



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**IDENTIFICACIÓN DE RIZOBIOS EN LAS LEGUMINOSAS  
*Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* EN DOS ZONAS PRODUCTIVAS  
DE LA PROVINCIA DE SANTA ELENA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Requisito parcial para la obtención del título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autor:** Omar Alfredo Zamora Prudente

**LA LIBERTAD, 2023**



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**IDENTIFICACIÓN DE RIZOBIOS EN LAS LEGUMINOSAS  
*Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* EN DOS ZONAS PRODUCTIVAS  
DE LA PROVINCIA DE SANTA ELENA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Requisito parcial para la obtención del título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autor:** Omar Alfredo Zamora Prudente

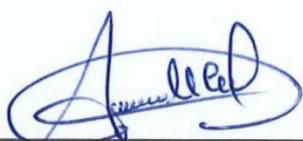
**Tutor:** Blgo. Javier Oswaldo Soto Valenzuela, Ph. D.

**LA LIBERTAD, 2023**

## TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **OMAR ALFREDO ZAMORA PRUDENTE** como requisito parcial para la obtención del grado de Ingeniero Agropecuario de la Carrera de Agropecuaria.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 3/03/2023



---

Ing. Verónica Andrade Yucailla, Ph. D.  
**DIRECTORA DE CARRERA**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Daniel Ponce De León, Ph. D.  
**PROFESOR ESPECIALISTA**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Blgo. Javier Soto Valenzuela, Ph. D.  
**PROFESOR TUTOR**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Nadia Quevedo Pinos, Ph. D.  
**PROFESORA GUÍA DE LA UIC**



---

Ing, Washington Perero Vera, M.Sc.  
**SECRETARIO**

## **AGRADECIMIENTOS**

En este espacio quiero dejar constancia de mis agradecimientos más sinceros a las personas que hicieron posible la culminación de mi trabajo de titulación.

Sin duda el mayor agradecimiento es para mi madre Santa Prudente, una mujer que me inculcó el esfuerzo y perseverancia, y sobre todo el sacrificio que hay que realizar para lograr mis objetivos. Gracias por su valiosa educación que hoy me forma como profesional y humano con principios y valores. Gracias madre por ese apoyo incondicional, amor infinito, la confianza que deposita en mí y ser ese manto que calman mis lágrimas y mi tristeza, la amo infinitamente.

A mis hermanos, Franklin, Patricia, Alicia, Rocio y Eduardo por su apoyo, consejos y enseñanzas, que me permitieron seguir aprendiendo de la vida y entender lo duro que puede llegar a ser. En especial a mi hermana María Prudente, por esa inspiración de superación y enseñarme que todo esfuerzo trae buenos resultados.

A mis sobrinos, en especial a Mathías Bajaña, quien da sentido a mi vida y cambia mis estados de ánimos grises.

A todos mis compañeros y amigos por su valiosa amistad y enseñanzas. A mis compañeros de laboratorio, Genesis Ricardo y Erick Limón, por su ayuda, enseñanzas y sobre todos los momentos amenos que pasamos en los laboratorios.

A Melany Sánchez, por enseñarme lo valioso que es la amistad. Gracias por el tiempo compartido, el apoyo moral, las experiencias de aprendizaje y de complicidad. Gracias por compartir tus conocimientos, habilidades y ser parte de mi vida.

A mi tutor, el Blgo. Javier Soto Valenzuela, quien fue parte importante de esta investigación al dar sentido a mis ideas, orientarme y brindarme la confianza para formar parte de su grupo de investigación. Gracias por sus conocimientos profesionales y el apoyo moral que me permitieron lograr este objetivo.

Al Blgo Menéndez, por la paciencia, facilitar y agilizar el proceso práctico de mi trabajo de titulación.

A todos los docentes miembros de la Facultad de Ciencias Agrarias, por sus experiencias profesionales y forjar mis conocimientos que me permitirán ser profesional con aptitudes competitivas. En especial a la Ph. D. Nadia Quevedo Pinos, por sus consejos, apoyo y conocimientos valiosos e importante para la culminación de mi trabajo de titulación.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres,**

Por el apoyo incondicional, la vida y formación de esta persona con principios y valores.

### **A mis hermanos,**

Franklin, Patricia, Alicia, Rocio, Eduardo y María que supieron aconsejarme para seguir con mis estudios.

### **A mi sobrino,**

Mathías Bajaña mi razón para superarme.

## RESUMEN

En este trabajo de investigación se aislaron 39 nódulos a partir de raíces de las leguminosas *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* en Río Verde y Manglaralto, con el objetivo de identificar la presencia de la relación rizobio-leguminosa como asociación mutualista, en una primera aproximación sobre esta interacción a nivel de la rizosfera que permite la fijación biológica de nitrógeno en los ecosistemas terrestres. Las raíces noduladas se colectaron y conservaron en microtubos luego procesadas en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB) de la UPSE. Se caracterizaron y cuantificaron las bacterias (UFC/nódulo) presentes en la rizosfera (exterior del nódulo) y simbióticas (interior del nódulo), las cuales fueron aisladas en medio LMA. Los resultados a partir de 6 nódulos de *Clitoria* sp. y 33 de *C. cajan* obtenidos en esta investigación permitirían asumir la presencia y posible fijación biológica de nitrógeno (FBN) en dos leguminosas de interés forestal y alimenticia, localizadas en dos zonas productivas en la provincia de Santa Elena.

**Palabras claves:** FBN, nódulos, rizobacterias, simbiosis efectiva

## ABSTRACT

In this research work, 39 nodules were isolated from the roots of the legumes *Clitoria* sp. and *Cajanus cajan* in Río Verde and Manglaralto, with the objective of identifying the presence of the rhizobio-legume relationship as a mutualistic association, in a first approximation on this interaction at the level of the rhizosphere that allows the biological fixation of nitrogen in terrestrial ecosystems. The nodulated roots were collected and preserved in microtubes then processed in the laboratories of the Center for Biotechnological Research (CEB). The bacteria (CFU/nodule) present in the rhizosphere (outside the nodule) and symbiotic (inside the nodule) were characterized and quantified, which were isolated in AML medium. Results from 6 nodules of *Clitoria* sp. and 33 of *C. cajan* obtained in this research would allow to assume the presence and possible biological fixation of nitrogen (FBN) in two forest and food legumes, located in two productive areas in the province of Santa Elena.

**Key words:** FBN, nodules, rhizobacteria, effective symbiosis

## DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

El presente Trabajo de Integración Curricular titulado **“IDENTIFICACIÓN DE RIZOBIOS EN LAS LEGUMINOSAS *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* EN DOS ZONAS PRODUCTIVAS DE LA PROVINCIA DE SANTA ELENA”** y elaborado por **Omar Alfredo Zamora Prudente**, declara que la concepción, análisis y resultados son originales y aportan a la actividad científica educativa agropecuaria.

### Transferencia de derechos autorales.

"El contenido del presente Trabajo de Graduación es de mi responsabilidad; el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena".



---

Firma del estudiante

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Problema Científico: .....	3
Objetivos .....	3
Objetivo General: .....	3
Objetivos Específicos:.....	3
<b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
1.1 Fijación biológica de nitrógeno .....	4
1.2 Bacterias PGPR.....	4
1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	4
1.3.1 Bacterias fijadoras de vida libre .....	5
1.3.2 Bacterias fijadoras simbióticas .....	5
1.4 Rizobios .....	5
1.5 Género <i>Rhizobium</i> .....	6
1.5.1 Taxonomía del género <i>Rhizobium</i> .....	6
1.5.2 Distribución ecológica.....	7
1.5.3 Aislamiento de <i>Rhizobium</i> .....	7
1.6 El nitrógeno.....	8
1.6.1 Fijación de nitrógeno en leguminosas .....	8
1.6.2 Promedio de nitrógeno fijado por leguminosas .....	9
1.7 Nódulos .....	9
1.7.1 Formación de nódulos en la rizósfera.....	10
1.7.2 Tipos de nódulos.....	11
1.7.3 Etapa de infección .....	12
1.8 Simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	12
1.9 Rizobacterias encontradas al exterior y al interior de los nódulos.....	13
1.9.1 <i>Clitoria sp.</i> .....	13
1.9.2 <i>Cajanus cajan</i> .....	13
1.10 Leguminosas .....	14
1.11 Generalidades de los cultivos.....	14

1.11.1	<i>Clitoria</i> .....	14
1.11.2	<i>Cajanus cajan</i> .....	14
1.12	Medios de cultivos para el crecimiento bacteriano.....	15
1.12.1	Medio Levadura Manitol Agar (LMA).....	16
1.13	Crecimiento microbiano.....	16
1.13.1	Ciclo del crecimiento microbiano.....	16
1.14	Requerimiento nutricional para el crecimiento microbiano.....	17
1.14.1	Agua.....	17
1.14.2	Fuentes de carbono.....	17
1.14.3	Fuentes de nitrógeno.....	17
1.14.4	Sales minerales.....	18
1.15	Factores condicionantes del crecimiento bacteriano.....	19
1.16	Características bacterianas en medios de cultivos.....	19
1.17	Colorantes diferenciales.....	21
1.17.1	Tinción de Gram.....	21
<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>22</b>
2.1	Área y descripción de las zonas de estudio.....	22
2.2	Material vegetativo.....	23
2.3	Material de campo.....	23
2.3.1	Material de bioseguridad para laboratorio.....	23
2.4	Materiales y equipos de laboratorio.....	24
2.4.1	Insumos y reactivos.....	24
2.4.2	Instrumentos de laboratorio.....	24
2.4.3	Equipos.....	24
2.5	Recolección de las muestras.....	24
2.6	Aislamiento de las cepas de Rizobios.....	25
2.6.1	Preparación de las muestras.....	25
2.6.2	Procesamiento de los nódulos.....	25
2.6.3	Presencia de bacterias en la rizosfera.....	26
2.6.3.1	Preparación del medio de cultivo LMA.....	27
2.6.3.2	Siembra en el medio LMA.....	27
2.6.3.3	Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos.....	28

2.6.4	Presencia de bacterias simbióticas en el nódulo .....	28
2.6.4.1	Protocolos de desinfección de los nódulos.....	28
2.6.4.2	Maceración de los nódulos .....	29
2.6.5	Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias con Tinción de Gram	29
2.7	Análisis de los resultados.....	29
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>30</b>
3.1	Aislamiento de nódulos en <i>Clitoria</i> sp. y <i>Cajanus cajan</i> .....	30
3.2	Presencia de bacterias en la rizosfera de <i>Clitoria</i> sp. y <i>Cajanus cajan</i> .....	31
3.3	Presencia de bacterias en el interior de los nódulos.....	32
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>		<b>35</b>
	Conclusiones .....	35
	Recomendaciones .....	35
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Promedio de nitrógeno fijado por leguminosas en simbiosis. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Características de las muestras aisladas y procesadas. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Variable número, peso fresco, tamaño y senescencia evaluadas en nódulos de <i>Clitoria</i> sp. y <i>Cajanus cajan</i> .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formación de nódulos en leguminosas infectadas por rizobios.....	10
<b>Figura 2.</b> Forma y tipos de nódulos colonizadores de las raíces. ....	11
<b>Figura 3.</b> Tipo de infección por parte de los rizobios en leguminosas. ....	12
<b>Figura 4.</b> Requerimientos de nutrientes bases en medios de cultivos para el recuento de microorganismos. ....	15
<b>Figura 5.</b> Características macroscópicas (forma, borde aspecto) de colonias en medios de cultivos. ....	20
<b>Figura 6.</b> Ubicación del Centro del Apoyo Río Verde. ....	22
<b>Figura 7.</b> Ubicación del Centro de Apoyo Manglaralto. ....	23
<b>Figura 8.</b> Procesamiento de los nódulos para el recuento de bacterias en la rizosfera. ....	26
<b>Figura 9.</b> Diluciones sucesivas de las muestras procesadas en el laboratorio. ....	26
<b>Figura 10.</b> Sembrado de las disoluciones seriadas en medio LMA.....	27
<b>Figura 11.</b> Conteo de las colonias con características mucosas. ....	28
<b>Figura 12.</b> Presencia de rizobios aislados de la rizosfera (exterior nodular) de <i>Clitoria</i> sp. y <i>Cajanus cajan</i> de los dos sitios evaluados. ....	31
<b>Figura 13.</b> Promedio de UFC en el interior de los nódulos de <i>Clitoria</i> sp. y <i>Cajanus cajan</i> aislados de los dos sitios en muestreo. ....	32
<b>Figura 14.</b> Promedios comparados de bacterias presentes en la rizosfera e interior de los nódulos aislados de los dos sitios en muestreo.....	33

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Tabla 1A.** Promedio de bacterias presentes en la rizosfera de las dos zonas muestreadas

**Tabla 2A.** Promedio de bacterias encontradas en el interior de los nódulos de los dos géneros de leguminosas

**Tabla 3A.** Promedio de bacterias encontradas en exterior e interior de los nódulos

**Figura 1A.** Recolección de las muestras

**Figura 2A.** Separación de nódulos de las raíces para la toma de variables

**Figura 3A.** Protocolos de desinfección

**Figura 4A.** Preparación del medio de cultivo LMA

**Figura 5A.** Procesamiento para aislar bacterias presentes en el exterior de los nódulos

**Figura 6A.** Sembrado en medio LMA para la cuantificar bacterias presentes en el exterior e interior de los nódulos

**Figura 7A.** Maceración de los nódulos

**Figura 8A.** Conteo de UFC, bacterias presentes en el exterior e interior de los nódulos

## INTRODUCCIÓN

Los rizobios son bacterias que se encuentran en gran número en el suelo, capaces de formar nódulos y asociarse a las raíces o tallos de las plantas. Cumplen un papel fundamental al promover el crecimiento mediante la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) que al realizar una asociación simbiótica en la rizosfera transforman el nitrógeno atmosférico a su forma de amonio o amoniaco asimilable (León, 2013).

Las leguminosas son eficientes en los sistemas productivos agropecuarios, transforman sustancialmente el flujo universal de nitrógeno atmosférico a formas asimilables en condiciones de escasez de nitrógeno (Guamán *et al.*, 2016).

Las leguminosas del género *Clitoria* tienen pocos estudios realizados y se encuentra actualmente en peligro de extinción (Soto *et al.*, 2021), siendo una planta perenne, semiarborescente y/o trepadora capaz de adaptarse a diferentes tipos de suelos y realizar la fijación del nitrógeno atmosférico, es una especie que garantiza una alta productividad y lograr la sostenibilidad en las producciones agropecuarias de áreas tropicales y subtropicales (Medel Contreras *et al.*, 2012). Así mismo, la leguminosa *Cajanus cajan* posee alto potencial para la FBN debido a la simbiosis efectiva con varias especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Enzyfer* (Araujo *et al.*, 2020), el cual ayuda al desarrollo sostenible de los agroecosistemas y disminuir el uso indiscriminado de fertilizantes químicos nitrogenados (Sarpong *et al.*, 2020).

