se mide el pH: si éste es ácido se agrega poco a poco carbonato de calcio hasta obtener un pH de 6,5 a 6,8 sin emplear más de 1 g de carbonato por 10 g de turba. Cuando se tiene la cantidad exacta de carbonato de calcio (se recomienda usar el gramo comercial), se colocan 200 g de turba en frascos de cristal de un litro, el equivalente de carbonato de calcio para neutralizar, y con una espátula la mezcla se hace homogénea hasta que desaparezcan los grumos.

Se agrega además una pinza de carbón activado con la finalidad de detectar algún tóxico que pueda estar en la turba, se agrega 60 ml de agua destilada neutra y se homogeniza.

5. **Esterilización de la turba:** Los frascos ya preparados con la turba se esterilizan en autoclave a 18 lb por tres horas. Después se ponen en un horno a secar a una temperatura de 72 °C por 24 horas con la finalidad de que pierdan el exceso de humedad y así se absorba la mayor cantidad de inóculo.
6. **Impregnación de la turba:** Se colocan 30 g de turba en bolsas de plástico desinfectadas y se les agrega aproximadamente 20 ml de inóculo hasta homogeneizar perfectamente, sin que se presente saturación de humedad. Una vez impregnada la turba se sella la bolsa y se incuba a 28 °C por 10 a 15 días aproximadamente.

2.14 FORMAS PARA EVALUAR UNA POBLACIÓN BACTERIANA

Los recuentos bacterianos se pueden efectuar por diferentes métodos, ya sea conteo solo de células vivas o también vivas y muertas. La cantidad y tipo de microorganismos en una muestra dependen de la composición química de la misma y de los tratamientos a que haya sido sometida.

El método del conteo elegido depende del objetivo del conteo. En esta forma se puede determinar la presencia o ausencia de microorganismos, así como el número presente en el material de estudio. Un conteo total establece el grado de contaminación microbiana. Conociendo el número se puede estandarizar la concentración de inóculos y seguir la dinámica poblacional de un cultivo puro y muchos otros estudios.

Según BENINTENDE S. y SANCHEZ C. (s.f., en línea), los métodos de conteo son:

a) Conteo microscópico directo: Es una técnica común y rápida que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología, ya que consiste en contar con un microscopio la cantidad de células presentes en un volumen determinado. Para estos conteos se utilizan generalmente cámaras de recuentos (cámara de Petroff Hauser, cámara de Neubaver). Una de las mayores ventajas del recuento microscópico es brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados.

El conteo se realiza con una cámara dividida en 25 cuadrados, se conoce el área de los 25 cuadrados y el volumen que ésta admite. Contando el número de bacterias que hay en uno o algunos de los cuadrados se puede conocer cuánto hay en un volumen conocido. Suponiendo 50 bacterias en 25 cuadrados y sabiendo que los 25 cuadrados corresponden a $0,02 \text{ mm}^3$, se tiene:

$$\begin{array}{rcl} 50 \text{ bacterias} & \rightarrow & 0,02 \text{ mm}^3 \\ \mathbf{X} & \rightarrow & 1000 \text{ mm}^3 \\ \mathbf{X} & = & 2'500 \text{ 000 bacterias/ml.} \end{array}$$

b) Conteo de células viables: El método se basa en la consideración de que el crecimiento implica el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias. Este método puede hacerse con medios sólidos o líquidos. Por lo tanto se determinan por este método sólo las células microbianas viables en las condiciones de trabajo (nutrientes, atmósfera, temperatura).

Se siembra una cantidad conocida de la suspensión bacteriana cuyo número se desea conocer. Cada bacteria se multiplicará formando una colonia visible a simple vista que puede ser contada. Como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término unidades formadoras de colonias (UFC), y esto puede constituir una desventaja ya que si dos bacterias no se separan darán una sola colonia, subestimando de esta forma el número de microorganismos en la suspensión.

Además, a los efectos de que todas las células que queden en una placa tengan una adecuada disponibilidad de nutrientes, y que los errores del método sean menores, se establece que las condiciones óptimas de conteo se dan cuando desarrollan entre 30 y 300 colonias.

Por otra parte GERADR J. *et al.* (2007) proponen las siguientes técnicas de determinación para conteo bacteriano:

a) Número más probable (NMP): Esta estimación estadística se basa en el hecho de que cuanto mayor sea el número de bacteria en una muestra mayor será la dilución necesaria para reducir la densidad hasta el punto en el cual no se desarrolle ninguna bacteria en los tubos de una serie de diluciones.

El NMP es solo un informe de que existe un 95 % de probabilidades de que la población bacteriana disminuya dentro de ciertos límites y de que el NMP es número estadísticamente más probable.

b) Medición de la densidad bacteriana: Es una técnica en la que se mide la masa de microorganismos en una suspensión. Para ello se utiliza un espectrofotómetro y se mide la cantidad de luz que atraviesa en una suspensión de microorganismos, en comparación con un blanco que es el medio esterilizado y sin sembrar. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, tanto menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Para relacionar la transmitancia con la densidad bacteriana se requiere hacer curvas patrón de densidad conocida.

OLIVAS E. y ALARCON L. (2004) mencionan otros métodos de recuento:

➤ **Determinación de ATP:** Es una técnica que permite determinar indirectamente la masa en una población bacteriana. Se considera que la proporción de ATP encontrada en una muestra es proporcional con la presencia de células vivas.

- **Recuento electrónico:** se hace pasar un volumen de la muestra con microorganismos a través de un orificio de 5 a 10 mm de diámetro, mediante una micropipeta de mercurio. La resistencia eléctrica a través del orificio está normalizada y se altera cada vez que un microorganismo pasa a través de él. La modificación de la resistencia se amplifica y se registra electrónicamente.

2.15 FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA INOCULACIÓN

Según LABZA.COM.AR. (s.f., en línea), la eficiencia de la nodulación depende del cultivo, la cepa que coloniza, lugar de la raíz donde lo hace y las condiciones de desarrollo de la planta. En todos los casos, el tipo de laboreo influye en el equilibrio de la microflora. Pero para que el nódulo se forme, hay que tener en cuenta además una serie de factores (temperatura, radiación solar, acidez del suelo, cantidad de oxígeno, disponibilidad de agua, estado sanitario de la semilla y actividad de productos químicos), que pueden resumirse en los siguientes:

- **Stress de la planta:** nutrientes deficientes, enfermedades o herbicidas.
- **Acidez del suelo:** los Rizobios, por ejemplo, pueden morir rápidamente en un suelo con un pH menor a 5,5 y son incapaces de sobrevivir cuando es menor a 4,2.
- **Sequías prolongadas.**
- **Elevadas temperaturas y heladas:** pueden reducir la población nativa.
- **Inundaciones:** pueden reducir la cantidad de bacterias inoculadas.
- **Pesticidas y tratamiento de semillas:** éstos pueden ser tóxicos para las bacterias inoculantes.
- **Niveles de nitrógeno en el suelo:** si hay en el suelo un alto nivel de nitrógeno, la planta puede utilizarlo antes de realizar la fijación; en presencia de altos niveles de este elemento, se puede reducir la formación de nódulos.

En síntesis varios estudios afirman que las bacterias de este género no solo viven en simbiosis con leguminosas, sino que también subsisten en el suelo como heterótrofos o saprófitos al desarrollarse en ausencia de la planta hospedera.

Las rizobacterias también colonizan las raíces de plantas no leguminosas como arroz, maíz, cebada, remolacha, colza, lechuga y caña de azúcar, estimulando la producción de sustancias promotoras del crecimiento y favoreciendo el desarrollo del cultivo.

Dado que el cultivo de maíz tiene preponderante importancia para la alimentación humana y animal, investigaciones buscan mejorar el rendimiento y calidad del producto, por medio de la biofertilización con *Rhizobium*.

Se ha demostrado que los rizobios aplicados a no leguminosas no solo incrementan la capacidad de fijar nitrógeno, sino que además estimulan el crecimiento de la planta mediante la producción de hormonas reguladoras del crecimiento tales como citoquininas, giberelinas, ácido indol acético, otorgándole salud y vigor a las plantas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DE ENSAYO

El experimento se realizó en los laboratorios de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, las muestras (raíces noduladas) fueron extraídas de tres sectores: Río Verde, Manglaralto y el campo de prácticas La Libertad.

- **Río Verde**, ubicado en la vía Guayaquil - Salinas km 118, en el cantón Santa Elena, provincia de Santa Elena, altura de 25 msnm., latitud Sur 2° 10' 45" y latitud Oeste 80° 40' 18", presenta una precipitación de 83 mm, temperatura media anual de 24 °C, una humedad relativa de 80 % y evapotranspiración 2 - 4 mm/día. Suelo de textura franco-arcillo arenoso, pH de 7,7 y 0,8 % de materia orgánica. Nitrógeno 17 ppm, fósforo 11 ppm, potasio 0,75 meq/100 ml.
- **Manglaralto**, ubicado en la parroquia Manglaralto, cantón Santa Elena, Provincia de Santa Elena, con temperatura promedio entre 20 y 30 °C., precipitación media anual entre 100 - 200 mm, altura 23 msnm. Suelo de textura franco arcilloso; con 2,4 % de materia orgánica y un pH 7,2. Nitrógeno 33 ppm, fósforo 39 ppm, potasio 4,70 meq/100 ml
- **Campo de prácticas La Libertad "UPSE"**, ubicada en el Km 1 ½ vía La Libertad - Santa Elena a 34,475 msnm. Su clima es seco, su temperatura promedio anual es de 25 °C. Suelo de textura Franco - Arenosa, con 55 % de arena, 35 % de limo y 10 % arcilla, pH es 7,8.

3.2 MATERIAL VEGETAL

Raíces noduladas de: *Phaseolus vulgaris* L, *Cajanus cajan*, *Vigna sp.* y *Leucaena leucocephala*, para aislar las bacterias.

Para la prueba de germinación se utilizó semillas de maíz, variedad Agri – 104.

3.3 MATERIALES, HERRAMIENTAS Y EQUIPOS

3.3.1 MATERIALES DE LABORATORIO

Insumos y reactivos.

- Extracto de levadura manitol Agar rojo congo (ELMARC).
- Extracto de levadura lactosa Agar (LLA).
- Extracto de levadura manitol Agar (ELMARC)
- Reactivos para tinción de Gram
- Glucosa, lactosa y sacarosa peptona Agar (PGA).
- ELMARC más NaCl.
- Discos de sensibilidad
- Pesticidas (AMINAROC, SEMEVIN, DEMOLEDOR)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Caldo extracto de levadura manitol (CELM)
- Soluciones para ajustar pH.

