

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS ICA L9 E ICA J96, DE BACTERIAS
SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y PRUEBAS DE
ESTABILIDAD DE INOCULANTES ELABORADOS PARA CULTIVOS DE
ARVEJA Y SOYA**



Pontificia Universidad Javeriana

LINA MARGARITA MORENO CONN

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar el título de

Master en Ciencias Biológicas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ, D.C. 2010

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1996

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral Católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS ICA L9 E ICA J96, DE BACTERIAS
SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y PRUEBAS DE
ESTABILIDAD DE INOCULANTES ELABORADOS PARA CULTIVOS DE
ARVEJA Y SOYA**



Pontificia Universidad Javeriana
LINA MARGARITA MORENO CONN

APROBADO

Margarita Ramírez Gómez MPhil

Directora

Marcela Franco Correa PhD

Codirectora

BOGOTÁ, D.C. 2010

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS ICA L9 E ICA J96, DE BACTERIAS
SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y PRUEBAS DE
ESTABILIDAD DE INOCULANTES ELABORADOS PARA CULTIVOS DL
ARVEJA Y SOYA**



Pontificia Universidad Javeriana

LINA MARGARITA MORENO CONN

APROBADO

Gabriel Roveda Hoyos MPhil

Jurado

Lucía Ana Díaz MSc

Jurado

Claudia Cristina Rojas MSc

Jurado

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS ICA L9 E ICA J96, DE BACTERIAS
SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y PRUEBAS DE
ESTABILIDAD DE INOCULANTES ELABORADOS PARA CULTIVOS DE
ARVEJA Y SOYA**



Pontificia Universidad Javeriana

LINA MARGARITA MORENO CONN

APROBADO

Ingrid Shuler

Decana Académica

Manuel A. Franco

Director Postgrado

DEDICATORIA

A DIOS PORQUE SIEMPRE ESTÁ A MI LADO, POR GUIARME Y PERMITIRME SEGUIR ADELANTE CUMPLIENDO MIS SUEÑOS VENCiendo CUALQUIER CIRCUNSTANCIA DESFAVORABLE

A MI MAMÁ, MI TÍA CANDE Y MI TÍO CESAR, POR SER INCONDICIONALES Y POR EL APOYO BRINDADO, SIEMPRE PENSANDO EN LOS MEJOR PARA MÍ

A MI ESPOSO, POR SER MI COMPAÑERO, MI CÓMPLICE, MI AMIGO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, QUIEN ME HA MOTIVADO A SEGUIR ADELANTE SURGIENDO COMO PERSONA Y COMO PROFESIONAL

A MACA Y ANDRÉS POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO, BRINDÁNDOME LA COMPAÑÍA INCONDICIONAL EN LOS DÍAS EN QUE ME DEDIQUÉ A ESCRIBIR ESTE DOCUMENTO

A LOS DOS ANGELITOS QUE TENGO EN EL CIELO, SÉ QUE DESDE ARRIBA ME CUIDAN Y ME PROTEGEN

A TODOS ELLOS, LOS AMO CON MI CORAZÓN

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Margarita por su apoyo incondicional, por ser mi jefe y amiga, quien con su experiencia me aportó muchos conocimientos en el campo de la microbiología de suelos.

A la Doctora Marcela Franco Correa, por su asesoría y colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Doctor Gabriel Roveda Hoyos, por su apoyo, colaboración y amistad.

A mis amigos Adrian Pérez y Yolanda Castro, por apoyarme en los muestreos y por estar conmigo en los momentos en que necesité de su compañía y comprensión.

A Nancy Sánchez por darme una mano siempre que la necesité.

A Linda Gómez y Sonia Rodríguez, del Laboratorio de Microbiología Molecular de Corpoica, por regalarme momentos muy valiosos de su tiempo, para colaborarme y asesorarme en la parte molecular.

A todos aquellos que de una u otra forma, aportaron un granito de arena para la consecución de este trabajo.....Gracias.

A mi familia, por ser la razón de mí existir.....!!!!

TABLA DE CONTENIDO

<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</i>	1
1. <i>OBJETIVOS</i>	5
1.1. Objetivo General	5
1.2. Objetivos específicos.....	5
2. <i>MARCO TEÓRICO</i>	6
2.1. La arveja (<i>Pisum sativum</i>).....	6
2.1.1. Taxonomía	6
2.1.2. Fisiología del cultivo	6
2.1.3. Requerimientos nutricionales del cultivo de la arveja	7
2.1.4. Descripción de la variedad arveja “Santa Isabel”	8
2.2. Importancia del cultivo de arveja	9
2.3. La soya (<i>Glycine max</i>).....	9
2.3.1. Taxonomía	9
2.3.2. Fisiología del cultivo	10
2.3.3. Requerimientos nutricionales del cultivo de soya	11
2.3.4. Descripción de la variedad “Superior 6” de soya	13
2.4. Importancia del cultivo de soya.....	13
2.5. Importancia del nitrógeno.....	15
2.6. Simbiosis Rizobios - Leguminosas	17
2.7. Proceso de nodulación.....	19
2.7.1. Funcionamiento de los nódulos	23
2.7.2. Tipos de nódulos.....	26
2.8. Taxonomía de los Rizobios	28
2.9. Características de los géneros Rhizobiaceas	29
2.9.1. Género <i>Bradyrhizobium</i>	29
2.9.2. Género <i>Rhizobium</i>	30
2.9.3. Género <i>Allorhizobium</i>	31
2.9.4. Género <i>Azorhizobium</i>	31
2.9.5. Género <i>Mesorhizobium</i>	32
2.9.6. Género <i>Sinorhizobium</i>	32
2.10. Caracterización de la familia Rhizobiaceae	33

2.11. Inoculantes elaborados con base en bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno.....	35
3. <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	37
3.1. Localización de la investigación	37
3.2. Material biológico	37
4. <i>METODOLOGÍA</i>	38
4.1. Identificación fenotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96	38
4.2. Prueba de acidez y alcalinidad de las cepas ICA L9 e ICA J96.....	38
4.3. Crecimiento de las cepas bajo diferentes valores de pH	38
4.4. Identificación bioquímica.....	39
4.5. Resistencia intrínseca a antibióticos.....	39
4.6. Identificación genotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96.....	40
4.6.1. Secuenciación de la región de ADN que codifica para el gen ARNr 16S. 40	
4.7. Curva de crecimiento de las cepas ICA L9 e ICA J96	42
4.8. Pruebas biológicas de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96.....	42
4.9. Reducción de acetileno.....	45
4.9.1. Preparación del acetileno.....	45
4.9.2. Determinación de la actividad nitrogenasa	45
5. <i>RESULTADOS Y DISCUSIONES</i>	47
5.1. Identificación fenotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96	47
5.2. Prueba de acidez y alcalinidad de las cepas ICA L9 e ICA J96.....	49
5.3. Crecimiento de las cepas bajo diferentes valores de pH	51
5.4. Identificación bioquímica.....	53
5.5. Resistencia intrínseca a antibióticos.....	55
5.6. Identificación genotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96.....	58
5.6.1. Secuenciación de la región de ADN que codifica para el gen ARNr 16S. 58	
5.7. Curva de crecimiento de las cepas ICA L9 e ICA J96	62
5.8 Pruebas biológicas de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96.....	66

5.8.1. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 sobre el pH y el porcentaje de humedad hasta los 180 días de evaluación.....	67
5.8.2. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 sobre el número de unidades formadoras de colonia hasta los 180 días de evaluación.....	70
5.8.3. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre la actividad biológica, evaluada en plantas de arveja	77
5.8.4. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre la actividad biológica, evaluada en plantas de soya	86
5.8.5. Determinación de porcentaje de nitrógeno foliar en las plantas de arveja y soya inoculadas con las cepas ICA L9 e ICA J96	94
5.9. Determinación de la actividad de la nitrogenasa.....	96
<i>Conclusiones</i>	100
<i>Recomendaciones</i>	102
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	103
<i>ANEXOS</i>	119

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Requerimientos nutricionales del cultivo de soya para la producción de 3 ton/ha.....	12
Tabla 2. Ciclos y temperaturas utilizadas para la amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S por medio de PCR.....	41
Tabla 3. Tratamientos evaluados sobre las plantas de arveja y soya	44
Tabla 4. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas ICA L9 e ICA J96 en medio LMA.....	47
Tabla 5. Descripción de la prueba de acidez y alcalinidad realizada a las cepas ICA L9 e ICA J96 en medio LMA con azul de bromotimol	49
Tabla 6. Resultados obtenidos a partir de la lectura de los Test API20 NE realizados a las cepas ICA L9 e ICA J96.....	54
Tabla 7. Comparación de las secuencias de la cepa ICA L9 e ICA J96, con las reportadas en las bases de datos del NCBI y CBS	60
Tabla 8. Parámetros cinéticos de la cepa ICA L9 e ICA J96.....	65
Tabla 9. Características fisicoquímicas de la turba Growing Mix utilizada para la elaboración de los inoculantes	66
Tabla 10. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes sobre el pH y el porcentaje de humedad a los 60 y 180 días de evaluación.....	67
Tabla 11. Control de calidad de la turba inoculada con las cepas ICA L9 e ICA J96; número de UFC/ml expresado en Log ₁₀	70
Tabla 12. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre el peso fresco de la parte aérea y radical en plantas de arveja.....	78
Tabla 13. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre el peso seco de la parte aérea y radical en plantas de arveja.....	79
Tabla 14. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre la longitud de la parte aérea, radical y número de nódulos en plantas de arveja.....	82

Tabla 15. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre el peso fresco de la parte aérea y radical en plantas de soya	87
Tabla 16. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre el peso seco de la parte aérea y radical en plantas de soya	88
Tabla 17. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre la longitud de la parte aérea, radical y número de nódulos en plantas de soya	90
Tabla 18. Porcentaje de nitrógeno foliar encontrado en plantas de arveja y soya, inoculadas con las cepas ICA L9 e ICA J96	94
Tabla 19. Actividad de la enzima nitrogenasa, determinada por medio de la técnica de reducción de acetileno (ARA) para inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 e ICA J96	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultados variables de rendimiento en plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9	8
Figura 2. Participación departamental en la producción nacional de Soya.....	14
Figura 3. Modelo esquemático de los Factores Nod; Rn: sitios de modificación; n: número variable de moléculas de N-acetilglucosamida.....	20
Figura 4. Establecimiento de la infección y formación de un nódulo en la raíz de una leguminosa	21
Figura 5. Nódulos efectivos formados en las raíces de soya.....	24
Figura 6. Nódulos efectivos formados en las raíces de arveja	24
Figura 7. Modelo esquemático de la formación de un nódulo determinado e indeterminado.....	28
Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa ICA L9 en el medio LMA.....	48
Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa ICA J96 en el medio LMA.....	48
Figura 10. Cepa ICA L9 (1a) e ICA J96 (1b) sembradas en el medio LMA suplementado con azul de bromotimol	50
Figura 11. Recuento de UFC/ml de las cepas ICA L9 e ICA J96 bajo diferentes condiciones de pH en el medio de cultivo LM	52
Figura 12. Cepa ICA J96 sembrada en medio de cultivo LMA con discos de antibióticos, halo de inhibición producido por Kanamicina y Estreptomina	57
Figura 13. Bandas observadas en el gel de agarosa al 2% de las cepas ICA L9 e ICA J96	59
Figura 14. Amplificación del gen ARNr 16S con los primers 27F-1544R en gel de agarosa TAE 1X al 2%; siembra con 1µl de muestra	59
Figura 15. Árbol filogenético empleando la metodología de Neighbour Joining; divergencias entre las secuencias amplificadas del gen ARNr 16S (1000 réplicas)...	61
Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa ICA L9 en medio de cultivo LM	63

Figura 17. Curva de crecimiento de la cepa ICA J96 en medio de cultivo LM	64
Figura 18. Tiempo (h) vs Absorbancia: ecuación regresión para la cepa ICA L9 tomando valores de absorbancia desde la hora 10 hasta la 40	64
Figura 19. Tiempo (h) vs Absorbancia: ecuación regresión para la cepa ICA J96 tomando valores de absorbancia desde la hora 22 hasta la 50	65
Figura 20. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA L9 a 4 ± 2 , 18 ± 3 y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ sobre el número de UFC/ml expresado en Log_{10} , hasta los 180 días de evaluación	72
Figura 21. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA J96 a 4 ± 2 , 18 ± 3 y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ sobre el número de UFC/ml expresado en Log_{10} , hasta los 180 días de evaluación	73
Figura 22. Longitud de la parte aérea de las plantas de arveja inoculada con la cepa ICA L9, testigo químico y absoluto	83
Figura 23. Longitud radical de las plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9 y testigo químico, comparadas con el testigo absoluto	83
Figura 24. Número de nódulos en las plantas de arveja inoculadas con productos almacenados durante 180 días a diferentes temperaturas	84
Figura 25. Nódulos efectivos encontrados en raíces de arveja	85
Figura 26. Longitud de la parte aérea y radical de las plantas de soya inoculadas con la cepa ICA J96	91
Figura 27. Número de nódulos en las plantas de soya inoculadas con productos almacenados durante 180 días a diferentes temperaturas	92
Figura 28. Actividad de la enzima nitrogenasa en plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9	97
Figura 29. Actividad de la enzima nitrogenasa en plantas de soya inoculadas con la cepa ICA J96	98

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Protocolo utilizado para la extracción de ADN de las cepas ICA L9 e ICA J96
- Anexo 2.** Preparación de la solución nutritiva de McClure e Israel
- Anexo 3.** Determinación de nitrógeno en tejido vegetal por el método de Kjeldahl
- Anexo 4.** Curva de calibración para la determinación de actividad reductora de acetileno (ARA) en bacterias simbióticas
- Anexo 5.** Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen 16S ARNr con el primer 27F de la cepa ICA L9
- Anexo 6.** Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen 16S ARNr con el primer 1544R de la cepa ICA J96

Resumen

Los biofertilizantes elaborados con base en bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (BFN), se emplean en cultivos de interés para el país como las leguminosas, constituyéndose en una alternativa para mejorar el rendimiento de los cultivos, a través del suministro de nitrógeno. El nitrógeno es un elemento importante para el desarrollo de las plantas, sin embargo, en el suelo se encuentra en formas poco disponibles para ellas, por lo que recurren a mecanismos de fijación biológica a través de microorganismos. La inoculación de BFN ha sido utilizada como opción para reducir la fertilización química nitrogenada. Para la elaboración de inoculantes con base en estos microorganismos, es indispensable conocer características fenotípicas y genotípicas de las cepas y estabilidad del inoculante durante el almacenamiento a diferentes temperaturas, con el fin de asegurar la vida útil del producto, su calidad y eficiencia. En este trabajo, se describieron características de las cepas ICA L9 e ICA J96, utilizadas en inoculantes para arveja y soya. Se observó que son bacterias Gram negativas, acidificaron el medio de cultivo y asimilaron como fuentes de carbono los azúcares D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, L-arginina y D-maltosa. La cepa ICA L9 mostró una alta sensibilidad a Kanamicina, Estreptomocina, Nitrofurantoina, Cloranfenicol y Ampicilina; la cepa ICA J96 mostró una alta resistencia frente a Ampicilina, Nitrofurantoina y Cloranfenicol. La identificación genética por medio de la secuenciación del gen ARNr 16S y la especificidad por el hospedero, permitió tener un acercamiento de su identificación hasta nivel de género; encontrándose con el empleo de la metodología utilizada que la cepa ICA L9 presenta una alta similaridad con bacterias del género *Rhizobium* sp y la cepa ICA J96 con *Sinorhizobium fredii*, género que ha sido descrito como hábil de asociarse simbióticamente con plantas de soya. Al evaluar la estabilidad de los inoculantes almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$, $18\pm 3^\circ\text{C}$ y $28\pm 2^\circ\text{C}$, se evidenció que la temperatura no afectó el número de rizobios después de 180 días de almacenamiento. El número de unidades formadoras de colonias por gramo fue superior a 10^8 , valor que garantiza la calidad del inoculante.