En Ecuador las leguminosas toman relevancia por sus diversas formas de uso. El género *Clitoria* es aprovechable al tener buenos contenidos de proteína, fibra, humedad y excelente digestibilidad para los ganados, además de ser usada como cobertura y fijadora de nitrógeno siendo una planta que mejora las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de los suelos (Yanes and Ramón, 2005). En este sentido, *Cajanus Cajan* cumple igual importancia en el ámbito agropecuario ya que a lo largo del tiempo se han realizado varios estudios que demuestran su alta capacidad de nodulación y realizar la FBN con varias bacterias simbióticas, disminuyendo la huella de N. Así como la importancia en la dieta animal y humana por su composición en proteína y fibra (López *et al.*, 2018).

El potencial de FBN del género *Clitoria* indica que puede llegar a fijar hasta 150 kg/ha de N por año (Londoño, 2018). Mientras que *Cajanus cajan* se estima una fijación de 20-140 kg/ha de N por año (Araujo *et al.*, 2020).

Por la información descrita anteriormente, se planteó esta investigación con la finalidad de identificar la presencia de rizobios al exterior e interior de los nódulos de las leguminosas *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* en dos zonas productivas de la provincia de Santa Elena, que permitiría llegar a una aproximación preliminar sobre presencia de bacterias tipos rizobios, indicadoras de una efectiva asociación simbiótica entre las leguminosas con sus rizobios hospederos escogidos.

**Problema Científico:**

¿La presencia de rizobios en *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* está estrechamente relacionada a la asociación mutualista que permite la fijación de nitrógeno en las dos zonas productivas de Santa Elena?

**Objetivos*****Objetivo General:***

- Identificar presencia de rizobios en la rizosfera de las leguminosas *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* en dos zonas productivas de la provincia de Santa Elena.

***Objetivos Específicos:***

1. Colectar aleatoriamente nódulos de raíces de *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan*.
2. Cuantificar el número de bacterias encontrados en los nódulos de las leguminosas *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* (UFC/nódulo).
3. Aislar bacterias de los nódulos de *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* encontrados en dos zonas productivas de la provincia de Santa Elena.

# **CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1 Fijación biológica de nitrógeno**

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso mediante el cual la mayor parte de nitrógeno atmosférico se ha incorporado a la materia viva siendo la fuente principal de nitrógeno en el ecosistema, convirtiéndolo en un elemento abundante del suelo que se encuentra disponible en sus formas orgánica e inorgánica representando el 85% del nitrógeno total (Cortés, 2011).

En el suelo el nitrógeno se encuentra reducido, es decir en su forma inorgánica como el  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}$  producto de la actividad de diferentes microorganismos diazotófos, donde, el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) son las principales fuentes de nitrógeno que las plantas absorben y metabolizan para sus procesos fisiológicos (Garabato, 2018).

Este proceso es realizado por microorganismos procarióticos capaces de aprovechar el nitrógeno directamente del aire, reduciéndolo a amoníaco a través de una enzima llamada nitrogenasa para la producción de proteínas (Calvo, 2011; Paredes, 2013).

## **1.2 Bacterias PGPR**

Según Huasasquiche *et al.* (2020), rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) por su abreviatura en inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, fue definida por Kloepper en el año 1993 al observar que eran microorganismos benéficos en vida libre que inducían el crecimiento de las plantas e influían en su desarrollo vegetativo. Al asociarse en la rizosfera contribuyen a la disponibilidad de nutrientes a través de procesos como: fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, solubilización de NPK y otros procesos que benefician la síntesis de nutrientes (Reyes, 2019).

## **1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno**

La fijación de nitrógeno atmosférico es realizada por grupos de bacterias con metabolismos aeróbicos y anaeróbicos que se encuentran en vida libre y de forma simbiótica (Osorio, 2019). Pertenecen a diversos grupos fisiológicos y filogenéticos, sin embargo, todas las bacterias diazotófas poseen un complejo enzimático semejante llamada nitrogenasa, la misma que le permite realizar la catálisis de la reacción primordial de la fijación del nitrógeno transformando en amoníaco el nitrógeno presente en la atmósfera (Calvo, 2011; León, 2013).

### **1.3.1 Bacterias fijadoras de vida libre**

El proceso de fijación de nitrógeno de estas bacterias se realiza en la rizosfera, es decir, que realizan una fijación asimbiótica Carpio (2014) y Garabato (2018) explican que, las bacterias diazótrofes se alimentan de materia orgánica muerta del suelo y pertenecen a varios grupos fisiológicos por lo que presentan características anaeróbicas, aeróbicas, autótrofas, heterótrofas, Gram positivas y pueden presentar asociaciones facultativas, además, algunas presentan características endofíticas. También estas bacterias al no realizar simbiosis mutualista con las plantas, su poder fijador de nitrógeno es muy deficiente ya que deben generar su propia energía.

### **1.3.2 Bacterias fijadoras simbióticas**

Calvo (2011) menciona que dentro de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno encontramos dos grupos de organismos. El autor indica que el primer grupo pertenece a bacterias móviles del suelo, que son atraídas hacia la raíz por compuestos que ésta libera y pertenecen al grupo de quimioorganotrofos aerobios denominados Rizobios, siendo *Rhizobium* (nodulan en raíces de leguminosas de climas templados y subtropicales), *Azorhizobium* (nódulos en tallos y raíces) y *Bradyrhizobium* (nodula raíces de soja). También menciona que el segundo grupo está formado por Actinomicetos (bacterias Gram positivas) que nodulan raíces de muchos árboles y arbustos, aquellas bacterias filamentosas que viven en simbiosis con plantas actinorrhizas (angiospermas capaces de formar nódulos) y son pertenecientes al género *Frankia*.

## **1.4 Rizobios**

Pastorino (2016) indica que los rizobios son bacterias Gram negativas móviles pertenecientes a la microbiota del suelo, y tienen forma de bacilos. En este grupo se encuentran variedades de microorganismos que tienen en común la capacidad de sintetizar una enzima nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico y lo convierte en amonio. Así, los rizobios poseen alta eficiencia para fijar el nitrógeno y abastecer hasta el 90% de los requerimientos de este elemento en las leguminosas (Soto *et al.*, 2021).

Los rizobios engloban diferentes especies de bacterias de acuerdo con la agrupación filogenética que codifica el gen ARNr 16S, el cual comprende la división de Proteobacterias ( $\alpha$ -Proteobacterias,  $\beta$ -Proteobacterias). Según Alías (2016), dentro de la clase de Alphaproteobacterias los rizobios se encuentran como una colección polifilética

de géneros en la orden Rhizobiales identificando nueve géneros: *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Ensifer* y *Rhizobium*.

Las bacterias que se encuentran en los géneros *Rhizobium* y *Ensifer* tienen un especial interés en estudios simbióticos, según Díez (2019).

### **1.5 Género *Rhizobium***

Las bacterias de este género pertenecen a la división de las Proteobacterias las cuales se caracterizan por realizar la fijación del nitrógeno atmosférico y asociarse con plantas específicamente de la familia Leguminosae (Hernández *et al.*, 2012).

Sánchez (2022) plantea que en el género *Rhizobium* las especies bacterianas se agrupan en dos subramas: en la primera se encuentran las especies *R. galegae* y *R. huautlense* junto con *Allorhizobium* y tres especies de *Agrobacterium*; en la segunda se encuentran las otras especies incluyendo las de tipo *R. leguminosarum*, y *Agrobacterium rhizogenes*. Actualmente los estudios realizados demuestran 73 especies bacterianas dentro del género *Rhizobium*, aunque algunas de ellas no se han identificado especificidad a un hospedador específico, según Díez (2019).

Estas bacterias son microorganismos aerobios de 0.5-0.9 x 1.2-3.0 µm, no forman esporas, eficientes al fijar el nitrógeno cuando están en un ambiente sin limitantes, bacilos cortos algunas veces pleomórfico, Gram-negativos con pared celular, móviles por flagelos peritricos o un solo flagelo lateral y son heterótrofas (Shener (2021). Sus características morfológicas dependen de diferentes variables como de la velocidad de su crecimiento, transmisión de luz, textura, forma, tipo de bordes y elevación. Las colonias de este género se las considera de crecimiento rápido en medio de cultivo LMA (Extracto de Levadura Manitol Agar) presentando características: blancas o color beige ligeramente rosadas, circulares, convexas, lisas, semitranslúcidas y opacas; miden de 2 a 4 mm de diámetro a 3-5 días de incubación (Saldaña, 2017).

#### **1.5.1 Taxonomía del género *Rhizobium***

Según Gonzales (2013), para realizar la taxonomía del género *Rhizobium* se debe emplear varias pruebas de manera estricta, estas involucran las pruebas fenotípicas y genotípicas. Menciona que la segunda prueba permite clasificar los géneros con mayor precisión ya que

esta involucra: composición de G+C del ADN, hibridación ADN, RFLP, sondas específicas de genes nif (responsables de la síntesis y regulación de la enzima nitrogenasa) y nod (involucrados en la formación de los nódulos en las raíces de las plantas leguminosas y la producción de moléculas de señalización necesarias para la simbiosis bacteriana-planta), perfiles plasmídicos, secuenciamiento del ARNr 16 entre otros. En su investigación, Tong et al. (2018) indican que la taxonomía del género *Rhizobium* puede ser expresada de la siguiente forma:

**Phylum:** Proteobacterias

**Clase:**  $\alpha$ -Proteobacterias

**Orden:** Rhizobiaceae

**Familia:** Rhizobiaceae

**Género:** *Rhizobium*

Por su parte, Gonzales (2013) indica que también está la clase  $\beta$ -Proteobacteria que incluye al orden *Burkholderiales* con dos géneros de bacteria, *Burkholderia* spp. y *Cupriavidus*, que también inducen la formación de nódulos con las leguminosas.

### ***1.5.2 Distribución ecológica***

En el suelo las bacterias crean una estrecha relación con las plantas. Las bacterias del género *Rhizobium* se encuentran en forma de vida libre o en la rizosfera. Sin embargo, Jiménez (2022) indica que a pesar de que estas bacterias en la rizosfera se encuentran en cantidades altas, solo el 7- 15 % de la superficie total de la raíz está ocupada por células microbianas en las leguminosas.

### ***1.5.3 Aislamiento de Rhizobium***

Para aislar bacterias de este género se lleva a cabo varios procesos donde involucra la desinfección para eliminar agentes contaminantes, y la maceración. Crespo and Julio (2012) indican que los rizobios inician por el proceso de esterilización, maceración, para luego ser estriados en medios de cultivos y así proporcionarle los recursos necesarios para su crecimiento. Los mismos autores mencionan que generalmente su velocidad de crecimiento se debe a los componentes del medio como: carbohidratos, compuestos

nitrogenados, productos de degradación de las proteínas, sustratos para la respiración, vitaminas y ciertos elementos que ayudan a diferenciarlos de otras bacterias.

## **1.6 El nitrógeno**

El nitrógeno es considerado como un macronutriente muy abundante en la atmósfera (80%), importante para algunas funciones metabólicas de los seres vivos al ser parte de aminoácidos, nucleótidos y amino azúcares, así como de sus correspondientes polímeros (Carballo and Flores, 2022). En las plantas repercute en sus procesos fisiológicos ya que es el encargado de varias reacciones y formar parte de la estructura de la clorofila, enzimas y proteínas (Benites, 2016).

El nitrógeno a su vez es un factor crucial que limita la productividad de los cultivos en muchos ecosistemas terrestres ya que su disponibilidad en los suelos depende en gran medida de las tasas de mineralización impulsadas por los microorganismos del N ligado orgánicamente en formas inorgánicas de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitratos disponibles para las plantas (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2018). Asimismo, mencionan que para contrarrestar la deficiencia de este elemento las bacterias pertenecientes a las  $\alpha$ -Proteobacterias y  $\beta$ -Proteobacterias ayudan a incorporarlo al suelo.

### ***1.6.1 Fijación de nitrógeno en leguminosas***

Cuando se trata de fijar el nitrógeno las plantas de la familia Leguminosae son muy utilizadas ya que tiene la capacidad de fijar el nitrógeno cuando se asocia con rizobios (*Rhizobium*). La fijación de este elemento se debe a la interacción entre la raíz y los microorganismos. Luna (2014) menciona que esta interacción se basa principalmente en la modificación interactiva del ambiente del suelo por procesos como captación de agua por la planta, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces, producción microbiana de factores de crecimiento vegetales y captura de nutrientes minerales por parte de los microorganismos.

Según Paredes (2013), todos los procesos que realizan las bacterias demandan de energías por el cual se asocian en la rizosfera de la planta, en este sentido, la energía que requieren las bacterias proviene de los carbohidratos del suelo cuando no están en asociación con la planta, los exudados radiculares cuando realizan asociación y directamente de los productos de la fotosíntesis.

### 1.6.2 Promedio de nitrógeno fijado por leguminosas

Con una correcta asociación entre rizobios y leguminosas se puede obtener cantidades de nitrógeno fijado que varían de 50 y 800 kg/ha por año de N, pudiendo de esta manera sustituir grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados, aunque, las proporciones dependen de la efectividad del rizobio, la especie de leguminosa, las condiciones edafoclimáticas y del manejo del cultivo (Hormazábal, 2013).

León et al. (2018) mencionan que las leguminosas obtienen 2/3 partes del nitrógeno provenientes del aire que hay en los poros del suelo, mientras que el 1/3 es obtenido por la mineralización de la materia orgánica del suelo. En la Tabla 1 se muestran las cantidades de nitrógeno que pueden llegar a fijar las leguminosas a través de la simbiosis mutualista con rizobios.