Materiales y equipos

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| ➤ Fiolas | ➤ Calibrador |
| ➤ Mascarilla | ➤ Vasos de precipitación |
| ➤ Cámara fotográfica | ➤ Refrigerador |

- Espátulas
- Pipetas
- Turba esterilizada
- Mangueras/neplos
- Probetas
- Bisturí
- Mecheros
- Fermentador
- Microscopio
- Cinta
- Autoclave
- Filtros micrométricos
- Tubos de ensayo
- Pinzas
- Balones de vidrio
- Mandil
- Papel aluminio
- Turba
- Estufa
- Bomba de pecera
- Agitadores
- Regla
- Pipetas automáticas
- Medidor de pH
- Incubadora
- Bandejas de aluminio
- Cajas Petri
- Placas porta objeto
- Vidrio reloj
- Estereomicroscopio
- Erlenmeyer con tapa rosca
- Chupones para picetas
- Soporte universal
- Picetas

3.4 EXPERIMENTO

3.4.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

- Se tomaron muestras aleatorias de leguminosas de interés en cada zona seleccionada.
- Se extrajo las raíces noduladas excavando a una profundidad de 20 centímetros, y alrededor de la planta 15 cm aproximadamente.

- Se las colocó en fundas plásticas rotuladas y procesadas inmediatamente en el laboratorio de Biología de la “UPSE”.

3.4.2 AISLAMIENTO DE CEPAS DE RIZOBIOS.

3.4.2.1 Lavado y selección de nódulos:

- Se lavaron las raíces con agua corriente evitando perder nódulos.
- Los nódulos fueron separados de las raíces y cortados transversalmente para verificar la actividad de la nitrogenasa considerando los siguientes parámetros: tamaño y color externo e interno de los nódulos.
- Se eligieron nódulos con coloración interna roja y rosada. MADIGAN M. *et al.* (2000) y MATOS G. *et al.* (2001) coinciden al mencionar que la gran abundancia de nódulos con dicha coloración se explica por la presencia de la leghemoglobina (proteína específica del nódulo o nodulina), encargada de aportar O₂ a los bacteroides y controlar los niveles de este elemento para proteger a la nitrogenasa y evitar la inactivación de dicha enzima. Además la leghemoglobina indica que existe fijación eficiente de nitrógeno.
- Los nódulos necrosados y vacíos se descartaron.

3.4.2.2 Desinfección del nódulo:

- Los nódulos fueron sumergidos en alcohol al 95 % por 10 segundos, enjuagados con agua destilada y colocados en solución de cloro al 50 % por 5 minutos. Se enjuagaron nuevamente seis veces con el fin de eliminar residuos de cloro y alcohol, evitando la contaminación de otros microorganismos. Finalmente se maceraron y se sometieron a tinción de Gram en fresco.

Seleccionados los nódulos de cada cultivo se establecieron los códigos para identificarlos.

Cuadro 1. Caracterización de cultivos seleccionados

Nombre Científico	Nombre común	Origen	Simbología
<i>Cajanus Cajan</i>	Frejol de palo	Río Verde	FP RV
<i>Phaseolus vulgaris</i> L	Frejol vainita	Río Verde	VAI RV
<i>Vigna sp.</i>	Tumbe	Río Verde	TUM RV
<i>Cajanus Cajan</i>	Frejol de palo	Manglaralto	FP MG 1
<i>Cajanus Cajan</i>	Frejol de palo	Manglaralto	FP MG 2
<i>Cajanus Cajan</i>	Frejol de palo	Manglaralto	FP MG 3
<i>Cajanus Cajan</i>	Frejol de palo	Manglaralto	FP MG 4
<i>Leucaena leucocephala.</i>	Leucaena	Río Verde	LEU RV
<i>Leucaena leucocephala</i>	Leucaena	“UPSE”	LEUPSE 1
<i>Leucaena leucocephala</i>	Leucaena	“UPSE”	LEUPSE 3

3.4.2.3 Preparación del medio para aislamiento

Se preparó el medio de cultivo Extracto de levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo (ELMARC), según FERRERA R. *et al.* (1993), y esterilizado en autoclave por 15 minutos a 120 °C y 15 libras de presión.

3.4.2.4 Técnica de tinción de Gram en fresco (macerado)

- Con asa de platino se tomó una muestra de cultivo puro de rizobios macerados extendiéndola sobre lámina portaobjetos y fijándola sobre la llama del mechero.
- Se cubrió con cristal violeta durante dos minutos y se lavó con agua destilada.
- Se adicionó Lugol por tres minutos y se lavó nuevamente.

- Para decolorar se utilizó alcohol al 95 % durante 4 a 5 segundos.
- Finalmente se tiñó con safranina por cinco minutos y se lavó por tercera vez.
- Se observó al microscopio con objetivo (100 X) de inmersión en aceite. Esta prueba se realizó para determinar la presencia de bacterias Gram negativas y de forma bacilar.

3.4.2.5 Siembra

- Se utilizó cajas Petri y tubos de ensayo esterilizados y rotulados (iniciales de la planta, lugar de muestreo y fecha de siembra).
- Se sembró por estrías en el medio sólido (ELMARC).
- Se selló cada muestra con cinta parafilm e incubó por 72 horas a una temperatura de 27 °C. Se evaluó diariamente el desarrollo de las colonias.
- Una vez obtenidas las unidades formadoras de colonias (UFC), se realizaron las pruebas para identificación y caracterización de cepas de rizobios.

3.4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA

La caracterización morfológica y bioquímica de cepas de rizobios siguió las metodologías recomendadas por FERRERA R. *et al.* (1993), SOMASEGARAN *et al.* P. y HOBEN H. (1994) y CONTRERAS C *et al.* (2007).

3.4.3.1 Pruebas morfológicas

- **Velocidad de crecimiento y caracterización morfológica de las colonias.**

Las cepas se sembraron en medio ELMARC y se incubaron durante 9 días, se observaron diariamente calificando de rápido crecimiento (*Rhizobium sp.*) aquellas colonias formadas entre el primer y tercer día de incubación, y de lento crecimiento (*Bradyrhizobium*) aquellas que aparecieron en el medio de cultivo durante el quinto y noveno día. JORDAN C. (1984) y ALARCÓN E. *et al.* (1997).

➤ **Prueba diferencial de Gram (tinción)**

Se utilizó la misma metodología de la tinción en fresco, pero se tomó una colonia bacteriana y no del macerado de los nódulos. Esta prueba se hizo para confirmar la presencia de bacterias Gram negativas de forma bacilar.

➤ **Prueba de Catalasa**

Se realizó únicamente para comprobar si los microorganismos en estudio son bacterias. Se agregó una gota de H_2O_2 a una colonia de cada cepa. La prueba se considera positiva si al entrar en contacto la colonia con el reactivo produce gas (burbujas).

Esta reacción se explica porque la membrana de las bacterias posee una enzima (catalasa) que actúa como catalizador desdoblado el H_2O_2 en H_2 y O_2 libre, que se manifiesta por la presencia de burbujas. RODRÍGUEZ E. *et al.* (2006).

3.4.3.2 Pruebas bioquímicas

➤ **Producción de ácido o álcali**

La prueba consistió en sembrar las cepas en medio Extracto de Levadura Manitol Agar azul de Bromotimol (ELMABT) e incubarlas de tres a siete días y determinar si hay o no cambio de color del medio. Si no hay cambio es neutro, azul indica alcalinidad y amarillo indica acidez.

Según MATOS G. *et al.* (2001) se puede separar a los rizobios en dos grupos: ácido productores o álcali productores. El género *Rhizobium* produce metabolitos ácidos; mientras que las cepas del género *Bradyrhizobium* producen metabolitos alcalinos.

➤ **Crecimiento en peptona, glucosa, agar, purpura de bromocresol (PGA)**

El procedimiento consistió en estriar las cepas en el medio, incubarlas a 28 °C durante 24 horas y observar si hubo o no crecimiento. Los rizobios no se desarrollan bien en medios con glucosa, por tanto un crecimiento notorio acompañado de un cambio de pH indica la presencia de un contaminante. RODRÍGUEZ M. y FERRERA C. (1984)

➤ **Crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)**

Las cepas fueron evaluadas respecto a su habilidad para crecer en el medio ELMARC bajo diferentes concentraciones de NaCl (2, 3 y 5 %).

Fueron incubadas a 28 °C por seis días para verificar presencia (p) o ausencia (a) de crecimiento, comparado con el crecimiento de las cepas en el medio sin NaCl. Varias investigaciones afirman que la tolerancia o sensibilidad a diferentes niveles de salinidad no determinan el género específico de estas bacterias.

➤ **Prueba de ketolactosa: (LLA = Levadura Lactosa Agar)**

Las cepas se incubaron en este medio hasta obtener un crecimiento suficiente de bacterias, luego se agregó reactivo de Benedict (10 ml) y se observó el cambio de coloración del medio. Si luego de 10 minutos no hay cambio se descarta la presencia de *Agrobacterium*, un contaminante frecuente capaz de inducir nodulación pero sin fijar nitrógeno. SOMASEGARAN P. *et al.*, (1994).

➤ **Prueba ANTIMIC con pesticidas.**

Las cepas se sembraron en medio ELMA (Extracto Levadura Manitol Agar). Se hizo un barrido sobre el medio sólido con un hisopo esterilizado, se esterilizaron discos de papel filtro y se embebieron en los pesticidas (Aminaroc 6, Semevin y

Demoleador) y agua destilada (testigo) por un lapso de 10 - 20 min. Las cajas sembradas se rotularon con la inicial de cada pesticida más el testigo y la fecha de siembra. Transcurrido el tiempo los discos se colocaron sobre el medio en la respectiva inicial y se incubó por tres días a 28 °C. Finalmente se midió el halo de inhibición según la escala SPAN Diagnostics Ltd. para microorganismos Gram negativos (Microbial Sensitivity Discs).

Esta prueba mide el grado de tolerancia, sensibilidad o resistencia (mediante el halo de inhibición), que presentan las bacterias a diferentes pesticidas, debido a que, se ha observado que no siempre repercuten negativamente sobre *Rhizobium*. COMITÉ NACIONAL DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (1984).