Palabras claves: Biofertilizantes, inoculante, bacterias fijadoras de nitrógeno, soya, arveja, *Rhizobium* sp, *Sinorhizobium fredii*

Abstract

The biofertilizer prepared from nitrogen-fixing bacteria (NFB), are used in crops of economical interest such as legumes, constituting an alternative to improve crop yields through the nutrient supply. Nitrogen is an important element for plant growth; however, in most of the cases, the availability of nitrogen in the soil is a limitant nutrient for the plant, so they turn of to mechanisms of biological fixation by microorganisms. NFB inoculation has been used as an alternative to reduce chemical nitrogen fertilization. For the development of inoculants based on these organisms, we need to know phenotypic and genotypic characteristics as well as the stability of the strains stored under different temperatures, in order to ensure shelf life, quality and efficiency of the biofertilizer. In this research, it was described the characteristics of the strains ICA L9 and ICA J96. They are used as biological inoculants in fertilization for peas and soybeans, respectively. It found that they are a Gram negative bacteria, which are able to acidified the culture medium and assimilated as carbon sources sugars D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, L-arginine and D-maltose. ICA L9 strain showed high sensitivity to kanamycin, streptomycin, nitrofurantoin, chloramphenicol and ampicillin antibiotics, in contrast, the ICA J96 strain showed high resistance to Ampicillin, Chloramphenicol and Nitrofurantoin. The genetic identification throughout sequencing the 16S rRNA gene as well as, the host specificity, allowed for an approach to gender showed that the strain L9 ICA can be a *Rhizobium* sp and ICA J96, a *Sinorhizobium fredii*, able to associate with soybean. In assessing the stability of inoculants stored at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $18\pm 3^{\circ}\text{C}$ and $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, it was evident that the temperature did not affect the number of rhizobia after 180 days of storage. The number of colony forming units per gram was 10^8 , this value guarantees the quality of inoculant.

Keywords: Biofertilizers, inoculant, nitrogen-fixing bacteria, soybeans, peas, *Rhizobium* sp, *Sinorhizobium fredii*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las leguminosas en Colombia, juegan un papel muy importante debido a que hacen parte primordial de los productos prioritarios de la canasta familiar y contribuyen al mejoramiento y sostenibilidad de los sistemas agropecuarios tropicales de climas cálido y frío, debido a la capacidad de aportar nitrógeno al suelo, ya sea como cobertura vegetal, o como cultivos de rotación en sistemas agroforestales. El nitrógeno lo pueden tomar las leguminosas mediante el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico en asociación con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, lo cual contribuye a una mejor producción de forrajes y frutos de alta calidad para pastoreo, conservación o consumo humano y animal (Ernst, 2004).

A nivel nacional, el cultivo de la arveja ocupa el segundo lugar en orden de importancia después del fríjol entre las leguminosas, con un área cosechada de 26795 hectáreas y una producción aproximada de 34310 toneladas (Agronet, 2007), con cultivos en 11 departamentos, entre ellos Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Tolima, en donde se concentra la mayor parte de esta producción, siendo por varios años el regulador de la economía de pequeños y medianos productores de zonas andinas. Este cultivo está destinado en un 95% al consumo directo humano y animal como grano rico en proteína y el 5% restante a la producción de arveja seca como semilla, constituyéndose en un alimento básico en la canasta familiar y su valor se refleja en el Índice de Precios al Consumidor (IPC) (Arjona, 1977; MADR, 2005; Buitrago *et al.*, 2006).

En el caso de la soya, Colombia ocupa el octavo lugar en superficie cosechada. Los primeros cultivos de soya datan de 1959 y hasta 1980 se concentró su producción en la región natural del valle del río Cauca. En la actualidad, el principal productor es el departamento del Meta ya que aporta cerca del 68,7% de la producción nacional con un área sembrada de aproximadamente 56700 ha, destinadas para la producción de aceite, harina de soya y como grano para su uso en la alimentación humana,

convirtiéndose en una alternativa nutricional por su alto contenido de proteína de excelente calidad (Gutiérrez & Forero, 2007).

La mayoría de los suelos colombianos cultivados con leguminosas presentan problemas de acidez y poca disponibilidad de nitrógeno para las plantas, esto se debe en parte a la escasa incorporación de materia orgánica y a las bajas tasas de mineralización y altas tasas de inmovilización de ésta, lo cual hace que el nitrógeno disponible se encuentre en cantidades pequeñas y sea de difícil asimilación por las plantas cultivadas. A este problema se suma el uso indiscriminado de fertilizantes químicos de síntesis que han alterado significativamente los constituyentes del suelo y con ello su equilibrio ecológico, modificando especialmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema (Reyes *et al.*, 2008).

Muchas leguminosas tienen la capacidad de asociarse de manera natural con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno del suelo, formando una estructura fundamental en la fijación biológica de nitrógeno (FBN₂) conocida como nódulo, órgano especializado en donde se lleva a cabo este proceso biológico. Esta asociación es de gran importancia tanto en la agricultura, como en ecosistemas naturales ya que conlleva a un aumento significativo del nitrógeno disponible para las plantas y es la principal forma de incorporar el nitrógeno atmosférico a los suelos (Ernst, 2004).

Con el fin de recuperar la fertilidad y sostenibilidad de los suelos cultivados con leguminosas en Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario ICA y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, han desarrollado productos biotecnológicos, elaborados con base en bacterias fijadoras de nitrógeno que han sido desarrollados como alternativa para reducir costos de producción, disminuir el uso y aplicación inadecuada de fertilizantes químicos y mejorar la nutrición de los cultivos. Lo anterior ha generado gran interés en el sector productivo agrícola por los beneficios obtenidos con su utilización y porque hace más efectiva la absorción de nitrógeno disponible en el suelo, ya que permite establecer

una asociación simbiótica con las plantas desde las primeras etapas de crecimiento del cultivo (Ernst, 2004).

El uso de los biofertilizantes es una alternativa viable ya que muchas de las bacterias se encuentran de forma natural en el suelo, establecen asociaciones simbióticas con diferentes especies de leguminosas y contribuyen a una fijación más eficiente del nitrógeno disponible, en niveles entre el 60 y el 80%, para ser utilizado por las plantas en su metabolismo (Munévar & Ramírez, 1990).

En los últimos años, los biofertilizantes se han convertido en una alternativa para mejorar el rendimiento de los cultivos a través de un mejor suministro de nutrientes en el medio ambiente favoreciendo el desarrollo de una agricultura ecológicamente sostenible, permitiendo una producción a bajo costo, amigable con el medio ambiente, garantizando la conservación del suelo respecto a su fertilidad y biodiversidad (Alfonso *et al.*, 2005).

Habitualmente las bacterias que habitan en la rizosfera son fijadoras de nitrógeno con propiedades benéficas para las plantas, logrando así una interacción bacteria-planta en donde se forma un sistema simbiótico en que la planta aporta carbono y la bacteria aporta fundamentalmente nutrientes como nitrógeno y en forma indirecta promueven la toma de fósforo, producen fitohormonas, vitaminas y sustancias antibacterianas capaces de mitigar el ataque por patógenos. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos logrados por los investigadores en estudiar la dinámica de crecimiento y desarrollo de los microorganismos en el suelo con potencial en biofertilizantes, es poco lo que se sabe debido a que se desconocen características básicas como crecimiento bajo diferentes condiciones de pH y rangos de temperaturas, resistencia intrínseca a antibióticos, especificidad por hospederos y el comportamiento bajo condiciones controladas de laboratorio, o en el suelo al estar expuestos a factores ambientales. Estos criterios de selección basados en las características de las cepas pueden asegurar la calidad y estabilidad de los inoculantes elaborados con base en bacterias fijadoras de nitrógeno (Reyes *et al.*, 2008; Munévar & Ramírez, 1990).

El objetivo del presente trabajo de investigación es fortalecer el conocimiento generado a partir de las cepas ICA L9 e ICA J96 de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la producción de biofertilizantes para arveja y soya, partiendo de la caracterización fenotípica y molecular. Así como evaluar el efecto de las temperaturas de almacenamiento sobre la viabilidad de las cepas, calidad de los biofertilizantes y observar la efectividad del producto en la FBN mediante ensayos biológicos en plantas de arveja y soya. La información generada en este trabajo de investigación permitirá potencializar el proceso de producción de inoculantes a gran escala, garantizando la inocuidad y calidad del producto.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

Caracterizar las cepas de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno ICA L9 e ICA J96 y realizar pruebas biológicas de los inoculantes elaborados con base en estas cepas, en plantas de arveja y soya.

1.2. Objetivos específicos

- Describir las características fenotípicas, bioquímicas y moleculares de las cepas ICA L9 e ICA J96.
- Evaluar la curva de crecimiento de las cepas ICA L9 e ICA J96.
- Evaluar la viabilidad de las cepas ICA L9 e ICA J96 en inoculantes almacenados a diferentes temperaturas durante 180 días de evaluación y la actividad biológica en plantas de arveja y soya.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La arveja (*Pisum sativum*)

2.1.1. Taxonomía

Pisum sativum es una leguminosa perteneciente a la división Magnoliophyta, familia de las *Fabaceae*, incluida dentro del género *Pisum* y especie *sativum*. Se caracteriza por ser una planta herbácea con una altura promedio de 90 cm. Presenta hojas paripinnadas, con 1 a 3 pares de folíolos que pueden ser elípticos o subortoculares, zarcillo terminal ramificado y estípulas semiamplexicaules grandes, mayores que los folíolos. Flores solitarias o inflorescencias con el estandarte y la quilla concoloradas (blancas, rosadas y lilas) y alas de color púrpura a blanquecinas. El fruto se encuentra en una vaina alargada de aproximadamente 7 cm con 5 a 10 semillas en promedio; las vainas pueden ser romas o puntudas y contener granos lisos (con gran contenido de almidón) o granos arrugados (dulces). Esta leguminosa se caracteriza por contener gran cantidad de carbohidratos y proteínas por unidad de peso, siendo una de las fuentes más importantes de sacarosa, aminoácidos, entre ellos lisina, constituyentes minerales (P-Fe) y vitaminas especialmente B1 (Faiguenbaum, 1993; FENALCE, 2009).

2.1.2. Fisiología del cultivo

Es un cultivo anual de ciclo corto, su mayor producción se obtiene en época seca tolerando baja humedad en el suelo, más no el encharcamiento; la máxima exigencia de agua se presenta en el periodo de floración y llenado de vainas. Sus requerimientos hídricos están alrededor de 300 a 400 mm por cosecha (Arjona, 1977). Es resistente al clima frío, razón por la cual se adapta bien en alturas entre 1500 y 2400 m; la temperatura óptima para este cultivo está comprendida entre 14 y 21°C, cuando se sobrepasan las temperaturas recomendadas se puede presentar aborto de flores, mientras que al presentarse temperaturas muy bajas, la vaina no crece lo suficiente (Galindo & Clavijo, 2009).

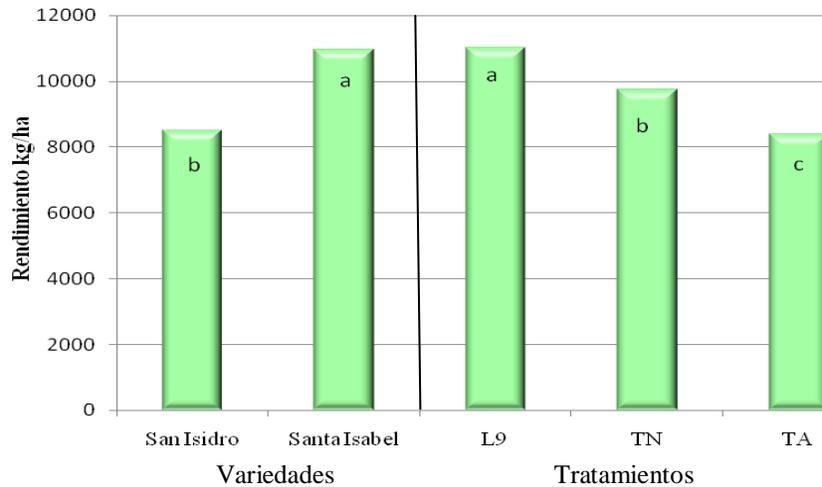
2.1.3. Requerimientos nutricionales del cultivo de la arveja

Los mayores limitantes en la producción de la arveja se ven reflejados en el incremento de costos de producción ya que este cultivo requiere de altas dosis de fertilizantes que suplan las necesidades nutricionales de las plantas, debido a la baja productividad de los suelos en que se establecen generalmente estos cultivos, con bajos contenidos de nitrógeno disponible, baja mineralización de la materia orgánica y a las altas tasas de pérdida de nitrógeno por lixiviación o volatilización. El nitrógeno es uno de los macronutrientes más importantes seguido del fósforo y potasio, ya que se estima que una cosecha de dos toneladas de grano de arveja por hectárea, extrae alrededor de 125 kg de nitrógeno, 30 kg de fósforo (P_2O_5) y 75 kg de potasio (K_2O).

Ensayos de investigación realizados por Ramírez *et al.* (2007), han presentado resultados interesantes empleando la inoculación de la cepa ICA L9 en dos variedades de arveja (San Isidro y Santa Isabel), un testigo con aplicación de fertilizante nitrogenado (TN: dosis 150 kg/ha) y un testigo absoluto (TA) no inoculado y sin aplicación de nitrógeno. Como resultado de estas pruebas los autores concluyeron que para todas las variables agronómicas evaluadas, el tratamiento inoculado con la cepa ICA L9 superó a los testigos con nitrógeno y absoluto (TN y TA). En cuanto al rendimiento, observaron una mayor producción de arveja (vaina + grano) en los tratamiento inoculados con la cepa ICA L9, siendo significativamente superior a los testigos, sustituyendo el 100% de la fertilización nitrogenada e incrementando el rendimiento (Figura 1).

Resultados obtenidos por Peñaranda (2004) muestran que plantas de arveja de la variedad “Santa Isabel” inoculadas con *Rhizobium* mantenidas bajo condiciones de invernadero, presentaron una mayor concentración de nutrientes tales como nitrógeno (N), potasio (K), magnesio (Mg), azufre (S) y calcio (Ca), en los tejidos aéreos de las plantas comparadas con los testigos sin inocular. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sieverding (1988) citados por Peñaranda (2004), en donde se han

encontrado mayores concentraciones de fósforo y magnesio en plantas inoculadas con *Rhizobium*, comparadas con los testigos sin inocular.



Tomado: Ramírez *et al.*, 2007

Letras diferentes representan diferencias significativas (Prueba Tukey $p < 0,05$)

Figura 1. Resultados variables de rendimiento en plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9

2.1.4. Descripción de la variedad arveja “Santa Isabel”

La arveja “Santa Isabel” es una planta herbácea anual con un ciclo de 60 días hasta el momento de la cosecha. Se adapta a alturas entre los 2200 y 3000 m, se puede cultivar en clima frío produciendo entre 900 y 1200 kg/ha por año, a partir de 60 a 80 kg/ha de semilla (Sánchez & Mosquera, 2006). Su óptimo desarrollo lo alcanza con precipitaciones entre 1200 y 2000 mm anuales y una temperatura media anual de 5 a 18°C. Es resistente a las heladas y es poco tolerante a la sequía; se desarrolla favorablemente en terrenos con pH neutro (≥ 6), suelos sueltos y aireados; por el contrario en suelos con texturas pesadas y mal drenados, puede afectar su desarrollo y por ende la producción (SEMICOL, 2009).

2.2. Importancia del cultivo de arveja

La arveja (*Pisum sativum*) es una planta originaria de Etiopía y Europa Mediterránea, siendo una de las leguminosas más antiguas, encontrándose referencias escritas de haber sido utilizada por pueblos neolíticos del Cercano Oriente (7000 a 6000 años AC). Su cultivo se expandió a regiones templadas y zonas altas de los trópicos de todo el mundo, siendo esta especie cultivada principalmente en Francia, España y Alemania, donde el 71% del área europea se dedica a dicho cultivo, alcanzando un área de 807000 ha cultivadas en el año 2006 (Buitrago *et al.*, 2006).

