



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

**PRESENCIA DE RIZOBIOS EN *Leucaena leucocephala*
LOCALIZADA EN TRES SITIOS DE LA PENÍNSULA DE
SANTA ELENA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

Autor: Melany Cristina Sánchez Guale

LA LIBERTAD, 2022



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

**PRESENCIA DE RIZOBIOS EN *Leucaena leucocephala*
LOCALIZADA EN TRES SITIOS DE LA PENÍNSULA DE
SANTA ELENA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

Autora: Melany Cristina Sánchez Guale

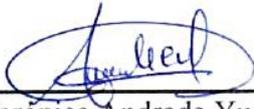
Tutor: Blgo. Javier Oswaldo Soto Valenzuela, Ph.D.

LA LIBERTAD, 2022

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Melany Cristina Sánchez Guale** como requisito parcial para la obtención del grado de Ingeniero/a Agropecuario de la Carrera de Agropecuaria.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 08/09/2022



Ing. Verónica Andrade Yucailla, Ph.D.

**DIRECTORA DE CARRERA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Ing. Lourdes Ortega Maldonado,
MSc.

**PROFESORA ESPECIALISTA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Blgo. Javier Soto Valenzuela, Ph.D.

**PROFESOR TUTOR/A
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



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



Lcda. Ana Villalta Gómez, MSc.
**ASISTENTE ADMINISTRATIVA
SECRETARIA**

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar mi tesis es inevitable pensar que sin la participación de ciertas personas esta etapa universitaria no hubiera resultado tan fácil. Etapa que me permitió conocer personas valiosas que me ayudaron a formar mi carácter para hoy poder enfrentar diferentes desafíos. En este pequeño espacio quiero agradecer a cada una de ellas por su apoyo, cariño y conocimientos brindados.

A **mi familia**, quien me ha brindado su apoyo, gracias por todas las enseñanzas que me ha entregado, pero sobre todo por su amor. Gracias mami, hermano, sobrinas, Tita, tía, primos y cuñada, los amo.

A **Carelys Constante y la familia Constante Suárez** por adoptarme y brindarme el apoyo necesario para culminar mis estudios. Tengo la fortuna de haberlos encontrados, gracias por su hospitalidad, confianza y cariño. Dios los bendiga siempre y que las risas medicinales y los buenos momentos nunca se aparten de esta hermosa familia.

A mis compañeros y amigos, por los que me siento bendecida y agradecida por sus vidas: **Omar, Carelys, Catalina, Marcelo, Tommy, Carla, Maybe, Cristina, Pamela, Bryan, Nallely, Karelis, Odalys, Kevin y Génesis**. Anhele que Dios cumpla los deseos que ha puesto en sus corazones, sean felices, lleguen lejos, sin limitarse, ni desconfiar de sus capacidades, que tengan un gran desarrollo profesional y personal queridos compañeros.

Agradezco de manera especial a mi mejor amigo **Omar Zamora**, quien estuvo trabajando junto a mí en la tesis. Estoy agradecida de que seas parte de mi vida y de haber compartido este tiempo de calidad y aprendizaje. Espero tener más momentos de aprendizaje junto a ti querido amigo.

A **Lesly González Catuto** por ser mi cómplice y apoyo en todo momento. Uno de los privilegios que tengo en esta vida es conocerte, gracias por cuidar de mí y por formar aún parte de mi vida a pesar del tiempo y las circunstancias.

Al biólogo **Javier Soto Valenzuela** por permitirme formar parte de su equipo de tesis. Gracias por su valiosa orientación, apoyo, confianza, paciencia y por haberme facilitado los medios necesarios para llevar a cabo el desarrollo de mi tesis.

A mis compañeros **Génesis Ricardo** y **Erick Limón** quienes fueron parte del equipo del PGPR para realiza la tesis, gracias por su compañerismo, por los momentos de complicidad y sobre todo de risas que compartimos.

Al biólogo **Menéndez**, por darme la disposición de realizar mi investigación en su laboratorio y por su paciencia.

A los ingenieros **Miguel Castillo, Lenni Ramírez, Araceli Solís, Mercedes Santistevan, Lourdes Ortega, Mayorga Mercedes y Ángel León** por ser docentes siempre dispuesto a enseñar y ayudar a sus estudiantes, por el apoyo, los consejos y por enseñarme a querer la carrera que elegí.

DEDICATORIA

A mi mami Jenny Guale Neira, que sin duda nada de lo que he podido lograr hasta ahora, lo hubiera hecho sin su constante apoyo y motivación. Gracias por ser madre y padre para mí durante todos estos años, eres una mujer esforzada, valiente y determinada. Gracias por amarme en medio de todas mis imperfecciones, te amo infinitamente mami.

Hermano, hemos crecido, tienes dos hermosas niñas, una relación con una gran mujer, un trabajo y metas que anhelas cumplir. Te admiro mucho porque a pesar de que no tuviste una buena infancia te convertiste en un gran hombre y padre. Muchas gracias hermano y Nicole por sus ánimos, cariño y apoyo para culminar mi carrera. Te amo hermano.

También le dedico mi proyecto a mi perrito y hermanito May, quien también estuvo en parte de mi proceso universitario, que con su presencia irradió de alegría el hogar, que gracias por quedarse junto a mi cuando me tocaba desvelarme, por molestarme mientras estaba en mis clases virtuales y por sus mordidas que hoy extraño. Siempre te vamos amar y extrañar mi May.

Dedico también esta investigación a la señora Petronila Suárez, Mayra Constante y Juan Constante, quienes me brindaron un hogar, buenos tratos y costumbres durante este tiempo. No tengo el privilegio de conocerlos desde antes, pero parte de lo que soy y seré también es gracias a ustedes y cada momento compartido ha sido de gran bendición, Dios guarde sus vidas.

RESUMEN

En este trabajo de investigación se determina la presencia y primera aproximación de la interacción rizobios-leguminosa, mediante el aislamiento de las bacterias encontradas en el microecosistema que comparten la leguminosa *Leucaena leucocephala* con sus rizobios. Se colectaron raíces de las plantas en tres sitios establecidos, estas fueron depositadas en microtubos y luego llevadas al laboratorio para su procesamiento. Se cuantificaron las bacterias encontradas en el exterior (rizosfera) de la raíz y al interior de nódulos (simbiótica), aislados en medio LMA. Lo cual, permitiría establecer la presencia de la simbiosis y probable fijación biológica de nitrógeno como prueba de la interacción microorganismo-planta en tres sitios de la península de Santa Elena.

Palabras claves: *Rhizobium*, *Leucaena leucocephala*, nódulos, PGPR.

ABSTRACT

In this research work, the presence and first approximation of the rhizobia-legume interaction is determined by isolating the bacteria found in the microecosystem shared by the legume *Leucaena leucocephala* and its rhizobia. Plant roots were collected from three established sites, deposited in microtubes and then taken to the laboratory for processing. The bacteria found on the outside (rhizosphere) of the root and inside nodules (symbiotic), isolated in LMA medium, were quantified. This would allow establishing the presence of symbiosis and probable biological nitrogen fixation as evidence of microorganism-plant interaction at three sites on the Santa Elena peninsula.

Keywords: *Rhizobium*, *Leucaena leucocephala*, nodules, PGPR.

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

El presente Trabajo de Integración Curricular titulado “**PRESENCIA DE RIZOBIOS EN *Leucaena leucocephala* LOCALIZADA EN TRES SITIOS DE LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA**” y elaborado por **Melany Cristina Sánchez Guale**, 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

INTRODUCCIÓN	1
Problema Científico:	2
Objetivos	2
Objetivo General:	2
Objetivos Específicos:	2
Hipótesis:	2
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Bacterias PGPR.....	3
1.2 Rizobios	3
1.2.1 Taxonomía de los rizobios	3
1.3 Género <i>Rhizobium</i>	4
1.4 Cultivo y aislamiento de <i>Rhizobium</i>	5
1.5 Nitrógeno	5
1.5.1 Fijación de nitrógeno en leguminosas	6
1.5.2 Promedio de nitrógeno fijado en leguminosas	6
1.6 Nódulos.....	7
1.6.1 Etapa de infección y formación de nódulos en las raíces.....	7
1.7 Simbiosis leguminosa-rizobios	8
1.8 Leguminosas	9
1.9 Generalidades del cultivo.....	9
1.9.1 Origen y adaptación del cultivo de leucaena.....	9
1.9.2 Clasificación botánica	9
1.10 Importancia del cultivo de Leucaena	10
1.11 Medios de cultivos	10
1.11.1 Medio Levadura Manitol Agar (LMA)	11
1.12 Crecimiento microbiano	11
1.12.1 Ciclo del crecimiento microbiano.....	11
1.13 Requerimientos nutricionales para el crecimiento microbiano.....	12
1.13.1 Fuentes de energía metabólica.....	12
MACRONUTRIENTES	12
MICRONUTRIENTES	13

VITAMINAS Y HORMONAS	13
ELEMENTOS TRAZA	13
1.14 Factores condicionantes del desarrollo bacteriano	13
1.15 Tipos, tamaño y forma de agrupaciones bacterianas.	14
1.16 Los colorantes diferenciales.....	15
1.16.1 Tinción de Gram.....	16
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Localización y descripción del lugar de estudio	17
2.2 Material vegetativo	19
2.3 Material de campo	19
2.3.1 Material de bioseguridad para laboratorio	19
2.4 Materiales y equipos de laboratorio.....	19
2.4.1 Insumos y reactivos.....	19
2.4.2 Instrumentos de laboratorio.....	19
2.4.3 Equipos.....	20
2.5 Recolección de las muestras	20
2.5.1 Descripción de los lugares de muestreo	20
2.5.2 Aislamiento de las cepas de Rizobios	20
2.5.2.1 Procesamiento de los nódulos.....	20
2.5.3 Presencia de bacterias en la rizosfera.....	22
2.5.3.1 Preparación del medio de cultivo LMA.....	24
2.5.3.2 Siembra en el medio LMA.....	24
2.5.3.3 Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos.....	25
2.5.3.4 Protocolos de desinfección de los nódulos	26
2.5.3.5 Maceración de los nódulos	26
2.5.4 Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias con Tinción de Gram ...	26
2.5.4.1 Aislamiento de bacterias	26
2.6 Análisis de los resultados.....	26
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3.1 Aislamiento de nódulos	27
3.2 Presencia de bacterias en la rizosfera.....	27
3.3 Presencia de bacterias en el interior de los nódulos.....	28

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
Conclusiones	30
Recomendaciones	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación antigua de <i>Rhizobium</i>	5
Tabla 2. Promedio de nitrógeno fijado en diferentes especies de leguminosa.....	7
Tabla 3. Diferencia entre Gram positivas y Gram negativas.....	16
Tabla 4. Procesamiento de muestra en el laboratorio.....	22
Tabla 5. Variables evaluadas número, tamaño y peso fresco de nódulos en 6 plantas de la leucaena (<i>Leucaena leucocephala</i>).....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la formación de nódulos en leguminosa infectada por el género <i>Rhizobium</i>	8
Figura 2. Requerimientos nutricionales para el crecimiento de microorganismos.....	10
Figura 3. Ubicación del campo de prácticas La Libertad UPSE.	17
Figura 4. Ubicación de la extensión de Río Verde.....	18
Figura 5. Ubicación de la extensión Manglaralto-UPSE.....	18
Figura 6. Procesamiento de los nódulos.....	21
Figura 7. Diluciones de las muestras.....	22
Figura 8. Siembra de las diluciones diluidas y sembradas en medio extracto de Levadura-Manitol-Agar (LMA).....	25
Figura 9. Conteo de colonias (UFC) con características mucosas (PGPR).....	25
Figura 10. Porcentaje de la incidencia de bacterias encontradas en la rizosfera de tres sitios de Santa Elena.	28
Figura 11. Promedio de UFC encontradas en el interior de los nódulos de los sitios de muestreo.	29
Figura 12. Comparación de los promedios de las bacterias encontradas en el suelo e interior de nódulos de los sitios de muestreo.	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Cuadro y figuras.