➤ **Prueba de resistencia a Co⁺²**

Las bacterias se incubaron por tres días a 28 °C. Se adicionó cobalto al 0,4 % al medio ELMARC; la prueba se realizó para determinar la presencia o ausencia de crecimiento de las colonias bacterianas.

Para evaluar los resultados se determinó una escala arbitraria basada en una proporción respecto a la presencia o ausencia de crecimiento en la placa (1/3 = crecimiento bajo; 2/3 = crecimiento medio y > 2/3 = crecimiento alto). Según MATOS G. *et al.* (2001), el cobalto tiene un papel esencial en la síntesis microbiana de algunos compuestos requeridos para la formación de la leghemoglobina.

3.5 SELECCIÓN DE CEPAS PARA PREPARACIÓN DE INOCULANTE

Luego de caracterizar morfológica y bioquímicamente las cepas, se hizo un análisis comparativo descriptivo, que permitió elegir las cepas para la preparación del inoculante. (Cuadro 13 A, anexos).

3.6 CONTEO BACTERIANO

Se empleó el método del número más probable (NMP) (Tabla 1A, anexos). Se preparó una solución madre tomando una asada de cada cultivo bacteriano, se diluyó en 1 ml de agua destilada y se depositó en un tubo con 9 ml de agua destilada y 0,85 % de cloruro de sodio.

Se realizaron las diluciones seriadas a partir del tubo madre hasta llegar a la dilución 10^7 . Una vez vertido y enfriado el medio, se rotuló la placa dividiéndola en cinco zonas, en cada una de estas zonas se marcó con el factor de dilución a ser inoculado. Para la siembra se tomó 5 μ l de la dilución y se sembró en la zona respectiva. Se sembró a partir de la dilución 10^3 .

Finalmente con la tabla de WOOMER (1994) citado por GERADR J. *et al.*, (2007) se obtuvo la cantidad aproximada de bacterias por cada mililitro. (Cuadro 12A, anexos).

3.7 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se utilizaron cepas jóvenes, se tomó tres asadas de cada aislado, se colocaron en fiolas independientes y se agregó 25 ml de CELM a cada una. Se llevó al fermentador, el mismo que se armó de la siguiente manera:

- Se empleó una Fiola de 1 L, con 0,5 L de CELM esterilizado.
- Se incorporó 15 ml CELM con el inóculo (tres asadas de cultivo).
- Se suministró aire filtrado (el proceso de fermentación dura de 2 a 5 días).
- Posteriormente se realizó la cuantificación de rizobios midiendo la turbiedad por la escala de Mc. Farland o dilución en placa, se ajusta el pH a 6,5. Cuando se obtuvo una población de 10^9 bacterias por ml aproximadamente el inoculante fue aplicado en los ensayos con plántulas de maíz.

3.8 DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL SUSTRATO Y MATERIAL BIOLÓGICO.

3.8.1 Esterilización de la turba.

Se colocó en bandejas de aluminio una cantidad determinada de turba y se sometió a calor seco dos horas durante tres días consecutivos a 121 °C. Este material se almacenó en fundas plásticas herméticas para evitar contaminación. La finalidad de este proceso es eliminar el exceso de humedad existente en la turba y así se absorba mayor cantidad de inóculo.

3.8.2 Desinfección de las semillas

- Las semillas se lavaron tres veces con agua destilada con el fin de eliminar residuos de desinfectantes químicos.
- Se desecharon las semillas no viables.
- Se sumergieron en alcohol potable al 90 % por 30 segundos para eliminar la presencia de microorganismos indeseables.
- Las semillas se depositaron en una solución azucarada al 20 % por 10 minutos (la glucosa permite que las bacterias se adhieran a la superficie de la semilla).
- Finalmente con el inoculante se preparó una solución al 10 % y se sumergieron las semillas por 10 minutos previos a la siembra.

3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un Diseño Completamente Aleatorio con ocho tratamientos (incluido el testigo), utilizando 25 semillas y cuatro réplicas para cada tratamiento. Los resultados fueron sometidos al análisis de la varianza utilizando el estadístico F y las medias de los tratamientos comparados según la Prueba de Tukey al 1 %. Los grados de libertad del experimento se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 2. Sistema de tratamientos

Tratamientos	Descripción	Concentración
Cepa 1	VAI RV	1X10 ⁹ UFC/ml
Cepa 2	FP MG2	1X10 ⁹ UFC/ml
Cepa 3	FP MG4	1X10 ⁹ UFC/ml
Cepa 1,2	VAI RV + FP MG2	1X10 ⁹ UFC/ml
Cepa 1,3	VAI RV + FP MG4	1X10 ⁹ UFC/ml
Cepa 2,3	FP MG2 + FP MG4	1X10 ⁹ UFC/ml
Cepa 1,2,3	VAI RV + FP MG2 + FP MG4	1X10 ⁹ UFC/ml
Testigo	Agua destilada	Agua destilada

Cuadro 3. Grados de libertad.

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	31
Tratamiento	7
Error experimental	24

3.10 SIEMBRA, INOCULACIÓN Y RIEGO.

Las semillas desinfectadas se colocaron en bandejas de germinación, una semilla por cavidad y se regaron con agua destilada. Al día siguiente se adicionó alícuotas del inóculo en cantidad de 1 ml por semilla y al cuarto día se inoculó nuevamente. El riego se realizó con agua destilada de acuerdo a las necesidades del cultivo en la etapa germinativa.

3.11 VARIABLES A EVALUAR

3.11.1 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL *RHIZOBIUM*.

- Prueba diferencial de Gram en fresco.
- Velocidad de crecimiento y caracterización morfológica de las colonias.

- Prueba diferencial de Gram (UFC).
- Prueba de Catalasa.

3.11.2 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL *RHIZOBIUM*.

- Producción de ácido o álcali.
- Crecimiento en Peptona, Glucosa, Agar Púrpura de Bromocresol (PGA)
- Crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).
- Prueba de 3-Ketolactosa: (LLA = Levadura Lactosa Agar).
- Prueba ANTIMIC con pesticidas.
- Prueba de resistencia a Co^{+2}

3.11.3 PRUEBA DE GERMINACIÓN Y ESTADO DE EMERGENCIA DEL MAÍZ.

Se seleccionaron 10 plántulas al azar de cada réplica en cada tratamiento evaluándose las siguientes variables:

- **Porcentaje de germinación:** Se registró el número de semillas emergentes a los ocho días de la siembra.
- **Longitud de plántula:** Se midió la longitud en cm desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la hoja más larga.
- **Peso verde de la raíz:** Medido en gramos.
- **Peso seco de la raíz:** Medido en gramos después de ser secadas en estufa a 65 °C por 48 horas.
- **Porcentaje de pérdida de agua en raíz:** diferencia de peso seco y peso verde, expresado en porcentaje.
- **Peso verde de la parte aérea:** Medido en gramos.
- **Peso seco de la parte aérea:** Medido en gramos después de ser secadas a 65 °C por 48 horas.

- **Porcentaje de pérdida de agua en parte aérea:** diferencia de peso seco y peso verde, expresado en porcentaje.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRUEBAS MORFOLÓGICAS DEL *RHIZOBIUM*

4.1.1 PRUEBA DIFERENCIAL DE GRAM (EN FRESCO)

De la prueba diferencial de Gram realizada en fresco a los nódulos de cada leguminosa se afirma que un 55,55 % son bacterias Gram Negativas. (Cuadro 1A, anexos).

4.1.2 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS COLONIAS

Los resultados de la prueba demostraron que todas las cepas son de rápido crecimiento. (Cuadro 2A. anexos), coincidiendo con JORDAN C. (1984) y ALARCÓN E. *et al.* (1997) que relacionaron el tiempo de crecimiento con el diámetro de las colonias y sus formas y las dividieron en dos grandes grupos; las de crecimiento rápido o grupo I, género *Rhizobium* (1 a 3 días) y las de crecimiento lento o grupo II, género *Bradyrhizobium* (5 a 9 días). A este género de bacterias se los conoce colectivamente como rizobios, son bacterias Gram negativas, fijadoras de nitrógeno, que forman nódulos en la planta anfitrión.

Un 70 % de las cepas presentaron elevación convexa, tonalidad blanquecina rosácea y consistencia gomosa muy suave, un 10 % tuvo crecimiento irregular, coloración traslúcida y consistencia gomosa muy suave, otro 10 % presentó elevación pulvinada, color blanquecino rosáceo y consistencia gomosa muy suave, el 10 % restante presentó elevación convexa, tonalidad blanquecina rosácea y consistencia firme poco gomosa, característica que concuerda con lo descrito por COYNE (2000). (Cuadro 3A, anexos).

4.1.3 PRUEBA DIFERENCIAL DE GRAM (UFC)

Los resultados de la tinción realizada a las UFC afirman que un 59,7 % son bacterias Gram negativas. (Cuadro 4A, anexos).

4.1.4 PRUEBA DE CATALASA

Los resultados de la prueba de catalasa afirman que todos los microorganismos analizados son bacterias (Cuadro 5A, anexos), coincidiendo con RODRÍGUEZ E. *et al.* (2006) que asevera que las bacterias se diferencian de otros microorganismos por liberar oxígeno en forma de burbujas al reaccionar con peróxido de hidrógeno. Esto se confirmó haciendo la prueba con un micelio de hongo, que no presentó reacción.

4.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

4.2.1 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO O ÁLCALI

Un 80 % de las cepas sembradas en el medio ELMABF (Se sustituyó el colorante Azul de bromotimol por azul de bromofenol) cambiaron la coloración del medio a amarillo permitiendo ubicarlos como ácido productores, el 20 % restante no produjo cambios por lo tanto se las considero neutras, resultados que concuerdan con lo mencionado por MATOS G. *et al.* (2001), que indicaron que las bacterias de crecimiento rápido generalmente producen metabolitos ácidos. Los resultados se muestran en el cuadro 6A, anexos.

4.2.2 CRECIMIENTO EN PEPTONA, GLUCOSA, AGAR, PURPURA DE BROMOCRESOL (PGA)

Los resultados demostraron que todas las cepas aisladas crecieron en los medios PGA, PSA y PLA.

Estos resultados coincidieron con la investigación realizada por B. CUADRADO *et al.* (2009), en donde todos sus aislados asimilaron glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

En el medio con glucosa el 40 % presentó un mediano crecimiento, el 60 % restante alcanzó buen crecimiento. En el medio con sacarosa el 70 % tuvo buen crecimiento, el 10 % alcanzó un mediano crecimiento, mientras que en el 20 % restante el crecimiento fue bajo. En el medio con lactosa el 20 % presentó mediano crecimiento y el 80 % buen crecimiento. (Cuadro 7A, anexos).