En Colombia, este cultivo ocupa el segundo lugar en orden de importancia después del frijol entre las leguminosas, con un área cosechada de 26795 ha y una producción aproximada de 34310 t, encontrándose en 11 departamentos, entre ellos Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Tolima, que concentran la mayor parte de la producción (Agronet, 2007). Este cultivo es destinado en un 95% al consumo directo humano y animal como grano rico en proteína y el 5% restante a la producción de arveja seca como semilla, constituyéndose en un alimento básico en la canasta familiar; su valor se refleja en el Índice de Precios al Consumidor (IPC) (MADR, 2005). Se cultiva también como leguminosa para uso como forrajes, destacándose como una fuente importante de sacarosa y aminoácidos, entre ellos lisina, con altos contenidos de minerales de hierro, fósforo y vitaminas, especialmente B1 (Forero, 2006).

2.3. La soya (*Glycine max*)

2.3.1. Taxonomía

Glycine max es una leguminosa perteneciente a la división Magnoliophyta, familia Fabaceae incluida dentro del género *Glycine*, procedente de la especie silvestre conocida como *Glycine ussuriensis*. Es una planta herbácea anual con un ciclo vegetativo que oscila entre 3 y 7 meses y 40 a 100 cm de envergadura. Tiene hojas compuestas trifoliadas con folíolos oval-lanceolados de color verde que se torna amarillo con la madurez del cultivo; el tallo es rígido y erecto con una altura promedio de 0,4 a 1,5 m dependiendo de la variedad y condiciones de cultivo. El

sistema radicular es fuerte, presentando una raíz principal que puede alcanzar hasta un 1 m de profundidad, aunque lo normal es que no sobrepase los 40-50 cm. Las flores son mariposadas de color blanquecino o púrpura dependiendo de la variedad; se encuentran en inflorescencias racimosas axilares con un número variable. El fruto es una vaina pubescente y dehiscente por ambas suturas, con una longitud aproximada de 2 a 7 cm; cada vaina puede contener de tres a cuatro semillas. La semilla generalmente es esférica de color amarillo con un tamaño mediano, rica en proteínas, aminoácidos (lisina y leucina) y aceites (Valencia, 2003).

2.3.2. Fisiología del cultivo

La temperatura óptima para el desarrollo del cultivo de soya está comprendida entre los 20 y 30°C, siendo las temperaturas próximas a 30°C las ideales para su desarrollo. El crecimiento vegetativo de las plantas es pobre o casi nulo bajo condiciones de temperaturas próximas o inferiores a 10°C, con fuertes reducciones en crecimiento por debajo de los 4°C. Sin embargo, este cultivo puede llegar a resistir heladas de -2 a -4°C sin morir. Por otra parte, temperaturas superiores a los 40°C pueden provocar un efecto no deseado sobre la velocidad de crecimiento, causando daños en la floración y disminuyendo la capacidad de retención de las flores y vainas. Las variedades de soya, en general son sensibles a la duración del día, por ser plantas de zona templada, es decir que para la floración, se hacen indispensables unas determinadas horas de luz. Sin embargo, mediante métodos de mejoramiento se han producido variedades que no son sensibles al fotoperíodo. Durante el ciclo del cultivo se necesitan al menos 300 mm de agua que pueden ser en forma de riego, cuando se trata de regadío, o bien en forma de lluvia en aquellas zonas templadas húmedas donde las precipitaciones son suficientes. El cultivo se desarrolla favorablemente en suelos neutros o ligeramente ácidos, con un pH cercano a 6. Es sensible a los encharcamientos del terreno. Sin embargo, es una planta que requiere mucha agua, por lo que en los terrenos arenosos debe regarse con frecuencia (Valencia, 2003).

2.3.3. Requerimientos nutricionales del cultivo de soya

La soya requiere diferentes nutrientes durante su ciclo de desarrollo, entre ellos nitrógeno, potasio, calcio, fósforo y azufre, indispensables para obtener altas producciones y buena calidad del grano, considerándose como uno de los cultivos que más extraen nutrientes en comparación con otras especies anuales (Guerrero, 1993).

Los macronutrientes requeridos por el cultivo de la soya varían dependiendo del estado fenológico del cultivo. Cerca del 50% del nitrógeno total necesario para las plantas es absorbido entre la floración (25 a 35 días) y llenado de vainas (85 a 90 días después de la emergencia). Sin embargo, la exigencia de nitrógeno diaria de esta leguminosa, es dependiente de su índice de crecimiento y la etapa del desarrollo. Las principales fuentes de nitrógeno para la soya provienen del suelo cuando no establece asociación simbiótica y del N₂ atmosférico, obtenido mediante el proceso de fijación biológica del nitrógeno (FBN) (George & Singleton, 1992). La proporción de este elemento absorbido mediante este proceso puede estar entre un 25% y 100%, donde intervienen condiciones del suelo, clima, manejo, variedad y aplicación de nitrógeno inorgánico por medio de fertilizantes químicos, pero bajo condiciones de simbiosis eficiente puede tomar el 100% del nitrógeno (Salamanca & Baquero, 2006).

Para el caso de fósforo y potasio, la absorción de estos elementos es lenta en la fase inicial del desarrollo del cultivo y se incrementa notoriamente a partir de la floración, hasta el llenado de los granos. Cerca del 75% del fósforo y 60% del potasio total encontrados en los tallos y hojas, se translocan a los granos, aproximadamente el 50% de los nutrientes presentes en las semillas provienen de tallos y hojas y el 5% de la absorción directa del suelo durante la formación y llenado de vainas (Guerrero, 1993) (Tabla 1).

Tabla 1. Requerimientos nutricionales del cultivo de soya para la producción de 3 ton/ha

Nutriente	Cantidad promedio (kg/ha)
N₂	220-275
P₂O₅	50-65
K₂O	120-150
Ca	60-70
Mg	15-25
S	15-20
Zn	3,0-4-5
Cu	1,0-1,5
B	0,44-0,66
Mo	0,40-0,60

Tomado: Guerrero, 1993

Investigaciones llevadas a cabo por el ICA y CORPOICA en diferentes regiones del país con el uso de biofertilizantes elaborados con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* en el cultivo de soya, han demostrado que existe una estrecha asociación de estos microorganismos con esta leguminosa y esto se ve reflejado en los rendimientos del cultivo y concentración de nutrientes, especialmente el nitrógeno presente en las plantas (Ramírez & Munévar, 1987).

Así mismo, el uso de biofertilizantes en variedades de soya de ciclo corto, es importante ya que garantiza la simbiosis desde las primeras etapas del cultivo, obteniendo un mayor beneficio en la FBN y la disminución parcial o total de la fertilización química mediante la sustitución de 150 kg de N/ha (Valencia, 2003). El uso de biofertilizantes ha sido una alternativa eficiente para contrarrestar los problemas que tienen los suelos de la altillanura, que es donde se cultiva la mayor cantidad de soya. Estos suelos se caracterizan por presentar bajos niveles de nitrógeno, calcio y fósforo, alta acidez y saturación de aluminio. La inoculación de la

soya con cepas eficientes de *Bradyrhizobium japonicum*, permite sustituir el 100% del fertilizante nitrogenado e incrementar hasta 1 ton/ha los rendimientos, con la respectiva reducción en los costos de producción. Adicionalmente, se ha observado que la eficiencia en la asociación depende de la variedad y las condiciones edafoclimáticas de la zona de producción, razón por la cual se han seleccionado diversas cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, dependiendo de la zona en la cual se va a producir el cultivo (Ramírez & Munévar, 1987, Munévar & Ramírez, 1990).

2.3.4. Descripción de la variedad “Superior 6” de soya

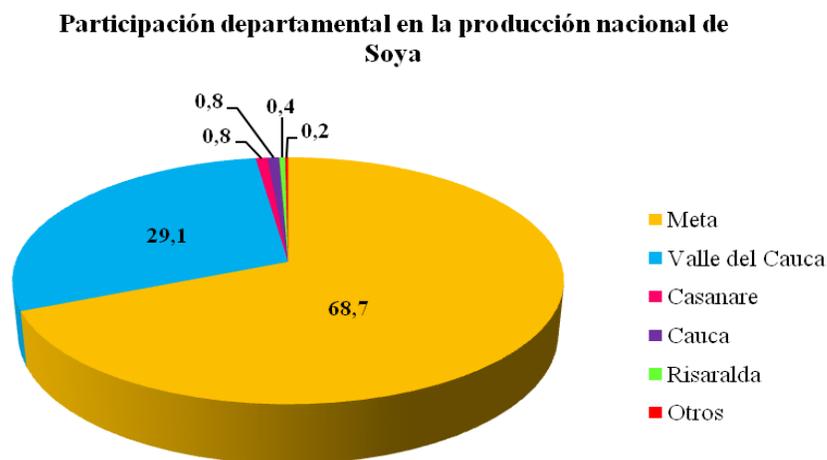
La variedad de soya “Corpoica Superior 6” fue desarrollada por CORPOICA en el C.I. La Libertad como alternativa genética para la Orinoquía colombiana, con adaptación a suelos de vega del piedemonte llanero y suelos mejorados de la altillanura, a altitudes entre los 150 y 1200 m. Esta variedad se originó a partir del cruce entre la línea 1426-1S generada a partir del cruzamiento simple entre Soyica P33 x Elta 01. El periodo vegetativo desde la floración hasta la madurez es de 78 días, la semilla es de color amarillo de forma ovoide con un hiliolum de color café, contiene un porcentaje de proteína entre el 36,2 y 40,8 y de aceite entre el 19,1 a 21,6%. Esta variedad tiene un hábito de crecimiento determinado con una altura de floración de 43 cm y una altura promedio de madurez de 70 cm; el color de la flor es púrpura y presenta un número aproximado de 30 vainas por planta con un promedio de 2,53 semillas (Valencia, 2006).

2.4. Importancia del cultivo de soya

La soya (*Glycine max*) es nativa del Este Asiático, probablemente originaria del norte y centro de China. Hacia el año 3000 AC los chinos ya consideraban a la soya como una de las cinco semillas sagradas. Su producción estuvo localizada en esa zona hasta después de la guerra chino-japonesa (1894-1895), época en que los japoneses comenzaron a importar tortas de aceite de soya para usarlas como fertilizantes. Las primeras semillas plantadas en Europa provenían de China y en el año 1765 se introdujo en América (Georgia, USA) proveniente de China; sin embargo hasta el año

1940 se promovió la gran expansión del cultivo en ese país, liderando la producción mundial de soya a partir de 1954 hasta la actualidad (Guerrero, 1993).

En Colombia el cultivo de la soya ocupa el octavo lugar en superficie cosechada y los primeros cultivos se iniciaron entre 1959 hasta 1980, concentrándose su producción en la región natural del valle del río Cauca (Valencia, 2005). En la actualidad, el principal productor es el departamento del Meta con una participación en la producción nacional del 68,7% (Figura 2) y un área sembrada de aproximadamente 56700 ha destinadas para la producción de aceite, harina de soya, grano para su uso en la alimentación humana o materia prima para la obtención de albúminas concentradas, convirtiéndose en una alternativa nutricional por su alto contenido de proteína de excelente calidad (Caicedo & Botero, 1999; Gutiérrez & Forero, 2007).



Tomado: Anuario estadístico del sector agropecuario, 2006

Figura 2. Participación departamental en la producción nacional de Soya

2.5. Importancia del nitrógeno

El nitrógeno en la naturaleza es de vital importancia para el desarrollo de las plantas y animales, este elemento hace parte de moléculas esenciales para la vida como los ácidos nucleicos (ADN y ARN), vitaminas y en las moléculas de almacenaje de energía; hace parte de aminoácidos, enzimas y coenzimas, base de glico y lipoproteínas que son constituyentes de todas las células vivas así como de la clorofila, interviniendo en la fotosíntesis, respiración, multiplicación y diferenciación celular. Si no hay suficiente nitrógeno disponible, habrá poca clorofila y así las plantas no utilizarán la luz del sol como fuente de energía para realizar las funciones esenciales entre las cuales está la absorción de nutrientes (Salisbury & Ross, 1992).

El nitrógeno atmosférico (N₂) es un elemento diatómico que se encuentra en forma libre (estado gaseoso) y en mayor abundancia en la atmósfera (78%). Sin embargo, la reserva activa de este nutriente se encuentra en el suelo, ya que allí se depositan los residuos y desechos orgánicos de los organismos vivos. En el suelo, este elemento es poco aprovechable para las plantas debido a que se encuentra en forma orgánica no disponible y la asimilación del nitrógeno atmosférico (N₂) es difícil como consecuencia del triple enlace formado entre los átomos, el cual es muy difícil de romper. La única manera de utilizar el nitrógeno de la atmósfera es mediante el rompimiento de este triple enlace por medio del complejo enzimático nitrogenasa que cataliza la reducción de N₂ en amoníaco (NH₃), un compuesto que los organismos sí son capaces de procesar metabólicamente o mediante la FBN (Pacheco *et al.*, 2002).

En la naturaleza existen microorganismos de vida libre o en simbiosis con plantas superiores capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico y reducirlo para formar compuestos de fácil asimilación como el amonio, rompiendo el triple enlace mediante la acción de la enzima nitrogenasa, contribuyendo a que se lleve a cabo el proceso de FBN (Fernández, 2003).

La reacción de la FBN es:



Los microorganismos de vida libre capaces de fijar nitrógeno deben generar su propia energía para realizar esta actividad, mientras que los organismos simbióticos usan los productos de la fotosíntesis de la planta para fijar el N_2 atmosférico por lo que es un proceso muy eficiente para la bacteria, siendo la FBN un proceso altamente costoso que requiere gran cantidad de energía para romper el triple enlace de la molécula de N_2 y lograr que se reduzca en dos moléculas de amoníaco. Para el establecimiento de la simbiosis, las bacterias llevan a cabo un proceso preliminar de reconocimiento planta-bacteria, que permite iniciar la infección en las raíces de la planta hospedera, dando como resultado la formación de una estructura especializada llamada NÓDULO, donde los bacteroides llevan a cabo el proceso de FBN. Este tipo de simbiosis es muy común entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas leguminosas (Mayz, 2004).

En suelos del trópico, el nitrógeno se encuentra en formas poco asimilables y es el factor limitante en la productividad de muchos cultivos. Para suplir la cantidad de este elemento en el suelo, los productores utilizan fertilizantes nitrogenados con el fin de mejorar los rendimientos de los cultivos, sin tener en cuenta los problemas ambientales que se generan con la aplicación. Dentro de la problemática que conlleva el uso indiscriminado de fertilizantes químicos se encuentran los elevados costos de producción y la contaminación ambiental generada por la lixiviación de los mismos a los mantos freáticos, contaminando las aguas subterráneas con acumulación de nitratos y nitritos (George & Singleton, 1992; Pacheco *et al.*, 2002).

En la actualidad, después de observar los efectos negativos de la implementación de la revolución verde, se han intentado cambiar, en el ámbito global, los paradigmas de la producción agrícola que implicaban el uso intensivo de energía, maquinaria y fertilizantes químicos, por un nuevo concepto: el de agricultura sostenible. Este nuevo esquema de agricultura sostenible busca trabajar como un sistema integrado de prácticas de producción vegetal que a largo plazo, además de satisfacer las necesidades humanas de fibra y alimentos, debe mejorar la calidad ambiental y la renovación de recursos naturales de los cuales depende la economía agrícola,

haciendo un uso eficiente de los recursos no renovables, manteniendo la viabilidad económica de las actividades agrícolas, aumentando la calidad de vida de los agricultores y de la sociedad como un todo (Jeffries & Barea, 2001 citado por Cuenca *et al.*, 2007).

Por tal razón, el uso de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno es una herramienta útil para promover una agricultura sostenible, como una alternativa para la biofertilización de cultivos de leguminosas y como aporte para el enriquecimiento de los suelos con la contribución de nitrógeno sin necesidad de la aplicación de fertilizantes químicos, cuyo costo es muy alto tanto económica como ambientalmente.

2.6. Simbiosis Rizobios - Leguminosas

La simbiosis es una relación biológica que se establece entre dos o más individuos que se encuentran en contacto directo, obteniendo un beneficio mutuo entre los partícipes de la asociación. Para el caso de la simbiosis Rizobios-leguminosa, son dos los organismos que intervienen en la relación y esta interacción puede verse influenciada por factores químicos, físicos, bióticos y abióticos en cada individuo por separado, así como en el complejo establecido entre ellos, determinando el éxito o fracaso de la simbiosis con el aprovechamiento o no de los beneficios mutuos que se deriven de dicha asociación (Moyano *et al.*, 2004).