Cuadro 1. Características de las muestras colectadas.

Cuadro 2. Promedio de bacterias encontradas en la rizosfera por diluciones.

Cuadro 3. Promedio de bacterias encontradas en el interior de los nódulos en los sitios muestreados.

Cuadro 4. Promedio de bacterias en el exterior e interior de los nódulos.

Figura 1A. Recolección de muestras.

Figura 2A. Raíz noduladas de la *Leucaena leucocephala*.

Figura 3A. Separación de nódulos para toma de datos.

Figura 4A. Procesamiento de los nódulos para obtener el conteo de la presencia de bacteriana en la rizosfera.

Figura 5A. Conteo de colonias-Rizosfera.

Figura 6A. Protocolos de desinfección.

Figura 7A. Maceración y sembrado de nódulos en medio LMA.

Figura 8A. Preparación de medio LMA.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de ciertos elementos esenciales en el suelo afecta diferentes aspectos de la fisiología de la planta (Casal, 2007). El nitrógeno es un elemento exuberante en la atmósfera, a pesar de ello, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y deben obtenerlo del suelo, principalmente en forma de amonio o amoníaco (Wang et al., 2012).

En la producción agrícola se requiere principalmente de compuestos nitrogenados para desarrollar sus funciones de manera adecuada (Crespo y Julio, 2012). La cantidad de nitrógeno liberado por las bacterias fijadoras de nitrógeno dependen del suelo, de las condiciones del cultivo, de la especie cultivada e incluso de la variedad (Nodal, 2008).

En el Ecuador las leguminosas son una especie importante, siendo cultivadas en las tres regiones del país (Oyagata, 2021). Son utilizadas para aumentar la porción de proteínas y minerales, balanceando la dieta animal y humana, también para la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el suelo (León et al., 2018). Se destacan por su capacidad de asociarse con la bacteria del género *Rhizobium* que fijan el nitrógeno atmosférico (Crespo y Julio, 2012). En esta asociación, la bacteria induce en la planta el desarrollo de un nuevo órgano, el nódulo; dentro del cual se crea el ambiente necesario para la FBN, haciendo que la planta se vuelva independiente del nitrógeno del suelo (Torres, 2009).

La especie *Leucaena leucocephala* puede fijar de 75 a 200 kilos de nitrógeno por hectárea al año mediante la simbiosis con las bacterias *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium*. Permitiendo a la planta una buena adaptación aún en zonas con limitantes de nutrición y humedad (Patiño, 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de rizobios aislados de la leguminosa *Leucaena leucocephala* en cultivos establecidos colectados en tres zonas de la provincia de Santa Elena. Lo cual permitió evidenciar, en una primera aproximación a la relación simbiótica rizobio-leucaena, evaluando la presencia y características de los nódulos, y, del aislamiento de las bacterias presentes en la rizosfera y al interior de los nódulos.

Problema Científico:

¿La presencia de rizobios (PGPR) en las raíces de la leguminosa *Leucaena leucocephala* obtenidos en tres suelos de producción agrícola confirmarían la FBN en la zona?

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la presencia de rizobios en la leguminosa *Leucaena leucocephala* aislados de tres sitios de la península de Santa Elena.

Objetivos Específicos:

1. Determinar la presencia simbiótica rizobios-leguminosa en los tres sitios muestreados.
2. Aislar rizobios de las raíces de la leguminosa *Leucaena leucocephala* localizados en tres sitios de la Península de Santa Elena.
3. Determinar la población aproximada de rizobios en cada sitio.

Hipótesis:

La identificación de rizobios (PGPR) en la leguminosa *Leucaena leucocephala* en tres zonas distintas indicaría la presencia efectiva de simbiosis mutualista.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Bacterias PGPR

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), abreviado en inglés como Plant Growth Promoting Rhizobacteria, son bacterias del suelo que pueden colonizar la rizosfera y mejorar la utilización de estos nutrientes a través de los mecanismos de fijación biológica de nitrógeno y reducción de N_2 a NH_3^- (Reyes, 2019).

1.2 Rizobios

Los rizobios son los simbioses de las leguminosas mejor estudiados, con alta eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y puede suplir hasta el 90% de los requisitos del elemento para las plantas antes mencionadas (Soto et al., 2021a).

Garabato (2018) plantea que una de las características de los rizobios es su capacidad para formar relaciones simbióticas con las leguminosas. Durante esta simbiosis, las bacterias forman nódulos en la planta huésped, donde colonizan y llevan a cabo la FBN. En el nódulo, las bacterias obtienen compuestos carbonados y otros nutrientes de la planta, creando un ambiente favorable para la FBN. A cambio, los rizobios aportan amonio a la planta, que se utiliza en diversas rutas metodológicas para producir proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y otras moléculas necesarias para su crecimiento.

1.2.1 Taxonomía de los rizobios

La actual taxonomía de los rizobios se apoya en un enfoque polifásico que abarca la morfología, bioquímica, fisiología, genética y la filogenética. De acuerdo con la definición de especie aceptada en bacteriología, cada especie de *Rhizobium* se compone de un grupo de cepas que comparten las características distintivas de un grupo particular de bacterias.

El análisis de secuencias de los genes ARNr 16S se ha vuelto de gran importancia debido que permite la descripción de los géneros y las especies de *Rhizobium*. (Wang et al., 2012).

Siendo útil para conformar bases de datos especializadas y además permite que las secuencias del ARNr 16S sean utilizadas como una herramienta sustancial en la reconstrucción de relaciones filogenética (Valenzuela et al., 2015). En la taxonomía de *Rhizobium* la hibridación de ADN-ADN y otros métodos han sido incluidos para definir especies dentro de cada género.

Cuando las diferencias entre dos secuencias de ADN exceden el 30%, se cruza el borde que separa a dos especies. Mientras que las cepas que comparten una similitud de ADN-ADN entre un 25 y 60% pueden representar diferentes especies dentro del mismo género y si el parecido es menor a 10% se considera que pertenecen a diferentes géneros. Hasta el momento se han planteado 6 géneros, que son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Según las secuencias de los genes ARNr 16S todos los rizobios definidos son miembros de la subdivisión Proteobacterias (Wang et al., 2012).

Según Paredes (2013), los rizobios se dividen en dos grandes grupos:

- ***Rhizobium***: sus cepas son de crecimiento rápido, con un tiempo de generación de 2-4 horas, con varios flagelos, acidificantes en diferentes medios. Estos rizobios forman nódulos en leguminosas de zonas templadas.
- ***Bradyrhizobium***: sus cepas son de crecimiento lento, con un tiempo de generación mayor a 6 horas, con un solo flagelo, alcalinizante en diferentes medios.

1.3 Género *Rhizobium*

El género *Rhizobium* está compuesto por dos subramas: las especies *R. galegae* y *R. huautilense* junto con *Allorhizobium* y tres especies de *Agrobacterium* forman la primera subrama; el resto de las especies, incluyendo la especie tipo *R. leguminosarum*, y *Agrobacterium rhizogenes* forman la otra subrama. También hay bacterias no-simbióticas cercanamente relacionadas con cada uno de los géneros de rizobios. Las bacterias de este género son bacilos que miden 0.5-1.0x1.2-3.0 µm. Por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares pueden realizar movimientos.

Las colonias de esta bacteria generalmente puede ser blancas o color beige, forma circular, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; suelen medir de 2-4 mm de diámetro después de 3-5 días de incubación en el medio LMA (Wang et al., 2012).

Paredes (2013) indica que, en la antigua clasificación del género *Rhizobium* se han definido seis especies, como se muestra en la Tabla 1. Y para la identificación presuntiva o preliminar de una bacteria se basa en la morfología colonial, tomando en cuenta las siguientes características:

- **Elevación:** plana, acuminada, papilada, umbilicada, planoconvexa y convexa.

- **Bordes:** redondeado, ondulado, rizoide, espiculado, filamentosa y lobulado.
- **Forma:** puntiforme, rizoide, irregular, filamentosa y circular.
- **Superficie:** lisa y rugosa.
- **Tamaño:** pequeña, mediana y grande.
- **Transmisión de luz:** opaca, translúcida y transparente.
- **Consistencia:** mantecosa (brillante, húmeda y translúcida), mucoide (como moco o baboso) y seca (si es dura).
- **Pigmentos:** color y olor.

Tabla 1. Clasificación antigua de *Rhizobium*.

Especies	Planta Huésped
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Vicia, Lens, Lathyrus</i>
<i>R. phaseoli</i>	Especies de <i>Phaseolus</i> de clima templado
<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>R. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>

Fuente: (Paredes, 2013)

1.4 Cultivo y aislamiento de *Rhizobium*

El aislamiento de *Rhizobium* se comienza desinfectando la superficie del nódulo, macerándolo y estriándolo en cultivos in vitro. Este género puede ser fácilmente suplementado con levaduras, una fuente de carbohidratos como el manitol, compuestos nitrogenados, entre otros. Estos elementos son los que naturalmente se utilizan para el aislamiento de *Rhizobium* (Crespo y Julio, 2012).

1.5 Nitrógeno

El nitrógeno (N) es un componente de muchas biomoléculas y es esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos. En las plantas es responsable de muchas reacciones y forma parte de la estructura de la clorofila, enzimas y proteínas (Benites, 2016a). Jugando un rol importante en la agricultura, siendo uno de los nutrientes que más limitan la productividad de los cultivos y que requiere la adición de fertilizantes nitrogenados químicos para obtener rendimientos óptimos (Durán et al., 2013).

La mayoría de las moléculas biológicas están compuestas de nitrógeno. La importancia de

este elemento se evidencia en las grandes cantidades de nitrógeno que se requieren para formar parte de las moléculas biológicas. Es muy abundantemente en la naturaleza, tanto libre como en combinaciones; libre constituye 4/5 partes del aire en volumen, y combinado se encuentra en ácidos nucleicos, aminoglucósidos, urea, poliaminas, vitaminas, nitratos, nitritos, proteínas de todo tipo (animal como vegetales), en los responsables de la disponibilidad de energía (adenosín trifosfato y guanosín trifosfato) y del potencial reductor (NAD (P) y FAD) (Calvo, 2011).

1.5.1 Fijación de nitrógeno en leguminosas

En la atmósfera, el nitrógeno se encuentra en forma molecular N_2 con una disponibilidad del 80%. Como se mencionó anteriormente, las plantas pueden asimilar el nitrógeno principalmente en forma de nitratos (NO_3^-) y en forma de amonio (NH_4^+). Las plantas para poder convertir el N de su forma no asimilable N_2 a una que sí lo sea, las bacterias realizan la FBN (Paredes, 2013).

La fijación del nitrógeno es un proceso en el que el dinitrógeno atmosférico se reduce con hidrógeno para dar amonio. Al contrario del dinitrógeno, el N reducido es una forma que ya puede incorporarse a la biosfera y ser utilizado por numerosos seres vivos (Medina, 2018).

Según Paredes (2013), la energía requerida por las bacterias para desarrollar este proceso proviene de:

- Los carbohidratos de la rizosfera, cuando los microorganismos son de vida libre.
- Los exudados radiculares para los asociados en la rizosfera de una planta.
- Los productos del proceso de fotosíntesis de la planta huésped cuando existe una simbiosis.