Se ha demostrado que las bacterias del género *Rhizobium* tienen la habilidad de asimilar una gama de carbohidratos mayor a la del género *Bradyrhizobium*, esta propiedad se considera de alta significancia taxonómica en particular para este grupo de bacterias.

4.2.3 CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO

En NaCl al 3 %, el 50 % de los aislados lograron crecer, mientras que al 2 y 5 % hubo crecimiento del 60 % (Cuadro 8A, anexos).

Estos resultados coinciden con las aseveraciones descritas por ELSHEIKH E. y WOOD M. (1995), ODEE W. *et al.* (1997) quienes mencionan que la tolerancia a la salinidad es otra propiedad presente en las cepas de crecimiento rápido pertenecientes al género *Rhizobium* en relación a los simbioses de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium*.

Por otra parte SHAMSELDIN A. y WERNER D. (2005) señalaron que dos de las cepas de *R. etli*, aisladas de los suelos de Egipto mostraron ser tolerantes a elevadas concentraciones salinas (4 % NaCl) y altas temperaturas (42°C).

4.2.4 PRUEBA DE 3-KETOLACTOSA: (LLA = LEVADURA-LACTOSA-AGAR)

Ninguna de los aislados cambió la coloración del medio, por lo tanto se descartó la presencia de *Agrobacterium sp.* (Cuadro 9A, anexos). Estos resultados concuerdan con lo dicho por SOMASEGARAN P. *et al.* (1994) y RODRÍGUEZ E. *et al.* (2006).

4.2.5 PRUEBA ANTIMIC CON PESTICIDAS

El 80 % de los aislados presentaron resistencia al pesticida *Demoledor*, el 20 % restante mostró sensibilidad. Con respecto al pesticida *Aminaroc* el 70 % presentó resistencia, el 10 % se mostró sensible y el 20 % presentó tolerancia. En el pesticida *Semevin* y en el testigo con agua destilada todos los aislados mostraron resistencia. (Cuadro 10A, anexos).

En diversos ensayos similares a este se realizaron pruebas ANTIMIC y en todos se empleó antibióticos, es por esta razón que la única comparación que se puede establecer es respecto a los niveles de sensibilidad, tolerancia y resistencia que presentan las bacterias.

ALARCÓN E. *et al.* (1997) afirman que las bacterias de crecimiento rápido son intrínsecamente más sensibles a ciertos antibióticos que los de crecimiento lento, contrario a los resultados que obtuvieron B. CUADRADO *et al.* (2009), que indican que las bacterias de crecimiento rápido fueron más resistentes a los mismos antibióticos.

En el ensayo de estos últimos autores las bacterias que presentaron resistencia a un antibiótico, mostraron sensibilidad a otro. Con esto se puede afirmar que no todas las bacterias tienen un patrón de sensibilidad, tolerancia o resistencia a un antibiótico o pesticida específico.

4.2.6 PRUEBA DE RESISTENCIA a Co⁺²

En esta prueba se demostró que todas las cepas lograron crecer en presencia de dicho metal. El crecimiento fue medio, bajo y alto con porcentajes de 10, 30 y 60 % respectivamente. (Cuadro 11A, anexos), contrario a lo que ocurrió en el ensayo de MATOS G. *et al.* (2001), en donde 9 cepas de crecimiento lento de un total de 36 resultaron resistentes al cobalto; mientras que las 25 restantes de crecimiento rápido no lograron crecer. Lo mismo ocurrió en el ensayo de CONTRERAS C. *et al.* (2007), donde 30 de las cepas (81,08 %) de crecimiento rápido no lograron crecer en CO⁺² y siete de crecimiento lento (18,92 %) presentaron escaso crecimiento.

Los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas para cada una de las cepas, se muestran en el cuadro 13A, anexos.

4.3 PRUEBA DE GERMINACIÓN Y ESTADO DE EMERGENCIA DEL MAÍZ

El análisis de la varianza, para cada una de las variables en estudio no presentó diferencias significativas entre los tratamientos.

4.3.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN AL DÍA OCHO

Los tratamientos uno, cuatro y seis tuvieron los porcentajes más altos de germinación, mientras que el porcentaje más bajo se obtuvo con el tratamiento dos. La prueba de Tukey al 1 % indicó medias iguales. El coeficiente de variación fue de 1,42 %. Se observó que al aplicar el inoculante con rizobios las semillas mostraron un porcentaje de germinación parejo, igualando y superando al testigo, a excepción del tratamiento dos que fue inferior en un 3 % respecto al porcentaje más alto de germinación.

Estos resultados coinciden con lo mencionado por JANZEN A. *et al.* (1992) y CASSÁN *et al.* (2009) que afirman que ciertas bacterias dentro de las denominadas PGPR o rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, pueden mejorar la germinación de semillas a través de la producción y liberación de sustancias reguladoras del crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas en medios químicamente definidos y en asociación con las plantas.

KOEPLER *et al.* (1991), además aseveran que el tratamiento de semillas con inoculantes microbianos o biofertilizantes también ha sido empleado para promover y acelerar la germinación.

Cuadro 4. Análisis de la varianza, porcentaje de germinación al día 8

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje Germinación	32	0,36	0,18	1,42

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor P
Modelo	27,50	7	3,93	1,96	0,1030
Tratamiento	27,50	7	3,93	1,96	0,1030
Error	48,00	24	2,00		
Total	75,50	31			

Medias de los tratamientos

Tratamientos	Medias
T2 FP - MG2	97,00 a
T7 VAI - RV + FP - MG2 + FP - MG4	99,50 a
T5 VAI - RV + FP - MG4	99,50 a
T8 Testigo	99,50 a
T3 FP - MG4	99,50 a
T4 VAI - RV + FP - MG2	100,00 a
T1 VAI - RV	100,00 a
T6 FP - MG2 + FP - MG4	100,00 a

4.3.2 LONGITUD DE PLÁNTULA DESDE EL CUELLO DE LA RAÍZ HASTA EL ÁPICE DE LA HOJA MÁS LARGA.

La mayor altura de plántula se alcanzó en el tratamiento seis y la menor en el tratamiento tres. La prueba de Tukey al 1 % indicó que los tratamientos tienen medias iguales. El coeficiente de variación fue de 5,13 %. Es importante mencionar que la tendencia se mantuvo respecto a la variable porcentaje de germinación, donde T1 y T6 presentaron los mejores resultados.

Estudios realizados por WANG T. *et al.* (2002), PERRIG D. *et al.* (2009) y GONZÁLEZ L. *et al.* (2011) demuestran el uso de rizobios como promotores del crecimiento de plantas no leguminosas, tal es el caso de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* y cepas de *Bradyrhizobium* presentes en las raíces de arroz y *Rhizobium etli* en raíces de maíz, este género bacteriano coloniza ciertas plantas no leguminosas y mejora su crecimiento mediante la síntesis de sustancias biológicamente activas como aminoácidos, vitaminas, ácido indol acético y giberelinas en cultivos puros, aunque no siempre mediante la fijación de nitrógeno.

Cuadro 5. Análisis de la varianza, longitud de plántula desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la hoja más larga.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud de plántula	32	0,36	0,17	5,12

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor P
Modelo	5,94	7	0,85	1,92	0,1107
Tratamiento	5,94	7	0,85	1,92	0,1107
Error	10,62	24	0,44		
Total	16,57	31			

Medias de los tratamientos.

Tratamientos	Medias
T3 FP - MG4	12,34 a
T4 VAI - RV + FP - MG2	12,43 a
T2 FP - MG2	12,65 a
T7 VAI - RV + FP - MG2 + FP - MG4	13,14 a
T8 Testigo	13,14 a
T1 VAI - RV	13,22 a
T5 VAI - RV + FP - MG4	13,40 a
T6 FP - MG2 + FP - MG4	13,60 a

4.3.3 PESO VERDE DE LA RAÍZ

El mayor peso se obtuvo con el testigo y el menor se encontró en el tratamiento dos. Al 1 % de probabilidad la prueba de Tukey indicó que los tratamientos tienen medias iguales. El coeficiente de variación fue de 14,59 %. Esta variable es solo una referencia que permite una comparación respecto al peso seco, para determinar la pérdida de agua en la raíz.

Cuadro 6. Análisis de la varianza, peso verde de la raíz

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso verde de la raíz	32	0,39	0,21	14,59

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	GI	CM	F	Valor P
Modelo	0,25	7	0,04	2,16	0,0751
Tratamiento	0,25	7	0,04	2,16	0,0751
Error	0,40	24	0,02		
Total	0,65	31			

Medias de los tratamientos.

Tratamientos	Medias
T2 FP - MG2	0,73 a
T3 FP - MG4	0,77 a
T5 VAI - RV + FP - MG4	0,84 a
T1 VAI - RV	0,88 a
T7 VAI - RV + FP MG2 + FP - MG4	0,92 a
T4 VAI - RV + FP - MG2	0,93 a
T6 FP- MG2 + FP - MG4	0,97 a
T8 Testigo	1,00 a

4.3.4 PESO SECO DE LA RAÍZ

El peso más bajo se obtuvo en el tratamiento tres y los siete restantes alcanzaron el promedio mas alto de peso, incluido el testigo. La prueba de Tukey al 1 % indicó medias iguales y el coeficiente de variación fue de 9,99 %. Estos resultados difieren de los obtenidos por MAYAK S. *et al.* (2004) que afirman que *Rhizobium* puede producir ACC (aminociclopropano carboxilato) diaminasa; compuesto que reduce el nivel de etileno en las raíces de las plantas, incrementando de esta manera la longitud y el crecimiento de las raíces.

Por otra parte GUTIÉRREZ M. y MARTÍNEZ E. (2001) encontraron incrementos de 49 % de materia seca de raíces en plantas de maíz inoculadas con *Rhizobium etli*, resultado que también se contrapone a los obtenidos en este ensayo.

**Cuadro 7. Análisis de la varianza,
peso seco de la raíz**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso seco de la raíz	32	0,25	0,04	3,11

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	GI	CM	F	Valor P
Modelo	4,4 E-04	7	6,3 E-05	1,16	0,3606
Tratamiento	4,4 E-04	7	6,3 E-05	1,16	0,3606
Error	1,3 E-03	24	5,4 E-05		
Total	1,7 E-03	31			

Medias de los tratamientos.