**Tabla 1.** Promedio de nitrógeno fijado por leguminosas en simbiosis.

Especie	kg/ha/año
Trébol blanco	200
Pastura con 30-40% de trébol blanco	180-200
Pastura con 20% de trébol blanco	106
Alfalfa	186
Trébol rojo	132
Meliloto blanco	125
Trébol de carretilla	107
Lenteja	103
Soya	101
Vicia	82
Arveja	69
Maní	42
Centrosema	280
Alfalfa tropical	84-290
Desmodio	264-300
Pega-pega	178
Leucaena	400-500

**Fuente:** Urzúa 2007

### 1.7 Nódulos

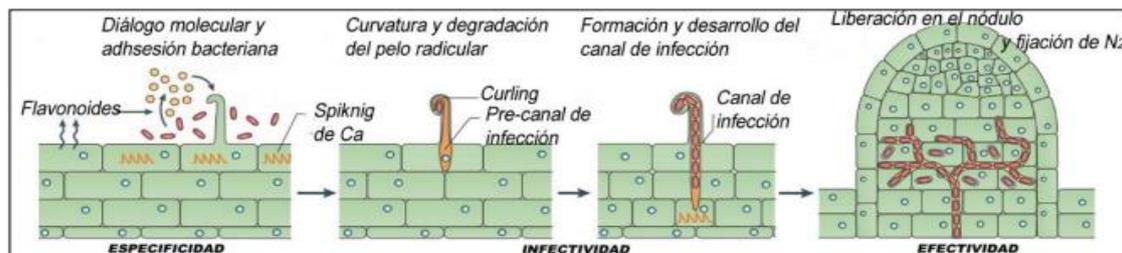
En una interacción eficiente entre los rizobios y la planta se forman estructuras denominadas nódulos Jiménez (2022) dice que los nódulos son masas de tejidos altamente

organizados, derivados de la multiplicación de las células de la corteza. Su formación depende de la interacción entre todos los simbioses donde intercambian señales incluso antes de hacer contacto físico (Marcos, 2017). Asimismo, el autor menciona que la planta expulsa varias sustancias químicas o exudados a través de la raíz como: azúcares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos grasos, esteroides, compuestos fenólicos, enzimas, proteínas, reguladores del crecimiento y metabolitos secundarios. También menciona que funcionan como quimiotácticos para los microorganismos que ayudarán a formar los tumores radicales.

Luna (2014) menciona que los nódulos están activamente funcionales cuando la proteína leghemoglobina mantiene su pigmentación rojiza, es decir que la fijación del nitrógeno es alta, por el contrario, los tejidos del nódulo a medida que envejecen cambian su pigmentación a verde y baja la eficiencia de fijar el nitrógeno.

### 1.7.1 Formación de nódulos en la rizósfera

Los nódulos conllevan procesos sumamente coordinados con varias etapas para su formación. Calvo (2011) y Madigan et al. (2015) mencionan que la formación de los nódulos se manifiesta por etapas; 1) se da con el reconocimiento celular mutuo entre la bacteria y la planta a través de señales quimioatrayentes, como son los flavonoides para la adhesión de la bacteria a los pelos radiculares. 2) las bacterias realizan el proceso de infección (factores Nod) donde penetra la raíz formando el tubo de infección y llegar a la corteza de la raíz. 3) última etapa donde la bacteria coloniza la raíz transportándose por el filamento de infección y establecer el simbiosoma. Como se muestra en la figura 1.



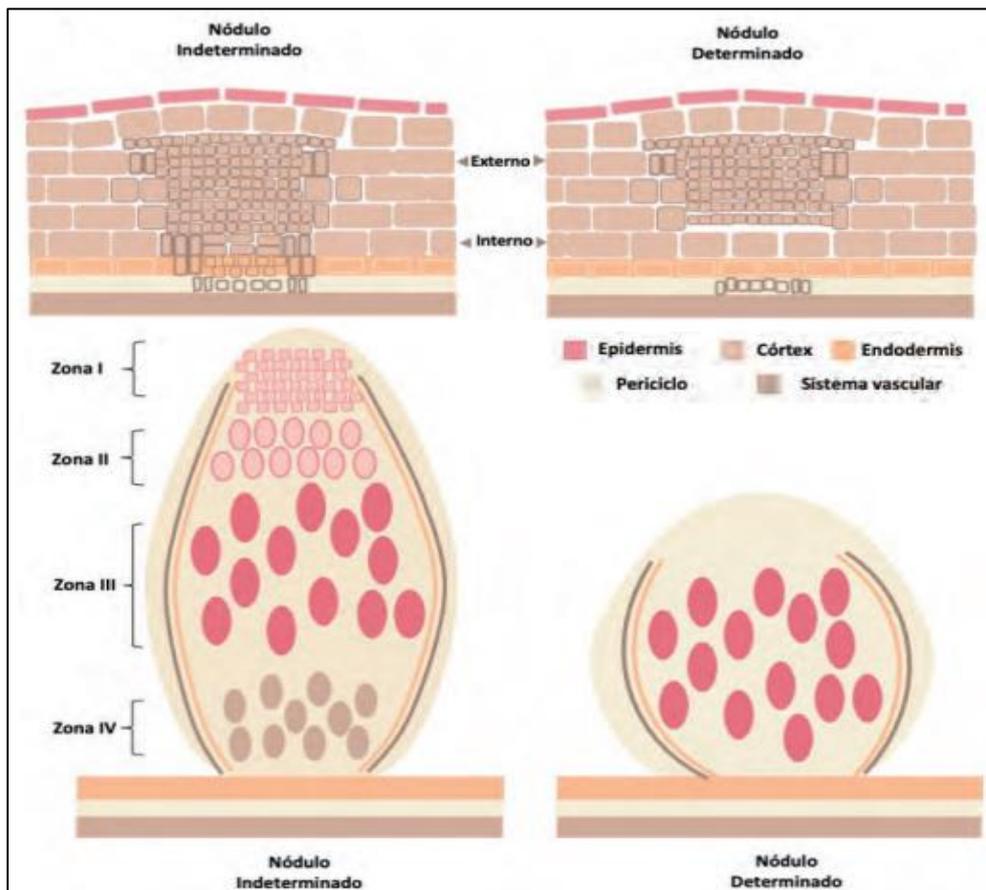
**Figura 1.** Formación de nódulos en leguminosas infectadas por rizobios.

**Fuente:** Díez (2019)

### 1.7.2 Tipos de nódulos

Estudios realizados han demostrado que los nódulos poseen varias formas y estructuras siendo dos tipos comúnmente conocidos, el nódulo indeterminado y el nódulo determinado. Bianco (2020) menciona que el primer tipo de nódulo ocurre en el interior de la corteza dividiéndose en la endodermis de la raíz, el tamaño varía desde 3 mm a varios centímetros de longitud, su senescencia es muy lenta y transporta productos ureidos. El segundo tipo, por el contrario, ocurre en las células subepidérmicas de la superficie de la corteza, el tamaño varía entre 2 y 5 mm de diámetro, su senescencia es muy rápida y transporta productos como las amidas.

Por lo general, los nódulos maduros indeterminados están divididos por zonas (I - IV) y los nódulos determinados predomina su forma esférica donde se realiza la fijación del nitrógeno atmosférico. Isidra-Arellano and Valdés-López (2022) indican que en la zona I está el meristemo, zona de infección (zona II), zona de fijación de nitrógeno (zona III), y zona de senescencia (zona IV) como se muestra en su representación gráfica Figura 2.



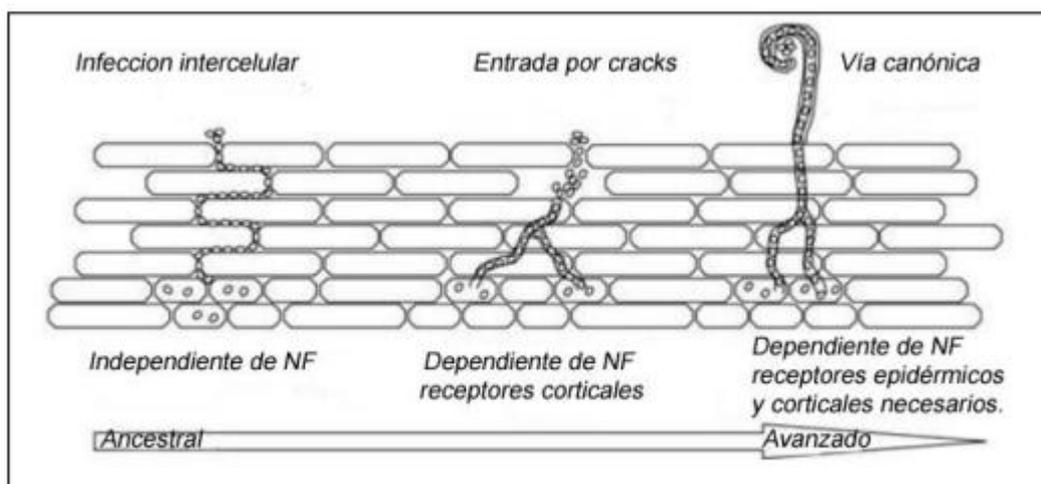
**Figura 2.** Forma y tipos de nódulos colonizadores de las raíces.

**Fuente:** Isidra-Arellano and Valdés-López (2022).

### 1.7.3 Etapa de infección

Díez (2019) indica que la infección que realizan los rizobios se da mediante espacios intercelulares (sin factor Nod) o por otras vías como heridas (cracks) de la pared celular siendo la infección tipo canónica la más frecuente en las leguminosas, como se aprecia en la Figura 3.

Esta infección por rizobios implica la modificación de la punta del pelo radical. Según Marcos (2017), la infección primaria comienza desde el cambio morfológico de los pelos radicales llamado fenotipo Hac (hair curling), proceso de degradación por la acción de diferentes enzimas como poligalacturonasas, celulasas, hemicelulasas y pectinasas; y así, formar el canal de infección para que las bacterias invadan el interior de la raíz. En la infección secundaria y final, el rizobio llega al citoplasma vegetal donde se realiza la diferenciación a bacteroides y formar un orgánulo llamado simbiosoma, de esta manera, inducir el sistema enzimático nitrogenasa y llevar a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, forma asimilable por la planta.



**Figura 3.** Tipo de infección por parte de los rizobios en leguminosas.

**Fuente:** Díez (2019).

## 1.8 Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

La asociación *Rhizobium*-leguminosa es considerada un proceso de alta eficiencia FBN, el cual la planta proporciona un ambiente micro-aeróbico para el funcionamiento efectivo de la nitrogenasa, enzima que reduce el nitrógeno atmosférico a amoníaco, esto por efecto quimiotáctico de exudados radicales como ácidos orgánicos, aminoácidos, auxinas, azúcares, enzimas, flavonoides y vitaminas (Valier, 2020).

Marcos (2017) indica que la asociación *Rhizobium*-leguminosa muestra la evidencia de que la inoculación del *Rhizobium* siempre tiene un efecto beneficioso en el crecimiento de la leguminosa si se da la nodulación; el aumento de un huésped compatible, aumenta la abundancia relativa de los rizobios en el suelo.

Díez (2019) plantea que la simbiosis se agrupa en 3 fases de acuerdo con su función simbiótica:

- **Especificidad:** capacidad para interactuar a nivel molecular de una manera específica permitiendo al rizobio anclarse a la superficie radicular e inducir la diferenciación del primordio nodular, así como la deformación completa del pelo radical.
- **Infectividad:** capacidad de penetración en el tejido radical de la planta huésped, así como de llegar hasta los nódulos a través del canal de infección.
- **Efectividad:** capacidad de transformarse en bacteroide y llevar a cabo la FBN en el interior del nódulo.

## 1.9 Rizobacterias encontradas al exterior y al interior de los nódulos

### 1.9.1 *Clitoria sp.*

Chapman (2021) menciona que el análisis microbiológico realizado en la rizosfera de *Clitoria ternatea* evidenció *Rhizobium* y ausencia de *Pseudomonas*. Coelho et al. (2018) indican la identificación de los géneros *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter* y *Leifsonia* en el exterior de los nódulos.

En cuanto a las rizobacterias simbióticas. Coelho et al. (2018) identificaron solo el género *Bradyrhizobium* de los aislados de *Clitoria fairchildiana* por la secuenciación del gen 16S rRNA. En su investigación, Soto et al. (2021) reportaron 24 cepas del género *Rhizobium* y 22 cepas del género *Bradyrhizobium*, en *Clitoria brachystegia*.

### 1.9.2 *Cajanus cajan*

En su investigación Araujo et al. (2015) identifican varias especies del género *Bradyrhizobium* e incluso una nueva especie nombrada como *Bradyrhizobium cajani*. Soto (2018) identificó bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter* en los aislados bacterianos de los suelos de Ecuador.

## **1.10 Leguminosas**

Las leguminosas revisten especial importancia en la agricultura, debido que contribuyen a aumentar la fertilidad de los suelos a través de la fijación de nitrógeno (Hernández *et al.*, 2012). Son uno de los grupos más abundantes del reino vegetal, con 650 géneros y alrededor de 18 000 especies distribuidas alrededor del mundo, sin embargo, se ha reconocido que de las 12 000 especies de leguminosas con capacidad fijadora de nitrógeno que existen, un 80 a 90% son papilionoideas, un 25% mimosoideas y sólo unas pocas son cesalpinoideas (Milano, 2018).

Según Garabato (2018), las leguminosas por su capacidad de asociarse con rizobios y fijar el nitrógeno permiten reducir el consumo de energía mejorando a largo plazo las condiciones físicas y la biodiversidad del suelo.

## **1.11 Generalidades de los cultivos**

### *1.11.1 Clitoria sp.*

La *Clitoria* se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales de América, es de ciclo vegetativo perenne y tiene buenas características agronómica (Lozano and Rivera, 2022). Tiene un crecimiento semi-arbustivo y semi-erecto de 80-90 cm de altura, en el Ecuador se adapta desde el nivel del mar hasta los 1600 msnm., requiere para su desarrollo precipitaciones de 800 mm, una vez establecida, la raíz pivotante permite que la planta resista muy bien la sequía, se desarrolla en óptimas condiciones en suelos con pH de 6 a 8 (León *et al.*, 2018).

Lozano and Rivera (2022) mencionan que una característica visible en sus raíces es la formación de estructuras llamadas nódulos los mismos que ayudan al enriquecimiento del suelo. Además, establecen simbiosis (bacteria-planta) donde los nódulos nitrificantes absorben nitrógeno atmosférico y los sintetizan para la planta, incrementando la disponibilidad de este elemento para el cultivo y el suelo.