La cantidad de N fijado por una leguminosa en un período de tiempo determinado depende de su rendimiento de forraje, el contenido de N del forraje y la proporción de ese N que se derivó de la atmósfera por simbiosis (García et al., 2021). Por su capacidad de fijar N_2 en simbiosis con rizobios, las leguminosas son excelentes colonizadoras de ambientes pobres en este elemento (Guamán et al., 2016).

1.5.2 Promedio de nitrógeno fijado en leguminosas

León et al. (2018) manifiesta que del N total contenido en una leguminosa nodulada, 2/3 partes provienen del aire que hay en los poros del suelo (fijación simbiótica) y el 1/3 restante

de la propia mineralización del suelo. La (Tabla 2) detalla las cantidades de N fijados por diferentes asociaciones de leguminosas y rizobios.

Tabla 2. Promedio de nitrógeno fijado en diferentes especies de leguminosa.

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	84-290
Desmodio	263-300
Pega-pega	178
Leucaena	400-500

Fuente: (Urzúa, 2007)

1.6 Nódulos

La formación de nódulos está controlada por fitohormonas: citoquininas, auxinas, giberelinas producidas por rizobios y por el huésped (Vicent, 1982). El exterior del nódulo puede ser liso, esculpido, estriado o costroso, algunas veces tienen el color de la raíz vecina o está brillantemente coloreado con pigmentos verdes o pardos, enmascarando el color de la hemoglobina del interior.

Los nódulos que son activos y fijan N₂ contienen una proteína pigmentada llamada leghemoglobina. Su presencia da como resultado una coloración rojiza dentro de los nódulos, lo que indica que las bacterias están vivas y activas. (Pommeresche y Hansen, 2017).

1.6.1 Etapa de infección y formación de nódulos en las raíces

La formación de un nódulo es un proceso que ocurre debido al intercambio de señales entre dos participantes que interactúan; sustancias que tienen un efecto nitrogenado (factores de nodulación) (Saldaña, 2017). Este proceso requiere energía que obtiene de la planta. Es por

este motivo que los factores que dificultan la fotosíntesis en las plantas, como el estrés hídrico y la falta de otros nutrientes aparte del nitrógeno, reducirán la fijación biológica de nitrógeno (Pommeresche y Hansen, 2017).

Madigan et al. (2015) manifiesta que los procesos de formación de nódulos para la mayoría de los rizobios son conocidas, como se muestra en la Figura 1. Los pasos para el desarrollo de nódulos en las raíces de la leguminosa son los siguientes:

1. Reconocimiento mutuo de la planta y la bacteria como socios adecuados, y la adherencia de la bacteria a los pelos radiculares.
2. Secreción de moléculas de oligosacáridos de señalización (factores Nod) por la bacteria.
3. Penetración bacteriana del pelo radicular.
4. Transferencia de la bacteria al cuerpo de la raíz a través de los filamentos de infección.

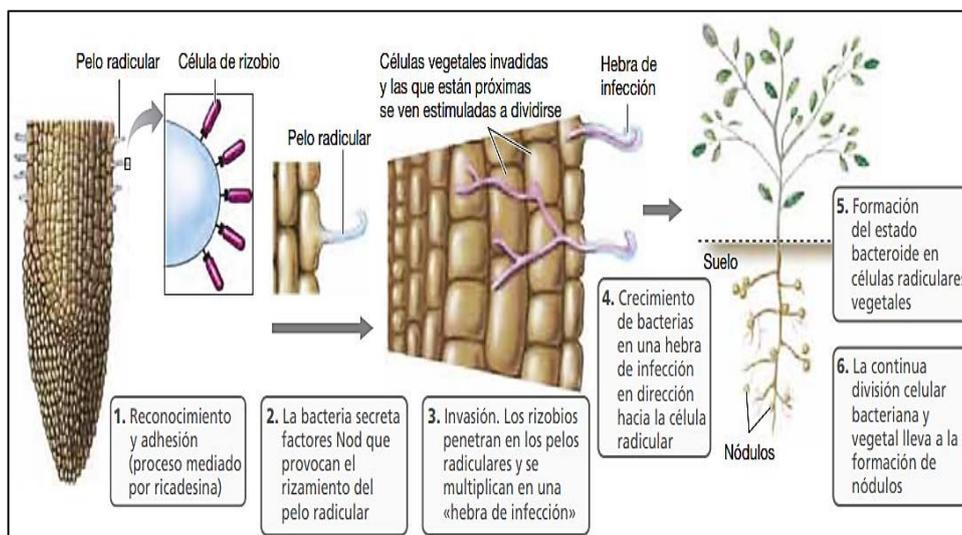


Figura 1. Etapas de la formación de nódulos en leguminosa infectada por el género *Rhizobium*.

Fuente: (Madigan et al., 2015)

1.7 Simbiosis leguminosa-rizobios

El nivel en que un cultivo puede beneficiarse del aporte de N de las leguminosas depende de la cantidad de FBN, que se introducen al sistema por la asociación simbiótica que establecen con los rizobios. Se estima que esta simbiosis alcanza el 20% de la cantidad total de N fijado anualmente en el planeta. Esta asociación determina el porcentaje de N residual para el siguiente cultivo y su eficiencia de aprovechamiento (Guamán et al., 2016).

1.8 Leguminosas

Las leguminosas son una familia extensa que se caracteriza por su fruto en forma de legumbre, donde se albergan las semillas. Las legumbres son las semillas secas (principalmente de la familia de las Leguminosas, subfamilia Papilionáceas), que por su bajo contenido en grasa se diferencian de las semillas oleaginosas (Olmedilla et al., 2010). Registran alto contenido de proteínas, ricas en lisina, un aminoácido esencial para la formación del colágeno que constituye a los cartílagos y tejidos conectivos (Benites, 2016b). Las leguminosas tienen en común, albergar bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico en sus raíces, formando nódulos radicales. Estas bacterias aportan el N necesario a la planta, por lo que las leguminosas, además de no necesitar fertilizantes para su correcto desarrollo, también se utilizan en la rotación de cultivos (LLamas y Acedo, 2016).

1.9 Generalidades del cultivo

1.9.1 Origen y adaptación del cultivo de leucaena

Patiño Guiza (2020) afirma que la leucaena es originaria de México, Nicaragua, El Salvador y Honduras; en el siglo XVII los españoles lo distribuyeron hacia Filipinas. Después fue introducido en Indonesia, Malasia, suroeste de Asia, Nueva Guinea y Papúa. Es un arbusto de raíces profundas y resistente a las épocas de sequía. Se adapta muy bien a zonas tropicales ubicadas entre los 30° de latitud norte y sur, puede desarrollarse bien en zonas con precipitaciones que oscilan entre 500 y 3000 mm y en una gran variedad de suelos, excepto en aquellos que son muy acuosos o ácidos como los suelos de la sabana (Barreto, 2006).

1.9.2 Clasificación botánica

La familia Leguminosae contiene más de 750 géneros y más de 18.000 especies (Bécquer y Prévost, 2014). El cultivo de leucaena presenta la siguiente taxonomía (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de la Leucaena.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Mimosoideae
Género	Leucaena
Especie	<i>L. leucocephala</i>

Fuente: (Patiño, 2020)

1.10 Importancia del cultivo de Leucaena

Es una planta de gran importancia en la producción ganadera, ya que proporciona alimento de alta calidad, tolera sequías y es rápidamente consumida por el ganado. También tiene usos medicinales, por ejemplo, problemas estomacales. Sus semillas son comestibles, es una planta forrajera que aporta a los animales las proteínas necesarias para su desarrollo (Dago et al., 2020). En el ganado lechero ha permitido a los ganaderos aumentar la capacidad de carga de sus tierras y la productividad animal siendo un componente estratégico (Escalante, 2019).

1.11 Medios de cultivos

Es una técnica de laboratorio empleada con el objetivo de cultivar microorganismos como bacterias y hongos, aunque también se utilizan para el crecimiento de células o tejidos. Consiste principalmente de una superficie sólida, semisólida o de una solución líquida con nutrientes y condiciones de pH y temperatura favorables para el crecimiento del microorganismo deseado. Además, es importante controlar la presencia o no de oxígeno o el grado de humedad (Amurí, 2021).

Según Rodríguez y Zhurbenko (2018), los ingredientes de los medios de cultivo, por su naturaleza y función, pueden ser agrupados de la siguiente manera:

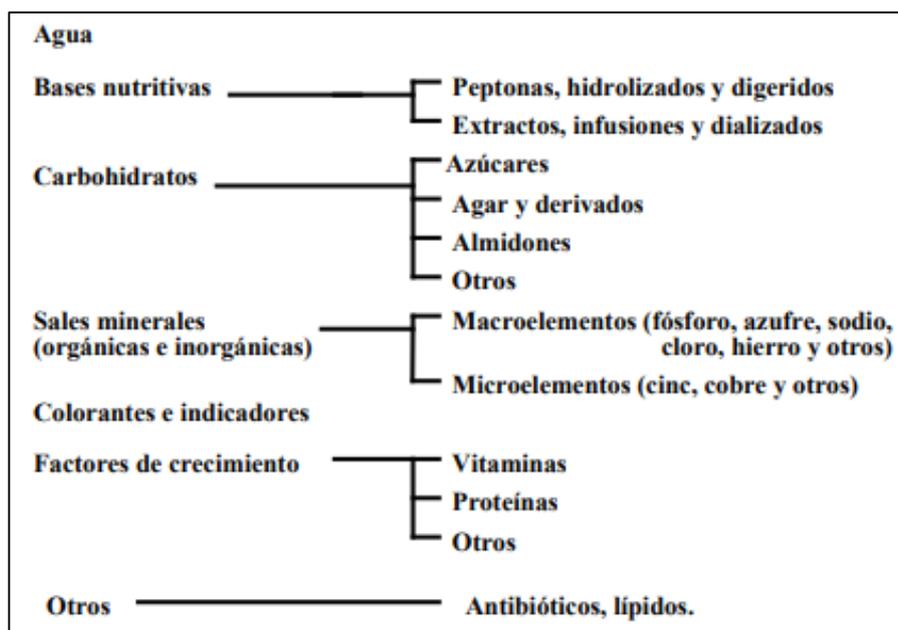


Figura 2. Requerimientos nutricionales para el crecimiento de microorganismos.

Fuente: (Rodríguez y Zhurbenko, 2018)

1.11.1 Medio Levadura Manitol Agar (LMA)

Es un medio ampliamente utilizado para el cultivo de rizobios (Ormeño y Zúñiga, 1998; Zúñiga, 2012).

1.12 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se define como al aumento ordenado de todos los componentes químicos de un organismo. El aumento de masa (tamaño) no da como resultado un crecimiento verdadero, puesto que las células pueden estar incrementando sus reservas, absorbiendo agua o realizando otras funciones.

Cuando una bacteria se adapta a un entorno apropiado, esta se encuentra en un estado de crecimiento equilibrado, donde duplicar su biomasa significa duplicar todas las demás propiedades medibles como el ARN, el ADN, las proteínas y el agua intracelular. La existencia de este crecimiento equilibrado es muy útil para medir el crecimiento bacteriano, ya que todos los componentes tienen la misma tasa de crecimiento. La multiplicación celular es una consecuencia del proceso de crecimiento, que induce a un aumento en el número de individuos generando una población o cultivo (Junco y Rodríguez, 2001).