Tratamientos	Medias
T3 FP - MG4	0,23 a
T5 VAI -RV + FP - MG4	0,24 a
T7 VAI - RV + FP MG2 + FP - MG4	0,24 a
T6 FP- MG2 + FP - MG4	0,24 a
T8 Testigo	0,24 a
T1 VAI – RV	0,24 a
T2 FP - MG2	0,24 a
T4 VAI - RV + FP - MG2	0,24 a

4.3.5 PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE AGUA EN RAÍZ

En esta variable se observó que el testigo superó a los demás tratamientos con un 76,07 % de pérdida de agua y el tratamiento dos presentó el porcentaje más bajo con 66,38 %. Las medias no presentaron diferencias significativas. La prueba de Tukey al 1 % indicó que los tratamientos tienen medias iguales. El coeficiente de variación fue 6,25 %.

Cuadro 8. Análisis de la varianza, porcentaje de pérdida de agua en raíz

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de pérdida de agua en raíz	32	0,38	0,20	6,25

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	Gl	CM	F	Valor P
Modelo	302,51	7	43,22	2,11	0,0812
Tratamiento	302,51	7	43,22	2,11	0,0812
Error	490,54	24	20,44		
Total	793,05	31			

Medias de los tratamientos.

Tratamientos	Medias
T2 FP - MG2	66,38 a
T3 FP - MG4	69,23 a
T5 VAI - RV + FP - MG4	71,43 a
T1 VAI - RV	71,93 a
T7 VAI - RV + FP - MG2 + FP - MG4	73,99 a
T4 VAI - RV + FP - MG2	73,53 a
T6 FP - MG2 + FP - MG4	75,72 a
T8 Testigo	76,07 a

4.3.6 PESO VERDE DE LA PARTE AÉREA

El peso más alto se alcanzó en el tratamiento seis y el más bajo en los tratamientos dos, tres, cuatro y testigo.

La prueba de Tukey al 1 % indicó que los tratamientos tienen medias iguales. El coeficiente de variación fue de 9,94 %. Al igual que la variable anterior, esta prueba permitió determinar el porcentaje de humedad perdida con relación al peso seco.

Cuadro 9. Análisis de la varianza, peso verde de la parte aérea

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso verde de la parte aérea	32	0,33	0,13	9,94

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	Gl	CM	F	Valor P
Modelo	0,03	7	3,6 E-03	1,66	0,1661
Tratamiento	0,03	7	3,6 E-03	1,66	0,1661
Error	0,05	24	2,2 E-03		
Total	0,08	31			

Medias de los tratamientos

Tratamientos	Medias
T4 VAI - RV + FP - MG2	0,44 a
T3 FP - MG4	0,44 a
T8 Testigo	0,44 a
T2 FP -MG2	0,44 a
T7 VAI - RV + FP - MG2 + FP - MG4	0,48 a
T5 VAI - RV + FP - MG4	0,48 a
T1 VAI - RV	0,50 a
T6 FP- MG2 + FP - MG4	0,51 a

4.3.7 PESO SECO DE LA PARTE AÉREA

El peso mas bajo se obtuvo en tratamiento tres con 0,03 g, los demás tratamientos alcanzaron 0,04 g. La prueba de Tukey al 1 % indicó que los tratamientos tienen medias iguales. El coeficiente de variación fue 8,12 %. En esta variable se puede observar que las medias presentan la misma tendencia respecto a la variable peso seco de la raíz. Por otra parte SANTILLANA N. *et al.*, (2005), observaron en su investigación mayor incremento de materia seca en la raíz, con relación a la parte aérea, incrementos que superaron a los testigos. Estos resultados divergen de los obtenidos en este experimento, donde el testigo iguala a la mayoría de los tratamientos.

**Cuadro 10. Análisis de la Varianza,
peso seco de la parte aérea**

Variable	N	R²	R²Aj	CV
Peso seco de la parte aérea	32	0,44	0,27	8,12

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	GI	CM	F	Valor P
Modelo	1,6E-04	7	2,2E-05	2,65	0,0352
Tratamiento	1,6E-04	7	2,2E-05	2,65	0,0352
Error	2,0E-04	24	8,4E-06		
Total	3,6E-04	31			

Medias de los tratamientos

Tratamientos	Medias
T3 FP - MG4	0,03 a
T5 VAI -RV + FP - MG4	0,03 a
T7 VAI - RV + FP - MG2 + FP - MG4	0,04 a
T6 FP- MG2 + FP - MG4	0,04 a
T8 Testigo	0,04 a
T1 VAI – RV	0,04 a
T2 FP -MG2	0,04 a
T4 VAI - RV + FP - MG2	0,04 a

4.3.8 PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE AGUA EN PARTE AÉREA

En esta variable los tratamientos superaron al testigo, el mejor tratamiento se alcanzó con la cepa tres; sin embargo el análisis de la varianza no mostró diferencias significativas. La prueba de Tukey indicó medias son iguales. El coeficiente de variación fue 0,50 %.

Cuadro 11. Análisis de la varianza, porcentaje de pérdida de agua en parte aérea

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso seco de la raíz	32	0,36	0,18	0,5

Análisis de la varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	Gl	CM	F	Valor P
Modelo	2,86	7	0,41	1,94	0,1070
Tratamiento	2,86	7	0,41	1,94	0,1070
Error	5,06	24	0,21		
Total	7,93	31			

Medias de los tratamientos

Tratamientos	Medias
T8 Testigo	91,73 a
T2 FP -MG2	92,09 a
T7 VAI - RV + FP - MG2 + FP - MG4	92,17 a
T5 VAI - RV + FP MG4	92,19 a
T1 VAI - RV	92,35 a
T4 VAI - RV + FP - MG2	92,38 a
T6 FP- MG2 + FP - MG4	92,63 a
T3 FP - MG4	92,75 a

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- En los lugares de ensayo, se aislaron 13 cepas de nódulos de vainita, frejol palito, tumbe y Leucaena, de las cuales 3 presentaron alta probabilidad de pertenecer al género *Rhizobium*, aunque las variables experimentales estudiadas no presentaron diferencias significativas.
- Las tres cepas seleccionadas se caracterizan por su crecimiento rápido (1-3 días), color traslúcido y blanquecino rosáceo, elevación convexa, consistencia gomosa y borde irregular y por ser ácido productoras.
- Dos de los tres aislados lograron crecer en las tres concentraciones de NaCl (1, 3 y 5 %), mientras que la restante sólo creció en NaCl al 3 %.
- La prueba ANTIMIC indicaron que las tres cepas posibles *Rhizobium* fueron tolerantes y resistentes a los pesticidas evaluados.
- Los tres aislados seleccionados demuestran resistencia al Co^{+2} y crecen en presencia de este metal pesado.
- Los aislados (VAI - RV, FP - MG2 y FP - MG4) provenientes de Manglaralto y Río Verde fueron seleccionados por su mayor potencial para la producción de inoculante de uso agrícola en calidad de biofertilizante.
- La inoculación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) con *Rhizobium* constituye una metodología compleja, pero eficaz que podría incrementar la producción del cultivo sin causar perjuicios al ambiente.

- Los resultados obtenidos conllevan a una selección de cepas con capacidad infectiva y efectiva para la producción de biofertilizante, como parte de la investigación “ESTUDIO DEL GÉNERO *RHIZOBIUM* PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTE DE USO AGRÍCOLA EN LA PROVINCIA DE SANTA ELENA.” que lleva a efecto el Centro de Investigaciones Agropecuarias.

5.2 RECOMENDACIONES

- Complementar las técnicas de aislamiento y caracterización morfológica y bioquímica con microscopía electrónica y análisis molecular.
- Realizar estudios similares en otras regiones del país que incrementen la colección de cepas nativas y probarlas en diferentes condiciones de suelo y clima.

6. BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR O., RIVA O. y PELZER E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports co evolution in centers of host diversification. Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 1900 La Plata, Argentina. Consultado el 01 de septiembre de 2012. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15340138>.

ALARCÓN E., LOZANO A. y CHAPARRO H. (1997) Caracterización fenotípica de los aislamientos rizobianos de Acacia (*Acacia* sp) y Retamo (*Teline monpessulana*), Colombia. Química p. 21, 26.

ALEXANDER M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. DF, México AGT. 492 p.

ALLEN y ALLEN 1981. The Leguminosae. University of Wisconsin press, Madison. London, Macmillan Publishing Company. 812 p.

ANTOUN H., BEAUCHAMP C., GOUSSARD N., CHABOT R. and LALANDE R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Rhaphanus sativus* L.) Plant and Soil. 204:57.

ANTOUN H. and PRÉVOST D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En PGPR biocontrol and biofertilization, Siddiqui, Z. A. P. 1-34.

ANYA O., ARCHAMBAULT J., BÉCQUER J. and SLASKI J. (2009). Plant growth-promoting diazotrophs and productivity of wheat on the Canadian prairies.

En: Microbial strategies for crop improvement. M. S. Khan. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 4. p. 287-300.

BASHAN Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16 (4): 729-770.

BENINTENDE S. y SANCHEZ C. s.f. Crecimiento Bacteriano. Cátedra Microbiología Agrícola. Unidad temática 3. En línea Consultado el 02 de abril de 2012. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf.

BOSQUESMEDITERRANEOS.COM. España. s.f. Fijación Biológica del Nitrógeno. En línea. Consultado el 1 de Junio del 2012. Disponible en: <http://www.bosquesmediterraneos.com/wp-content/documentos-pdf/fijacion-biologica-nitrogeno.pdf>.

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 Claudia. Tesis. Quim. Biol. Guatemala. En línea. Consultado el 23 de marzo del 2012. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2236.pdf.

CARSON K., MEYER M. and DILWORTH M. 2000. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. 32 : 11 - 21.

CASSÁN F., PERRIG D., SGROY V., MASCIARELLI O., PENNA C., y LUNA V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil biology* 45: p. 28-35.

CENTRO DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN AMBIENTAL DE NORTE AMÉRICA. A.C. (CICEANA.ORG.) México. s.f. Ciclo del Nitrógeno. Fases del ciclo. Fijación. En línea. Consultado el 1 de Junio del 2012. Disponible en: <http://www.ciceana.org.mx/recursos/ciclo%20del%20nitrogeno.pdf>.

CHABOT R., ANTOUN H., KLOPPER W. and BEAUCHAMP C. 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Washington DC, Applied and Environmental Microbiology. 62: 2767.