### *1.11.2 Cajanus cajan*

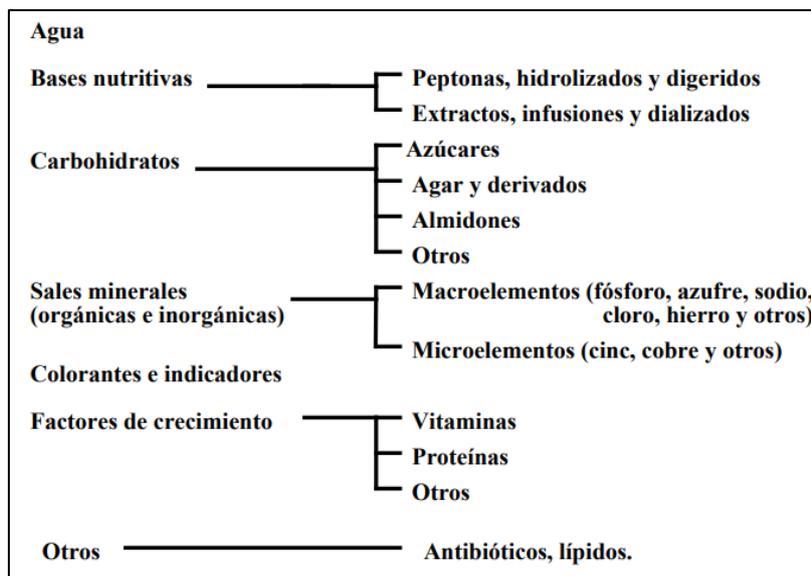
*Cajanus cajan* es una leguminosa arbustiva rústica y de rápido crecimiento a partir de los 30-40 días después de la siembra resistente a la sequía, su raíz es profunda y pivotante, no tolera encharcamientos y heladas, es una planta bianual y en algunos casos dependiendo de la zona y variedad se comporta como perenne (Córdova, 2017). Smith *et al.* (2016)

manifiestan que es una leguminosa leñosa que puede aportar nitrógeno a los suelos agrícolas a través de la producción de biomasa rica en nitrógeno y al mismo tiempo producir granos comestibles que se suplementan en la dieta humana y animal.

Castillo et al. (2016) manifiestan que esta leguminosa se cultiva en terrenos ligeros arenosos, limosos y pedregosos, por las características de su raíz le permiten crecer en suelos pobres. Sin embargo, no prospera en suelos pesados, arcillosos y con problemas de drenaje en referencia a los suelos arcillosos de la península. También menciona el autor que se desarrolla mejor en suelos preferentemente francos, profundos, fértiles, de topografía ondulada y de buen drenaje.

### 1.12 Medios de cultivos para el crecimiento bacteriano

Rodríguez and Zhurbenko (2018) consideran que los medios de cultivos son un conjunto de elementos o sustancias que garantizan a los microorganismos u otras células los nutrientes necesarios para su conservación y/o desarrollo. El principal objetivo de los medios de cultivos es crear un ambiente adecuado para el crecimiento, simulando las condiciones lo más cercanas posibles a las naturales, asegurando así el apropiado funcionamiento de la función enzimática de los microorganismos (Gómez and Batista, 2006). Asimismo, el mismo autor plantean que los medios de cultivos tienen una base de ingredientes estricta para desarrollar las colonias, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Requerimientos de nutrientes bases en medios de cultivos para el recuento de microorganismos.

**Fuente:** Rodríguez and Zhurbenko (2018).

### ***1.12.1 Medio levadura manitol Agar (LMA)***

Este medio fue desarrollado por Windle Taylor en el año 1958 para el recuento de microorganismos heterótrofos (bacterias y mohos) en placas, siendo el medio más empleado desde entonces para la identificación de rizobios (Zuñiga, 2012; Rodríguez y Zhurbenko, 2018).

### **1.13 Crecimiento microbiano**

En un sistema biológico las células están sometidas a dividirse o incrementar su masa celular definiendo el crecimiento del microorganismo. El crecimiento microbiano básicamente es el aumento y/o crecimiento celular, cuando hay aumento de tamaño de las células, estas han crecido reservando sus nutrientes precediendo a la división; caso contrario, hay aumento de población o colonias bacterianas cuando todas las células aumentan en número por la división celular.

Generalmente en los laboratorios se observan los crecimientos bacterianos poblacionales, es decir, donde el crecimiento microbiano aumenta en una misma proporción por unidad de tiempo (crecimiento balanceado). Este tipo de crecimiento permite a la célula aumentar proporcionalmente su masa celular, número de células, proteína, ARN, ADN, etc., debido al factor coeficiente exponencial de crecimiento.

#### ***1.13.1 Ciclo del crecimiento microbiano***

Según Láñez (2005), en laboratorios se emplean dos sistemas de cultivos para el crecimiento microbiano, sistemas abiertos y sistemas cerrados, los cuales drenan y no drenan los nutrientes respectivamente.

Benintende y Sánchez (2009) explican que en medios líquidos el crecimiento microbiano está dado por cuatro fases:

- **Fase de retardo o latencia:** las células entran en estado de reposo para sintetizar las enzimas y activar su actividad metabólica lo que permitirá adaptarse al medio de cultivo, el producto de la adaptación al medio genera aumento en su masa celular.
- **Fase de crecimiento exponencial:** las células alcanzan su velocidad máxima de crecimiento al pasar por un tiempo de generación. La velocidad de crecimiento

depende del tipo de microorganismos y de las condiciones ambientales (temperatura, pH, composición del medio de cultivo, oxigenación, etc.).

- **Fase estacionaria:** se caracteriza por definir el crecimiento neto de las bacterias, se mantiene el equilibrio entre todas las poblaciones del medio por muerte de celulares. La limitación se debe al cambio de las propiedades nutritivas del medio, ya sea por agotamientos de compuestos o por los desechos tóxicos producto del metabolismo microbiano, siendo un medio inhóspito para el desarrollo de las células.
- **Fase de muerte:** termina con una lisis exponencial de las células viables, los microorganismos pierden energía y las poblaciones entran en fase de muerte.

Con respecto a los medios sólidos, Lláñez (2005) manifiesta que son igual de nutritivos que los medios líquidos, pero la característica principal es la incorporación del componente gelificante que le da esa consistencia. Son añadidos solidificantes tipo Agar, gelatina o sílica gel.

## **1.14 Requerimiento nutricional para el crecimiento microbiano**

### ***1.14.1 Agua***

El agua es fundamental para solubilizar los nutrientes, transportarlos y asegurar las reacciones de hidrólisis (Bonnet *et al.*, 2020). Además, es el principal constituyente del protoplasto, ayuda a las reacciones biológicas y es un reactante de exceso en algunas reacciones bioquímicas (Morejón and Pardo, 2008).

### ***1.14.2 Fuentes de carbono***

El carbono es el elemento más abundante y requerido por las bacterias, pueden utilizar fuentes de carbono inorgánicas, como el CO<sub>2</sub>, o fuentes orgánicas, como azúcares y alcoholes (Bonnet *et al.*, 2020). Independientemente del tipo de bacteria sintetizan el carbono para utilizarlo como fuente de energía para sus procesos metabólicos (Morejón and Pardo, 2008).

### ***1.14.3 Fuentes de nitrógeno***

Se pueden encontrar en un gran número de compuestos utilizados en la composición de un medio de cultivo. Se encuentra en forma orgánica por hidrolizados de proteínas como

proteosa-peptona o triptona, pero también en forma inorgánica como nitratos, permitiendo que las bacterias sintetizen sus proteínas, enzimas y ácidos nucleicos (Bonnet *et al.*, 2020).

#### **1.14.4 Sales minerales**

Son fuentes de algunos elementos (macros y microelementos) que las bacterias requieren para su proliferación (Morejón and Pardo, 2008).

Caycedo et al. (2021) indica que las bacterias requieren de los siguientes elementos superficialmente en altas cantidades (macroelemento) para su crecimiento:

- **Potasio:** interviene en la activación de enzimas y síntesis de proteínas.
- **Magnesio:** interviene en funciones ribosómicas, membranas y ácidos nucleicos. Participa como cofactor en diversas como en la de transferencia de grupos fosfato y cuando las células necesiten de ATP, en este último, el Mg interviene en la unión de la enzima al medio por la acción de la activación de enzimas.
- **Calcio:** actúa en varias reacciones enzimáticas como cofactor de proteinasas.
- **Hierro:** participa como los procesos de respiración, como citocromos y ferropoteínas no hémicas, además es cofactor de ciertas enzimas.

De igual forma, requieren de sales minerales en menores cantidades que se encuentran dentro de los microelementos como:

- **Manganeso:** cofactor de ciertas enzimas y a veces puede sustituir al Mg.
- **Cobalto:** interviene para la síntesis de la vitamina B12, excepto si se ha suministrado en el medio.
- **Zinc:** se encarga de estabilizar los complejos enzimáticos como las ADN y ARN polimerasas.
- **Molibdeno:** interviene en la síntesis de las molibdoflavoproteínas implicadas en la asimilación de nitratos. De igual forma, participa como cofactor junto con el Fe, en el complejo nitrogenasa de las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> atmosférico.
- **Níquel:** participa en la mayoría de las funciones de las hidrogenasas, encargadas de captar o liberar hidrógeno.

### **1.15 Factores condicionantes del crecimiento bacteriano**

Caycedo et al. (2021) dicen que los factores que afectan el crecimiento microbiano significativamente son la temperatura y el pH:

**Temperatura:** el mismo autor menciona que todos los microorganismos se ven afectados tanto en su crecimiento como supervivencia al enfrentarse a temperaturas extremadamente bajas o relativamente altas, siendo así, cada uno tiene un rango de temperatura donde aprovechan los nutrientes del medio para desarrollar correctamente los procesos catabólicos y anaeróbicos necesarios para la división celular. Un microorganismo que se encuentre en ambientes donde las temperaturas son óptimas, las reacciones enzimáticas aumentarán su velocidad de crecimiento de forma lineal, mientras que, a altas temperaturas la inhibición de los sistemas sintetizadores de enzimas y proteínas provoca una lisis térmica que daña la membrana celular. Caso contrario, las temperaturas muy bajas reducen el metabolismo enzimático provocando que la membrana plasmática pierda su fluidez, de tal forma, los microorganismos pierden la capacidad de absorber los nutrientes disminuyendo su crecimiento.

**pH:** el mismo autor indica que el pH es determinante al permitir la regulación de acidez o alcalinidad de los medios y el interior de la célula, influye en el transporte de hidrógeno a través de la membrana citoplasmática, los microorganismos neutrófilos se desarrollan en pH 7, los acidófilos se desarrollan a pH inferior a 5 y los basófilos o alcalófilos se desarrollan a pH mayores de 8.

### **1.16 Características bacterianas en medios de cultivos**

Entre las principales características que tienen las bacterias es por su tamaño, forma y el modo en que se agrupan en un determinado medio. Granados and Villaverde (2003) plantean que estas características definen la morfología de cada célula bacteriana. El mismo autor explica las siguientes características:

#### **Tamaño**

Son microorganismos de dimensiones microscópicas medibles en micras ( $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$ ), generalmente, se define un rango que va entre 0.1 y 4  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, el tamaño depende de la forma de las células; en algunas bacterias (cocos) pueden ser de 0.2  $\mu\text{m}$  y otras (bacilos) pueden llegar a un tamaño de 5-8  $\mu\text{m}$  x 1.5  $\mu\text{m}$  largo y ancho respectivamente.

Cuando forman colonias (masa con millones de bacterias) el tamaño de cada género o especie es casi uniforme, por lo tanto, se puede considerar colonias con tamaño medio (1-2 mm de diámetro) y tamaño grande (4-6 mm de diámetro).

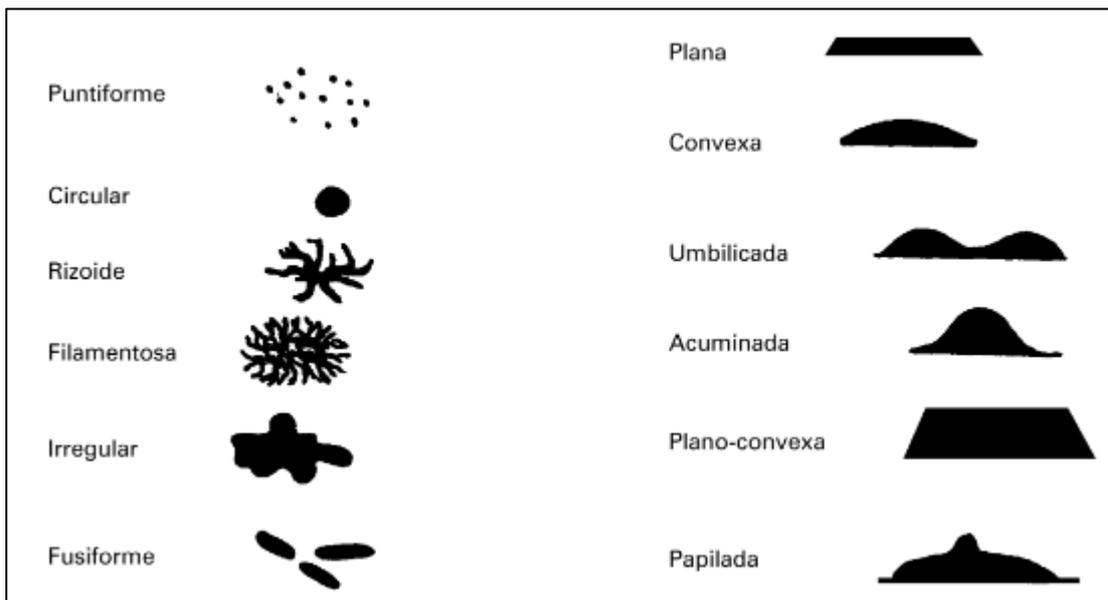
**Forma**

Adoptan forma esféricas o cocoideas y cilíndricas o bacilares. En ocasiones esta última, tiene una forma intermedia llamada cocobacilos, el cual indica más que una característica, la etapa inicial del desarrollo del bacilo.

**Agrupaciones**

**Agrupaciones macroscópicas**

Este tipo de agrupaciones permite caracterizar un microorganismo a simple vista, al ser una célula la responsable del crecimiento en población bacteriana en un punto lineal; el crecimiento celular forma colonias que presentan características de formas, tamaños y aspectos en uno o varios puntos dentro de un medio de cultivo según la especie bacteriana, como se aprecia en la Figura 5.



**Figura 5.** Características macroscópicas (forma, borde aspecto) de colonias en medios de cultivos.

**Fuente:** Granados and Villaverde (2003).

## **Agrupaciones microscópicas**

El tipo de agrupación depende principalmente de la fisión celular binaria que permitirá a las células estar asociadas entre sí, por lo tanto, no todas las formas bacterianas se agrupan en este apartado. Se da el caso que formas bacterianas (espirilos) no se unen con los grupos que permiten establecer clasificaciones taxonómicas, así las formas cocoideas y bacilares se agrupan en mayor y menor proporción respectivamente. Las estructuras cocoideas se agrupan en: diplococos, estreptococos, tetradas, estafilococos y sarcinas. Las bacilares pueden aparecer como: diplobacilos, estreptobacilos y formas irregulares.