1.12.1 Ciclo del crecimiento microbiano

Según Caycedo et al. (2021), se puede diferenciar de un medio líquido cuatro fases en el progreso del crecimiento bacteriano:

- **Fase de adaptación:** Las bacterias adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales y de nutrientes para iniciar el crecimiento exponencial.
- **Fase exponencial o logarítmica:** Todo tipo de bacteria tiene un tiempo de generación (fase de infección y multiplicación dentro del organismo).
- **Fase estacionaria:** Las bacterias presentan un metabolismo diferente que la anterior fase (fase exponencial), aquí se observa la acumulación y liberación de metabolitos secundarios, importantes en el lapso de la infección o intoxicación. Esto ocurre debido a que uno o varios nutrientes esenciales se agotan, ya sea porque los productos de desecho liberados en la fase exponencial convierten el medio en inhóspito para su crecimiento o por la presencia de competidores que limitan su crecimiento.
- **Fase de muerte:** Sucede porque el número de bacterias viables en el medio disminuye.

1.13 Requerimientos nutricionales para el crecimiento microbiano

El peso seco de los microorganismos se compone en materia orgánica (carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre). Además, se necesitan iones inorgánicos como sodio, hierro, potasio, magnesio, cloruro y calcio para favorecer la catálisis enzimática y conservar los gradientes químicos a través de la membrana celular. Durante el crecimiento, un microorganismo demanda de todos los elementos de su materia orgánica y el complemento absoluto de iones imprescindibles para la energética y la catálisis. También, debe haber una fuente de energía que radique la fuerza motriz protónica y que posibilite la síntesis macromolecular. Los microorganismos cambian considerablemente en cuanto a sus demandas nutricionales y sus fuentes de energía metabólica (Junco y Rodríguez, 2001).

1.13.1 Fuentes de energía metabólica

Según Mateos (2014), para generar energía metabólica se conocen tres modos principales: fermentación, respiración y fotosíntesis, uno de estos mecanismos debe llevar a cabo los microorganismos para su desarrollo. Estos nutrientes se clasifican en los siguientes grupos:

- **Macronutrientes:** carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno.
- **Micronutrientes:** fósforo, potasio, azufre, magnesio.
- **Vitaminas y hormonas.**
- **Elementos traza:** zinc, cobre, manganeso, molibdeno, cobalto.

MACRONUTRIENTES

Carbono: El carbono es el sostén de tres importantes nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas), que se utilizan para la obtención de energía y como material celular. Se denominan a los microorganismos de acuerdo a como utilizan el carbono. Los heterótrofos son los que utilizan los compuestos orgánicos, mientras que los autótrofos son aquellos que usan el CO₂ como fuente de carbono (Mateos, 2014).

Hidrógeno y Oxígeno: El hidrógeno y oxígeno forman parte de numerosos compuestos orgánicos. Estos dos macronutrientes se encuentran en el H₂O, en la atmósfera y como componentes de diferentes nutrientes. El O₂ además se utiliza en la respiración aeróbica como aceptor terminal de electrones (Mateos, 2014).

Nitrógeno: Algunos microorganismos obtienen el nitrógeno de fuentes inorgánicas y otros obtienen la energía a través del metabolismo de sustancias que contienen nitrógeno

inorgánico (Junco y Rodríguez, 2001). El N₂ como fuente de nitrógeno solo lo utilizan los procariotas fijadores de nitrógeno (Madigan et al., 2015).

MICRONUTRIENTES

Azufre y Fósforo: Los microorganismos necesitan un suministro de ciertos minerales, especialmente azufre y fósforo, los cuales son componentes celulares importantes. Ellos obtienen el azufre a partir de las sales inorgánicas de sulfato y de los aminoácidos que contienen azufre, y lo utilizan en la elaboración de proteínas, coenzimas y otros componentes celulares. El fósforo es adquirido, principalmente, mediante iones fosfato inorgánico (PO₄³⁻) y lo emplean para sintetizar ATP, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Junco y Rodríguez, 2001).

VITAMINAS Y HORMONAS

Se clasifican en dos grupos, hidrosolubles y liposolubles. En él, la vitamina A, D y E no son imprescindibles para el crecimiento de las bacterias. Todas las vitaminas hidrosolubles, excepto el ácido ascórbico, son necesarias para el crecimiento bacteriano. La mayoría de las vitaminas hidrosolubles son componentes de coenzimas. En los medios indeterminados se utiliza extracto de levadura como fuente de vitaminas (Mateos, 2014).

ELEMENTOS TRAZA

En general, los requerimientos de oligoelementos solo se conocen sólo cualitativamente, porque es difícil justificar su necesidad debido a que las cantidades requeridas a menudo se pueden encontrar como contaminantes en otros constituyentes del medio. Son necesarios para activar ciertas enzimas; por ejemplo, el Mo⁶⁺ se requiere en la nitrogenasa que es el enzima que cataliza la conversión del nitrógeno atmosférico en amoníaco durante la fijación biológica del nitrógeno (Mateos, 2014).

1.14 Factores condicionantes del desarrollo bacteriano

Las bacterias frecuentemente interactúan con otros organismos vivos, y esto afecta su crecimiento. Por ejemplo, las bacterias endófitas, son útiles para que las plantas prosperen dentro de ellas y pueden aumentar su crecimiento; esto puede deberse a una mejor absorción de los nutrientes que regulan el crecimiento y la síntesis de fitohormonas relacionadas con el estrés (Caycedo et al., 2021).

Temperatura: Es uno de los factores ambientales más importantes en el crecimiento bacteriano. La razón es que cuando se encuentra expuesto a temperaturas extremadamente bajas, tanto la membrana plasmática como el citoplasma de los microorganismos pierden su fluidez, lo que reduce o inhibe por completo el transporte de nutrientes del medio externo y las reacciones que el metabolismo enzimático permite utilizar. Y cuando la temperatura es demasiado alta inhabilita los sistemas enzimáticos, desnaturaliza las proteínas y daña las membranas celulares, lo que lleva a la lisis térmica. Hay entre ambos extremos, un rango de temperaturas de crecimiento dentro del cual un microorganismo dado puede absorber nutrientes del medio ambiente, dirigiéndolos a las vías catabólicas y anabólicas requeridas para la división celular, lo que lleva al crecimiento de la población (Caycedo et al., 2021).

pH: La condición de pH del sustrato, a su vez, regula el pH interno de la bacteria y afecta el transporte de iones de hidrógeno a través de la membrana citoplasmática. Se denominan neutrófilos a los microorganismos que crecen con un pH 7, acidófilos a los que crecen por debajo de un pH 5 y basófilos o alcalófilos a los que crecen por encima de un pH de 8 (Caycedo et al., 2021).

1.15 Tipos, tamaño y forma de agrupaciones bacterianas.

Según López y Torres (2006), la morfología bacteriana es el conjunto de características (forma, tamaño, estructura y tipo de agrupación) que se lleva a cabo por medio de tinciones, exámenes directos en fresco, entre otros. Características:

TAMAÑO

Las bacterias son organismos de un pequeño tamaño, por este motivo se necesita de un microscopio para observarlas. Su tamaño se mide en micras ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{m}$) y va desde 0,2 μm en algunos cocos hasta 5-8 μm de longitud y 1,5 μm de ancho en bacilos. El tamaño es una de las características que diferencian a las bacterias y se pueden medir con gran precisión y fiabilidad.

FORMA

Se obtiene muchas diferencias en la longitud, número de rotaciones y la amplitud de cada especie bacteriana. En algunos casos son muy pequeños, tienen una espiral muy cerrados, y en otros casos son todo lo contrario. Cuando este tipo de bacteria toma una forma filamentosa que bajo un microscopio óptico es similar a los hongos. Las bacterias que tienen formas

intermedias entre cocos y bacilos se denominan cocobacilos que, en muchos casos, más que formas específicas de especie, corresponden a la etapa temprana de desarrollo de muchas especies.

AGRUPACIONES

Se clasifican en dos grandes grupos: microscópicas y macroscópicas.

Agrupaciones microscópicas: El agrupamiento depende de cómo se realice la fisión celular binaria de la célula y si las células descendentes permanecen fusionadas. Se pueden observar bajo el microscopio agrupaciones bacterianas (formando 2 o más grupos de bacterias). Cabe señalar que no todas las formas bacterianas forman grupos microscópicos. Por ejemplo, los espirilos nunca se asocian mientras existan otras especies bacterianas en las que su agrupación es muy característica y útil a la hora de establecer clasificaciones taxonómicas, siendo las formas cocoideas las más frecuentes en este sentido, y las formas bacilares en menor medida. Las formas cocoideas se agrupan en diplococos, estafilococos, diplobacilos, estreptobacilos y formas irregulares.

Agrupaciones macroscópicas: Estas agrupaciones se visualizan a simple vista corresponden al crecimiento en un punto de una única línea celular hasta formar una colonia (todas las células que componen la colonia provienen de una sola célula). El cultivo se realiza en medio de cultivo sólido para formar colonias que serán diferentes y con características para cada tipo bacteriano; el medio sólido lo que hará es impedir el posible movimiento de los individuos de la colonia, lo que favorecerá a su agrupación.

Es importante indicar que para obtener colonias bacterianas no se debe utilizar directamente un medio de cultivo líquido. Estas colonias tienen una morfología macroscópica fácilmente reconocible y variable en función de: las características del medio, tipo de bacteria, aspectos de las colonias sembradas en placas por estrías y por último el tamaño de las colonias.

1.16 Los colorantes diferenciales

Son una alternativa para la identificación de varios grupos de microorganismos, que actúan de diferentes formas. Por ello, permite realizar diferentes tipos de identificación y así adaptarse a diversos microorganismos, según sus características físicas (Espinoza et al., 2016).

1.16.1 Tinción de Gram

Es un tipo de tinción que se aplica a las bacterias para observarlas mejor bajo el microscopio. La tinción de Gram diferencia a las bacterias en dos grandes grupos. Se denominan Gram-positivas si las bacterias toman un color púrpura y Gram-negativas si presentan un color rojo o rosa. (Jurado et al., 2021).

Tabla 3. Diferencia entre Gram positivas y Gram negativas.

Características	Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Color con la tinción de Gram	Violeta	Rojo
Pared celular	Gruesa	Delgada
Presencia de lipopolisacáridos en pared celular	Ausente	Presente
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular	Presente	Ausente

Fuente: (Jurado et al., 2021)

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización y descripción del lugar de estudio

Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB) de la Universidad Estatal Península de Santa Elena. Las muestras vegetales utilizadas en esta investigación fueron extraídas de tres zonas de la provincia de Santa Elena, en el campo de prácticas de La Libertad UPSE, centro de prácticas Río Verde y extensión de Manglaralto.

- **Campo de prácticas La Libertad UPSE**, ubicado a un extremo de la Facultad de Ciencias Agrarias en el cantón La Libertad Península 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 $80^{\circ} 54' 9''$ y una altitud 54 msnm.