CHAKRAVARTY U. and PURKAYASTHA P. 1984. Role of Rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. Canadian Journal of Microbiology, 1984, 30(3): 285-289, 10.1139/m84 - 043.

CONTRERAS C., IRIARTE J. y MUÑOZ A. 2007. Aislamiento y Caracterización Bioquímica, Fisiológica y Morfológica de Géneros *Rhizobium sp.* y *bradyrhizobium sp.*, asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del Municipio de Sampedra, Departamento de Sucre. Tesis. biól., Colombia-Sincelejo. Universidad de Sucre. p. 21 - 23.

COYNE M. 2000. Microbiología del suelo: Un enfoque Exploratorio. España, Paraninfo. 416 p.

DANIVAL.ORG. 2002. Los Medios de cultivo en microbiología. La Coruña. España. En línea. Consultado el 30 de marzo de 2012. Disponible en: http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/medioscult/medios_100_intro.html.

DEACON J. s.f. El mundo microbiano: el ciclo del nitrógeno y la fijación de nitrógeno. Instituto de Biología Celular y Molecular de la Universidad de

Edimburgo. En línea. Consultado el 29 de Noviembre de 2012. Disponible en: <http://www.biology.ed.ac.uk/archive/jdeacon/microbes/nitrogen.htm>.

DEY R., PAL K., BHATT M. and CHAUHAN M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. Volume 159, Issue 4 p. 371 - 394.

EDUCARCHILE.CL. s.f. El Aire. El aire, características y funciones. En línea. Consultado el 31 de Mayo de 2012. Disponible en: <http://www.educarchile.cl/portal.Base/Web/VerContenido.aspx?ID=181917>.

ELSHEIKH E. y WOOD M. (1995). Nodulation and N₂ fixation by soy bean inoculated with sal-tolerant rhizobia salt-sensitive *Bradyrhizobia* in saline. *Soil. Biol. Biochem.* 27: p. 656 - 661.

ESSALMANI H. and LAHLOU H. 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *Comptes Rendus Biologies*. Volume 326, Issue 12. p. 1163 - 1173.

FAGRO.EDU.UY. 2000. Medios de cultivo. Composición y preparación. Micropropagación y Proyectos de Producción. Dpto. de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Uruguay. En línea. Consultado el 30 de marzo de 2012. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~fisveg/docencia/cursos%20posgrado%20y%20optativos/curso%20de%20micropropagacion/mateoricos/Medios%20de%20cultivo.pdf>.

FERRERA R., GONZÁLEZ M. y RODRIGUEZ M. 1993. Manual de Microbiología. México, TRILLAS. 144 p.

FERRERA R. y RODRIGUEZ M. 1993. Manual del curso de fijación simbiótica de Nitrógeno *Rhizobium*-leguminosa. Sección de Microbiología CEDAF. Chapingo, Proyecto CONACYT, Colegio de Postgraduados.

GAMAZO C., LOPEZ I. y DIAZ R. 2005. Manual Práctico de Microbiología. 3 ed. Barcelona, Masson S.A. 91 p.

GARCÍA V. 2005. Introducción a la Microbiología. 2 ed. San José. Universidad Estatal a Distancia. UNED. 243 p.

GARCÍA P., CARRO L., ROBLEDO M., RAMÍREZ M., FLORES J., FERNÁNDEZ M., MATEOS P., RIVAS R., IGUAL J., MARTÍNEZ E., PEIX A., VELÁZQUEZ E. 2012. *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. PLOS ONE 7(5): e38122. doi:10.1371/journal.pone.0038122.

GERARD J., BERDELL R., FUNKE, CRHISTINE L. y CASE., 2007. Introducción a la Microbiología 9 ed. España, Médica Panamericana. 988 p.

GRAHAM P., and PARKER C., 1964. Diagnostic in the characterization of the root nodule bacteria of legume. Australia, Plant and soil., Vol 20. P. 383 - 396.

GREEN y BLACKMER 1994. Tesis de Doctorado en la Universidad de Iowa, USA.

GUTIÉRREZ M. y MARTÍNEZ E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). Journal of biotechnology. Vol. 91. No. 2: 117 - 126.

HASSAN Gh., ZARGAR M. and BEIGH G. 1997. Biocontrol of Fusarium Root Rot in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using Symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. New York, Microbial Ecology. Vol. 34. No 1. p. 74 - 80.

HERNANDEZ A., ALFARO I. y ARRIETA R. 2003. Microbiología Industrial. San José, Universidad Estatal a Distancia. UNED. 267 p.

JANZEN R., ROOD R., DORMAAR J. y MCGILL W. (1992). *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture on chemically defined medium and in co-culture on Straw. Alberta, Canadá, Soil Biology and Biochemistry. Vol. 24. Issue 10. p. 1061 - 1064.

JORDAN C. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Ed. por Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 1, P. 234 - 256.

KLOPPER J., ZABLOTOWICZ R., TIPPING M., and LIFSHITZ R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In KEISTER y CREGAN (eds). The rhizosphere and plant growth. p. 315 - 326.

LABZA.COM.AR. Sin Fecha. ¿QUÉ ES UN INOCULANTE? En línea. Consultado el 30 de marzo de 2012. Disponible en <http://www.labza.com.ar/descargas/Inoculantes.pdf>.

LEWIS M. 1986. Plants and Nitrogen. The Institute of Biology's Studies in Biology. London, Publishers. p. 166.

MADIGAN M. y COL 2000. Biología de los microorganismos de Brock. 9 ed. Prentice - Hall.

MATOS G., ORMEÑO E. y ZÚÑIGA D. 2001. Diversidad de los rizobios que nodulan el cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus L.*) en la Costa central del Perú. *Ecología*. 1(1): 42-49. En línea. Consultado el 01 de noviembre de 2012. Disponible en <http://www.lamolina.edu.pe/ecolapl/Artículo%209.pdf>.

MAYAK S., TIROSH T. and GLICK B. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42 : 565 - 572.

MHADHBI H., JEBARA M., LIMAM F. and ELARBI AOUANI M. 2004. Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42 : 717 - 722.

OBATON M., Manual Técnico de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno Rhizobium/leguminosa. 1995. Información General sobre la simbiosis Fijadora de Nitrógeno Rhizobium/leguminosa. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. p. 1 - 6.

ODEE W., SUTHERLAND J., MAKATIANI E., MCINROY S. y SPRENT J. (1997). Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant Soil*. P. 188: 65 - 75.

OLIVAS E. y ALARCON L. (2004). Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Departamento de Ciencias Básicas del IBC. ACADEMIA DE Microbiología y Parasitología.

PERRINE F., ROLFE B., HYNES M. and HOCART C. 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan

following aqueous chloroformate derivatisation of Rhizobium exudates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42 : 723 - 729.

PERSO.WANADOO.ES. Sin fecha. Clasificación de los medios de cultivo. En línea. Consultado el 30 de marzo de 2012. Disponible en: http://perso.wanadoo.es/sergioram1/medios_de_cultivo.htm.

PRÉVOST D., SADDIKI S. and ANTOUN H. 2000. Growth and mineral nutrition of corn inoculated with effective strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. 5th International PGPR Workshop. Villa Carlos Paz, Córdoba. Argentina.

QUINTERO R. 1993. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. México, Alambra.

REDONDO M., BONILLA I. y BOLAÑOS L. Sin fecha. Fijación Biológica del Nitrógeno. En Línea. Consultado el 11 de junio de 2012. Disponible en http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm#FIJACION%20BIOL%20GICA_DEL_NITROGENO.

ROCA M. y MIROGINSKI A. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT). 970 p.

RODRÍGUEZ C., SEVILLANO F. y SUBRAMANIAM P. 1984. La Fijación de Nitrógeno Atmosférico. Una Biotecnología en la producción Agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agro Biología. Salamanca, España. 1ed. En línea. Consultado el 21 de marzo de 2012 disponible en: http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/nitrogeno_atmosferico.pdf.

- RODRÍGUEZ E., GAMBOA M., HERNANDEZ F. y GARCIA J. 2006. Bacteriología general. Principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. p. 217 - 218.
- RODRIGUEZ H. and FRAGA R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17: 319 - 339.
- RODRIGUEZ M. y FERRERA R, GONZALES M. 1993. Manual de Agromicrobiología. México, Trillas S.A. 144 p.
- ROSENBLUETH M. and MARTÍNEZ R. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *J. Arch. Microbiol.* p. 181 - 337.
- SAHIN F., CAKMAKCI R. and KANTAR F. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*. p. 265 - 123.
- SCRIBD.COM.ES. Sin fecha. Producción de Inoculante de fijadores de N₂. En línea. Consultado el 30 de marzo de 2012. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/56204687/Produccion-de-inoculante-de-fijadores-de-N2>.
- SESSITSCH J., HOWIESON X., PERRET H., ANTOUN H. and MARTINEZ R. 2002. Advances in *Rhizobium* Research. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Vol. 21. Issue 4. 1: 323 - 378.
- SHAMSELDIN A. y WERNER D. 2005. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Curr. Microbiol.* p. 50: 11 - 6.
- SMITH S. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* 38: 485 - 492.

SOMASEGARAN P. y HOBEN H. 1994. Handbook for Rhizobia: methods in legume – *Rhizobium* technology. New York, Springer - .erlag, p. 1 - 450.

SPAINK H. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 54, P, 257 - 288.

SPRENT J. y SPRENT P. 1990. Nitrogen fixing organsims. Pure and applied aspects. Chapman and Hall, Camdbrige. Great Britain. p. 256.

STEPHENS J. y RASK H. 2000. Inoculant production and formulation. Field Crops Res., 65, 249 - 258.

TAIZ L. y ZEIGER E. 2006. Fisiología vegetal. Vol 1. 3 ed. Universidad Jaume. Colección Ciencias experimentales. 1338 p.

VAN R., MUYOTCHA A., VAN W., STOUTHAMER H. and BOOGERD F. 1994. Siderophore production by *Bradyrhizobium spp.* strains nodulating groundnut. Plant and Soil. 163: 177 - 187.

VARGAS G. 2011. Botánica General. Desde los musgos hasta los árboles. 1 ed. San José. Costa rica, Universidad Estatal a Distancia. 496 p.

VILLALOBOS E. 2006. Fijación simbiótica del Nitrógeno. 1 ed. San José, C.R., Universidad de Costa Rica. 38 p. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales.

VINCENT M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. I.B.P. Handbook N° 15, Oxford. Blacwell Scientific Publications 164 p.