Las leguminosas pertenecen a la familia Leguminosae con más de 700 géneros y más de 17000 especies incluyendo árboles, arbustos y especies herbáceas. A su vez se clasifican en tres subfamilias con base en el tipo de flor que presentan: Mimosoideae (*Mimosa*, *Acacia*), Cesalpinoideae (*Ceratonia*, *Cercis*, *Gleditsia*) y Papilionoideae (*Lupinus*, *Cicer*, *Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Phaseolus*, *Glycine*, *Arachis*, *Trifolium*, *Medicago*) (Universidad Politécnica de Valencia, 2009).

No todas las especies de leguminosas están facultadas para formar nódulos y tampoco se sabe cuántas pueden establecer simbiosis. Sin embargo, las observaciones realizadas en trabajos de investigación estiman que el 90% de las Papilionoideae y las

Mimosoideae pueden formar nódulos, pero solo el 30% de las Cesalpinoideae los poseen. Las leguminosas más conocidas por asociarse con bacterias simbióticas y fijar nitrógeno atmosférico son las que tienen valor agropecuario y alimenticio para el ser humano o para el ganado como el frijol, soya, chícharo o arveja, lenteja, haba, leucaena, mataratón, vicia y alfalfa. Muchas de ellas juegan un papel importante ya que además de hacer parte de la canasta familiar y servir de alimento para animales, contribuyen con el mejoramiento y sostenibilidad de los sistemas agropecuarios tropicales y subtropicales debido a su capacidad para aportar nitrógeno al suelo, como cobertura vegetal, cultivos de rotación o en sistemas agroforestales (Ernst, 2004).

Se estima que la asociación de rizobios con leguminosas contribuye entre el 60 y el 80% a la fijación biológica del nitrógeno, siendo una actividad llevada a cabo de forma natural, donde podemos encontrar varios géneros de microorganismos fijadores de nitrógeno. Sin embargo, esta asociación se origina preferencialmente si existe en el suelo un déficit de este elemento. Si hay suelos ricos en nitrógeno, las leguminosas prefieren utilizarlo independientemente de la presencia de las bacterias. Por el contrario, si la bacteria está presente y los niveles de nitrógeno en el suelo son bajos, la planta estimula el ingreso de los rizobios a la raíz para que lleven a cabo la FBN (Wang *et al.*, 1999b).

Son muchas las ventajas de esta asociación simbiótica: primero, la planta puede autoabastecerse del nitrógeno fijado por los bacteroides encontrados dentro de los nódulos, elevando de manera considerable su contenido de proteínas; así mismo, los bacteroides reciben de la planta toda la energía necesaria para su multiplicación. En caso de cultivos mixtos, puede proporcionar a la especie no leguminosa asociada, una cantidad importante de este nutriente, permitiendo a su vez dejar en el suelo nitrógeno disponible para la siguiente rotación siempre que se incorporen los residuos de cultivo, rastrojos o el abono verde y se mineralice este elemento. A pesar de estas indiscutibles ventajas, los rizobios no siempre se encuentran en el suelo, están en poblaciones relativamente bajas o si se encuentran presentes, muchas veces son de baja efectividad. Existe entonces la posibilidad de introducir estos microorganismos

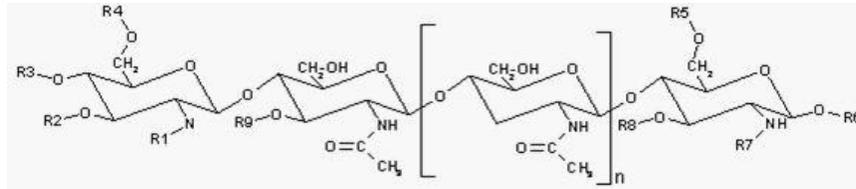
en el suelo a través de la inoculación y favorecer así la simbiosis. Adicionalmente, cabe destacar que inocular las semillas de leguminosas tiene un bajo costo para el productor, con un valor promedio estimado en sólo un 5% sobre el costo de la semilla (Urzúa, 2005).

2.7. Proceso de nodulación

El primer paso en el proceso de nodulación se caracteriza por la atracción y reconocimiento entre la leguminosa y las bacterias que se encuentran en la rizosfera. Este reconocimiento ocurre debido a los estímulos producidos por una serie de compuestos específicos exudados por la planta conocidos como flavonoides, dentro de los cuales se pueden encontrar cumarinas, isoflavonas, flavenoles y flavanonas, estos son derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona. Estas sustancias estimulan la multiplicación de la población bacteriana alrededor de las raíces y la adhesión a los pelos radicales, desencadenándose una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes (Fernández, 2003). Concentraciones bajas de flavonoides (10^{-10} - 10^{-7} M) provocan una quimiotaxis activa que permite que los rizobios se desplacen hacia la superficie radical, mientras que concentraciones mayores (10^{-12} M) inducen la expresión de los genes responsables de la nodulación (genes *nod*, *nol*, *noe*, *nin*). Estos se pueden localizar en plásmidos o islas simbióticas dentro del cromosoma y codifican los factores Nod que son excretados por las bacterias, induciendo el enroscamiento de los pelos de la raíz (curling), alcalinización del medio, entrada de Ca^{2+} a nivel del ápice del pelo radical, despolarización de la membrana e inducción de los genes *ENOD11* y *ENOD12* en la epidermis de la raíz (Ramos & Bisseling, 2004).

Los factores Nod están constituidos por una estructura básica que consiste en oligómeros de N-acetilglucosamida, unidos por un enlace β 1-4, con diversas sustituciones; al interactuar con la planta, los factores Nod estimulan la división de las células vegetales induciendo el enroscamiento de los pelos radiculares, dando lugar a las estructuras conocidas como nódulos y determinando la especificidad del hospedero (Figura 3) (Bordeleau & Prevost, 1994). El factor Nod está codificado por

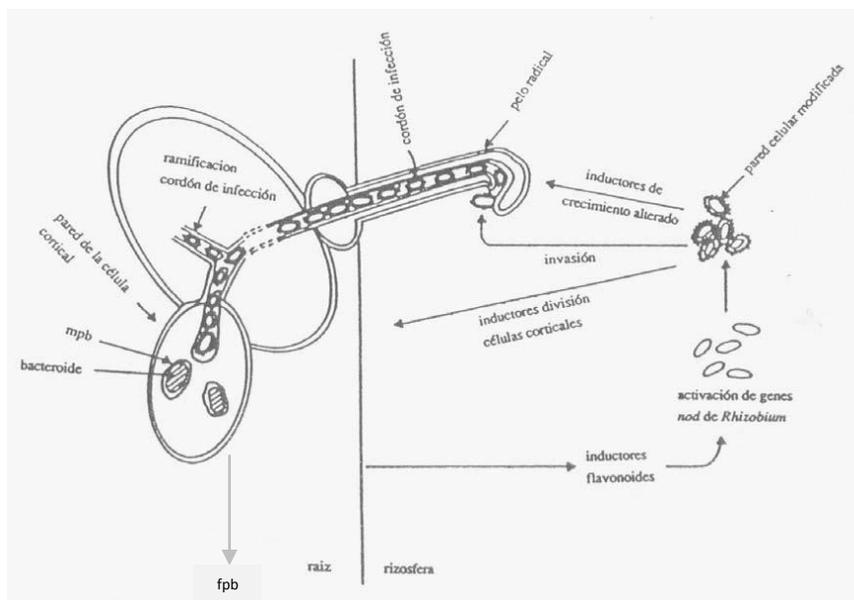
genes canónicos como el *nodA*, *nodB* y *nodC* presentes en los 6 géneros de rizobios; sin embargo, Giraud *et al.* (2007) demostraron que bacterias del género *Bradyrhizobium* no poseen los genes *nodABC*, por lo cual deben utilizar otros mecanismos de señalización con la planta; de ahí surgió la hipótesis de que la activación de los genes de nodulación podría estar influenciada por derivados de purinas (citosinas), implicados directamente en la formación de los nódulos.



Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos60/fijacion-biologica-nitrogeno/fi2.jpg>

Figura 3. Modelo esquemático de los Factores Nod; Rn: sitios de modificación; n: número variable de moléculas de N-acetilglucosamida

El segundo paso es la unión de los rizobios a los pelos radicales de la planta de manera polar. Este proceso de adhesión se ve favorecido por componentes bacterianos como ricadhesinas (proteína específica de adherencia), polisacáridos superficiales, microfibrillas de celulosa y lectinas vegetales capaces de unir complejos glucosídicos y por la activación de una serie de genes que promueven el proceso de nodulación. Una vez se ha dado la unión de los rizobios a los pelos radicales, se induce un cambio en la dirección de crecimiento apical, reordenamiento de microtúbulos, generándose una deformación y curvatura de los pelos radicales o “curling” donde quedan atrapadas las bacterias. Se forma un canal de infección por donde entran los rizobios al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar a la endocitosis; este se extiende desde la corteza de la raíz e infecta otras células vecinas incrementándose la división celular y dando lugar a la formación de estructuras especializadas conocidas como nódulos (Figura 4) (Carlson *et al.*, 1994).



Tomado: López y Lluch Plá, 1992

Figura 4. Establecimiento de la infección y formación de un nódulo en la raíz de una leguminosa

Las bacterias quedan separadas por una envoltura conocida como membrana peribacteroidal (MPB) derivada de la planta hospedera. Posteriormente se presenta una división continua y sincronizada de los rizobios rodeados de MPB y una vez ha cesado la división de los mismos, se transforman en unas estructuras ramificadas, hinchadas y deformes llamadas bacteroides. Entre la MPB y los bacteroides concurre un fluido peribacteroideo (FPB) que es el material soluble que mantiene en contacto la superficie de ambos, estableciendo una zona que permite la interacción y el intercambio de nutrientes. Los bacteroides quedan rodeados individualmente o en pequeños grupos por la MPB; a la estructura que contiene estos grupos de bacteroides se les conocen como simbiosomas y es dónde se da el intercambio de metabolitos entre planta y bacteria. Los bacteroides son multiformes, contienen reservas de polihidroxybutirato y polifosfato, pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que los Bacilos a partir de los que se desarrollan, y se pueden encontrar alrededor de 10000 bacteroides por célula vegetal dando inicio a la FBN (Fernández, 2003; De

Felipe *et al.*, 2006). El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Finalmente cuando el nódulo se deteriora, entran en estado de senescencia y las bacterias pasan nuevamente al suelo. La senescencia nodular (SN) está dada por un conjunto de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que son inducidos por el envejecimiento natural o cuando las plantas son sometidas a condiciones de estrés y puede variar entre los nódulos dependiendo de la localización en el sistema radical. Estos cambios pueden estar estrechamente relacionados con la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva de las plantas, así como las condiciones ambientales bajo las cuales se cultivan las leguminosas (Fujihara *et al.*, 2006).

En algunos casos, las formas bacteroidales que se integran al suelo luego de la SN no tienen la capacidad de división pero los nódulos contienen siempre algunos rizobios en estado de anabiosis o latencia. Estas formas proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo como saprófitos (Vance & Pladys, 1993).

En la FBN, los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para este proceso; los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, como el succinato, malato y fumarato, ácidos de cuatro carbonos. Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la generación de ATP y su transformación en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N_2 . Los productos de la fijación simbiótica de N_2 como el amoníaco (NH_4^+) son exportados desde los nódulos al resto de la planta (Puppo *et al.*, 2005); estos productos son transformados por acción de las enzimas glutamino sintetasa (GS), glutamina 2-oxiglutarato amino transferasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenada (GDH) en macromoléculas esenciales como proteínas y aminoácidos como la alanina para el crecimiento y desarrollo de las plantas (De Felipe *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 1998 citado por Allaway *et al.*, 2000). Muchas

leguminosas tropicales transportan los productos de la fijación de N₂ desde los nódulos a otras partes de las plantas en forma de ureidos como la alantoina y ácido alantoico. Los ureidos son compuestos que proceden de la sustitución de átomos de hidrógeno del grupo –NH= de la urea por radicales ácidos. Las leguminosas de zonas templadas generalmente transportan los productos de la FBN a las plantas en forma de amidas (Giller, 2001).

Los elementos genéticos bacterianos cuyos productos intervienen en la infección simbiótica y en el proceso de nodulación pueden estar localizados en plásmidos o megaplásmidos como es el caso de *Rhizobium* o en el cromosoma como en *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Los plásmidos que contiene la información para la asociación se conocen como plásmidos pSym y en ellos se encuentran los genes responsables de la nodulación; dentro de estos se pueden encontrar los genes canónicos *nodABC* que intervienen en la síntesis del factor Nod. Estos genes son conservados en todos los *Rhizobios* y pueden intercambiarse entre géneros y especie, y los genes *nod* específicos (*nodFE*, *nodH*, *nodQ*) los cuales no están necesariamente presentes en todos los *Rhizobios* y son los responsables de la especificidad del hospedero (Carlson *et al.*, 1994).

2.7.1. Funcionamiento de los nódulos

El nódulo comienza a fijar nitrógeno sólo cuando culmina el desarrollo de los bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo sintetizando sustancias importantes para la fijación de nitrógeno como la leghemoglobina que contiene hierro con capacidad de unirse al O₂ y proveer suficiente oxígeno para las funciones metabólicas del bacteroide, pero regula el nivel de oxígeno dentro del nódulo previniendo la acumulación de O₂ libre que inhibiría la actividad de la nitrogenasa. La leghemoglobina se localiza en el citosol de las células de la planta infectada por los bacteroides y es la que le proporciona el color rojo al interior de los nódulos funcionales indicando que se está fijando activamente el N₂ por acción de la enzima nitrogenasa y se consideran nódulos efectivos (Figura 5 y 6).



Figura 5. Nódulos efectivos formados en las raíces de soja



Figura 6. Nódulos efectivos formados en las raíces de arveja

La nitrogenasa es la enzima responsable de la ruptura de la molécula de N₂ a amoníaco, reduciendo de forma similar moléculas de cianuro, acetileno, ciclopropano y otros compuestos de triple enlace. Este complejo está constituido por dos ferrosulfoproteínas que se inactivan de forma irreversible en presencia de O₂, la Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa, componente II) es un dímero con una masa molecular de 62 kDa codificada por los genes *nifH* y la FeMo proteína (dinitrogenasa, componente I) es un tetrámero con una masa molecular de 220 kDa codificada por los genes *nifD* y *nifK*. Las dos pueden ser inactivadas por el O₂. Sin embargo, la Fe proteína es más sensible (T^{1/2} en aire= 30 a 45 segundos) que la FeMo proteína (T^{1/2} en aire= 10 minutos). En los nódulos formados en la raíz de las leguminosas, la planta crea una barrera física a la difusión del O₂ y el complejo planta bacteria crea estrategias fisiológicas y bioquímicas para proporcionar un ambiente casi de anoxia en el nódulo que permita que la enzima nitrogenasa actúe en la FBN pero a su vez mantener el oxígeno necesario para la multiplicación de los bacteroides, por medio de la leghemoglobina (Hill, 1988).

La FBN es dependiente del hierro (Fe), este nutriente es necesario para la iniciación de la nodulación, desarrollo de la bacteria dentro del nódulo y componente estructural de las enzimas nitrogenasa, hidrogenasa y leghemoglobina. La deficiencia de este elemento puede afectar la competitividad de los rizobios, previniendo el inicio de la formación de nódulos o bloqueando el desarrollo de los mismos, una vez están establecidos en las raíces de las plantas. Sin embargo, estudios han demostrado que cuando se presenta escases de Fe en el suelo, las bacterias formadoras de nódulos pueden producir sideróforos específicos o compuestos quelantes del tipo carboxilatos como las rizobactinas, hidroxamatos, catecoles, fenolatos, citrato y antranilato para atrapar los iones de Fe⁺ y transportarlos hasta la planta, estimulando su crecimiento y regulando la FBN. Estos compuestos no son más que metabolitos secundarios que aparecen en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano que además de captar Fe desempeñan un factor determinante en el biocontrol de patógenos fúngicos de la rizosfera. Los sideróforos suprimen enfermedades fúngicas por el acoplamiento del Fe, convirtiéndose en factor limitante para el crecimiento del hongo. También se ha

comprobado la capacidad que presentan varias cepas de rizobios de utilizar sideróforos exógenos tales como compuestos fúngicos ferricromo y ferroxiamina B para la captación de Fe (Reigh & O'Connell, 1993).