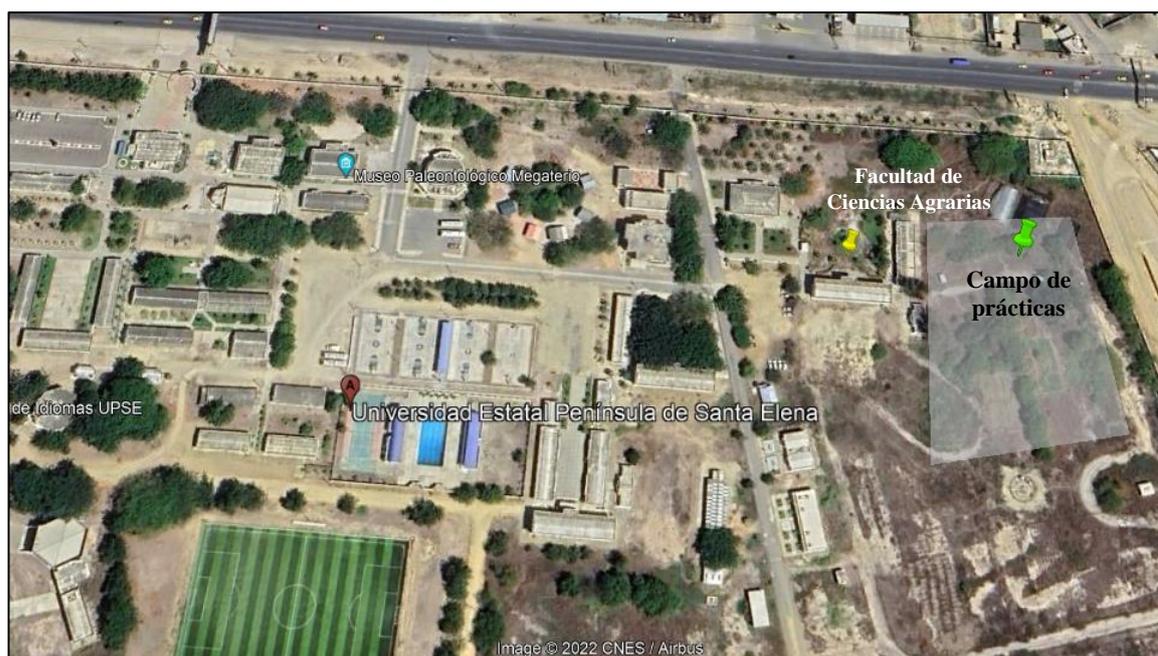


Figura 3. Ubicación del campo de prácticas La Libertad UPSE.

Fuente: Google Earth Pro.

- **Río Verde-UPSE**, el centro de prácticas de Río Verde, ubicado en la vía Guayaquil, a 27 km del cantón Santa Elena. Sus coordenadas geográficas son latitud Sur $2^{\circ} 15' 45''$, longitud Oeste $80^{\circ} 40' 17''$ y con una altitud de 25 msnm.



Figura 4. Ubicación de la extensión de Río Verde.

Fuente: Google Earth Pro.

- **Extensión Manglaralto-UPSE**, el muestreo se realizó dentro de las instalaciones en la parroquia Manglaralto, ubicada cerca de la vía de dos Mangas a 55 km al norte de Santa Elena, sus coordenadas geográficas son latitud Sur $01^{\circ} 50' 36''$, longitud Oeste $80^{\circ} 44' 31''$ y altitud de 12 msnm. Posee un suelo franco arcilloso con un pH de 7,7.



Figura 5. Ubicación de la extensión Manglaralto-UPSE.

Fuente: Google Earth Pro.

2.2 Material vegetativo

Se extrajeron muestras al azar de las raíces noduladas de la leguminosa *Leucaena leucocephala* en las tres zonas mencionadas.

2.3 Material de campo

- Pala pequeña para huerto.
- Azadón pequeño para jardinería.
- Microtubos de 1.5 mL.
- Silica 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 6.80%
- Tinción de Gram

2.4.2 Instrumentos de laboratorio

- Varilla de agitación
- Pipeta
- Micropipetas de 100 a 1000 μ 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 de secado
- Autoclave
- Incubadora

2.5 Recolección de las muestras

2.5.1 Descripción de los lugares de muestreo

Para la recolección de las muestras en los tres sitios establecidos de la provincia de Santa Elena (centro de práctica La Libertad, Río Verde y Manglaralto), se introdujo una pala cuidadosamente para evitar dañar la planta y se tomó un corte de suelo a una profundidad de 15 cm a 20 cm alrededor de la planta, extrayendo las raíces noduladas.

Las muestras se colocaron en microtubos de 1.5 mL con silica gel y algodón, sellados con cinta Parafilm y envueltos en papel periódico para su conservación. Se rotularon las muestras de acuerdo a las características y ubicación de la planta y luego fueron trasladadas a los laboratorios del CEB-UPSE para los análisis correspondientes.

2.5.2 Aislamiento de las cepas de Rizobios

2.5.2.1 *Procesamiento de los nódulos*

Se limpiaron cuidadosamente con una brocha pequeña los nódulos para quitar el exceso de tierra, luego se colocaron en fundas plásticas con cierre hermético rotulándolas acorde al sitio y fecha colectada. Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio para el aislamiento de las bacterias de la rizosfera (Cuadro 1).

Luego, estas muestras se lavaron con agua destilada evitando desprender los nódulos y colocándolos en papel absorbente para quitar el exceso de humedad, que permitió proceder

con la desinfección de los nódulos, los cuales fueron macerados con una varilla de vidrio estéril, sembrándolas finalmente en cajas Petri con medio LMA para su identificación fenotípica, como bacterias PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

Cuadro 1. Características de las muestras colectadas.

Código de muestra	Número de nódulos	Sitio
BS-1Lr0	Raíz	La Libertad
BS-3R03	3	Río Verde
BS-2Ra05	5	Río Verde
BS-2Rb09	9	Río Verde
BS-4Ma09	9	Manglaralto
BS-4Mb19	19	Manglaralto

Se prepararon 800 mL de solución salina, pesando 0.85 g NaCl al 6.8 % en una solución de 800 mL. Se dispensaron 20 mL de la solución salina en los beakers y con ayuda de una pinza se colocaron los nódulos en la solución, dejándolo reposar 24 horas (Figura 6).

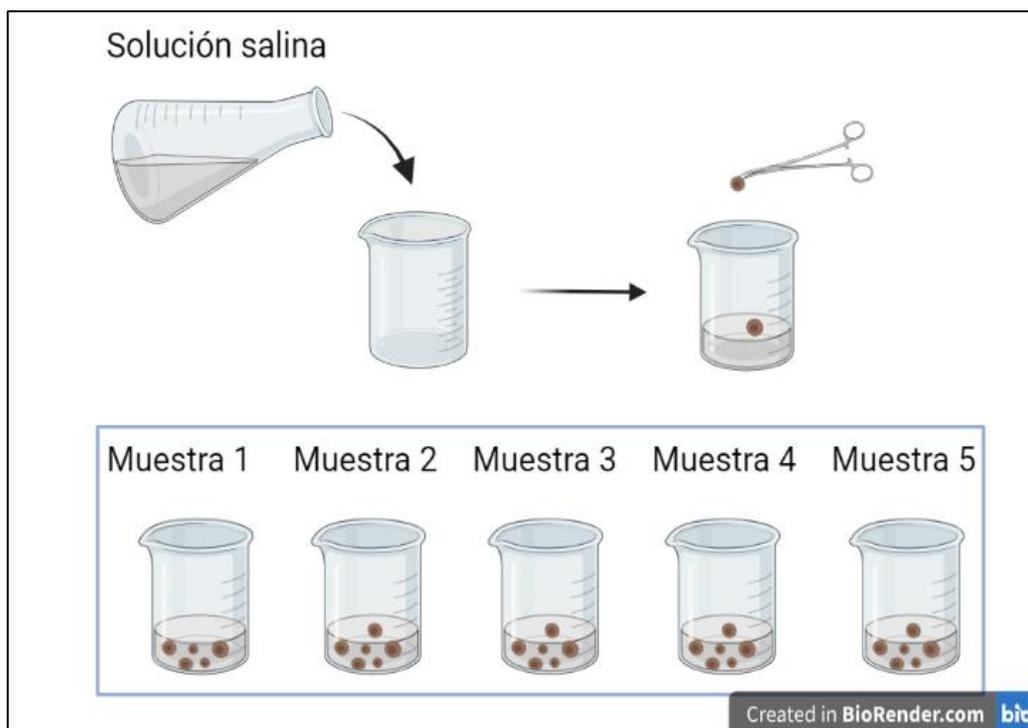


Figura 6. Procesamiento de los nódulos.

Fuente: Elaboración autora.

Después de ese tiempo se rescataron los nódulos colocándolos en beakers con 20 mL de H₂O destilada y cubriéndolos con papel aluminio como tapa.

2.5.3 Presencia de bacterias en la rizosfera

En 24 tubos de ensayos esterilizados (4 por muestra), se añadieron 4,5 mL de solución salina y con la pipeta se extrajeron 0.5 mL de la solución, preparadas en el procesamiento de los nódulos para obtener el conteo de la presencia bacteriana en la rizosfera, realizando diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-5} con 3 repeticiones por muestra, mostrados en la Figura 7 y Tabla 4.

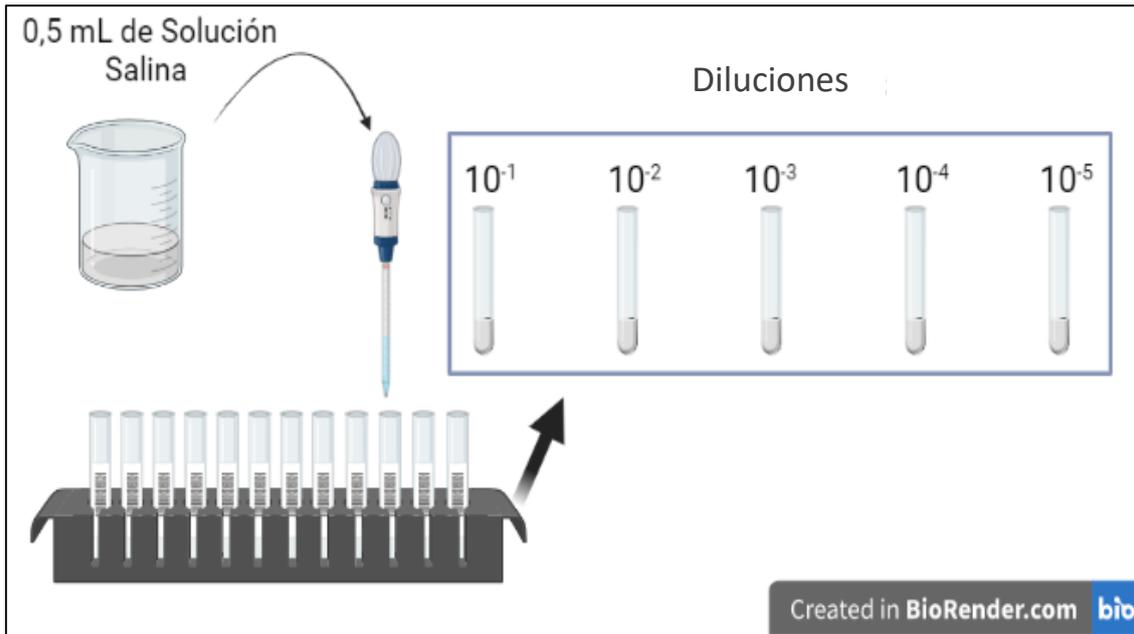


Figura 7. Diluciones de las muestras.

Fuente: Elaboración autora.

Tabla 4. Procesamiento de muestra en el laboratorio.