WANG T., MARTÍNEZ J. y LOPEZ I. 2002. *Rhizobium* y su simbiosis con plantas. Monografía. Centro de investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México.

YANNI Y., RIZK R., FATTAH K. and SQUARTINE A. 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice root. Australian Journal of Plant Physiology. 28: 845 - 870.

ANEXOS

Cuadro 1A. Prueba diferencial de Gram en fresco

Cepas	Test de Gram
VAI RV	50% Gram (-)
TUM RV	75% Gram (-)
FP RV	15% Gram (-)
FP MG 1	75% Gram (-)
FP MG 2	80% Gram (-)
FP MG 3	75% Gram (-)
FP MG 4	50% Gram (-)
LEU RV	10% Gram (-)
LEUPSE 1	52% Gram (-)
LEUPSE 3	47,5 Gram (-)

Cuadro 2A. Velocidad de crecimiento

Aislado	Días
	1 - 3
VAI RV	60,00 %
FP RV	92,50 %
TUM RV	86,20 %
FP MG 1	36,00 %
FP MG 2	57,50 %
FP MG 3	83,75%
FP MG 4	52,30 %
LEU RV	85,00 %
LEUPSE 1	77,50 %
LEUPSE 3	75,00 %

Cuadro 3A Caracterización morfológica de las colonias.

Aislados	Caracterización
VAI RV	i, T, g
FP RV	c, BR, f
TUM RV	c, BR, g
FP MG 1	c, BR, g
FP MG 2	c, BR, g
FP MG 3	c, BR, g
FP MG 4	c, BR, g
LEU RV	p, BR, g
LEUPSE 1	c, BR, g
LEUPSE 3	c, BR, g

Simbología

i: irregular,

BR: Blanquecino Rosáceo,

R: Rosáceo,

T: translúcida,

f: firme poco gomosa,

c: Convexa,

p: Pulminada,

g: gomosa muy suave

Cuadro 4A. Prueba diferencial de Gram (UFC)

Aislados	Gram Negativas
VAI RV	50 %
FP RV	50 %
TUM RV	30 %
FP MG 1	90 %
FP MG 2	80 %
FP MG 3	90 %
FP MG 4	70 %
LEU RV	46 %
LEUPSE 1	27 %
LEUPSE 3	64 %

Cuadro 5A. Prueba de Catalasa

Aislados	Reacción positiva	Reacción negativa
VAI RV	X	
FP RV	X	
TUM RV	X	
FP MG 1	X	
FP MG 2	X	
FP MG 3	X	
FP MG 4	X	
LEU RV	X	
LEUPSE 1	X	
LEUPSE 3	X	
Hongos		X

Cuadro 6A. Producción de ácido o álcali

Aislados	Crecimiento en medio ELMABF
VAI RV	+
FP RV	+
TUM RV	+
FP MG1	+
FP MG2	+
FP MG3	+
FP MG4	+
LEU RV	+
LEUPSE 1	+-
LEUPSE 3	+-

+ Ácido **+ - Neutro**

**Cuadro 7A. Crecimiento en peptona, glucosa, Agar,
purpura de bromocresol (PGA)**

Aislado	Crecimiento PGA
VAI RV	M
FP RV	B
TUM RV	M
FP MG1	B
FP MG2	M
FP MG3	B
FP MG4	M
LEU RV	B
LEUPSE 1	B
LEUPSE 3	B

B= Buen crecimiento

M = mediano crecimiento

**Cuadro 8A. Crecimiento en diferentes
concentraciones de cloruro de sodio.**

Aislado	Concentración		
	2 % NaCl	3 % NaCl	5 % NaCl
VAI RV 1	a	p	a
FP RV 1	p	a	p
TUM RV 1	p	p	a
FP MG 1	p	a	p
FP MG 2	p	p	p
FP MG 3	p	p	p
FP MG 4	p	p	p
LEU RV	a	a	a
LEUPSE 1	a	a	a
LEUPSE 3	a	a	a

a = ausencia

p = Presencia

Cuadro 9A. Prueba de 3-ketolactosa

Aislado	Sin cambio	Cambio
	(Color normal del medio)	(Color amarillo del medio)
VAI RV	X	
FP RV	X	
TUM RV	X	
FP MG 1	X	
FP MG 2	X	
FP MG 3	X	
FP MG 4	X	
LEU RV	X	
LEUPSE 1	X	
LEUPSE 3	X	

Cuadro 10A. Prueba ANTIMIC con pesticidas.

AISLADO	DEMOLEDOR	AMINAROC	SEMEVIN	AGUA DESTILADA
VAI RV	r	t	r	r
FP RV	r	r	r	r
TUM RV	r	r	r	r
FP MG1	r	s	r	r
FP MG2	r	t	r	r
FP MG3	r	r	r	r
FP MG4	r	r	r	r
LEU RV	r	r	r	r
LEUPSE 1	s	r	r	r
LEUPSE 3	s	r	r	r

r = resistente; t = tolerante; s = sensible

Cuadro 11A. Prueba de resistencia a CO⁺²

Aislado	Crecimiento en medio ELMARC + CO⁺²
VAI RV	1
FP RV	3
TUM RV	1
FP MG1	3
FP MG2	3
FP MG3	3
FP MG4	3
LEU RV	3
LEUPSE1	2
LEUPSE3	1

1 = Crecimiento bajo; 2 = crecimiento medio y 3 = crecimiento alto

Cuadro 12. Conteo bacteriano

Aislado	Número aproximado de bacterias por ml
VAI RV	613 250 000
FP MG2	12 500 000
FP MG4	4 350 000

Cuadro 13A. Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas

Cepas	Velocidad 1-3 días %	Caracterización morfológica	Tinción de Gram %	Ácido o álcali productoras	Crecimiento en PGA	Diferentes concentraciones NaCl			Prueba ANTIMIC			Resistencia a Co ⁺²
						2 %	3 %	5 %	D	A	S	
						VAI RV	60,00	I, T, G	50	+	M	
FP RV	92,50	C, BR, F	75	+	B	p	a	p	t	t	r	3
TUM RV	86,20	C, BR, G	15	+	M	p	p	a	t	t	t	1
FP MG1	36,00	C, BR, G	75	+	B	p	a	p	r	s	r	3
FP MG2	57,50	C, BR, G	80	+	M	p	p	p	t	s	t	3
FP MG3	83,75	C, BR, G	75	+	B	p	p	p	t	s	r	3
FP MG4	52,30	C, BR, G	50	+	M	p	p	p	r	t	r	3
LEU RV	85,00	P, BR, G	52	+	B	a	a	a	r	r	t	3
LEUPSE 1	77,50	C, BR, G	36	+-	B	a	a	a	s	r	t	2
LEUPSE 3	75,00	C, BR, G	47,5	+-	B	a	a	a	s	r	r	1

Ácido o álcali productoras	Resistencia a Cobalto	ANTIMIC	NaCl	PGA	Morfología		
+ = Ácido	1 = Bajo	s = Sensible	D = Demoledor	P = Presencia	M = Mediano crecimiento	I = irregular	F= Firme poco gomosa
+- = Neutro	2 = Medio	t = Tolerante	A = Aminaroc	A = Ausencia	B = Buen crecimiento	C = Convexa	P = Pulminada
	3 = Alto	r = Resistente	S = Semevin			BR = Blanquecino Rosáceo	T= Traslúcida
						R = Rosáceo	G = Gomosa muy suave

Tabla 1. El número más probable para series de diluciones en réplicas de cinco por nivel de dilución (Woomer, 1994)*.

Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada	Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada
1-2-3-4-5-6		1-2-3-4-5-6	
1-0-0-0-0-0	1.9	5-5-4-2-0-0	2159
1-1-0-0-0-0	4.0	5-5-4-3-0-0	2716
2-0-0-0-0-0	4.4	5-5-5-0-0-0	2305
2-1-0-0-0-0	6.8	5-5-5-0-1-0	3126
3-0-0-0-0-0	7.7	5-5-5-1-0-0	3282
3-1-0-0-0-0	10	5-5-5-1-1-0	4532
3-2-0-0-0-0	13	5-5-5-2-0-0	4922
4-0-0-0-0-0	12	5-5-5-2-1-0	6918
4-1-0-0-0-0	16	5-5-5-3-0-0	7797
4-2-0-0-0-0	21	5-5-5-3-1-0	10702
4-3-0-0-0-0	27	5-5-5-3-2-0	13826
5-0-0-0-0-0	23	5-5-5-4-0-0	12753
5-0-1-0-0-0	31	5-5-5-4-1-0	16902
5-1-0-0-0-0	33	5-5-5-4-2-0	21589
5-1-1-0-0-0	45	5-5-5-4-3-0	27150
5-2-0-0-0-0	49	5-5-5-5-0-0	23054
5-2-1-0-0-0	69	5-5-5-5-0-1	31225
5-3-0-0-0-0	78	5-5-5-5-1-0	32720
5-3-1-0-0-0	107	5-5-5-5-1-1	45261
5-3-2-0-0-0	138	5-5-5-5-2-0	49224
5-4-0-0-0-0	127	5-5-5-5-2-1	69148
5-4-1-0-0-0	169	5-5-5-5-3-0	78127
5-4-2-0-0-0	216	5-5-5-5-3-1	107022
5-4-3-0-0-0	270	5-5-5-5-3-2	138269
5-5-0-0-0-0	230	5-5-5-5-4-0	127528
5-5-0-1-0-0	312	5-5-5-5-4-1	169028
5-5-1-0-0-0	327	5-5-5-5-4-2	215899
5-5-1-1-0-0	453	5-5-5-5-4-3	271557
5-5-2-0-0-0	488	5-5-5-5-4-4	334051
5-5-2-1-0-0	692	5-5-5-5-5-0	230546
5-5-3-0-0-0	780	5-5-5-5-5-1	328192
5-5-3-1-0-0	1070	5-5-5-5-5-2	492238
5-5-3-2-0-0	1383	5-5-5-5-5-3	781272
5-5-4-0-0-0	1275	5-5-5-5-5-4	1312535
5-5-4-1-0-0	1690		

* Esta es la densidad poblacional estimada asumiendo 1 ml de inóculo. Este valor debe ser ajustado por el factor de dilución y el volumen de inóculo (por ejemplo, si usted inoculó en cada placa un volumen de 10 µl, entonces el valor de la tabla debe ser corregido multiplicándolo por 100 [10 X 100 = 1,000 µl ó 1 ml]).