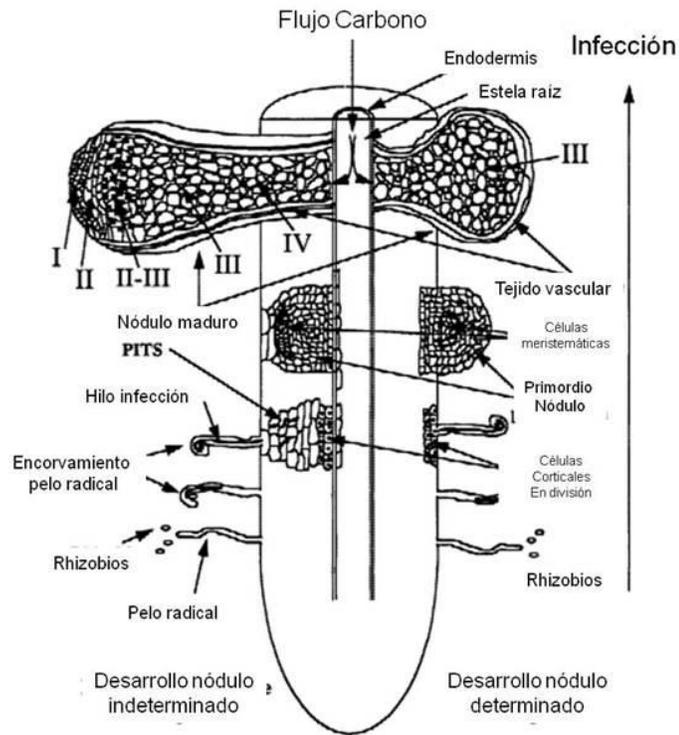
Además de fijar el nitrógeno, los nódulos juegan un papel importante en el intercambio de metabolitos entre los dos simbioses durante la simbiosis; dentro de estos podemos encontrar los compuestos carbonados aportados por la planta, nutrientes y compuestos nitrogenados procedentes del amonio fijado por la bacteria. El nitrógeno fijado biológicamente por los microorganismos se puede determinar por varios métodos, entre ellos podemos nombrar el método Kjeldahl, la técnica isotópica de incorporación de N^{15} que permite determinar la porción de nitrógeno en la planta que proviene del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera (Bergensen, 1980). Si se quiere evidenciar la actividad de la enzima nitrogenasa dentro de los nódulos, se puede determinar por medio de la reducción de acetileno (ARA) realizado por el complejo nitrogenasa presente exclusivamente en los microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos o asimbióticos. La aplicabilidad de esta técnica se basa en la reducción del acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) por acción de la nitrogenasa permitiendo verificar indirectamente la actividad de la enzima en el proceso de fijación. Dentro de las ventajas de esta técnica encontramos una alta sensibilidad, las muestras se analizan directamente en un camarógrafo de gases, sin necesidad de tratamientos químicos y con fácil manipulación manual (Lee & Watanabe, 1977).

2.7.2. Tipos de nódulos

La morfología de los nódulos formados en las raíces varía dependiendo de la leguminosa, del desarrollo del canal de infección en la presencia o no del meristemo apical, en la forma, en la organización histológica y anatómica, en la vía de asimilación de amonio y por tanto, en el tipo de metabolitos nitrogenados que exporta (Fernández, 2003). Con base en estas diferencias se pueden encontrar dos tipos que se conocen como: nódulos de crecimiento determinado e indeterminado (Rae *et al.*, 1992).

Los nódulos con crecimiento determinado se encuentran generalmente en leguminosas tropicales como *Glycine* sp, *Arachis* sp, *Phaseolus* sp, *Vigna* sp, *Lotus* sp; son nódulos temporales de estructura globular, el meristemo de crecimiento está ubicado de forma radial y una vez ha alcanzado su máximo desarrollo deja de crecer. Carecen de meristemo indeterminado y el tejido central contiene tanto células infectadas como no infectadas encontrándose en el mismo estado de desarrollo. Las células no infectadas están especializadas en el transporte de ureidos procedentes del nitrógeno fijado (Vasse *et al.*, 1990).

Los nódulos con crecimiento indeterminado se encuentran habitualmente en leguminosas de zona templada como *Lupinus* sp, *Vicia* sp, *Pisum* sp o *Medicago*. Presentan una forma alargada con un meristemo nodular que es persistente y un cordón de infección ancho. A lo largo del eje longitudinal del nódulo desde el ápice hasta su conexión con la raíz se identifican 4 zonas: (a) Zona I o zona meristemática donde se forman los tejidos del nódulo en desarrollo; (b) Zona II o zona de infección donde la bacteria sigue liberándose de los hilos de infección y la mitad de las células no están infectadas; (c) Zona III o zona simbiótica la cual está ocupada por bacteroides maduros donde se lleva a cabo la fijación activa de nitrógeno, aunque también se encuentran células bacterianas no infectivas cuyo papel es el soporte metabólico del proceso de fijación y (d) Zona IV o zona de senescencia la cual aparece con el envejecimiento del nódulo (Figura 7) (Crespi *et al.*, 2000; Vasse *et al.*, 1990; Timmers *et al.*, 2000).



Tomado: Crespi *et al.*, 2002

Figura 7. Modelo esquemático de la formación de un nódulo determinado e indeterminado

Una característica importante que sirve para diferenciar los nódulos indeterminados de los determinados es que estos estimulan la producción de polímeros de reserva de poli β -hidroxibutirato (PHB) los cuales juegan un papel importante en el metabolismo celular de la bacterias interviniendo en el proceso de infección, nodulación y fijación de nitrógeno (Trainer *et al.*, 2006).

2.8. Taxonomía de los Rizobios

Los rizobios son un grupo heterogéneo de bacterias que se encuentran en la rizosfera y pueden asociarse con raíces de plantas formando estructuras llamadas nódulos, cuya característica común es la habilidad para fijar nitrógeno atmosférico (diazotrofia) por medio de la enzima nitrogenasa. Algunos autores como Santillana *et al.* (2005), Boiero *et al.* (2007) y Kumari *et al.* (2009) han encontrado cepas de *Rhizobium* y

Bradyrhizobium capaces de promover el crecimiento vegetal (PGPR: acrónimo del inglés: “*Plant growth promoting rhizobacteria*”) mediante la producción de hormonas como el ácido 3 indol acético (AIA), giberelinas y citoquininas.

Estos microorganismos pertenecen al grupo de las α y β proteobacterias. Las α -proteobacterias se han dividido en cuatro familias: Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae y Bradyrhizobiaceae. Dentro de la familia Rhizobiaceae se encuentran seis géneros capaces de llevar a cabo el proceso de FBN; entre ellos: *Rhizobium* sp, *Sinorhizobium* sp, *Mesorhizobium* sp, *Bradyrhizobium* sp, *Azorhizobium* sp y *Allorhizobium* sp. (Wang *et al.*, 1999a; Bécquer, 2004). En el grupo de las β -proteobacterias se encuentran los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum* que también pueden fijar nitrógeno en nódulos (Lindstrom & Martínez-Romero, 2007; <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>).

Hasta la fecha, se han descrito más de 30 especies distribuidas en los seis géneros mencionados anteriormente; todos ellos se caracterizan por ser heterótrofos, aerobios obligados; microscópicamente tienen forma de bacilos, con pared celular con bajo porcentaje de peptidoglucano, característica que las incluye dentro del grupo de las bacterias Gram negativas; sus células tienen formas irregulares o pleomórficas (en forma de X o de Y, llamados bacteroides) dentro de los nódulos. Se ha reportado que los rizobios tienen tres diferentes estados de vida: uno dentro de los nódulos de las leguminosas, otro en el suelo y otro dentro de plantas no leguminosas como endófitos. Todos los rizobios pueden vivir muy bien como saprófitos en los suelos o en medios de cultivos. Sin embargo, existen algunas características distintivas entre los géneros (Bécquer, 2004).

2.9. Características de los géneros Rhizobiaceas

2.9.1. Género *Bradyrhizobium*

Estas bacterias son bacilos Gram negativos pleomórficos de 0.5-0.9 x 1.2-3.0 μm ; se desplazan por medio de un flagelo polar o subpolar. Las células bacterianas de este género se caracterizan por ser de lento crecimiento (5 a 7 días) con un tiempo de generación de 8 ó más horas después de su cultivo. Pueden formar colonias secas,

opacas, circulares, rara vez translúcidas, blancas y convexas con un diámetro menor a 1 mm entre 5 y 7 días de incubación. *Bradyrhizobium* es productor de álcali, lo cual puede estar relacionado con que las cepas de este género son generalmente más tolerantes a los suelos ácidos. Sin embargo, dentro de este género podemos encontrar cepas que acidifican el medio de cultivo, esta característica puede estar relacionada con la capacidad que tienen estos microorganismos para adaptarse a diferentes tipos de suelos donde se desarrollan las leguminosas con las que se asocian o por algún tipo de mutación que se presente a través del tiempo (Bécquer, 2009). Las tres especies definidas de este género son: *B. japonicum*, *B. elkanii* y *B. liaoningense* pueden nodular en raíces de plantas de soya (*Glycine max*) aunque se sabe que solo *B. japonicum* forma nódulos efectivos sobre la raíz de esta leguminosa (Bécquer, 2004; Trainer & Trevor, 2006). Algunos rizobios fotosintéticos capaces de formar nódulos en tallos de la leguminosa acuática *Aeschynomene* han sido identificados como miembros de *Bradyrhizobium*, cercanos o distintos a las especies descritas. Este género de bacterias se ubica como el linaje más antiguo, siendo el único que ha conservado la capacidad de fotosintetizar y fijar nitrógeno en condiciones de vida libre y en simbiosis, a diferencia de los otros géneros que solo pueden fijar nitrógeno en simbiosis, lo que sugiere que *Bradyrhizobium* podría ser el linaje más cercano a la forma ancestral (Molouba *et al.*, 1999).

2.9.2. Género *Rhizobium*

Son bacilos Gram negativos que miden entre 0.5-1.0 x 1.2-3.0 μm y se desplazan por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales (varios flagelos que rodean el perímetro de la célula) o subpolares. Las células bacterianas de este género se caracterizan por ser de crecimiento rápido (1 a 3 días) con un tiempo de generación entre 2 y 4 horas después de cultivadas, productor de ácido en el medio de cultivo y producción de abundante lipopolisacáridos extracelulares (Vincent, 1970).

Las colonias son blancas o color crema, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas. Generalmente miden de 2 a 4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en medio LMA (Levadura Manitol Agar) a una temperatura entre 25 y

30°C. Presentan crecimiento óptimo en pH entre 6,0 y 7,0; aunque se observa crecimiento de estas bacterias a pH entre 4,0 y 8,0. Son quimio-organotróficas y utilizan gran variedad de carbohidratos, ácidos orgánicos y algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Hay nueve especies definidas: *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huatlense*, *R. mongolense* y *R. tropici*. Este género nodula diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales (Bécquer, 2004). Algunas cepas de *Rhizobium* se han caracterizado por ser promotoras de crecimiento vegetal; *Rhizobium meliloti* es capaz de producir fitohormonas como el ácido- indol-acético (AIA); sin embargo, Schmidt *et al.* (1988) encontraron que aunque esta hormona no es capaz de promover el crecimiento vegetal por ser inactiva, si favorece el proceso de FBN mediante el incremento significativo en el número de nódulos en la raíz del huésped.

2.9.3. Género *Allorhizobium*

Son bacilos Gram negativos pleomórficos que miden entre 0.5-0.7 x 2.0-4.0 µm. Las células bacterianas pertenecientes a este género son de crecimiento rápido (1 a 3 días) productoras de ácido y polisacáridos extracelulares: las colonias tienen un diámetro entre 0.5–3.0 mm después de 1 a 2 días de incubación en el medio de cultivo LMA. Dentro de este género solo se ha descrito una especie *A. undicola* aislado de nódulos de la raíz de una planta acuática *Neptunia natans*, que crece en África. Esta bacteria nodula leguminosas como *Medicago sativa*, *Acacia Senegal*, *Acacia seyal*, *Acacia tortilis*, *Lotus arabicus* y *Faidherbia albida* (Kuykendall & Dazzo, 2003).

2.9.4. Género *Azorhizobium*

Son bacilos Gram negativos que miden entre 0.5-0.6 x 1.5-2.5 µm; se desplazan por medio de flagelos peritricos. Las células bacterianas son de crecimiento rápido (1 a 3 días) como *Rhizobium* sp pero a su vez producen álcali en el medio de cultivo como *Bradyrhizobium* sp. Las colonias generalmente son circulares, translúcidas, gomosas y presentan un color crema. Es capaz de fijar nitrógeno en vida libre bajo condiciones microaerofílicas requiriendo ácido nicotínico para esta fijación y en simbiosis con

plantas leguminosas. A diferencia de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* este género no asimila azúcares (excepto la glucosa); en cambio si puede asimilar alcoholes como el 1,2-propanodiol y 2,3-butanodiol. Es la rama más alejada del género *Rhizobium* y solo hay una sola especie descrita de este género *A. caulinodans* aislada de nódulos de raíces de *Sesbania rostrata*. Este género además de fijar nitrógeno biológicamente, promueve el crecimiento vegetal por medio de la producción de giberelinas (Wang *et al.*, 1999a; Bécquer, 2004).

2.9.5. Género *Mesorhizobium*

Las bacterias de este género son bacilos Gram negativos que miden entre 0.4-0.9 x 1.2-3.0 μm . Son de crecimiento intermedio (3-5 días); se desplazan por medio de flagelos peritricos o un flagelo polar o subpolar. Las colonias son circulares, convexas, semitranslúcidas y mucilaginosas. Presentan formas pleomórficas cuando se encuentran en condiciones adversas como altas concentraciones de sales y dentro de los nódulos. Son bacterias quimio-organotróficas que usan carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de carbono y energía produciendo ácido en el medio de cultivo LMA. Tiene la capacidad de asociarse con las raíces de diferentes leguminosas de regiones templadas, subtropicales y tropicales formando nódulos para la fijación biológica del nitrógeno (Wang *et al.*, 1999a). Este género se encuentra separado filogenéticamente de *Rhizobium* sp y *Bradyrhizobium* sp debido a su moderado crecimiento y a la producción de ácido bajo condiciones de cultivo. En la actualidad existen ocho especies capaces de formar simbiosis con leguminosas entre estas se encuentran: *M. loti*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum* y *M. tianshanense*.

2.9.6. Género *Sinorhizobium*

Las bacterias de este género son bacilos Gram negativos que miden entre 0.5-1.0 x 1.2-3.0 μm . Presentan un crecimiento rápido (1 a 3 días), contienen gránulos de poli- β -hidroxibutiratos y producen ácido en el medio de cultivo LMA con contenido de sales minerales y carbohidratos. En la actualidad existen ocho especies simbióticas dentro de este género *S. arboris*, *S. fredii*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medica*, *S.*

saheli, *S. terangae* y *S. xinjiangense*. Dentro de estas, *S. fredii* es capaz de nodular raíces de soya para fijar nitrógeno.

2.10. Caracterización de la familia Rhizobiaceae

Existen varios métodos usados para la identificación de cepas de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, dentro de los cuales se destacan la caracterización fenotípica y genotípica. Con la caracterización fenotípica se obtiene información básica como son características macro y microscópicas de las células bacterianas (forma, tamaño, color, consistencia), utilización de sustratos como fuentes de carbono mediante pruebas bioquímicas, tolerancia a diferentes pH y patrones de resistencia a antibióticos proporcionando una visión detallada de la variabilidad de las bacterias dentro de una especie o entre diferentes especies mediante el reconocimiento de rasgos característicos (Martins *et al.*, 2004).

Dentro de las características fenotípicas, la resistencia a antibióticos es uno de los aspectos más importantes en la fisiología de la célula bacteriana ya que dependiendo de su nivel de tolerancia o resistencia, el microorganismo es capaz de sobrevivir cuando existe una interacción antagonista con otras especies bajo condiciones naturales. Esta técnica ha sido usada en estudios con *Rhizobium* sp como alternativa para identificar cepas individuales o para el estudio ecológico de comunidades bacterianas en el suelo; este método también es usado para la evaluación de niveles de resistencia intrínseca a antibióticos en aislamientos frescos de cepas efectivas con el fin de determinar patrones de resistencia para evaluaciones ecológicas y para la selección de mutantes con resistencia adquirida a antibióticos en un medio específico (Davies, 1962; Ramírez, 1995).