### **1.17 Colorantes diferenciales**

Los colorantes se pueden utilizar como indicador de color en un medio de cultivo o como agente selectivo contra ciertas bacterias (Bonnet et al., 2020). Son compuestos orgánicos y reactivos necesarios para la observación de un microorganismo. Cada tipo de colorante tiene afinidad por determinados componentes celulares y generalmente, actúan mediante reacciones de intercambio iónico entre el colorante y los elementos celulares. De forma particular, los colorantes utilizados con frecuencia en microbiología tienen propiedades catiónicas y reaccionan con las partes celulares constituyentes de aniónicas, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos (González et al., 2020).

#### ***1.17.1 Tinción de Gram***

Esta técnica permite dividir a los microorganismos acorde con la composición y estructura de su pared celular. Las bacterias que tienen una capa gruesa de peptidoglucano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico con la reacción de Gram toman un color púrpura denominándose Gram positiva; las bacterias con una capa de peptidoglucano más delgada toman un color rosado a rojo (González et al., 2020).

Wang et al. (2012) indican que los rizobios son bacilares y su tamaño varía dependiendo del género. En este sentido, las bacterias del género *Allorhizobium* generalmente miden 0.5-0.7 x 2.0-4.0  $\mu\text{m}$ , las del género *Azorhizobium* miden 0.5-0.6 x 1.5-2.5  $\mu\text{m}$ . En las bacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, mencionan que su tamaño es muy similar midiendo 0.5-1.0 x 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ .

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Área y descripción de las zonas de estudio

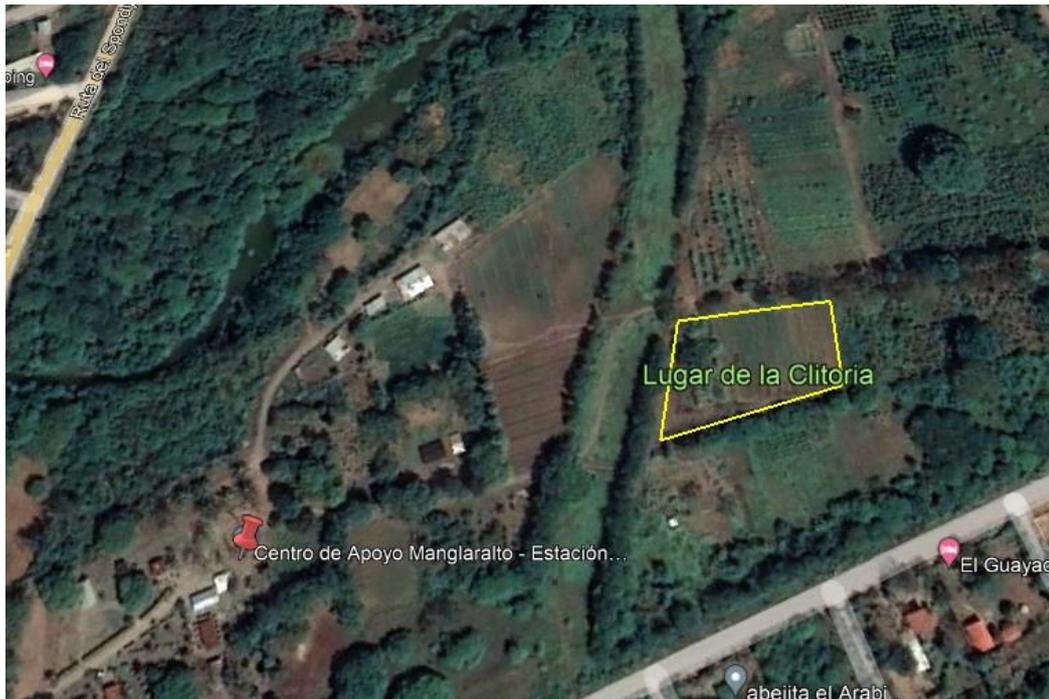
La investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), ubicado en la Facultad de Ciencias Agrarias en el cantón La Libertad provincia de Santa Elena, vía principal Guayaquil-La Libertad, a 27 km del cantón Santa Elena, sus coordenadas geográficas son: latitud Sur  $2^{\circ}14'6''$ , longitud Oeste  $80^{\circ}54'9''$ . Las muestras fueron colectadas en dos zonas productivas de la provincia:

- **Centro de Apoyo Río Verde UPSE:** ubicada en el kilómetro 35 de la vía Salinas–Guayaquil, cuyas coordenadas geográficas son: Latitud Sur  $2^{\circ}18'25.92''$ , Longitud Oeste  $80^{\circ}42'1.54''$  con una altitud de 54 msnm, el tipo de suelo predominante es el franco-arcillo-arenosa. Lugar donde se colectaron los nódulos de *Cajanus cajan*.



**Figura 6.** Ubicación del Centro del Apoyo Río Verde.

- **Centro de Apoyo Manglaralto UPSE:** ubicada cerca de la vía Dos Mangas a 55 km al norte de la ciudad de Santa Elena, sus coordenadas geográficas son; Latitud Sur  $1^{\circ}50'37''$  y Longitud Oeste  $80^{\circ}44'33''$ . La textura del suelo predominante es franca-arcillosa. En sus instalaciones se colectó la muestra de *Clitoria*.



**Figura 7.** Ubicación del Centro de Apoyo Manglaralto.

## **2.2 Material vegetativo**

Se extrajeron raíces noduladas aleatoriamente de una sola planta de *Clitoria* sp. y de dos plantas de *Cajanus cajan* encontradas en las dos zonas descritas.

## **2.3 Material de campo**

- Pala de jardinería.
- Azadón pequeño.
- Microtubos de 1.5 ml.
- Sílica gel
- Cinta Parafilm
- Algodón
- Papel periódico

### **2.3.1 Material de bioseguridad para laboratorio**

- Guantes
- Mascarilla
- Bata

## **2.4 Materiales y equipos de laboratorio**

### **2.4.1 Insumos y reactivos**

- Medio extracto de levadura-Manitol-Agar (LMA)
- Tiras indicadoras de pH
- Solución salina 7%
- Reactivos para Tinción de Gram

### **2.4.2 Instrumentos de laboratorio**

- Varilla de agitación
- Pipeta
- Micropipetas de 100 a 1000  $\mu$ L
- Cajas Petri
- Beakers 250 mL
- Matraz
- Plato agitador calefactor
- Papel filtro
- Fiolas
- Tubos de ensayo
- Mortero
- Espátula
- Alcohol
- Balanza analítica

### **2.4.3 Equipos**

- Estufa
- Autoclave
- Incubadora

## **2.5 Recolección de las muestras**

Las muestras se colectaron en las dos zonas de la provincia de Santa Elena (Río Verde y Manglaralto) escarbando el suelo cuidadosamente con una pala de jardín a 20 cm alrededor y 10 cm de profundidad de las plantas seleccionadas aleatoriamente. De las raíces

noduladas se colectaron a su vez los nódulos, que para su conservación del campo a los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas CEB-UPSE fueron colocados con sílica gel y algodón, luego transferidos en microtubos de 1.5 mL sellados con cinta Parafilm. Luego, se rotularon acorde a las características y ubicación de la planta.

## 2.6 Aislamiento de las cepas de Rizobios

### 2.6.1 Preparación de las muestras

En el laboratorio, los nódulos se limpiaron cuidadosamente para eliminar el exceso de tierra, luego se los colocó en cajas Petri selladas con cinta Parafilm y respectiva rotulación (Tabla 2). Después fueron procesadas en el laboratorio para el aislamiento de las bacterias.

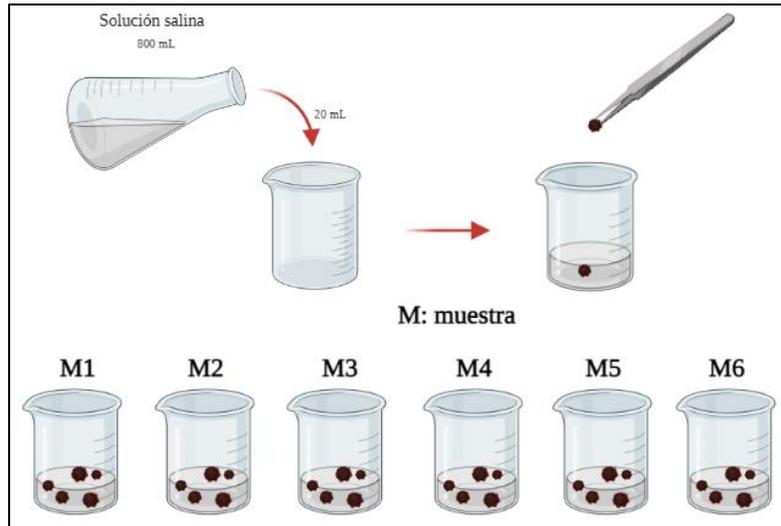
**Tabla 2.** Características de las muestras aisladas y procesadas.

Muestra	Código de muestra	Número de nódulos	Sitio
1	ORV1-01	9	Río Verde
2	ORV1-02	4	Río Verde
3	ORV1-03	8	Río Verde
4	ORV2-01	10	Río Verde
5	ORV2-02	2	Río Verde
6	ZM01	6	Manglaralto

### 2.6.2 Procesamiento de los nódulos

Los nódulos colectados de cada muestra fueron procesados para su identificación bacteriana exterior e interior. Se lavaron con agua destilada estéril teniendo la precaución de no desprenderlos y colocarlos en papel absorbente para retirar el exceso de humedad. Después se desinfectaron para realizar la maceración con una varilla de vidrio estéril y sembrarlos en las cajas Petri con medio de cultivo para crecimiento bacteriano e identificar fenotípicamente las bacterias.

Después de secar el exceso de agua de los nódulos, se procedió a preparar solución de NaCl al 7% para obtener 800 mL que luego se repartió en seis beakers (vaso de precipitado, 1 por muestra) como se aprecia en la Figura 8, y con la ayuda de una pinza desinfectada se depositaron los nódulos en la solución, dejándolos reposar por 24 horas.

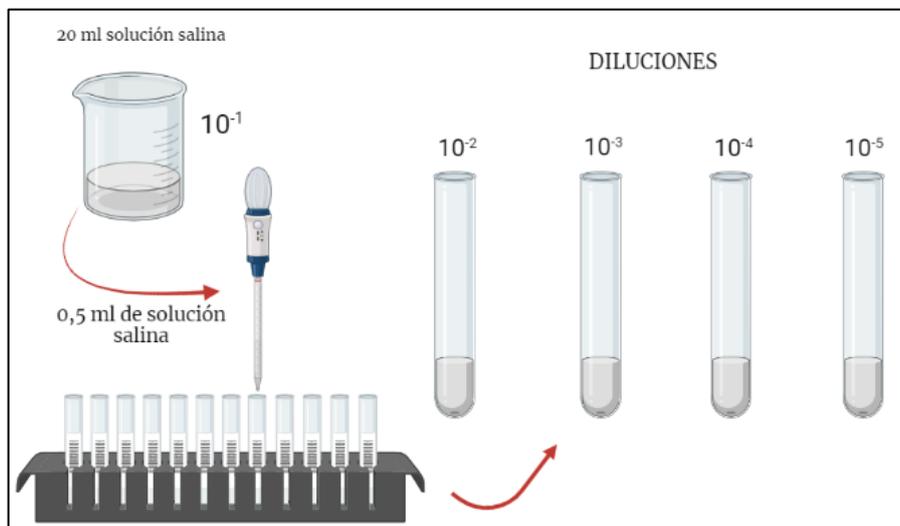


**Figura 8.** Procesamiento de los nódulos para el recuento de bacterias en la rizosfera.

Finalmente se retiraron los nódulos de la solución salina colocándolos en beakers con 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril, cubriéndolos con una tapa de papel aluminio.

### 2.6.3 Presencia de bacterias en la rizosfera

En este procedimiento se utilizaron 24 tubos de ensayos esterilizados (cuatro por muestra), se vertieron 4.5 mL de la solución salina y con una pipeta se añadió 0.5 mL de la solución preparada anteriormente para cuantificar las bacterias presentes en la rizosfera (procesamiento externo de los nódulos), este proceso permitió realizar diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  unidad donde la primera fue la dilución principal. Cada dilución tuvo tres repeticiones por muestra, como se observa en la Figura 9.



**Figura 9.** Diluciones sucesivas de las muestras procesadas en el laboratorio.

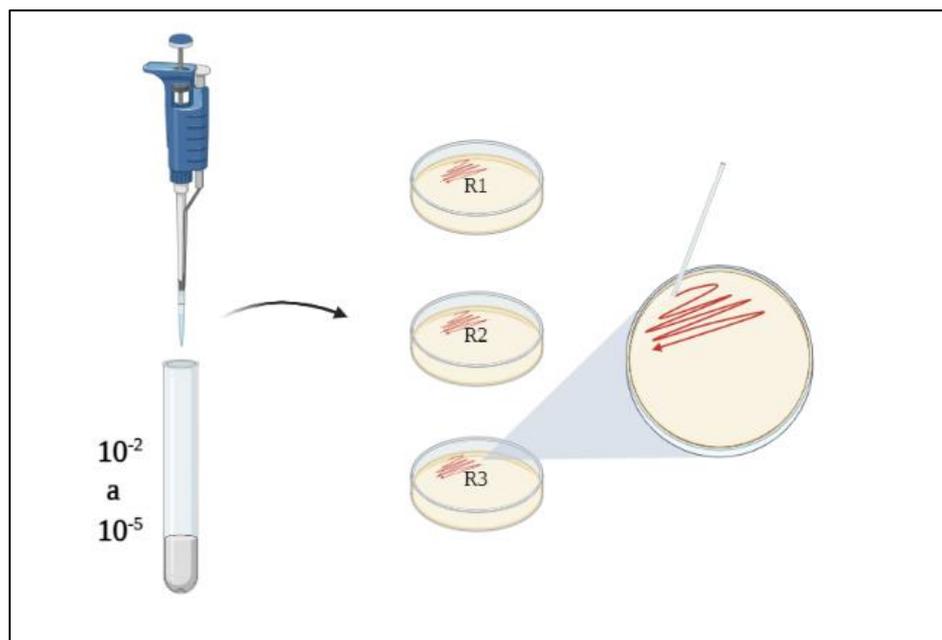
### 2.6.3.1 Preparación del medio de cultivo LMA

Para el aislamiento bacteriano, se preparó el medio de cultivo LMA acorde al Manual de Microbiología Agrícola (Zuñiga, 2012).

Se realizó una solución empleando H<sub>2</sub>O destilada, donde se añadieron 5 g de manitol, 0.25 g de extracto de levadura, 0.25 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.10 g de NaCl y 7.5 g de Agar con el pH 7 u (neutro). Se utilizó un plato calefactor para homogenizar el medio y esterilizarlo en la autoclave por 2 horas a 121 °C y 1 ATM. Luego del tiempo estipulado, se vertieron aproximadamente 12 mL del medio en las cajas Petri (tres repeticiones por muestra), luego fueron codificadas y solidificadas a temperatura ambiente.