Muestra	Código	Diluciones	Número de repeticiones
1	BS-1Lr0	10^{-1}	R1
			R2
			R3
		10^{-2}	R1
			R2
			R3
		10^{-3}	R1
			R2
			R3
		10^{-4}	R1
			R2
			R3

		10 ⁻⁵	R1 R2 R3
--	--	------------------	----------------

Tabla 4. Continúa

Muestra	Código	Diluciones	Número de repeticiones
		10 ⁻¹	R1 R2 R3
		10 ⁻²	R1 R2 R3
2	BS-2Ra05	10 ⁻³	R1 R2 R3
		10 ⁻⁴	R1 R2 R3
		10 ⁻⁵	R1 R2 R3
		10 ⁻¹	R1 R2 R3
		10 ⁻²	R1 R2 R3
3	BS-2Rb09	10 ⁻³	R1 R2 R3
		10 ⁻⁴	R1 R2 R3
		10 ⁻⁵	R1 R2 R3
		10 ⁻¹	R1 R2 R3
		10 ⁻²	R1 R2 R3
5	BS-4Ma09	10 ⁻³	R1 R2 R3
		10 ⁻⁴	R1 R2 R3

			R1
			R2
		10 ⁻⁵	R3

Tabla 4. Continúa

Muestra	Código	Diluciones	Repeticiones
			R1
			R2
		10 ⁻¹	R3
			R1
			R2
		10 ⁻²	R3
			R1
			R2
		10 ⁻³	R3
			R1
			R2
		10 ⁻⁴	R3
			R1
			R2
		10 ⁻⁵	R3

2.5.3.1 Preparación del medio de cultivo LMA

Se preparó el medio LMA de acuerdo al Manual de Microbiología Agrícola (Zúñiga, 2012). Donde se pesaron 5 g de manitol, 0,25 g de extracto de levadura, 0,25 g de K₂HP0₄, 0,05 g de MgSO₄ 7H₂O, 0,10 g de CINa y 7,5 g de Agar, esto para 500 mL de H₂O destilada con pH 7 (neutro). El medio se homogenizó en un plato agitador calefactor, después fue esterilizado en la autoclave por 2 horas a 121 °C y 1 ATM. Luego de ese tiempo, se dispersaron 12 mL aproximadamente del medio LMA en las 72 cajas Petri (3 repeticiones por muestra) fueron codificadas dejándolas solidificar a temperatura ambiente.

2.5.3.2 Siembra en el medio LMA

Se extrajeron 14,5 µL de solución salina (diluciones preparadas) con la micropipeta se esparcieron en las cajas Petri, y con una varilla de vidrio estéril se estriaron. Luego fueron selladas con cinta y llevadas a la incubadora, manteniéndolas a una temperatura de 28°C durante 3 días para observar el crecimiento de las colonias (Figura 8).

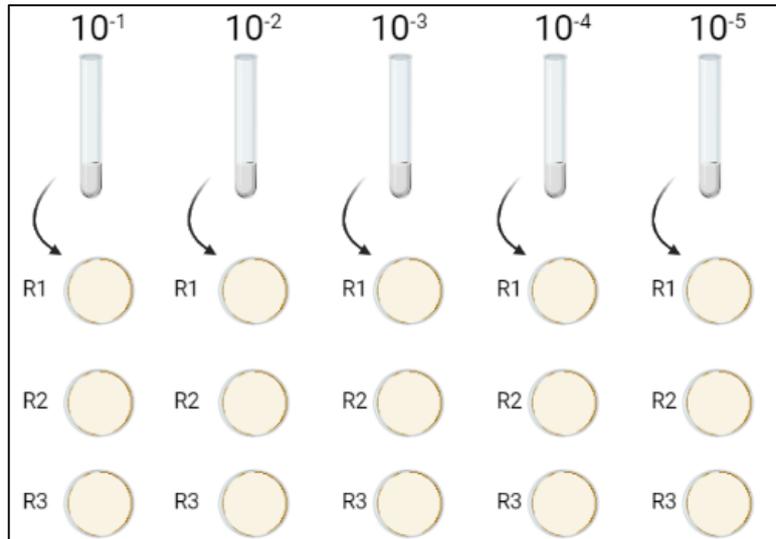


Figura 8. Siembra de las diluciones diluidas y sembradas en medio extracto de Levadura-Manitol-Agar (LMA).

Fuente: Elaboración autora.

2.5.3.3 Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos

Se dividieron las cajas Petri en cuatro partes iguales con ayuda de un rotulador, se escogió una sección con crecimiento uniforme de las colonias, a las que se denomina UFC (Unidad Formadora de Colonias). Una vez realizado lo anterior, se realizó el conteo de cada placa, contabilizando solamente las bacterias mucosas (PGPR), multiplicándola por 4 para obtener el total de UFC/g de cada caja Petri (Figura 9).

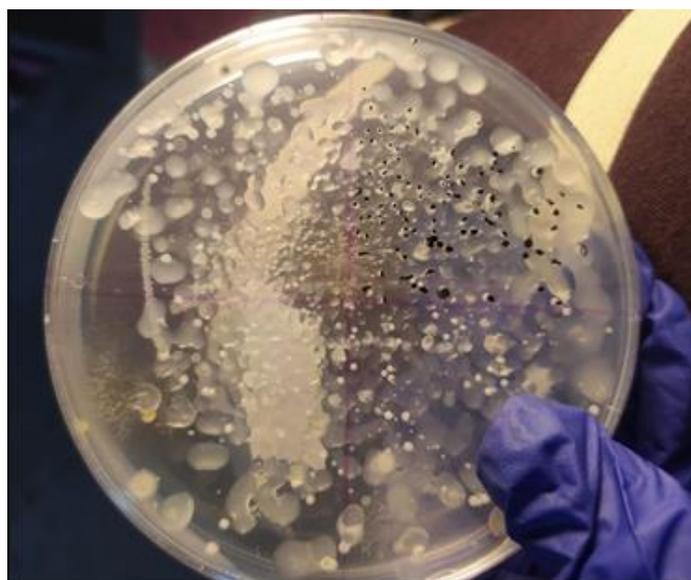


Figura 9. Conteo de colonias (UFC) con características mucosas (PGPR).

2.5.3.4 Protocolos de desinfección de los nódulos

Para la identificación de las bacterias de la rizosfera, específicamente la familia Rhizobiaceae, se procedió a desinfectar los nódulos de acuerdo a Zúñiga (2012).

Primero, se desinfectaron los nódulos con alcohol al 70% durante 1 minuto en beakers estériles de 250 mL. Segundo, se preparó una solución con NaClO al 3% en beakers estériles de 250 mL. En estos beakers rotulados se colocaron 20 mL de cada solución desinfectante y se cubrieron con papel aluminio. Luego los nódulos de cada muestra fueron rescatados con una pinza e introducidos en los beakers con la solución durante 3 minutos y posterior a esto se enjuagaron con agua destilada estéril por 8 veces cada 5 minutos.

2.5.3.5 Maceración de los nódulos

Se colocó un nódulo en cada mortero y se le agregó una gota de H₂O destilada estéril con una varilla de agitación macerando cada nódulo por separado, con 3 repeticiones.

El macerado se sembró en las cajas Petri realizando la técnica de estría con ayuda de la varilla de agitación. Luego se sellaron las cajas Petri y se las ubicó en la incubadora a 28°C durante 5 a 7 días para evaluar la presencia de bacterias.

2.5.4 Aislamiento y caracterización fenotípica de bacterias con Tinción de Gram

2.5.4.1 Aislamiento de bacterias

En el sexto día se observó la presencia de bacterias en todas las muestras, encontrando colonias con consistencia cremosa, mucosa o viscosa; de forma circular, irregular o puntiforme, con color blanquecino, opaco, transparente o semitransparente (Zúñiga, 2012).

Luego se seleccionaron las colonias con las características escritas anteriormente, fueron sometidas a la Tinción de Gram, observándolas con objetivos 40 y 100x, este último con aceite de inmersión, empleando diferentes reactivos como cristal violeta, lugol, alcohol y safranina.

2.6 Análisis de los resultados

En esta investigación cada caja Petri será una unidad experimental con 3 repeticiones. Se empleó el análisis de medias (Microsoft Excel) para reportar la presencia de los rizobios en el exterior de las raíces de las plantas (Rizosfera) y del número de bacterias encontradas en el interior de los nódulos aislados (Simbiosis).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de nódulos

Para determinar la presencia de bacterias consideradas como PGPR (rizosfera) se procesaron las muestras de raíces noduladas de cada sitio en el laboratorio. Obteniendo 45 nódulos de 6 plantas muestreadas de los tres sitios declarados. Se evaluó número, tamaño y peso fresco de nódulos (Tabla 5). Obteniendo un promedio general de 1,69 mm en diámetro de nódulos y 0,06 g en peso de nódulos. De las 6 plantas que se extrajeron nódulos, 5 tenían presencia de floración, menos la muestra "1", dónde no hubo nódulos, coincidiendo con Graham (1981), Rosas y Bliss (1986) y Córdova et al. (2011), donde menciona que la nodulación y actividad de fijación esta asociada con la etapa de floración.

Tabla 5. Variables evaluadas número, tamaño y peso fresco de nódulos en 6 plantas de la leucaena (*Leucaena leucocephala*).

Muestra	Código de muestra	Número de nódulos	Peso (g)	Diámetro (mm)
1	BS-1Lr0	-	0.037	-
2	BS-2Ra05	5	0.015	1,98
3	BS-2Rb09	9	0.021	1,61
4	BS-3R03	3	0.004	1,63
5	BS-4Ma09	9	0.004	0,99
6	BS-4Mb19	19	0.270	2,24

3.2 Presencia de bacterias en la rizosfera

En la zona de la rizosfera, se evaluó el porcentaje de la presencia de bacterias en los tres sitios de muestreo, evidenciando que el 46% de los conteos bacterianos se encontraron en el campo de prácticas de La Libertad, mientras que el 39% en el centro de prácticas Río Verde y el 15% en la extensión Manglaralto. Resaltando que, la muestra del campo de prácticas de La Libertad solo fueron procesadas las raíces sin nódulos (Figura 10). Mientras que los nódulos encontrados en Manglaralto presentaron mayor tamaño y diámetro (Tabla 5), quizás debido a la mayor edad de los árboles en comparación con los nódulos hallados en Río Verde.

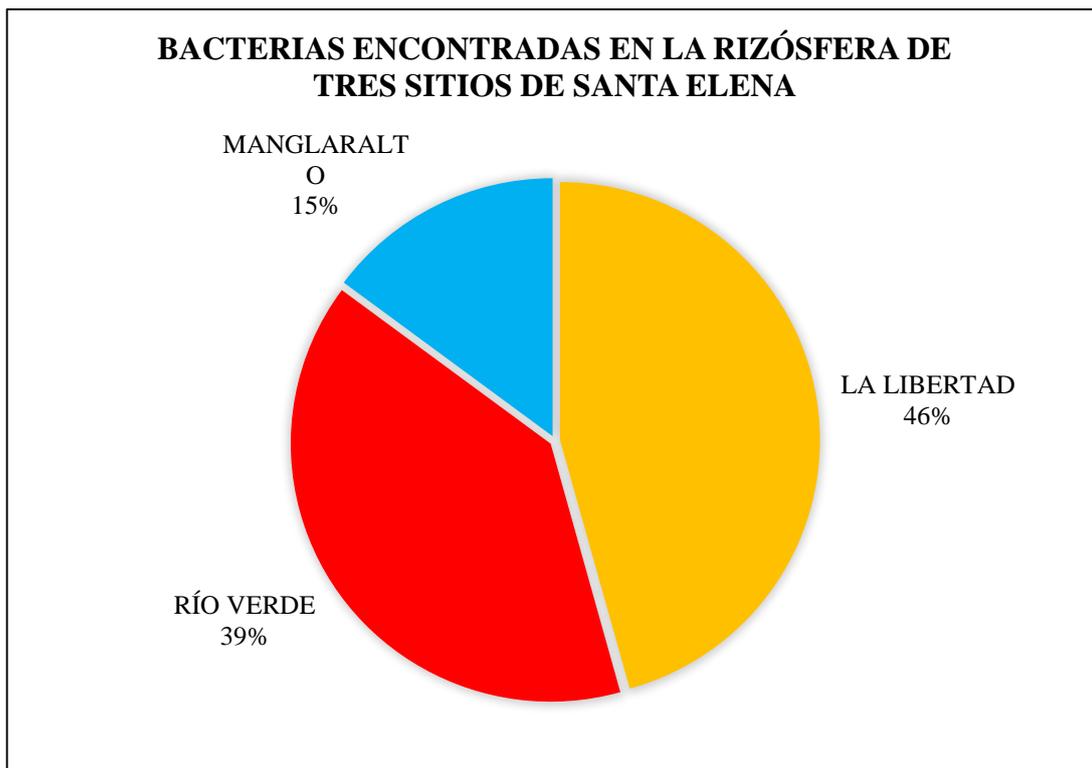


Figura 10. Porcentaje de la incidencia de bacterias encontradas en la rizosfera de tres sitios de Santa Elena.