Figura 1A. Raíz nodulada de *Leucaena leucocephala*



Figura 2A. Nódulo con presencia de leghemoglobina



Figura 3A. Técnica de aislamiento de cepas

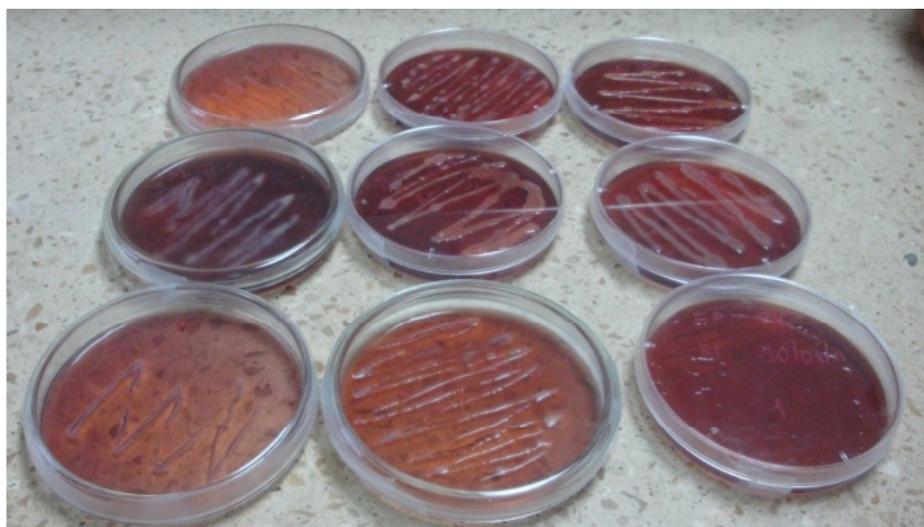


Figura 4A. Desarrollo morfológico de colonias en medio ELMARC

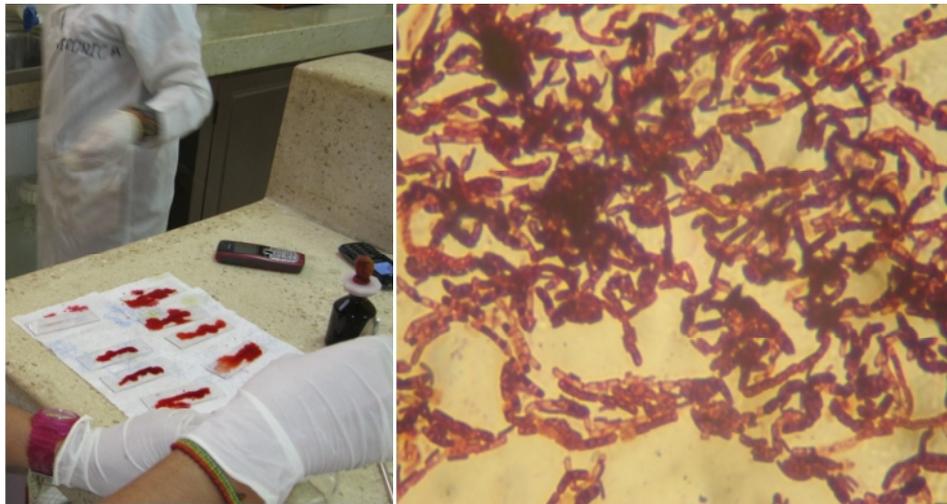


Figura 5A. Prueba diferencial de Gram

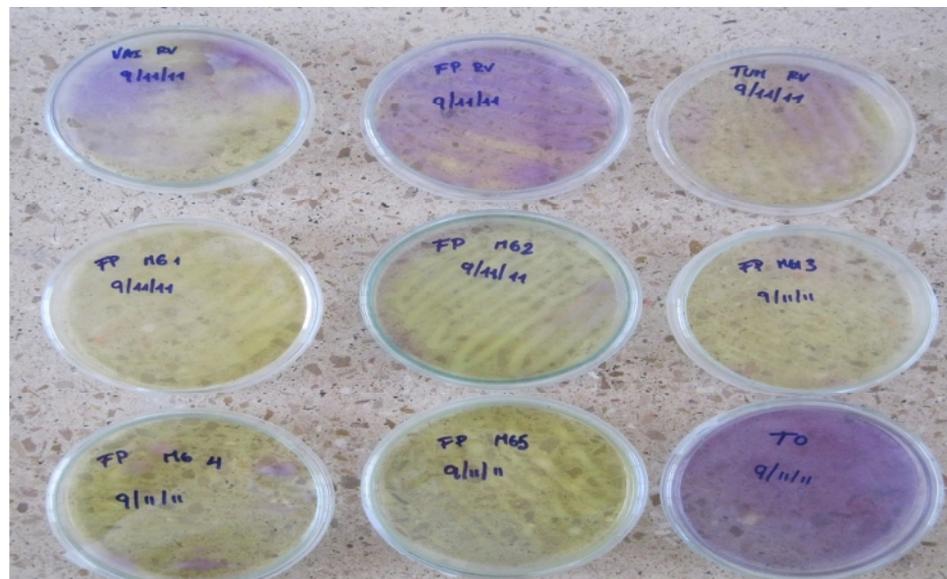


Figura 6A. Crecimiento en medio PGA

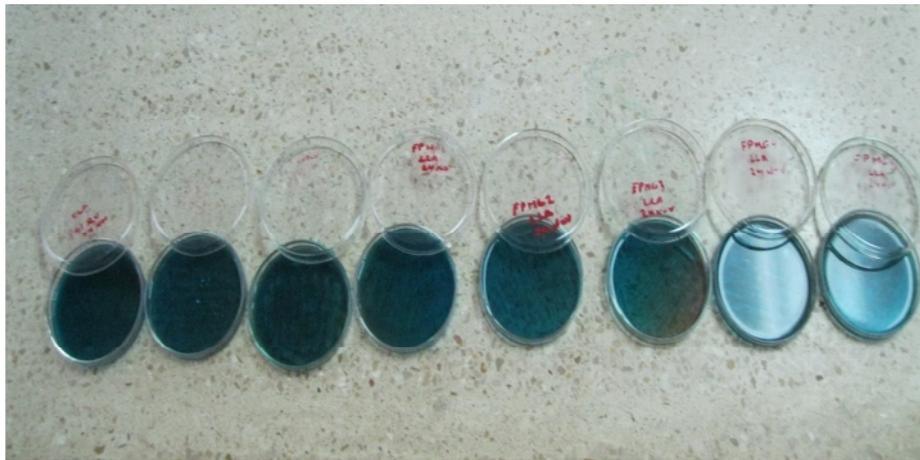


Figura 7A. Prueba de 3-ketolactosa

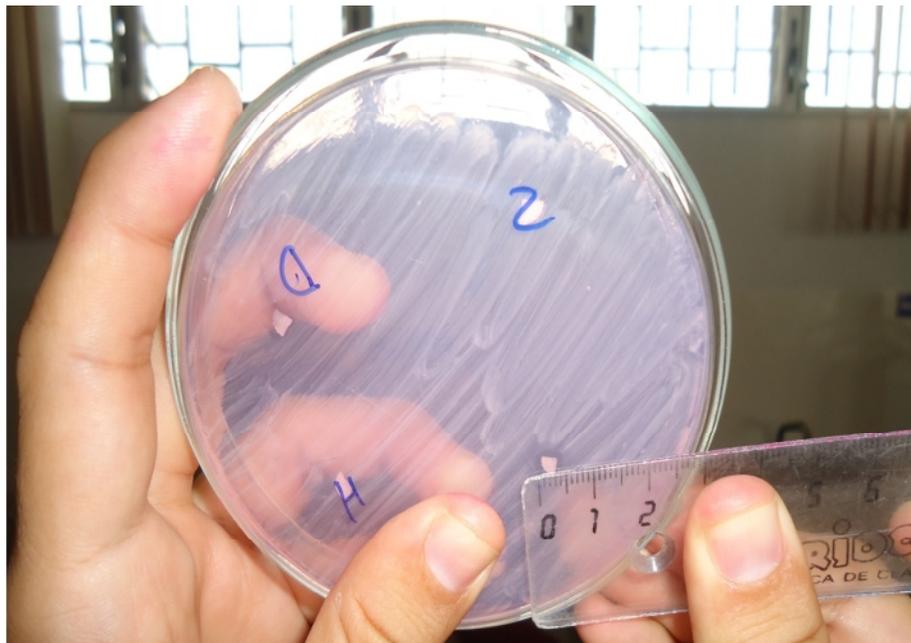


Figura 8A. Medida de halo de inhibición en prueba ANTIMIC

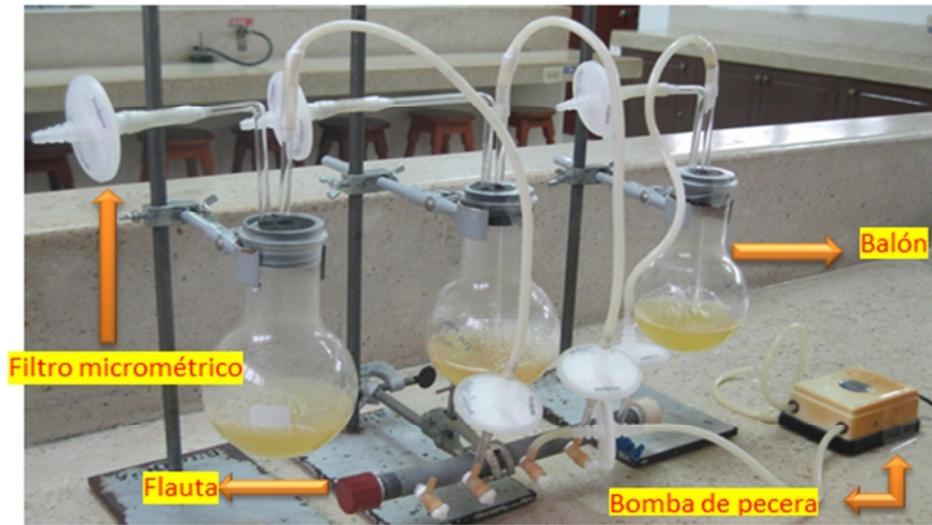


Figura 9A. Preparación del biofertilizante



Figura 10A. Ajuste de pH del biofertilizante



Figura 11A. Siembra de semillas de maíz



Figura 12A. Inoculación



Figura 13A. Plántulas de maíz al día 8



Figura 14A. Toma de datos