### 2.6.3.2 Siembra en el medio LMA

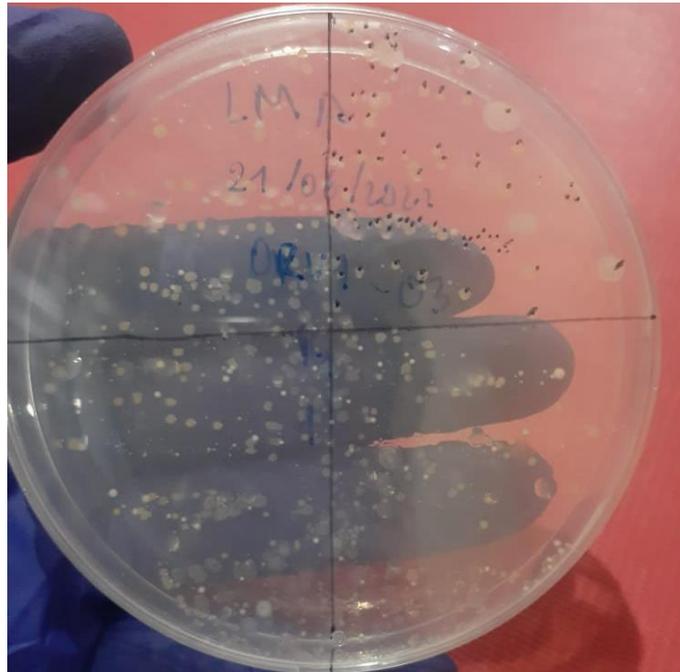
Con una micropipeta de 100 µL se extrajeron 1.5 µL de solución, se dispersó en la caja Petri en el medio sólido mediante estrías con una varilla de agitación estéril, graficado en la Figura 10. Luego las cajas Petri fueron selladas y rotuladas con cinta y llevadas a la incubadora, manteniendo una temperatura de 28 °C por tres días para observar el crecimiento poblacional de las unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC).



**Figura 10.** Sembrado de las disoluciones seriadas en medio LMA.

### **2.6.3.3 Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos**

La caracterización fenotípica de los aislados se la realizó dividiendo las cajas Petri (sembrada e incubada) en cuatro cuadrantes iguales, que permitió elegir la sección con mejor uniformidad en el crecimiento de las colonias y cuantificar las UFC como se aprecia en la Figura 11. Luego se realizó el conteo de los rizobios en cada placa observando su apariencia y color, formación de mucosidad, luego se multiplicó por 4 para obtener el número total de UFC/g de cada caja Petri.



**Figura 11.** Conteo de las colonias con características mucosas.

### **2.6.4 Presencia de bacterias simbióticas en el nódulo**

#### **2.6.4.1 Protocolos de desinfección de los nódulos**

Para identificar los rizobios en el interior de los nódulos se desinfectaron acorde al protocolo de desinfección descrito por Zuñiga (2012) para aislar rizobios presentes en la rizosfera y obtener específicamente la familia Rhizobiaceae.

Los nódulos se sumergieron en alcohol al 70% por 1 minuto y 3% en solución de NaClO por 3 minutos, empleando beakers de 250 mL esterilizados y rotulados con 20 mL de cada solución cubriéndolos con papel aluminio durante el tiempo mencionado. Con una pinza

estéril se sacaron los nódulos para luego ser enjuagados ocho veces cada 5 minutos con agua destilada estéril.

#### ***2.6.4.2 Maceración de los nódulos***

Posterior a la desinfección de los nódulos, se realizó el proceso de maceración con una pinza estéril, los nódulos de cada muestra fueron transferidos a morteros, con una varilla de agitación se añadió una gota de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se maceraron por separado teniendo 3 repeticiones por nódulos, por consiguiente, se sembraron en las cajas Petri utilizando la técnica de estriado. Finalmente se sellaron y rotularon las cajas Petri llevándolas a incubar a una temperatura de 28 °C durante 5 a 7 días para el crecimiento de las colonias.

#### ***2.6.5 Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias con Tinción de Gram***

Al sexto día de incubación se observó el crecimiento de las bacterias en las cajas Petri. Se caracterizaron las colonias encontradas de acuerdo con la metodología de Zuñiga (2012) acorde a la forma circular, irregular o puntiforme; apariencia mucosa con color blanquecino, opaco, transparente o semitransparente. Luego con un asa de platino se tomó la muestra de las colonias con estas características y se las sometió a la tinción de Gram, para luego observarlas en el microscopio con objetivos 40x y 100x este último con aceite de inmersión.

### **2.7 Análisis de los resultados**

Para la investigación planteada se consideró a cada caja Petri como una unidad experimental con tres repeticiones. Se aplicó el software Microsoft Excel para analizar medias, construir tablas y gráficos que reportan la presencia de bacterias tipo rizobios en la rizosfera y el número de bacterias simbióticas aisladas del interior de los nódulos.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Aislamiento de nódulos en *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan*

Los nódulos se aislaron de las dos especies de leguminosas para determinar bacterias tipo rizobios presentes en la rizosfera de cada planta. Fueron procesados en el laboratorio 6 nódulos en *Clitoria* sp. y 33 nódulos en *Cajanus cajan*, un total de 39 nódulos de 3 plantas en los dos sitios muestreados. Se evaluó el número, peso fresco, diámetro y senescencia de cada nódulo (Tabla 4). En el peso fresco se obtuvieron promedios de 0.019 g en *Cajanus cajan* y 0.048 g en *Clitoria* sp., en el diámetro se obtuvieron promedios de 1.60 mm y 1.79 mm en *Cajanus cajan* y *Clitoria* sp., respectivamente. Todas las plantas noduladas y muestreadas presentaron etapa final de floración. Sin embargo, la investigación de Hernández (1988), Mayz (2007) y Córdova et al. (2013) demuestran que el aumento de la nodulación y actividad de fijación del nitrógeno se da al iniciar la etapa de floración.

**Tabla 3.** Variable número, peso fresco, tamaño y senescencia evaluadas en nódulos de *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan*.

Muestra	Código	Número de nódulos	Peso (g)	Diámetro (mm)	Senescencia nodular
1	ORV1-01	9	0.050	1.90	Si
2	ORV1-02	4	0.006	1.64	No
3	ORV1-03	8	0.012	1.34	Si
4	ORV2-01	10	0.026	1.56	Si
5	ORV2-02	2	0.003	1.58	Si
6	ZMO1	6	0.048	1.79	No

En este contexto, los aislados en su mayoría presentaron senescencia nodular (SN) que quizás influya en la FBN en las leguminosas de las dos zonas muestreadas. Como mencionan Fernández and Espinosa (2008), que después de fijar el nitrógeno atmosférico por un tiempo límite el nódulo llega a una lisis provocando su muerte.

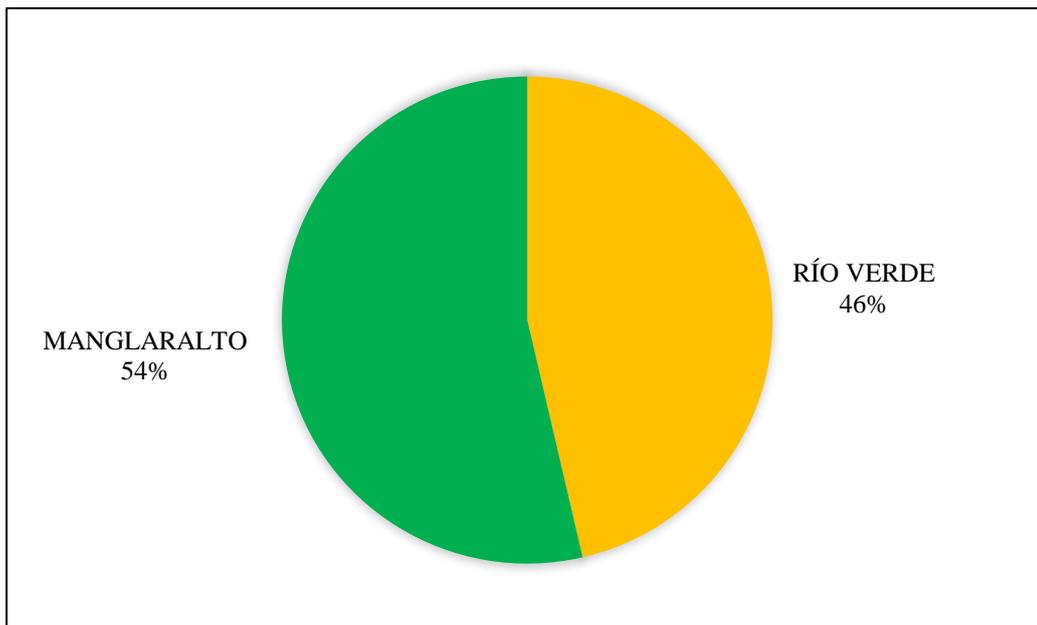
Los nódulos aislados presentaron cambios morfológicos y probablemente cambios bioquímicos y fisiológicos, reduciendo la actividad de la nitrogenasa en el período final de la floración o en la etapa de llenado de las vainas. (Andreeva *et al.*, 1998; Fernández and Espinosa, 2008). Sin embargo, otros autores mencionan que la senescencia de los nódulos es independiente de la etapa fenológica (floración o fructificación) de la planta huésped, y

que las condiciones ambientales intervienen en la activación de este proceso (Fernández *et al.*, 2008; Marcos, 2017).

### 3.2 Presencia de bacterias en la rizosfera de *Clitoria sp.* y *Cajanus cajan*

La presencia de rizobios en la parte externa de los nódulos se evaluó los dos sitios muestreados. Donde el 54% de los conteos bacterianos fueron encontrados en el Centro de Apoyo Manglaralto, mientras que el 46% en el Centro de prácticas Río Verde (Figura 12). La presencia bacteriana en el exterior nodular de *Clitoria sp.* se encontró en el Centro de Apoyo Manglaralto con mayor peso y tamaño (Tabla 3), mientras que en el centro de prácticas Río Verde los nódulos de *Cajanus cajan*, presentaron valores inferiores; en esta última es probable que la nodulación se vió afectada por las condiciones edafoclimáticas del sitio, como menciona Láñez (2005) y Olivas (2012) que, el crecimiento microbiano en la rizosfera está influenciado por factores abióticos como la humedad, temperatura, calor y radiación.

De igual forma, puede ser que los antecedentes con baja materia orgánica realizada en la fertilización en el suelo, influencia los niveles de formación de los nódulos, como demuestra Mayz (2007) evaluando la biomasa de los nódulos con diferentes concentraciones de N y P en esta leguminosa.

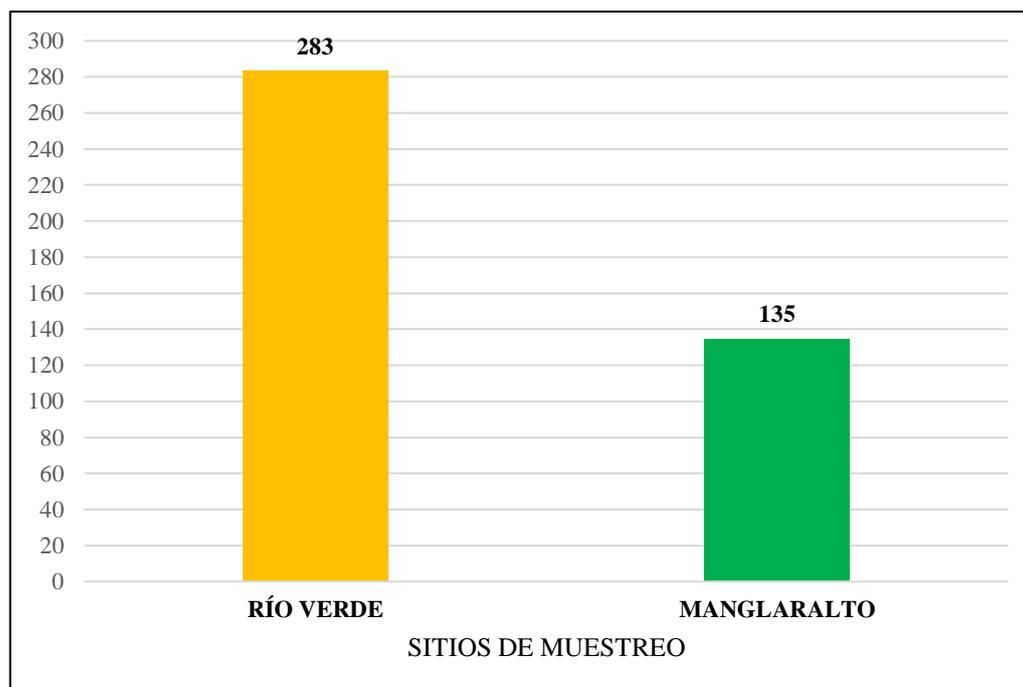


**Figura 12.** Presencia de rizobios aislados de la rizosfera (exterior nodular) de *Clitoria sp.* y *Cajanus cajan* de los dos sitios evaluados.

### 3.3 Presencia de bacterias en el interior de los nódulos

Para evidenciar la presencia de bacterias rizobianas en el interior de los nódulos se realizó la desinfección, maceración y sembrado de los nódulos en cajas Petri con medio LMA, caracterizando las colonias de forma macroscópica. La mayor cantidad de bacterias rizobianas al interior del nódulo se encontró en el Centro de Apoyo Río Verde, con un promedio de 283 UFC/nódulos procesados, mientras que en el Centro de Apoyo Manglaralto se obtuvo un promedio de 135 UFC/nódulos procesados (Figura 13).