3.3 Presencia de bacterias en el interior de los nódulos

En el interior del nódulo, se evaluó el promedio del número de bacterias encontradas (Figura 11). En este conteo el mayor número de bacterias se registró en el centro de prácticas Río Verde con un promedio de 146,48 UFC/por nódulo procesado, mientras que en la extensión Manglaralto se encontró el menor número de bacterias, con un promedio de 115,38 UFC/por nódulo procesado.

Como se indicó anteriormente, en el campo de prácticas La Libertad no se encontraron nódulos y esto puede deberse a diversos factores que limitan la productividad de la planta y el desarrollo de la simbiosis, hasta impedir la formación de nódulos (Cuadrado et al., 2009). Mientras que Manglaralto presentó un menor promedio (115,38), que pudo deberse al estrés hídrico, de un área seca no irrigada (Pommeresche y Hansen, 2017), a diferencia de Río Verde que cuenta con láminas de riego que satisfacen la necesidad hídrica del cultivo, obteniendo un conteo promedio de 146,48 UFC/nódulo.

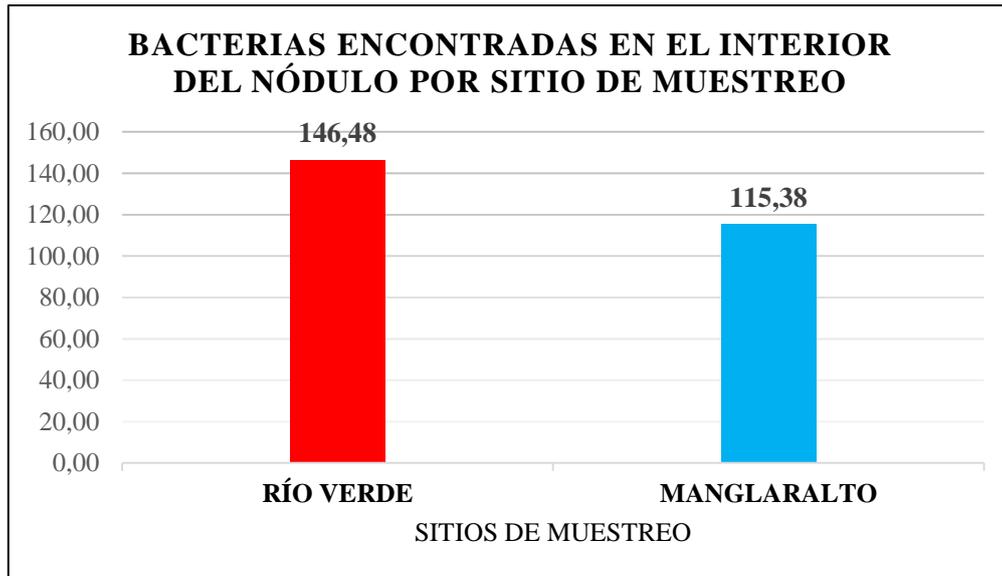


Figura 11. Promedio de UFC encontradas en el interior de los nódulos de los sitios de muestreo.

En la comparación de incidencia de las bacterias PGPR en el exterior e interior de los nódulos muestreados, Río Verde tuvo el mayor promedio del número de bacterias, con 645 UFC en la rizosfera y 146,48 UFC en el interior de los nódulos consideradas como rizobacterias, que seguramente participan de la simbiosis mutualista entre planta-bacteria. Mientras que, en Manglaralto se contabilizaron en promedio 243 UFC en la rizosfera y 115,38 UFC al interior de los nódulos (Figura 12).

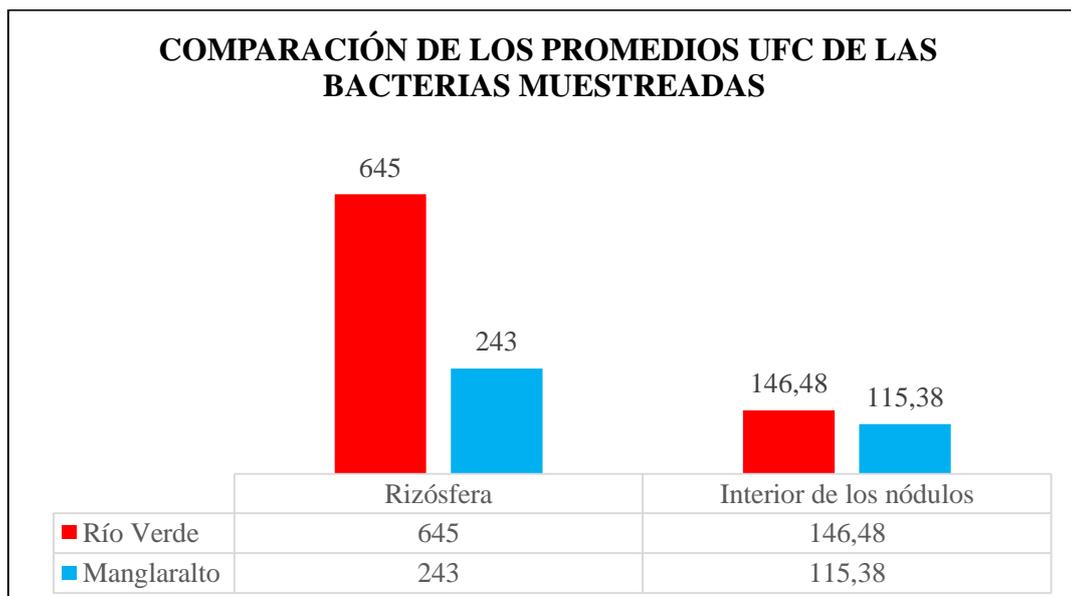


Figura 12. Comparación de los promedios de las bacterias encontradas en el suelo e interior de nódulos de los sitios de muestreo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Esta investigación que estudió la presencia de los rizobios en la leguminosa *Leucaena leucocephala* en La Libertad, Río Verde y Manglaralto, concluye lo siguiente:
- En los lugares establecidos, se logró aislar a partir de las raíces de seis plantas de *L. leucocephala*, bacterias rizosféricas, de las cuales 5 plantas presentaron nódulos, evidenciando una relación simbiótica efectiva presente en Río Verde y Manglaralto; mientras que, las aisladas de La Libertad solo presentaron bacterias tipo PGPR en las rizosferas, acorde a lo descrito en la bibliografía científica consultada.
- Los aislados de bacterias UFC contabilizados en Río Verde fueron en mayor cantidad que Manglaralto, por lo que se concluye que en el primer sitio ocurre simbiosis efectiva y probablemente con un mayor aporte a la fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Recomendaciones

- Realizar estudios que incluyan técnicas bioquímicas, genéticas y moleculares para una mayor aproximación a la identidad y tipificación de los posibles géneros aislados en esta investigación.
- Profundizar la investigación sobre la formación de nódulos y el efecto de abastecimiento de nutrientes en suelos con bajo índice de riego, nutrientes, entre otros.
- Realizar ensayos para determinar el uso potencial de estas cepas como bioinoculantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barreto, L. A., 2006. *Leucaena Leucocephala en Venezuela*. [En línea] Available at: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/leucaena-leucocephala-en-venezuela-t26661.htm>
[Último acceso: 29 Julio 2022].
- Bécquer, C. J. & Prévost, D., 2014. Potencial de formación de nódulos en leguminosas forrajeras y de granos de rizobios, nativos de Sancti Spíritus, Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(3), pp. 301-307.
- Benites, J. R., 2016a. Leguminosas y plantas silvestres en la alimentación y la agricultura. *leisa revista de agroecología*, Junio.32(2).
- Benites, J. R., 2016b. Las leguminosas en la alimentación y en la fertilidad de los suelos. *leise revista de agroecología*, Junio, 32(2), pp. 5-7.
- Calvo, S., 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Dialnet*, Volumen 3, pp. 173-186.
- Casal, J., 2007. *Las plantas, entre el suelo y el cielo*. Buenos Aires: Eudeba.
- Catuto, A., 2013. *Efecto de inoculación de rhizobium en el crecimiento y nutrición de plántulas de soya, en la zona de Manglaralto, cantón Santa Elena*, Santa Elena: s.n.
- Caycedo, L., Corrales Ramírez, L. C. & Trujillo Suárez, D. M., 2021. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *NOVA*, 19(36).
- Córdova, S. y otros, 2011. Fijación biológica de nitrógeno por tres abáceas (Leguminosae) en suelos ácidos de Tabasco, México. *Revista de investigación y difusión científica agropecuaria*, 15(1), pp. 31-50.
- Crespo, L. D. R. & Julio, A. P., 2012. *Identificación y caracterización de Rhizobium nativo para la producción de biofertilizante en la provincia de Santa Elena*, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Cuadrado, B., Rubio, G. & Santos, W., 2009. Caracterización de cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana*, 38(1), pp. 78-104.

- Dago, Y. y otros, 2020. Uso potencial de *Leucaena leucocephala* Lam. (*leucaena*) presente en sistemas agroforestales de Pinar del Río. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(1), pp. 154-162.
- Durán, D., Rey, L., Sanchez-Cañizares, C. & Jorjin, B., 2013. *Biodiversity of Slow-Growing Rhizobia: The Genus Bradyrhizobium*. s.l.:s.n.
- Escalante, E. E., 2019. Uso y rendimiento de la leucaena (*Leucaena leucocephala*) en sistemas de producción animal venezolanos. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 16 Mayo, Volumen 7, pp. 407-409.
- Espinoza, D. y otros, 2016. Estudio bacteriano en úteros de vacas sacrificadas en el rastro municipal de Tulancingo, Hidalgo. *ABANICO VETERINARIO*, Enero-Abril, 6(1), pp. 22-28.
- Garabato, F., 2018. *Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas*, Montevideo: s.n.
- García, J., Labandera, C., Pastorini, D. & Curbelo, S., 2021. *Fijación de nitrógeno por leguminosas en la Estanzuela*. [En línea] Available at: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/8374/1/111219220807121938-p.13-18.pdf> [Último acceso: 27 Junio 2022].
- Guamán, F., Torres Gutiérrez, R., Granda Mora, K. & Nápoles García, M., 2016. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBIOS DE *Crotalaria* sp. EN EL SUR DE ECUADOR. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 37(1), pp. 40-47.
- Intriago Rodríguez, S. A., 2017. *Comportamiento morfoagronómico de variedades criollas y mejoradas de maní bajo condiciones de secano en la parroquia Boyacá*, Manabí: s.n.
- Junco, R. D. I. Á. & Rodríguez, C. M., 2001. *Cultivo y crecimiento de los microorganismos*. 1 ed. s.l.:Ciencias Médicas.
- Jurado, H., Fajardo Argoti, I. C. & Parreño Salas, J. J., 2021. *Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica*. 1 ed. San Juan de Pasto(Nariño): Universidad de Nariño.
- León, R., Bonifaz, N. & Gutiérrez, F., 2018. *Pastos y forrajes del Ecuador - Siembra y producción de pasturas*. Primera ed. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- LLamas, F. & Acedo, C., 2016. Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo.. *Ambiociencias*, Issue 14, pp. 5-18.