La resistencia intrínseca a antibióticos ha sido usada para identificar cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *R. phaseoli* bajo condiciones de laboratorio e identificar inóculos de *R. phaseoli* bajo condiciones de campo así como para *R. leguminosarum* bv *trifolii* (Bordeleau & Prevost, 1982, Ramírez, 1995). Igualmente es una herramienta útil para estudios ecológicos como los realizados con *R. trifolii* y *Bradyrhizobium japonicum* en donde se demostró la utilidad de la resistencia múltiple

a antibióticos que actúan de manera similar sobre la célula. En la identificación de *Rhizobios* aislados directamente del suelo e incapaces de mantenerse en simbiosis con plantas y en experimentos de transferencia plasmídica en *R. leguminosarum* para identificar células somáticas recuperadas a partir de nódulos (DeJong *et al.*, 1982).

Investigaciones realizadas por Ramírez (1991), Reyes (1994) y Chica (1998) han resaltado la importancia del uso de resistencia intrínseca a antibióticos en la diferenciación de cepas de rizobios capaces de infectar un grupo de plantas o en control de calidad de inoculantes, agrupamiento de cepas de acuerdo a resistencia cualitativa y cuantitativa frente a antibióticos, siendo un método fácil, relativamente reproducible y de bajo costo.

Por otra parte, la caracterización genotípica de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno ha sido un proceso que ha tenido grandes avances a partir de la implementación de métodos de biología molecular lo cual ha ayudado a definir nuevos géneros y especies de rizobios. Cada especie bacteriana consta de un grupo de cepas que comparten características que las diferencian de otras especies bacterianas, así como su especificidad por un hospedero la cual está dada por la activación de genes específicos y por señales quimiotácticas que son intercambiadas entre el microorganismo y la planta (Vineusa *et al.*, 1998). El uso de técnicas de biología molecular ha proporcionado una descripción más precisa de los microorganismos en estudio, siendo el análisis de los genes ARNr 16S un criterio importante para la descripción de los géneros y especies de rizobios considerando que las cepas de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno cuyas secuencias del gen ARNr 16S son similares en un 97% o más, probablemente pertenezcan a la misma especie. Sin embargo, cuando las secuencias del gen ARNr 16S son muy similares, esta metodología no permite diferenciar especies cercanamente relacionadas lo cual ocurre debido a que este gen está muy conservado entre todos los organismos vivos procariotes (Wang *et al.*, 1999b).

Existen otros métodos empleados para el estudio de cepas de rizobios como es el caso de los perfiles de isoenzimas, plasmídicos y proteínas (Ramírez, 1995). Estas técnicas son utilizadas para estimar la diversidad genética y la estructura de poblaciones nativas de *Rhizobium* sp (Mohd Saud, 1990 citado por Ramírez, 1995).

2.11. Inoculantes elaborados con base en bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno

En la actualidad existen varios tipos de inoculantes obtenidos con base en bacterias diazotróficas referenciados como inoculantes líquidos e inoculantes con soporte sólido con presentaciones en polvo, granulado, líquido, en medios de agar. Sin embargo, el más común y ampliamente utilizado es el inoculante en polvo el cual es elaborado con un soporte en base a turba impregnada con un cultivo líquido mediante un proceso de fermentación. La turba es utilizada para estabilizar el número de bacterias y protegerlas durante el período de almacenamiento así como proveer mejor adhesión a la semilla (Drevon, 1995).

Para la elaboración de inoculantes con base en FBN de la familia Rhizobiaceae, se deben tener en cuenta algunos criterios como la selección de la cepa, la cual debe tener alta especificidad con el hospedero, debe ser infectiva (producción de nódulos en la raíz) y efectiva (fijación del nitrógeno), con un alto grado de competitividad con otras cepas, estable genéticamente, resistente a la acción de factores adversos del suelo como acidez, sequía, exceso de humedad, salinidad y pH. Antes de ser comercializado, el inoculante debe ser sometido a un control de calidad en el laboratorio con el objeto de determinar la viabilidad y el número de unidades formadoras de colonias de rizobios, el cual a nivel internacional se ha considerado que debe ser mayor a 1×10^8 UFC/g de soporte sólido ó 1×10^8 UFC/ml de medio de cultivo, en caso de inoculantes con formulación líquida, con el fin de garantizar el éxito de la inoculación. Adicionalmente, se debe garantizar que no contenga ningún microorganismo antagonista contaminante o patógeno para las plantas. Debido a que los inoculantes son productos biológicos con microorganismos vivos se deben tener en cuenta recomendaciones para su uso y almacenamiento con el objeto de garantizar

la vida útil del producto y la efectividad en la FBN. Es de anotar que existen formulaciones de inoculantes en los que tanto el cultivo como el soporte son sometidos a esterilización e inoculantes en que solo el medio de cultivo es esterilizado, pero el soporte no (Espinosa & Malpica, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de la investigación

El presente trabajo se llevó a cabo en CORPOICA, Centro de Investigación TIBAITATÁ en el laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB). El Centro de Investigación está ubicado en el kilómetro 14 de la carretera troncal de occidente, vía Mosquera (Cundinamarca – Colombia), a una altura de 2543 m; localizado geográficamente a 4°41'43'' de latitud norte y 74°12'30'' de latitud oeste.

3.2. Material biológico

Las cepas que se utilizaron en este trabajo de investigación fueron ICA L9 e ICA J96. La cepa ICA L9 nodula plantas de arveja (*Pisum sativum*) e ICA J96 nodula plantas de soya (*Glycine max*); estos microorganismos pertenecen al Banco de Germoplasma de Microorganismos con Potencial en Biofertilizante del Laboratorio de Microbiología de suelos de CORPOICA. La ICA L9 es proveniente de Australia y la ICA J96 de Brasil, cepas ampliamente utilizadas para la elaboración de inoculantes.

La turba Growin Mix utilizada para la preparación de los inoculantes proviene del centro de Investigación La Selva de Corpoica.

Para los ensayos de actividad biológica con los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96, se utilizaron semillas de arveja y soya previamente desinfectadas, de la variedad “Santa Isabel” y “Corpoica Superior 6” respectivamente, la semilla de soya fue obtenida en el Centro de Investigación La Libertad de CORPOICA.

4. METODOLOGÍA

4.1. Identificación fenotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96

Se realizó una descripción macroscópica y microscópica mediante la observación visual del color, diámetro y textura de las colonias así como la observación al microscopio en fresco y tinción de Gram con el objeto de observar la forma, tamaño y movilidad de las células bacterianas crecidas en el medio levadura-manitol agar (LMA) (g/l: 10g manitol; 0,5g extracto levadura; 0,2g de $MgSO_4$; 0,2g de K_2HPO_4 ; 0,1 de NaCl; 15g de Agar-agar; pH. 6,5-6,7) según la metodología propuesta por Vincent, (1970). Cada una de las cepas fue sembrada en cajas Petri con medio LMA con rojo congo (10ml/l) con el objeto de observar las características macroscópicas de las colonias según el Manual *Bergey's* (2005); se sembraron tres repeticiones por cepa.

4.2. Prueba de acidez y alcalinidad de las cepas ICA L9 e ICA J96

Con ayuda de una asa estéril se sembró un inóculo de cada una de las cepas en el medio LMA suplementado con azul de bromotimol (5ml/l). Las cajas Petri sembradas con los microorganismos se incubaron a una temperatura de $28\pm 2^\circ C$ en posición invertida durante 5 días. Con el objeto de verificar el cambio de color en el medio de cultivo se realizaron observaciones todos los días durante el tiempo de incubación.

4.3. Crecimiento de las cepas bajo diferentes valores de pH

Se inocularon las cepas ICA L9 e ICA J96 con un recuento inicial de 5×10^8 y 14×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC/ml) respectivamente, en erlenmeyers con 30 ml de medio de cultivo líquido levadura manitol (LM) (Vincent, 1970) utilizando diferentes pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 y 8,0. De cada cepa se sembraron dos repeticiones y se colocaron en agitación en un agitador orbital marca Termolyne a 120 rpm y temperatura de $28\pm 2^\circ C$ durante 5 días. Se utilizó un medio de cultivo LM con valor de pH 6,5 como control, ya que corresponde a las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos en el laboratorio. La observación del crecimiento se determinó desde las 24 hasta las 72 horas después de la incubación.

4.4. Identificación bioquímica

La evaluación de la actividad metabólica de cada una de las cepas se llevó a cabo mediante el empleo de la prueba API20NE (Biomérieux). Este test consta de 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación, ubicadas en una galería con 20 microtubos que contienen medios y/o sustratos en forma deshidratada. Para las pruebas convencionales se tomó de una a cuatro colonias aisladas de cada cepa y se resuspendieron en solución salina al 0,85% hasta obtener una suspensión bacteriana de turbidez igual al tubo 0,5 de McFarland. Esta suspensión bacteriana se inoculó en los pozos con cada prueba convencional, se almacenaron en cámaras húmedas y se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ entre 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, la lectura de las galerías se realizó teniendo en cuenta el cambio de color.

Para los ensayos de asimilación, el crecimiento bacteriano se observó mediante la turbidez en cada uno de los pozos inoculados con la suspensión. Estas pruebas mostraron la utilización o no de los diferentes sustratos por las cepas evaluadas.

4.5. Resistencia intrínseca a antibióticos

Se tomó una colonia pura de cada una de las cepas en estudio y se sembró en medio LM, se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ en un agitador horizontal marca Termolyne a 120 rpm. Después de crecido el microorganismo se sembró una alícuota de 0,1 ml en medio LMA, se distribuyó uniformemente en las cajas con ayuda de un rastrillo y se colocaron los discos de antibióticos de Kanamicina (30 μg), Estreptomycin (10 μg), Nitrofurantoina (300 μg), Cloranfenicol (30 μg) y Ampicilina (10 μg); para cada una de las cepas se sembraron tres réplicas y se incubaron en posición invertida a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. En cada caja se colocó un disco de cada antibiótico con el objeto de tener información comparativa sobre el crecimiento bacteriano bajo condiciones similares para todos los antibióticos evaluados.

El patrón de resistencia intrínseca fue determinado teniendo en cuenta la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano alrededor del disco y se midió el diámetro del halo de inhibición como indicativo de la sensibilidad de las cepas en presencia del antibiótico (Ramírez, 1995).

La escala que se tuvo en cuenta fue:

1. No crecimiento= No resistente.
2. Halo de inhibición de 5 mm de distancia del disco o mayor= Baja resistencia.
3. Halo de inhibición de 3 a 4 mm= Moderadamente resistente.
4. Halo de inhibición de 1 a 2 mm= Resistente.
5. No inhibición del crecimiento= Altamente resistente.

4.6. Identificación genotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96

4.6.1. Secuenciación de la región de ADN que codifica para el gen ARNr 16S

Se extrajo el ADN de cada una de las cepas siguiendo el protocolo de extracción con fenol-cloroformo descrito por Agrawal *et al.* (2009) (Ver anexo 1) y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro marca NanoDrop modelo ND-1000. Para la amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S se utilizaron primers universales 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1544R (5' AGAAAGGAGGTGATCCAG CC 3'). El ADN extraído de cada una de las cepas bajo estudio se utilizó para el montaje de la PCR; las reacciones de amplificación se realizaron con una concentración de 25µg utilizando las siguientes cantidades: Solución tampón 10X 15µl (Bioline), BSA 20X 3,0µl (Invitrogen), MgCl₂ 50nm 3,0µl (Bioline), dNTP's mix 10nm 3,0µl (Invitrogen), *Taq* DNA polimerasa 5u/µl 0,6µl (Bioline), primer 27F 3,0µl, primer 1544R 3,0µl, agua estéril grado molecular 113,4µl y ADN extraído 1µl. La PCR se corrió en un termociclador PTC100 MJ Research® Global Medical Instrumentation, Inc., Minnesota EU), bajo las condiciones presentadas en la tabla 2.

Tabla 2. Ciclos y temperaturas utilizadas para la amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S por medio de PCR

Ciclo	Temperatura/°C	Tiempo
1	94	2'
2	94	15''
3	46 (Anillamiento)	30''
4	72	1'
5	Repetición paso 2,3,4	10 veces
6	94	15''
7	51 (Anillamiento)	30''
8	72	2'
9	Repetición paso 6,7,8	20 veces
10	72	1'

Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE1X (Tris-borato-EDTA) teñido con SYBR Safe 10000x marca Invitrogen; se dejó correr a 55 voltios por tres horas. Se utilizó un marcador de peso molecular Boline ® Hyperladder IV 100 a 1000 pb para determinar el tamaño de las Bandas y el gel se observó en un transiluminador de UV, marca UVP® (UVP LLC - Upland, Canadá).

Los productos de la PCR se enviaron a un laboratorio particular de análisis molecular Corporación CORPOGEN, para su secuenciación; las secuencias obtenidas fueron alineadas usando el programa CLC Free Workbench 3.6 utilizando el software Clustal W. Las secuencias fueron comparadas con las bases de datos del GenBank (NCBI-CBS) usando el algoritmo BLAST; el análisis filogenético se realizó utilizando el paquete Mesquite y *Neighbor Joining* con 1000 repeticiones (*Phylogeny Inference Package V3.67*, U.Washington) (Pearson, 1988).

4.7. Curva de crecimiento de las cepas ICA L9 e ICA J96

Se observó la curva de crecimiento de cada una de las cepas por turbidimetría, determinando la absorbancia a 540nm a través del tiempo y conteo de células viables mediante el recuento en placa. Se sembró una colonia pura de cada una de las cepas en 100ml de medio LM, se incubó a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ en un agitador horizontal marca BIOLINE a 120 rpm durante la noche (ON) para obtener el preinóculo. Se preparó un medio de cultivo LM de 250ml el cual se inoculó con 2,5ml del preinóculo, correspondiente al 1% del volumen total del medio. El preinóculo de ICA L9 presentó un conteo inicial de 7×10^8 UFC/ml y para ICA J96, un conteo de 11×10^8 UFC/ml. Estas pruebas se realizaron por triplicado para cada una de las cepas en estudio y se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ en un agitador horizontal a 120 rpm. Se determinó la fase de adaptación y multiplicación (fase exponencial) de cada una de las cepas con un intervalo de dos horas, evaluando la turbidez del medio en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV a una longitud de onda de 540nm, hasta llegar a la fase estacionaria.

Paralelamente, se realizó el recuento en placa de las células viables de cada uno de los inóculos adicionando 1ml de la suspensión bacteriana en un tubo con 9ml de solución salina estéril al 0,85% (tubo 1), a partir de éste se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a 10^{-8} . De los tubos 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} se tomó una alícuota de 20 μl de cada una de las cepas y se sembró en cajas Petri con medio LMA con la técnica de microgota; para cada cepa se sembraron tres repeticiones por cada dilución (Romeiro, 2001). El uso de estas dos metodologías permite tener una correlación entre el número de colonias (células viables) y la densidad óptica del cultivo (Somasegaran & Hoben, 1985).

4.8. Pruebas biológicas de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96

Se prepararon inoculantes en bolsas de polietileno de alta densidad en presentación de 100g. Se pesaron 62,5g de turba Growing Mix y se les agregó 2,5g de CaCO_3 con el objeto de obtener un pH cercano a 7,0. La turba se esterilizó a 120°C , 15 libras de presión por 15 minutos durante tres días consecutivos y posteriormente se le adicionó

a cada una de las bolsas de polipropileno, 35 ml de medio de cultivo LM inoculado con cada una de las cepas evaluadas ICA L9 e ICA J96 en fase exponencial, con una concentración de 8×10^8 UFC/ml. Se prepararon dos lotes por cepa y se impregnaron 45 bolsas por lote para un total de 90 bolsas por cepa, las cuales se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días. Pasado el tiempo de incubación se verificó la pureza de los inoculantes y UFC/g tomando dos bolsas al azar de cada lote, utilizando el método de siembra de diluciones sucesivas en medio de cultivo LMA, LMA con rosa de bengala para determinación de hongos y agar topping para bacterias, de acuerdo con los protocolos establecidos en el manual de procedimientos técnicos para el control de calidad de inoculantes de Corpoica (Corpoica, 2007).