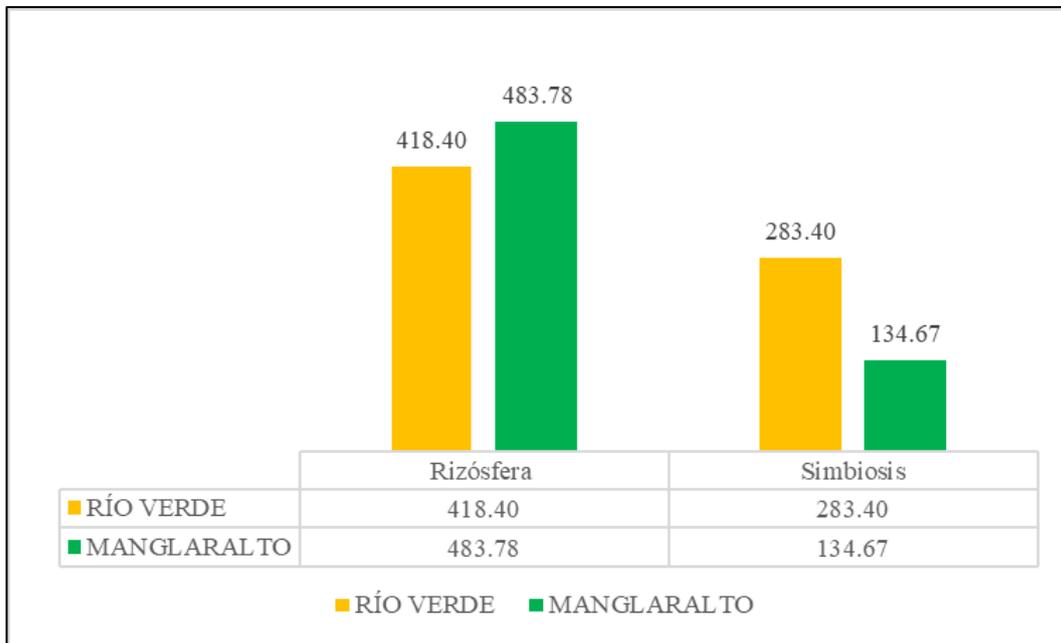
Como se muestra en la Figura 13, en los nódulos de *Clitoria* sp. se obtuvo mayor presencia de bacterias en la rizosfera (exterior del nódulo); por el contrario, al interior de los nódulos se encontró menor UFC comparado con *C. cajan*, quizás debido a la diversidad de rizobios en los suelos muestreados (Yanes and Ramón, 2005); o también por la selectividad de simbiontes escogidos por cada especie vegetal (López *et al.*, 2018). Con respecto a esto, la leguminosa *Clitoria* sp. se considera una leguminosa promiscua por su relación con diferentes rizobios (Beukes *et al.*, 2019), siendo los rizobios del género *Bradyrhizobium* más abundantes, seguido en menor densidad del género *Rhizobium* (Menna *et al.*, 2006).



**Figura 13.** Promedio de UFC en el interior de los nódulos de *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* aislados de los dos sitios en muestreo.

En la Figura 14 se compara la presencia de rizobios en la rizosfera y en el interior de los nódulos de las dos zonas agropecuarias muestreadas, acorde a Guamán *et al.* (2016). En la rizosfera, Manglaralto presentó mayor número promedio de bacterias, con 483.78 UFC; mientras que, el promedio en Río Verde fue 418.40 UFC. La diferencia quizás se deba a la diversidad de bacterias endofíticas colonizadoras oportunistas de nódulos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter* y *Leifsonia* (Aeron *et al.*, 2014; Coelho *et al.*, 2018).

Por el contrario, el mayor promedio del conteo de bacterias aisladas del interior de los nódulos, consideradas como rizobacterias simbióticas, se obtuvieron en las leguminosas de Río Verde con 283.40 UFC, mientras que Manglaralto obtuvo 134.67 UFC, acorde a Araujo *et al.* (2020), referente a la mejor especificidad rizobium-*C. cajan*.



**Figura 14.** Promedios comparados de bacterias presentes en la rizosfera e interior de los nódulos aislados de los dos sitios en muestreo.

Además, la misma figura muestra que el promedio de bacterias en la rizosfera (418.40 UFC), el 67.7% podrían haber colonizado el interior de los nódulos con respecto a las encontradas en el exterior en las leguminosas de Río Verde; mientras que, las de mayor promedio de bacterias encontradas en el exterior de los nódulos (483.78 UFC) fue en Manglaralto, mostrando que solo el 27.7% de los rizobios podrían ser las que la leguminosa *Clitoria sp.* permitió el paso al interior de los nódulos y ser las consideradas

como rizobacterias simbióticas. Esto indicaría que las leguminosas a través de receptores específicos que reconocen bacterias benéficas y patógenos regulan y contralan el ingreso de rizobacterias al interior del nódulo (Alias, 2016; Isidra-Arellano and Valdés-López, 2022), y a su vez la capacidad infectiva de cada bacteriana en las raíces de las plantas (Díez, 2019).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Esta investigación que identificó rizobios presentes en la rizosfera e interior de los nódulos de las leguminosas *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan* en Río Verde y Manglaralto, concluye que:

- Se logró aislar nódulos de forma aleatoria de las raíces de las leguminosas *Clitoria* sp. y *Cajanus cajan*, en los que la mayoría de los nódulos presentaron senescencia, sin embargo, se identificó morfológicamente rizobios simbióticos en su interior. Esto probablemente indica que aún existiría fijación de nitrógeno y que bacterias endofíticas intervienen en este proceso.
- Se contabilizaron las colonias blanquecinas, transparentes y semitransparentes, circulares e irregulares, características de los rizobios; así como por su tinción de Gram (-) en la mayoría de las aisladas. Se evidenció que la presencia de la relación bacteria-planta como asociación mutualista en los suelos de las dos zonas productivas contribuyen a la FBN, donde Manglaralto obtuvo el mayor conteo bacteriano a nivel de rizosfera y Río Verde mayor interacción rizobio-leguminosa que permite simbiosis efectiva.

### Recomendaciones

- Realizar estudios más profundos sobre la diversidad de simbiontes nativos de los dos géneros de leguminosas en las zonas productivas de la provincia de Santa Elena.
- Realizar pruebas sobre el potencial de FBN de los rizobios presentes en las dos leguminosas de varios sitios de estudio.
- Profundizar el estudio sobre las causas de la senescencia nodular y factores limitantes que inhiben la formación de nódulos en las leguminosas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M., Morsy, M., Elsadek, A. and Ohyama, T. (2012) 'Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67, pp. 48–55.
- Aeron, A., Chauhan, P., Dubey, R., Maheshwari, D. and Bajpai, V. (2014) 'Root nodule bacteria from *Clitoria ternatea* L. are putative invasive nonrhizobial endophytes', *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), pp. 131–142.
- Alias Villegas, C. (2016) *Caracterización de rizobios aislados de leguminosas del suroeste de Andalucía e implicación del gen NOLG en la simbiosis de ensifer meliloti ort12 - medicago sativa*. Doctorado. Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
- Andreeva, N., Kozharinova, G. and Izmailov, S. (1998) 'Senescence of legume nodules', *Russ. J. Plant Physiol.*, 45, pp. 101–112.
- Araujo, J., Díaz, C., Velázquez, E., Urbano, B. and González, F. (2015) 'Bradyrhizobium yuanmingense related strains form nitrogen-fixing symbiosis with *Cajanus cajan* L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization', *Scientia Horticulturae*, 192, pp. 421–428.
- Araujo, J., Díaz, C., Velázquez, E., Urbano, B. and González, F. (2020) 'Inoculation with native Bradyrhizobium strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.)', *European Journal of Agronomy*, 113, p. 125985.
- Benintende, S. and Sánchez, C. (2009) *Crecimiento Bacteriano*. Argentina: Universidad Nacional De Entre Ríos (UNER).
- Benites, J. (2016) 'Leguminosas y plantas silvestres en la alimentación y la agricultura', *Revista de Agroecología*, 32(2), pp. 5–7.
- Beukes, C., Boshoff, F., Phalane, F., Hassen, A., le Roux, M., Stępkowski, T., Venter, S. and Steenkamp, E. (2019) 'Both Alpha- and Beta-Rhizobia Occupy the Root Nodules of *Vachellia karroo* in South Africa', *Frontiers in Microbiology*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01195>.
- Bianco, L. (2020) 'Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica en Fabáceas', *Idesia (Arica)*, 38, pp. 21–29.
- Bonnet, M., Lagier, J., Raoult, D. and Khelaifia, S. (2020) 'Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology', *New Microbes and New Infections*, 34, p. 100622.
- Calvo, S. (2011) 'Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno', *Dialnet*, pp. 173–186.

- Carballo Obando, E. A. and Flores Medina, D. S. (2022) *Fijación biológica de nitrógeno en tres variedades mejoradas de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) por el método de dilución isotópica de  $^{15}N$  en condiciones de invernadero*. Pregrado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria.
- Carpio Espinosa, M. J. (2014) *Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de rizobios asociados a cultivos de arveja (Pisum sativum L.), chocho (Lupinus mutabilis S.), fréjol (Phaseolus vulgaris L.), haba (Vicia faba L.) y vicia (Vicia sp.) en suelos de la provincia de Imbabura y obtención de un banco de cepas*. Pregrado. Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Castillo, C., Narváez, W. and Hahn von Hessberg, C. (2016) ‘Agromorfología y usos del Cajanus cajan L. Millsp. (Fabaceae)’, Boletín Científico Centro De Museos Historia Natural, 20, pp. 52–62.
- Caycedo, L., Ramírez, L. and Suárez, D. (2021) ‘Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química’, Nova, 19(36), pp. 49–94.
- Coelho, K., Ribeiro, P., Moura, E., Aguiar, A., Rodrigues, T. and Rodrigues, T. (2018) ‘Symbiosis of rhizobia with Gliricidia sepium and Clitoria fairchildiana in an Oxisol in the pre-Amazon region of Maranhão State’, Acta Scientiarum Agronomy, 40(1), p.e35248.
- Córdova Muñiz, R. R. (2017) *Estudio del frijol gandul (cajanus cajan) como fuente de proteína en la alimentación de la codorniz (Coturnix, coturnix)*. Pregrado. Facultad De Ciencias Naturales Y Agricultura, Universidad Estatal Del Sur De Manabí.
- Córdova, S., Cárdenas, R., Peña, J., Salgado, S., Castelán, M., Lobbit, C. and Vera, J. (2013) ‘Fijación biológica de nitrógeno por cuatro fabáceas en suelos ácidos de Tabasco, México’, Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, 45(1), pp. 1–9.
- Cortés Lozano, A. X. (2011) *Selección de cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas asociadas a la leguminosa Clitoria ternatea en el César y la Guajira*. Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.
- Crespo Arízaga, L. D. and Julio Julio, A. P. (2012) *Identificación y caracterización de rhizobium nativo para la producción de biofertilizante en la provincia de Santa Elena*. Pregrado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península De Santa Elena.
- Díez Méndez, A. D. (2019) *Análisis genómico y funcional de Rhizobium cellulosilyticum ALA10B2T como bioinoculante agrícola y estudio de la regulación del operón celABC en la biosíntesis de celulosa bacteriana*. Doctorado. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

- Drouin, P. and Ferrero, F. (2020) 'Testing selectivity of bacterial and fungal culture media compared to original silage samples using next generation sequencing', *Journal of Microbiological Methods*, 179, p. 106088.
- Fernández, F., Espinosa, D., Munive, A., Corlay, L. and Serrano, L. (2008) 'Nodule senescence and biomass components in common bean cultivars', *Revista Fitotecnia Mexica*, 31(3), pp. 195–201.
- Fernández, F. and Espinosa, D. (2008) 'Bioquímica, fisiología y morfología de la senescencia nodular: una revisión crítica', *Terra Latinoamericana*, 26(2), pp. 133–144.
- Garabato, F. (2018) *Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas*. Pregrado. Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Universidad De La Republica Uruguay (UDELR).
- Gómez, G. and Batista, C. (2006) 'Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola', *Cultivos Tropicales*, 27(3), pp. 17–24.
- Gonzales Medina, E. Y. (2013) *Estudio de la diversidad de cepas de Rhizobium provenientes de nódulos de tres variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Pregrado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).
- González, R., Elizalde, B., Cortés, M. and Orduña, M. (2020) *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico*. México: UNAM, FES Zaragoza.
- Granados, R. and Villaverde, C. (2003) *Microbiología. Tomo 1* Primera Edición. Ediciones Paraninfo, S.A.
- Guamán, F., Torres, R., Granda, K. and Nápoles, M. (2016) 'Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. en el sur de Ecuador', *INCA*, 37, pp. 40–47.
- Gutiérrez, V. (2021) *Reproducción y Crecimiento Bacteriano*. Argentina: Universidad Nacional de La Matanza (UNLaM).
- Hernández Gadea, D. P. (1988) *Evaluación de cinco cepas de Bradyrhizobium japonicum en el rendimiento del cultivo de soya Glicine max L. vr. cristalina ei ac – 8*. Diplomado. Escuela de Producción Vegetal. Departamento de cultivos anuales, Instituto Superior De Ciencias Agropecuarias.
- Hernández, J., Cubillos, J. and Milian, P. (2012) 'Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe', *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2), pp. 51–62.
- Hormazábal Hormazábal, M. (2013) *Evaluación de la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno de cepas silvestres de rizobios en simbiosis con tres variedades de frejol (Phaseolus vulgaris L.)*. Pregrado. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad De Chile.