- López Tévez, L. & Torres, C., 2006. *Identificación, Argentina : Microbiología General-Carrera Farmacia* .
- Madigan, M. T. y otros, 2015. *Biología de los microorganismos*. 14 ed. Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Mateos, P. F., 2014. *Nutrición microbiana*, España: s.n.
- Medina, A., 2018. *Caracterización taxonómica y simbiótica de rizobios que nodulan Spartocytisus supranubius en el P. N. del Teide*, s.l.: s.n.
- Nodal, S., 2008. *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Olmedilla, B., Farré Rivira, R., Asencio Vegas, C. & Martín Pedrosa, M., 2010. Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad Dietética*, 10 Mayo, 2(14), pp. 72-76.
- Ormeño, E. & Zúñiga, D., 1998. Modificación Del Caldo Extracto De Levadura Manitol Para La producción a Mediana Escala De Inoculantes Para Leguminosas. *Revista Peruana De Biología*, 31 Diciembre, 5(2), pp. 83-89.
- Oyagata, E. A., 2021. *Efecto de cuatro especies de leguminosas sobre el aporte de N y manejo de arvenses entre hileras de durazno*, Quito: s.n.
- P.H. Graham, 1981. Algunos problemas de nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno en Phaseolus vulgaris L.: Una revisión. *Investigación de cultivos extensivos*, Volumen 4, pp. 93-112.
- Paredes, M. C., 2013. *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*, Argentina: s.n.
- Patiño Guiza, S. V., 2020. *El uso de la leucaena (leucaena leucocephala) y sus beneficios ambientales y económicos por su implementación en sistemas agroforestales y silvopastoriles en Colombia*, Colombia: s.n.
- Perdomo , C. & Barbazán, M., s.f. [En línea].
- Perdomo, C. & Barbazán, M., s.f. *Nitrógeno*. [En línea] Available at: <http://www.fagro.edu.uy/fertilidad/publica/Tomo%20N.pdf> [Último acceso: 27 Julio 2022].
- Pommeresche & Hansen, 2017. Examinando la actividad de los nódulos en raíces de leguminosas. *FERTILCROP*.
- Reyes, A., 2019. *Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) y su aporte en la nutrición mineral de tomate (Lycopersicon sculentum L.)*, Chillan: s.n.
- Rodríguez, C. & Zhurbenko, R., 2018. *Manual de medios de cultivos*. Cuarta ed. Cuba: s.n.

- Rodríguez, P. A. & Arenas, R., 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *DCMQ*, Abril-Junio.16(2).
- Rosas, J. C. & Bliss, F., 1986. Principios y prácticas para la conducción de ensayos sobre fijación de nitrógeno en condiciones de campo. Volumen 27, p. 18.
- Saldaña, J. M., 2017. Aislamiento e Identificación de Cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de Suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León. *Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, Enero-Junio. Issue 07.
- Soto, J. O., Borbor, G. C. & Borbor, V., 2013b. Identificación y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* en la Provincia de Santa Elena. *Revista Científica y Tecnológicas UPSE-CTU*, 1(1), p. 007.
- Soto, J. O., Ormeño Orrillo, E. & Zúñiga Dávila, D., 2021a. 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*, 05 04, Volumen 92, p. 923426.
- Torres Gutiérrez, R., 2009. *Incrementos de la fijación biológica del nitrógeno*. Santa Fe: El Cid Editor | apuntes.
- Urzúa, H., 2007. Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 32(2), pp. 133-150.
- Valenzuela, F., Casillas Hernández, R., Villalpando, E. & Vargas Albores, F., 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 18 Diciembre, 41(4), pp. 297-313.
- Wang, T., Martínez Romero, J. & López Lara, I., 2012. *Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas*, México: s.n.
- Zúñiga, D. E., 2012. *MANUAL DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA*. s.l.:Universidad Nacional Agraria la Molina.

ANEXOS

Cuadro 2. Promedio de bacterias encontradas en la rizosfera por diluciones.

MUESTRA	CÓDIGO	DILUCIONES	REPETICIONES	CONTEO	TOTAL COLONIAS	PROMEDIO
1	BS-1Lr0	10 ²	R1	202	808	872
			R2	234	936	
			R3	92	368	
		10 ³	R1	101	404	684
			R2	241	964	
			R3	97	388	
		10 ⁴	R1	107	428	634
			R2	44	176	
			R3	210	840	
		10 ⁵	R1	189	756	794
			R2	208	832	
			R3	102	408	
2	BS-2Ra05	10 ²	R1	121	484	488
			R2	123	492	
			R3	-	732	
		10 ³	R1	119	476	438
			R2	100	400	
			R3	46	184	
		10 ⁴	R1	107	428	427
			R2	108	432	
			R3	105	420	
		10 ⁵	R1	101	404	396
			R2	183	732	
			R3	97	388	
3	BS-2Rb09	10 ²	R1	189	756	686
			R2	-	808	
			R3	154	616	
		10 ³	R1	-	808	808
			R2	202	808	
			R3	143	572	
		10 ⁴	R1	65	260	265
			R2	56	224	
			R3	78	312	
		10 ⁵	R1	32	128	188
			R2	62	248	

			R3	201	804
			R2	49	196
			R3	46	184

Cuadro 2. Continúa

MUESTRA	CÓDIGO	DILUCIONES	REPETICIONES	CONTEO	TOTAL COLONIAS	PROMEDIO
4	BS-3R03	10^2	R1	393	1572	1883
			R2	471	1884	
			R3	548	2192	
		10^3	R1	78	312	251
			R2	59	236	
			R3	51	204	
		10^4	R1	100	400	409
			R2	80	320	
			R3	127	508	
		10^5	R1	54	216	263
			R2	84	336	
			R3	59	236	
5	BS-4Ma09	10^2	R1	-	748	748
			R2	94	376	
			R3	187	748	
		10^3	R1	47	188	186
			R2	24	96	
			R3	46	184	
		10^4	R1	103	412	45
			R2	47	188	
			R3	43	172	
		10^5	R1	58	232	225
			R2	71	284	
			R3	40	160	
6	BS-4Mb19	10^2	R1	5	20	116
			R2	39	156	
			R3	19	76	
		10^3	R1	59	236	213
			R2	42	168	
			R3	-	236	
		10^4	R1	-	236	200
			R2	22	88	
			R3	41	164	
		10^5	R1	-	236	205
			R2	49	196	
			R3	46	184	

Cuadro 3. Promedio de bacterias encontradas en el interior de los nódulos en los sitios muestreados.

SITIO	CÓDIGO	Nº NÓDULOS	PP REDONDEADO	P. GENERAL
RÍO VERDE	BS-2Ra05	1	179,11	146,48
		2		
		3		
		4		
		5		
	BS-2Rb09	1	148,34	
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
	BS-3R03	1	112	
		2		
3				
MANGLARALTO	BS-4Ma09	1	110,93	115,38
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
		8		
		9		
	BS-4Mb19	1	119,83	
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
		8		
		9		
		10		
		11		
		12		
		13		
		14		
		15		
		16		
		17		

		18	
		19	

Cuadro 4. Promedio de bacterias en el exterior e interior de los nódulos.

SITIO	RIZOSFERA	INTERIOR DE LOS NÓDULOS
Rio Verde	645	146,48
Manglaralto	243	115,38



Figura 1A. Recolección de muestras.



Figura 2A. Raíz noduladas de la *Leucaena leucocephala*.



Figura 3A. Separación de nódulos para toma de datos.



Figura 4A. Procesamiento de los nódulos para obtener el conteo de la presencia de bacteriana en la rizosfera.

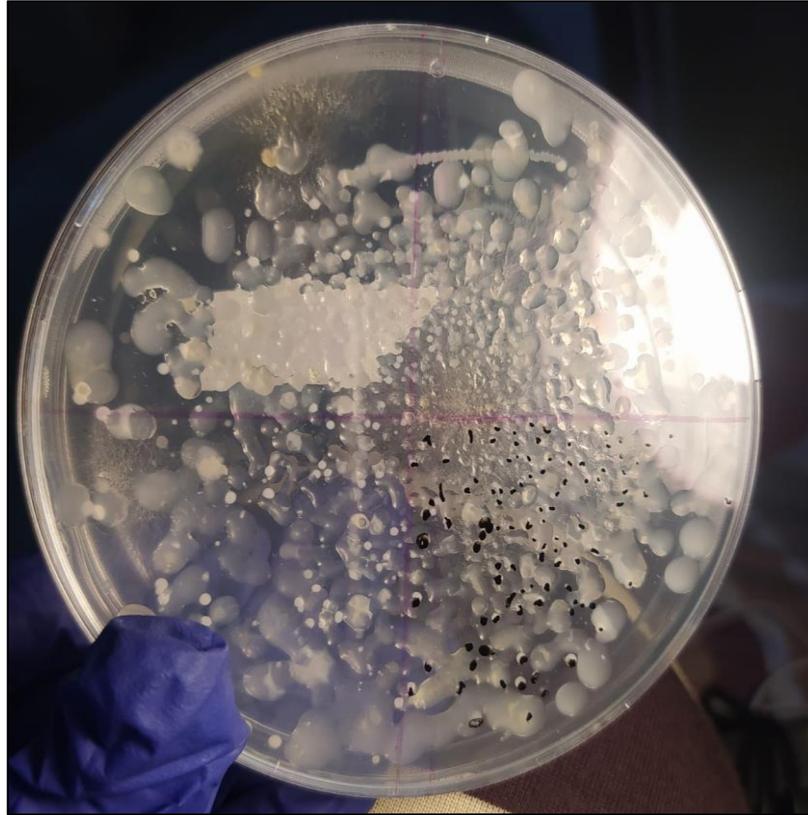


Figura 5A. Conteo de colonias-Rizosfera.



Figura 6A. Protocolos de desinfección.

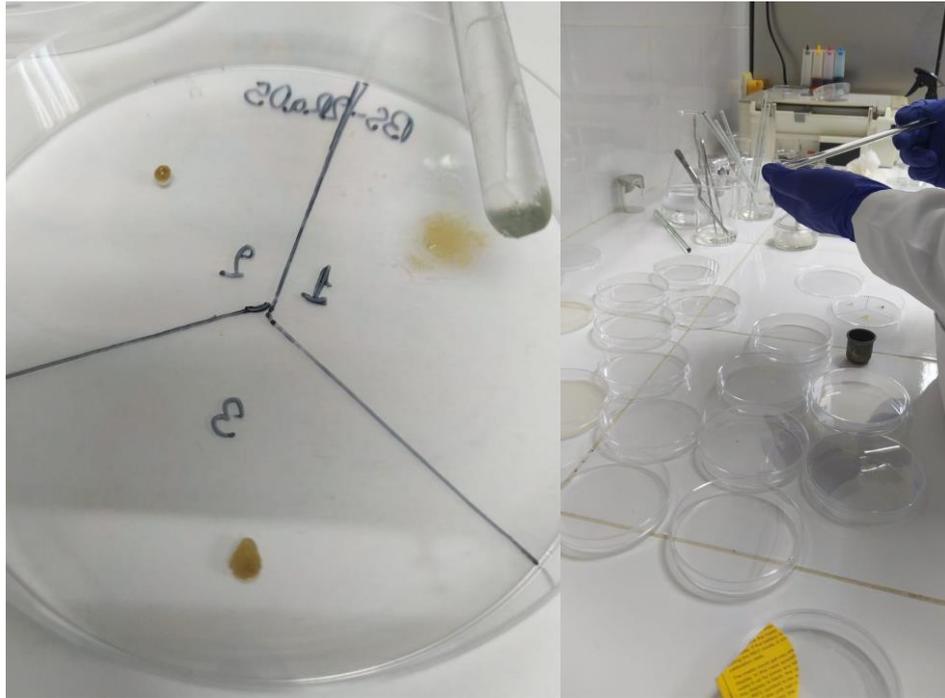


Figura 7A. Maceración y sembrado de nódulos en medio LMA.



Figura 8A. Preparación de medio LMA.