Los inoculantes se almacenaron a tres temperaturas: 4 ± 2 , 18 ± 3 y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por seis meses (180 días) durante los cuales se verificó la pureza, viabilidad y actividad biológica; los tiempos evaluados fueron:

- T₀: Inmediatamente después de la incubación
- T₁: 2 meses después de la incubación
- T₂: 4 meses después de la incubación
- T₃: 6 meses después de la inoculación

Para las pruebas biológicas de los inoculantes y con el fin de confirmar la eficiencia de los microorganismos inoculados, se establecieron ensayos bajo condiciones de invernadero. Las semillas de arveja y soya utilizadas se desinfectaron sumergiéndolas en etanol al 85% por 20 segundos, luego se pasaron a hipoclorito de sodio al 2% por dos minutos y finalmente se enjuagaron con suficiente agua destilada con el objeto de eliminar el exceso de las soluciones desinfectantes; se colocaron en cámara húmeda y se incubaron en oscuridad por 48 horas a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Corpoica, 2007).

Se prepararon vasos plásticos de 12 onzas con vermiculita estéril como sustrato inerte. Se aplicaron 80 ml de agua destilada a cada vaso para humedecer el sustrato y posteriormente se sembraron dos semillas de las leguminosas evaluadas en cada vaso. Las semillas de arveja se recubrieron con 5 g del inóculo/kg de semilla de la cepa ICA L9 previamente mezclado con una suspensión de sacarosa al 10%. Este

procedimiento igualmente fue empleado para las semillas de soya las cuales se recubrieron con el inóculo de la cepa ICA J96 y se llevaron a invernadero, por un periodo de dos meses para cada uno de los tiempos.

Los tratamientos evaluados se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos evaluados sobre las plantas de arveja y soya

TRATAMIENTOS ICA L9		
1. ICA L9 (Lote 1) 4±2°C	2. ICA L9 (Lote 1) 18±3°C	3. ICA L9 (Lote 1) 28±2°C
4. ICA L9 (Lote 2) 4±2°C	5. ICA L9 (Lote 2) 18±3°C	6. ICA L9 (Lote 2) 28±2°C
7. Testigo absoluto (Sin inocular)	8. Testigo absoluto (Sin inocular)	9. Testigo absoluto (Sin inocular)
10. Testigo nitrogenado (200 ppm N ₂)	11. Testigo nitrogenado (200 ppm N ₂)	12. Testigo nitrogenado (200 ppm N ₂)
TRATAMIENTOS ICA J96		
1. ICA J96 (Lote 1) 4±2°C	2. ICA J96 (Lote 1) 18 ± 2°C	3. ICA J96 (Lote 1) 28±2°C
4. ICA J96 (Lote 2) 4±2°C	5. ICA J96 (Lote 2) 18 ± 2°C	6. ICA J96 (Lote 2) 28±2°C
7. Testigo absoluto (Sin inocular)	8. Testigo absoluto (Sin inocular)	9. Testigo absoluto (Sin inocular)
10. Testigo nitrogenado (200 ppm N ₂)	11. Testigo nitrogenado (200 ppm N ₂)	12. Testigo nitrogenado (200 ppm N ₂)

Las plantas inoculadas con las cepas, mantenidas en invernadero bajo cubierta plástica, crecieron a una temperatura entre 10,9 y 32,9°C y una humedad relativa entre 50 y 70%; se regaron cada tres días con una solución nutritiva de McLeure e Israel, compuesta por micro y macronutrientes exceptuando el nitrógeno. Los testigos absolutos se regaron con agua y los testigos nitrogenados, con solución nutritiva de McLeure e Israel con adición de 200 ppm de nitrógeno inorgánico (KNO₃) (Ver

anexo 2). La cantidad de solución nutritiva tanto para las plantas inoculadas como los testigos nitrogenados fue de 1ml por vaso.

Los muestreos destructivos para cada uno de los tiempos se realizaron dos meses después de la siembra y se evaluaron las variables peso fresco de la parte aérea y radical, peso seco de la parte aérea y radical, longitud de la parte aérea y radical, número de nódulos y la prueba de reducción de acetileno. Se determinó el nitrógeno total extraído por las plantas utilizando el método de Kjeldahl (Ver anexo 3).

El diseño estadístico empleado para las pruebas biológicas fue de bloques completos al azar con cinco repeticiones por tratamiento por cada bloque. Se aplicó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple con el test de DUNCAN ($p < 0,05$) empleando el programa SAS 3.1, para la determinación de diferencias entre los tratamientos evaluados.

4.9. Reducción de acetileno

4.9.1. Preparación del acetileno

El acetileno utilizado para la prueba se produjo a partir de carburo de calcio añadiendo agua destilada en un recipiente, hasta la producción del gas del cual se tomaron alícuotas con ayuda de una jeringa para la inyección de las muestras (Corpoica, 2007).

4.9.2. Determinación de la actividad nitrogenasa

Inmediatamente después del muestreo de las plantas de arveja y soya, se tomó una raíz nodulada de una planta por cada tratamiento, se introdujeron en un recipiente de vidrio con una capacidad de 280 ml, al cual se le acondicionó un tapón de caucho, se cerró herméticamente y se le introdujo una aguja de jeringa para equilibrar la presión del frasco con la presión atmosférica. Se reemplazaron 28 ml de la atmósfera interna de los recipientes que contenían las muestras (10% v/v) por 28 ml de acetileno; las raíces noduladas se dejaron en incubación durante 1 hora. Pasado este tiempo, se tomó con ayuda de una jeringa de 10ml, una alícuota de 5ml de la mezcla de gases almacenada dentro de cada recipiente de vidrio a través del tapón de caucho y se

inyectó en un tubo al vacío (vacutainer). Para determinar el contenido de etileno y acetileno se tomó 1ml de muestra contenida en cada vacutainer y se inyectó en un cromatógrafo de gases marca Perkin-Elmer 3920B, con detector de llama FID, columna empacada Poropack R (malla 80/100) de 200cm de longitud y 0,2cm de sección e inyector manual. Los picos de etileno y acetileno se registraron en el cromatograma, cuantificando por altura de pico; finalmente se calculó el número de micromoles (μm) de etileno producidas en 1ml de muestra inyectada interpolando los datos en la ecuación de la curva patrón realizada para microorganismos simbióticos, con cinco concentraciones conocidas de etileno; donde $Y = 0,1456 X + 0,548$; $R^2 = 0,9971$ (Ver anexo 4) (Corpoica, 2007).

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Identificación fenotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96

La descripción fenotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96 se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas ICA L9 e ICA J96 en el medio LMA

Cepa	Descripción macroscópica y microscópica								
	TC	CC	DC	TR	EL	FC	FM	M	DM
ICA L9	R	C	3	T	C	R	P	P	Bacilos Gram negativos
ICA J96	M	C	1-2	T	C	R	P	P	Bacilos Gram negativos pequeños

TC-tiempo de crecimiento: R: rápido (1-3 días), M: medio (3-5 días); CC-color colonia (C: cremosa); DC-diámetro colonia (mm); TR-transparencia (T: translúcida); EL-elevación (C: convexa); FC-forma colonia (R: redonda); FM-formación de mucilago o exopolisacáridos (P: presente); M-movilidad en fresco (P: presente); DM-descripción microscópica.

Teniendo en cuenta las observaciones macroscópicas y microscópicas de las cepas ICA L9 e ICA J96, éstas podrían corresponder a los géneros de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* o *Sinorhizobium* ya que son capaces de asociarse, formar nódulos y fijar nitrógeno en raíces de arveja y soya, respectivamente; estas características son similares a las descritas por Wang (1999b) y Kuykendall *et al.* (2005) quienes describen a las bacterias del género *Rhizobium* y *Sinorhizobium* como Bacilos Gram negativos, presentan flagelos peritricos o subpolares que les permiten desplazarse con mayor facilidad en medio de cultivo LM, las colonias generalmente son de color crema o blancuzcas de forma circular con bordes regulares, el diámetro oscila entre 2 a 4 mm después de 48 horas de incubación a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, son de crecimiento rápido y producen abundante goma o acumulación de poli- β -hidroxibutirato y exopolisacáridos extracelulares (Figura 8).



Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa ICA L9 en el medio LMA

Las bacterias del género *Bradyrhizobium* se caracterizan por ser Bacilos Gram negativos pequeños, algunas veces pleomórficos dependiendo de la edad del cultivo; el tamaño de las colonias es menor a 1 mm después de 5 a 7 días de incubación. Las colonias pueden ser convexas, circulares o puntiformes con bordes regulares y gomosas; son de crecimiento lento y al igual que las bacterias del género *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, no producen ningún tipo de pigmento fluorescente difusible en el medio de cultivo (Figura 9).

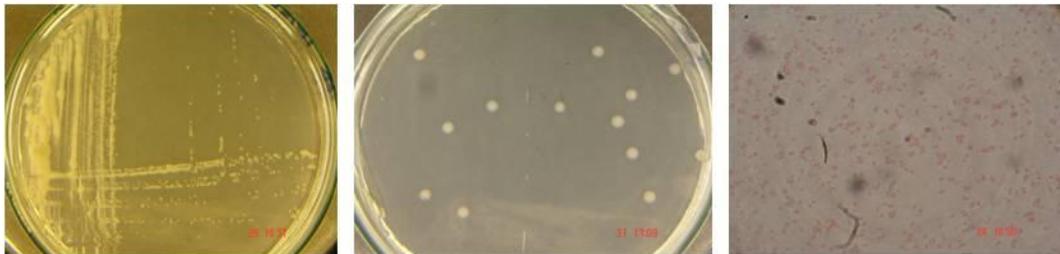


Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas de la cepa ICA J96 en el medio LMA

Las cepas ICA L9 e ICA J96 cultivadas en el medio LMA con adición de rojo congo presentaron una coloración crema o ligeramente rosada debido a que éstas generalmente no absorben el colorante, siendo una particularidad distintiva de este

grupo de microorganismos. Sin embargo, esta característica puede variar dependiendo de la concentración del colorante, condiciones de incubación, edad del cultivo y la exposición de las cajas a la luz. El medio LMA suplementado con rojo congo puede ser empleado como medio selectivo para diferenciar a los rizobios de microorganismos contaminantes, como es el caso de *Agrobacterium* que forma colonias rojas en el medio por absorber fuertemente el color; este colorante tiene propiedades antifúngicas evitando el crecimiento de hongos contaminantes sobre el medio de cultivo (Kneen & Laure, 1983).

5.2. Prueba de acidez y alcalinidad de las cepas ICA L9 e ICA J96

La prueba de acidez y alcalinidad realizada a las cepas ICA L9 e ICA J96 sembradas en el medio de cultivo LMA, suplementado con azul de bromotimol se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Descripción de la prueba de acidez y alcalinidad realizada a las cepas ICA L9 e ICA J96 en el medio LMA con azul de bromotimol

Cepa	Descripción macroscópica				
	CC	TR	FC	DC	RAA
ICA L9	C	T	R	3	AC
ICA J96	C	T	R	1	AC

CC-color colonia (C: cremosa); TR-transparencia (T: traslúcida); FC-forma colonia (R: redonda); DC-diámetro colonia (mm); RAA-reacción ácida o alcalina (AC: ácida).

El viraje de color del medio LMA suplementado con azul de bromotimol que inicialmente es verde a color amarillo indica una reacción ácida. La cepa ICA L9 después de 24 horas de incubación, mostró una reacción ácida al igual que la cepa ICA J96 después de 72 horas de incubación (Figura 10). Morales (1992) encontró que cepas de crecimiento rápido e intermedio, pertenecientes a los géneros *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* producen ácidos a partir de los azúcares utilizados como fuentes de carbono, que pueden ir desde mono hasta disacáridos como el manitol, la glucosa y la sacarosa.

Según Lancheros (2001), citado por Ramírez (2004) la característica de acidificar el medio de cultivo está relacionada con la capacidad de estos microorganismos de producir diferentes tipos de exopolisacáridos mucilaginosos extracelulares de carácter ácido o neutro en medio LMA, compuestos por carbohidratos, que son secretados al medio a través de la pared celular. Dentro de los exopolisacáridos ácidos secretados por *Rhizobium* se encuentra el succinoglicano, galactoglucano y glucuronan. Las cepas de crecimiento rápido también pueden utilizar ciertos aminoácidos o azúcares como glutamina y galactosa, que pueden promover la acidificación del medio donde estén creciendo.

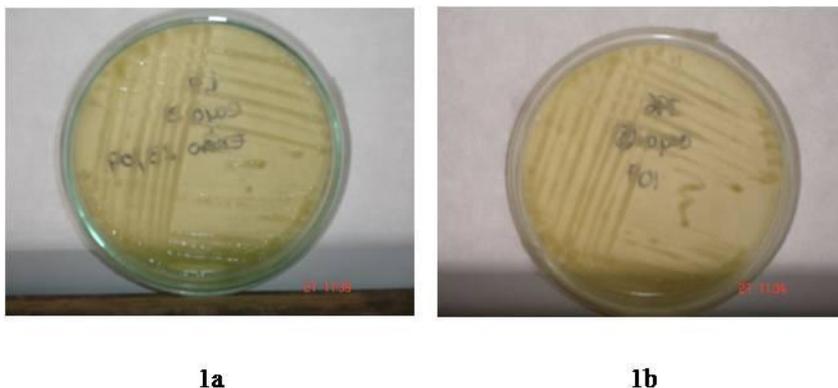


Figura 10. Cepa ICA L9 (1a) e ICA J96 (1b) sembradas en el medio LMA suplementado con azul de bromotimol

Los microorganismos pertenecientes al género *Allorhizobium* y *Bradyrhizobium* generalmente producen una reacción alcalina en el medio de cultivo, sin embargo, bajo condiciones naturales y de laboratorio, esta característica puede variar de acuerdo a las condiciones del suelo como el pH o del medio en donde se está desarrollando el microorganismo. Rojas *et al.* (2009) realizaron esta prueba con una cepa de *Bradyrhizobium* sp (ICA J01-inoculante para soya) crecida en LMA más azul

de bromotimol y obtuvieron que la cepa de crecimiento lento acidificó el medio de cultivo.

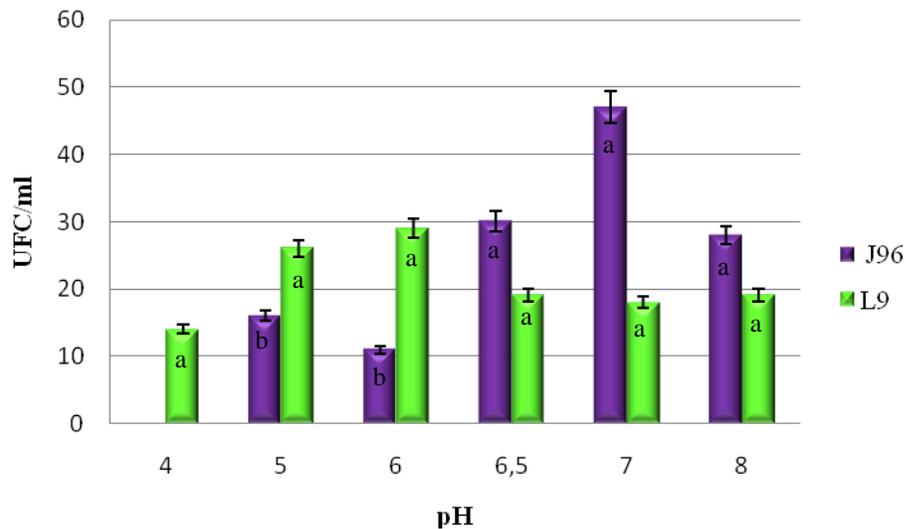
Esta característica presentada por algunos rizobios puede ser una ventaja competitiva que le permita sobrevivir a condiciones adversas y está estrechamente relacionada con la composición del medio, fuentes de carbono como hexosas, pentosas, polisacáridos, disacáridos, ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados disponibles y no se puede tomar como carácter taxonómico exclusivo de estos microorganismos (Frioni, 1999).