- Huwasquiche, L., Moreno, P. and Dávalos, J. (2020) ‘Caracterización y evaluación del potencial pgpr de la microflora asociada al cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)’, *Ecología Aplicada*, 19(2), pp. 65–76.
- Chapman Intriago, J. L. (2021) *Composición microbiológica de Clitoria ternatea en diferentes estados de madurez*. Pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Agraria Del Ecuador.
- Isidra-Arellano, M. and Valdés-López, O. (2022) ‘¿Cómo controlan las leguminosas el número de nódulos para evitar comprometer su crecimiento y desarrollo?’, *Revista de Educación Bioquímica*, 41(2), pp. 51–65.
- Izaguirre-Mayoral, M., Lazarovits, G. and Baral, B. (2018) ‘Ureide metabolism in plant-associated bacteria: purine plant-bacteria interactive scenarios under nitrogen deficiency’, *Plant and Soil*, 428(1), pp. 1–34.
- Jiménez, J. (2022) *Potencial de fijación de nitrógeno de aislados de Rhizobium spp. endémicos del Ecuador en tres variedades de fréjol arbustivo*. Pregrado. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador.
- Láñez, E. (2005) *Microbiología general*. Instituto de Biotecnología, Universidad De Granada.
- León, M. (2013) ‘La simbiosis rizobio-leguminosa. Árboles fijadores de nitrógeno y su importancia en los ecosistemas’, in XIX Jornadas Forestales de Gran Canaria, pp. 2–10.
- León, R., Bonifaz, N. and Gutiérrez, F. (2018) *Pastos y forrajes del Ecuador: siembra y producción de pasturas*, Ecuador: Editorial Universitaria Abya-Yala.
- Londoño, A. (2018) *Manual para La Siembra de Clitoria ternatea como banco de proteína*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia (UNAL).
- López, H., Martínez, J., Balseca, D., Gusqui, L. and Cienfuegos, E. (2018) ‘Initial growth of two varieties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) in the tropics of Ecuador’, *Abanico veterinario*, 8(2), pp. 33–46.
- Lozano Ayala, N. I. and Rivera Contreras, J. J. (2022) *Efecto de la aplicación de abonos orgánicos foliares y edáficos en el crecimiento vegetativo y valor nutricional de la clitoria (clitoria ternatea) en el subtrópico de Cotopaxi*. Pregrado. Facultad De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales, Universidad Técnica De Cotopaxi.
- Luna Murillo, R. A. (2014) *Rizosfera de las asociaciones de gramíneas y leguminosas de interés ganadero. finca “La María” UTEQ, Los Ríos*. Maestría. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. and Stahl, D. (2015) *Biología de los microorganismos*, Madrid: Person Educación, SA.
- Marcos García, M. (2017) *Estudio de la biodiversidad bacteriana asociada a nódulos de lotus corniculatus y análisis de los procesos de infección, nodulación y producción vegetal*

- inducidos por cepas del género mesorhizobium*. Posgrado. Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.
- Mayz, J. (2007) ‘Cajanus Cajan L.: Fijación biológica de nitrógeno (FBN) en un suelo de sabana’, *Revista De La Facultad De Agronomía (LUZ)*, 24(1), pp. 312–317.
- Medel, C., Joaquín, B., Sánchez, M., Parra, M., Cancino, J., Gómez, A. and Hernández, A. (2012) ‘Evaluación de la distancia entre plantas sobre el rendimiento y calidad de semilla de *Clitoria ternatea* L. cv. tehuana’, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(3), pp. 489–497.
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F., Bangel, E., Hess, P. and Martínez, E. (2006) ‘Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants’, *Systematic and Applied Microbiology*, 29(4), pp. 315–332.
- Milano, C. (2018) *Leguminosas herbáceas nativas: una alternativa para la restauración de pastizales y suelos degradados en el sudoeste bonaerense*. Maestría. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional Del Sur.
- Oldroyd, G. (2013) ‘Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants’, *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), pp. 252–263.
- Olivas, E. (2012) *Manual de prácticas laboratorio de microbiología*. México: Universidad Autónoma De Ciudad Juárez (UACJ).
- Osorio Menéndez, D. D (2019) *Establecimiento de la simbiosis rhizobiummicorrizas en fréjol de palo (cajanus cajan) bajo condiciones controladas*. Pregrado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad De Guayaquil.
- Paredes, M. C. (2013) *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*. Pregrado. Facultad de Ciencia Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina.
- Pastorino, G. N. (2016) *Diversidad de los rizobios que nodulan la soja en los suelos de la Pampa húmeda e identificación de cepas para la fabricación de inoculantes comerciales*. Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- Reyes Castillo, A. (2019) *Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) y su aporte en la nutrición mineral de tomate (Lycopersicon sculentum L.)*. Doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Universidad de Concepción.
- Rodríguez, C. and Zhurbenko, R. (2018) *Manual de medios de cultivo*. Cuba: Centro Nacional de Biopreparados.
- Saldaña, J. (2017) ‘Aislamiento e Identificación de Cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de Suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León.’, *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 4(7).

- Sánchez Guale, M. C. (2022) *Presencia de rizobios en Leucaena leucocephala localizada en tres sitios de la península de Santa Elena*. Pregrado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península De Santa Elena.
- Sarpong, C., Zhang, X., Wang, Q., Wang, W., Jamali, Z., Yong, T., Chang, X., Yang, W., Wang, Y. and Song, C. (2020) 'Improvement of plant microbiome using inoculants for agricultural production: a sustainable approach for reducing fertilizer application', *Canadian Journal of Soil Science*, 101(1), pp. 1–11.
- Shener, C. (2021) *Inoculación con rhizobium phaseoli en tres genotipos de Phaseolus vulgaris L. bajo dos densidades de población*. Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Smith, A., Snapp, S., Dimes, J., Gwenambira, C. and Chikowo, R. (2016) 'Doubled-up legume rotations improve soil fertility and maintain productivity under variable conditions in maize-based cropping systems in Malawi', *Agricultural Systems*, 145, pp. 139–149.
- Soto, J. (2018) 'Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador', *Ciencia ergon-sum*, 25(1).
- Soto, J., Ormeño, E. and Zúñiga, D. (2021) 'Diversidad de rizobios y fijación biológica de nitrógeno en aislados de Clitoria brachystegia, en remanentes de bosque seco tropical de Ecuador y Perú', *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92, pp. 1–11.
- Tong, W., Li, X., Huo, Y., Zhang, L., Cao, Y., Wang, E., Chen, W., Tao, S. and Wei, G. (2018) 'Genomic insight into the taxonomy of Rhizobium genospecies that nodulate Phaseolus vulgaris', *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), pp. 300–310.
- Urzúa, H. (2007) 'Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile', *Ciencia e investigaciones agrarias: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 32(2), pp. 133–150.
- Valier, M. M (2020) *Actividad simbiótica microbiana con Clitoria sp. y Clitoria ternatea en la fitorremediación de suelos con petróleo fresco*. Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Colegio de Postgraduados.
- Wang, T., Martínez, J. and López, I. (2012) *Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas*. México: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.
- Yanes, M. and Ramón, T. (2005) *Memorias de la semana de divulgación y video científico UJAT*. Villahermosa, Tabasco, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Zuñiga, D. (2012) *Manual de microbiología agrícola Rhizobium, PGPRS, indicadores de fertilidad e inocuidad*. Primera edición. Q & P Impresores S.R.L.

## ANEXOS

**Tabla 1A.** Promedio de bacterias presentes en la rizosfera de las dos zonas muestreadas.

Muestra	Código	Diluciones	Repeticiones	Conteo	Total de Colonias	Promedio		
1	ORV1-01	10 <sup>-2</sup>	R <sub>1</sub>	59	236	308.0		
			R <sub>2</sub>	290	1160			
			R <sub>3</sub>	95	380			
		10 <sup>-3</sup>	R <sub>1</sub>	93	372	292.0		
			R <sub>2</sub>	66	264			
			R <sub>3</sub>	60	240			
		10 <sup>-4</sup>	R <sub>1</sub>	97	388	437.3		
			R <sub>2</sub>	93	372			
			R <sub>3</sub>	138	552			
		10 <sup>-5</sup>	R <sub>1</sub>	63	252	570.0		
			R <sub>2</sub>	117	468			
			R <sub>3</sub>	168	672			
		2	ORV1-02	10 <sup>-2</sup>	R <sub>1</sub>	-	-	294.0
					R <sub>2</sub>	94	376	
					R <sub>3</sub>	53	212	
10 <sup>-3</sup>	R <sub>1</sub>			69	276	206.0		
	R <sub>2</sub>			165	660			
	R <sub>3</sub>			34	136			
10 <sup>-4</sup>	R <sub>1</sub>			63	252	252.0		
	R <sub>2</sub>			163	652			
	R <sub>3</sub>			-	-			
10 <sup>-5</sup>	R <sub>1</sub>			39	156	266.0		
	R <sub>2</sub>			181	724			
	R <sub>3</sub>			94	376			
3	ORV1-03			10 <sup>-2</sup>	R <sub>1</sub>	74	296	296.0
					R <sub>2</sub>	-	-	
					R <sub>3</sub>	138	552	
		10 <sup>-3</sup>	R <sub>1</sub>	54	216	436.0		
			R <sub>2</sub>	108	432			
			R <sub>3</sub>	110	440			
		10 <sup>-4</sup>	R <sub>1</sub>	151	604	580.0		
			R <sub>2</sub>	139	556			
			R <sub>3</sub>	94	376			
		10 <sup>-5</sup>	R <sub>1</sub>	117	468	454.7		
			R <sub>2</sub>	116	464			
			R <sub>3</sub>	108	432			

**Tabla 1A.** Continúa

<b>Muestra</b>	<b>Código</b>	<b>Diluciones</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Conteo</b>	<b>Total de Colonias</b>	<b>Promedio</b>
4	ORV2-01	10 <sup>-2</sup>	R <sub>1</sub>	64	256	204.0
			R <sub>2</sub>	38	152	
			R <sub>3</sub>	-	-	
		10 <sup>-3</sup>	R <sub>1</sub>	63	252	257.3
			R <sub>2</sub>	51	204	
			R <sub>3</sub>	79	316	
		10 <sup>-4</sup>	R <sub>1</sub>	-	-	1616.0
			R <sub>2</sub>	452	1808	
			R <sub>3</sub>	356	1424	
		10 <sup>-5</sup>	R <sub>1</sub>	87	348	322.7
			R <sub>2</sub>	77	308	
			R <sub>3</sub>	78	312	
5	ORV2-02	10 <sup>-2</sup>	R <sub>1</sub>	66	264	244.0
			R <sub>2</sub>	50	200	
			R <sub>3</sub>	67	268	
		10 <sup>-3</sup>	R <sub>1</sub>	164	656	604.0
			R <sub>2</sub>	81	324	
			R <sub>3</sub>	138	552	
		10 <sup>-4</sup>	R <sub>1</sub>	47	188	416.0
			R <sub>2</sub>	95	380	
			R <sub>3</sub>	113	452	
		10 <sup>-5</sup>	R <sub>1</sub>	68	272	312.0
			R <sub>2</sub>	92	368	
			R <sub>3</sub>	74	296	
6	ZM01	10 <sup>-2</sup>	R <sub>1</sub>	72	288	414.0
			R <sub>2</sub>	102	408	
			R <sub>3</sub>	105	420	
		10 <sup>-3</sup>	R <sub>1</sub>	-	-	-
			R <sub>2</sub>	-	-	
			R <sub>3</sub>	-	-	
		10 <sup>-4</sup>	R <sub>1</sub>	105	420	433.3
			R <sub>2</sub>	96	384	
			R <sub>3</sub>	124	496	
		10 <sup>-5</sup>	R <sub>1</sub>	138	552	604.0
			R <sub>2</sub>	164	656	
			R <sub>3</sub>	102	408	

**Tabla 2A.** Promedio de bacterias encontradas en el interior de los nódulos de los dos géneros de leguminosas.

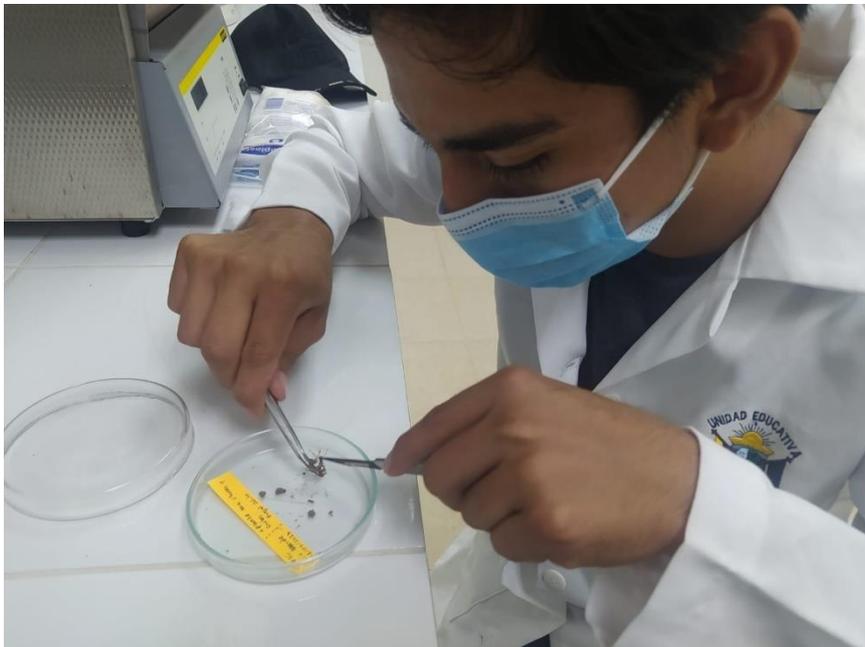
<b>Sitio</b>	<b>Código</b>	<b>N° nódulos</b>	<b>PP redondeados</b>	<b>Promedio general</b>
<b>RÍO VERDE</b>	ORV1-01	1	502	283
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
		8		
		9		
	ORV1-02	1	497	
		2		
		3		
		4		
	ORV1-03	1	127	
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
		8		
	ORV2-01	1	115	
		2		
		3		
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
ORV2-02	1	176		
	2			
<b>MAGLARALTO</b>	ZM01	1	135	
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		

**Tabla 3A.** Promedio de bacterias encontradas en exterior e interior de los nódulos.

<b>Sitio</b>	<b>Rizósfera</b>	<b>Simbiosis</b>
RÍO VERDE	418.40	283.40
MANGLARALTO	483.78	134.67



**Figura 1A.** Recolección de las muestras



**Figura 2A.** Separación de nódulos de las raíces para la toma de variables



*Figura 3A.* Protocolos de desinfección



*Figura 4A.* Preparación del medio de cultivo LMA



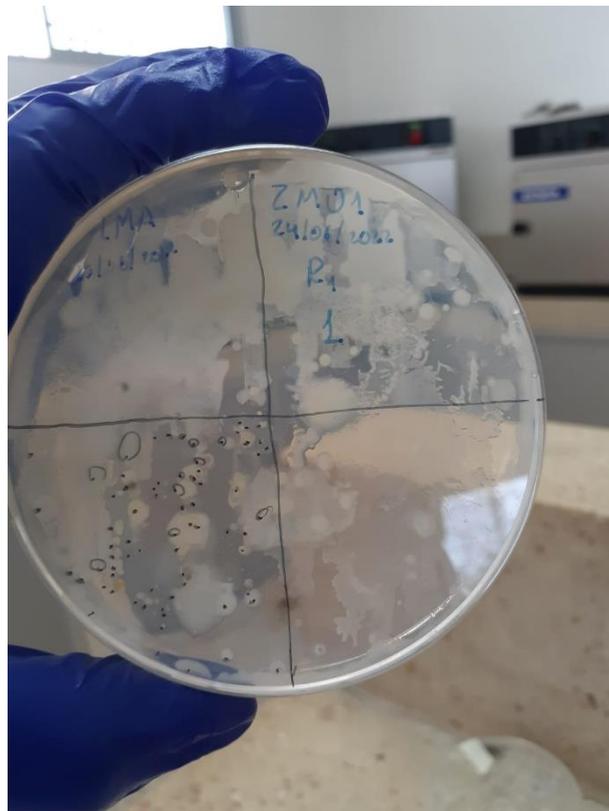
**Figura 5A.** Procesamiento para aislar bacterias presentes en el exterior de los nódulos



**Figura 6A.** Sembrado en medio LMA para la cuantificar bacterias presentes en el exterior e interior de los nódulos



**Figura 7A.** Maceración de los nódulos



**Figura 8A.** Conteo de UFC, bacterias presentes en el exterior e interior de los nódulos