Norris (1965) encontró que cepas aisladas de suelos ácidos son capaces de excretar al medio de cultivo sustancias que alcalinizan; mientras que cepas aisladas de suelos alcalinos excretan sustancias que acidifican el medio, lo cual parece ser un mecanismo de adaptación a condiciones adversas, siendo este comportamiento mediado por el tipo de suelo, cantidad y calidad de los nutrientes disponibles. Esta característica es aplicable a los suelos tropicales donde se cultivan leguminosas de interés agrícola como la soya, ya que éstos generalmente tienen pH ácidos.

5.3. Crecimiento de las cepas bajo diferentes valores de pH

El crecimiento de la cepa ICA L9 en los medios de cultivo con pH: 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0 y 8,0, se observó a las 24 horas de agitación e incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$; siendo los pH 5,0 y 6,0 donde se determinó el mayor número de UFC/ml, con valores de 26 y 29 $\times 10^8$ UFC/ml respectivamente. Sin embargo, se puede observar que esta cepa tolera un amplio rango de pH, no encontrándose diferencias significativas entre los valores de pH evaluados ($p < 0,05$). Para el caso de la cepa ICA J96, el crecimiento en los medios de cultivo con pH: 5,0; 6,0; 6,5; 7,0 y 8,0 se observó a las 72 horas de agitación e incubación; siendo en los pH 6,5, 7,0 y 8,0 donde se evidenciaron más UFC/ml con valores de 30, 47 y 28 respectivamente, comparado con el pH 5,0 y 6,0 con valores de 16 y 11 UFC/ml, evidenciándose diferencias significativas ($p < 0,05$) (Figura 11). Este crecimiento se determinó por la viabilidad y número de UFC/ml de las cepas crecidas en el medio de cultivo líquido LM.

Cuando se observa el crecimiento y recuento de UFC/ml de ICA L9 e ICA J96 bajo diferentes concentraciones de pH en el medio de cultivo, se puede decir que las dos cepas toleran un amplio rango de pH entre 4,0 (ácido) y 8,0 (básico); siendo el rango entre 4,0 y 10,0 óptimo para el crecimiento y multiplicación de rizobios (Kuykendall *et al.*, 2005). El tolerar pH ácidos podría ser un mecanismo de adaptación de las cepas al ambiente asociadas con leguminosas cultivadas en suelos del trópico, donde generalmente se presentan problemas de acidez con valores entre 3,5 y 5,5 (Valencia, 2003), teniendo en cuenta que estas cepas han sido introducidas; pudiendo ser esta una ventaja selectiva de adaptación.



Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Prueba Duncan $p < 0,05$)

Figura 11. Recuento de UFC/ml de las cepas ICA L9 e ICA J96 bajo diferentes condiciones de pH en el medio de cultivo LM

Se han descrito algunas especies de *Rhizobium* que nodulan trébol, alfalfa y arveja que toleran pH inferiores a 3,5; así como cepas de *Bradyrhizobium* que nodulan soya que pueden sobrevivir a pH 4,0, incluso 3,5. Sin embargo, es importante destacar que las condiciones de acidez de un suelo puede tener algunos efecto adversos ya sea

sobre los rizobios, en la formación de nódulos, o en la FBN ya que hay etapas en el proceso de nodulación que son sensibles a la acidez, donde ciertas enzimas como la nitrogenasa puede disminuir su actividad (Drevon, 1995). Al evaluar las cepas ICA L9 e ICA J96 inoculadas en plantas de arveja y soya respectivamente, bajo condiciones de invernadero, se evidenció que el pH 6,8 no tuvo ningún efecto negativo en el establecimiento de la simbiosis y en la fijación biológica del nitrógeno.

Meghvansi *et al.* (2005) aislaron 8 cepas de *Bradyrhizobium japonicum* en soya (*Glycine max*) y evaluaron el crecimiento en medio LMA con diferentes valores de pH (entre 5,0 y 9,0), encontrando que todas las cepas crecieron en el rango de pH entre 5,5 y 8,5; sin embargo, tres de ellas presentaron los mayores valores de absorbancia a 540 nm a pH ligeramente ácido entre 5,0 y 6,0; este resultado es similar a los obtenidos con las cepas ICA L9 e ICA J96 las cuales crecieron en este rango de pH. Esta característica es importante, debido a que se puede inferir que algunas cepas de rizobios son capaces de adaptarse a condiciones de acidez en los suelos con bajos contenidos de nutrientes.

5.4. Identificación bioquímica

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos a partir de la lectura del Test API20 NE para cada una de las cepas en estudio, después de 24 y 48 horas de incubación.

Tabla 6. Resultados obtenidos a partir de la lectura de los Test API20 NE realizados a las cepas ICA L9 e ICA J96

Cepa	Pruebas convencionales								Pruebas de asimilación											
	NO ₃	TRP	<u>GLU</u>	<u>ADH</u>	<u>URE</u>	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
ICA L9	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
ICA J96	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

(-): Reacción negativa; (+): Reacción positiva; NO₃: Nitrato (reducción de nitratos a nitritos); TRP: Triptófano (formación de índol); GLU: Fermentación glucosa; ADH: L-arginina; URE: Urea; ESC: Esculina; GEL: Gelatina; PNP: 4-nitrofenil-βD-galactopiranosida; GLU: D-glucosa (asimilación glucosa); ARA: L-arabinosa; MNE: D-manosa; MAN: D-manitol; NAG: N-acetil-glucosamina; MAL: D-maltosa; GNT: Gluconato potásico; CAP: ácido cáprico; ADI: ácido adípico; MLT: ácido málico; CIT: citrato trisódico; PAC: ácido fenilacético.

Las cepas ICA L9 e ICA J96 asimilaron diferentes azúcares como D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, L-arginina, N-acetil glucosamina y D-maltosa como fuentes de carbono. Las cepas de crecimiento rápido como *Rhizobium* y *Sinorhizobium* tienen una maquinaria enzimática que les permite utilizar una mayor variedad de fuentes carbonadas siendo la sacarosa y el manitol los sustratos de preferencia. Las cepas de crecimiento lento como *Bradyrhizobium* prefieren utilizar glicerol y pentosas como L-arabinosa, xilosa y ribosa como fuentes de carbono y nitrógeno. La vía principal para la degradación de azúcares en rizobios de crecimiento rápido es la Entner Doudoroff (ED) dando como productos finales piruvato y gliceraldehído-3- fosfato, la vía de las pentosas fosfatos (PF) y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT). En las cepas de crecimiento lento se han encontrado enzimas que intervienen en la vía ED y CAT para la degradación de fuentes carbonadas (Mylona *et al.*, 1995). Muchas cepas incluidas dentro de este grupo crecen mejor en medios suplementados con pentosas; sin embargo, la L-arabinosa es la fuente de

carbono preferida y puede ser metabolizada a α -cetoglutarato (Bécquer, 2004; Kuykendall *et al.*, 2005).

Los azúcares asimilados por los microorganismos son importantes para sus funciones celulares ya que intervienen en la formación de oligosacáridos, polisacáridos que conforman la pared celular y sirven como reservas energéticas. Estos resultados son similares a los reportados por Amarger *et al.* 1997 y González *et al.* 1998 donde cepas de *Rhizobium* empleadas para la inoculación de leguminosas asimilaron D-manosa, D-fructosa, D-glucosa, L-arabinosa, L-arginina, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, D-galactosa, D-glucosa y D-trehalosa como fuentes de carbono en los diferentes medios donde fueron crecidas.

Las cepas ICA L9 e ICA J96 no hidrolizaron la gelatina; esta característica es señalada por Kuykendall *et al.* 2005, quienes observaron que dentro de los azúcares asimilados por rizobios, la peptona es pobremente utilizada mientras que el almidón, la caseína, la quitina, agar-agar y gelatina no son hidrolizados por estos microorganismos.

Para el caso del NO_3 y la urea, las dos cepas utilizaron estos sustratos como fuentes de nitrógeno bajo condiciones de laboratorio; en el suelo, los nitratos pueden inhibir el proceso de nodulación y disminuir la fijación biológica de nitrógeno.

5.5. Resistencia intrínseca a antibióticos

Al sembrar las cepas ICA L9 e ICA J96 en medio de cultivo LMA con los discos de antibióticos de Kanamicina (30 μg), Estreptomycin (10 μg), Nitrofurantoina (300 μg), Cloranfenicol (30 μg) y Ampicilina (10 μg), se obtuvieron los siguientes resultados:

La cepa ICA L9 presentó halos de inhibición mayores a 5 mm de diámetro para todos los antibióticos evaluados, lo cual muestra sensibilidad ante estos agentes antimicrobianos. Teniendo en cuenta que estas sustancias pueden encontrarse en los suelos producidos por microorganismos rizosféricos, esta característica puede ser desfavorable para los rizobios afectando el desarrollo y por lo tanto su biodiversidad. Este resultado es similar al obtenido por Chen *et al.* 1997 donde aislamientos de

Rhizobium sembrados en LMA con discos de Kanamicina (5µg/ml), Cloranfenicol (10µg/ml) y Terramicina (50µg/ml), no crecieron en el medio de cultivo lo cual indicó sensibilidad de las cepas ante estos antibióticos, utilizando concentraciones más bajas que las usadas en este estudio.

Amer en el 2008, encontró que rizobios productores de abundante goma o exopolisacáridos son más sensibles a concentraciones de 30 µg de Estreptomina, Kanamicina y Cloranfenicol que aquellas que producen colonias secas en el medio de cultivo, capaces de tolerar estos antibióticos. La cepa ICA L9 que produce abundante goma en el medio de cultivo, mostró sensibilidad frente a los antibióticos evaluados; estudios de resistencia intrínseca a antibióticos muestran que cepas de crecimiento rápido pueden ser menos resistentes a diferentes concentraciones de antibióticos encontrados en el medio con respecto a las cepas de crecimiento lento que pueden mostrar más resistencia, especialmente frente al Cloranfenicol y Estreptomina (*Bergey's*, 2005).

Cuadrado *et al.* (2009) aislaron rizobios nativos en suelos del departamento de Bolívar en Colombia, encontrando cepas de rápido crecimiento posiblemente pertenecientes al género *Rhizobium*, que fueron altamente resistentes a la Estreptomina y Cloranfenicol con concentraciones de 100 y 500 ppm respectivamente; mostrando un resultado diferente al obtenido en este trabajo, en el cual la cepa de crecimiento rápido ICA L9 mostró sensibilidad a estos antibióticos evaluados.

Para el caso de ICA J96, esta cepa presentó una alta resistencia frente a Ampicilina (10µg), Nitrofurantoina (300µg) y Cloranfenicol (30µg) lo cual se manifestó por el crecimiento en el medio de cultivo; la cepa mostró una baja y moderada resistencia frente a la Kanamicina (30µg) y Estreptomina (10µg) observando halos de inhibición entre 6 y 3 mm de diámetro respectivamente (Figura 12). Esta característica de resistencia a antibióticos puede estar mediada por la cantidad de

goma, exopolisacáridos y polisacáridos capsulares, que interfieren en el paso de compuestos hacia dentro de las células bacterianas evitando lisis celular o inhibición de síntesis de proteínas (Milicic *et al.*, 2006).

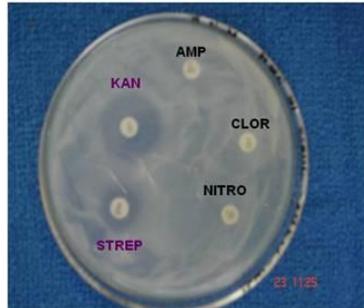


Figura 12. Cepa ICA J96 sembrada en medio de cultivo LMA con discos de antibióticos, halo de inhibición producido por Kanamicina y Estreptomicina

Estudios realizados por Romero & Bernal (2008) mostraron que cepas de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* presentaron resistencia a la Kanamicina y Estreptomicina en concentraciones de 10 y 5µg respectivamente; este resultado puede estar relacionado con que en los suelos del trópico se pueden encontrar poblaciones altas de actinomicetos (género: *Streptomyces*) capaces de producir una amplia gama de antibióticos en diferentes concentraciones como mecanismo de supervivencia; en consecuencia los rizobios pudieron haberse adaptado a estas condiciones adversas (Bécquer, 2009) o pueden vivir sinérgicamente con este grupo de microorganismos generando mecanismos enzimáticos que confieran tolerancia o resistencia a los diversos antibióticos o sustancias antimicrobianas producidos por ellos, presentes en el suelo.

Tokala *et al.* (2002) evaluaron la cooperación entre cepas de *Streptomyces-Rhizobium*-leguminosas en plantas de *Pisum sativum* encontrando beneficios en la interacción, evidenciándose una mejora tanto en el crecimiento como en la salud de las plantas inoculadas con *Streptomyces + Rhizobium* en comparación con las plantas

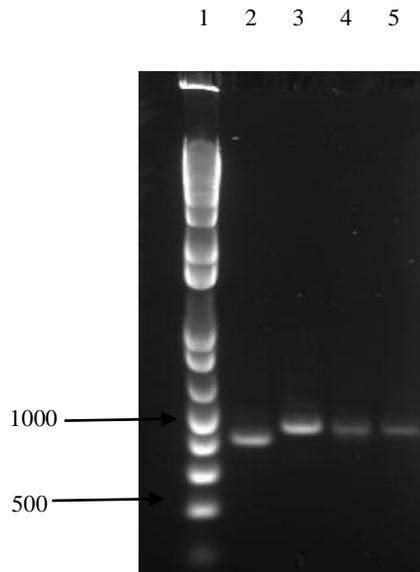
control inoculadas con sólo *Rhizobium*; aumentando la frecuencia de nodulación, el tamaño medio de los nódulos, el vigor y número de bacteroides de *Rhizobium* en su interior, e incrementando a su vez la asimilación de hierro y probablemente de otros nutrientes encontrados en el suelo.

Esta característica de resistencia intrínseca a antibióticos muestra la gran diversidad que puede existir entre cepas de rizobios; sin embargo, la resistencia a la Estreptomicina es uno de los factores más importantes que se ha tenido en cuenta para el monitoreo de estos microorganismos ya que aumenta la posibilidad de obtener cepas más adaptadas a las condiciones del suelo, sin que se presente una interrupción en la asociación y por ende en la FBN (Milicic *et al.*, 2006).

5.6. Identificación genotípica de las cepas ICA L9 e ICA J96

5.6.1. Secuenciación de la región de ADN que codifica para el gen ARNr 16S

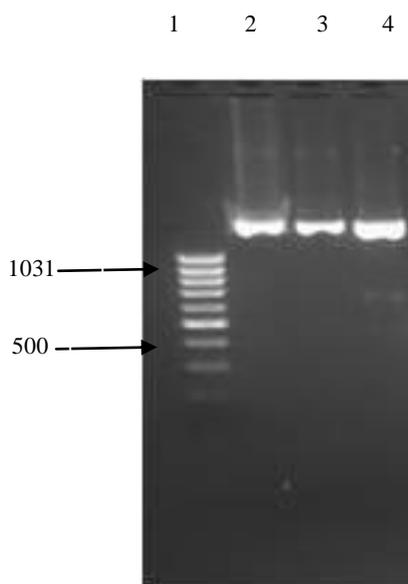
La cuantificación del ADN de las cepas ICA L9 e ICA J96 utilizado para la PCR mostró valores de 51,8ng/µl y 171,3 ng/µl respectivamente. Las bandas en el gel de agarosa se muestran en la figura 13.



Pozos: 1 (Marcador peso molecular 1Kb); 2 (Cepa ICA L9); 3 (Cepa ICA J96); 4 (Control positivo: bacteria); 5 (Control positivo: bacteria)

Figura 13. Bandas observadas en el gel de agarosa al 2% de las cepas ICA L9 e ICA J96

Las amplificaciones del gen ARNr 16S obtenidos a partir de la PCR utilizando los primers 27F y 1544R, se muestran en la figura 14.



Pozos: 1 (Marcador masa molecular: 81 a 1031pb); 2 (Control positivo: bacteria); 3 (Cepa ICA L9); 4 (Cepa ICA J96)

Figura 14. Amplificación del gen ARNr 16S con los primers 27F-1544R en gel de agarosa TAE 1X al 2%; siembra con 1µl de muestra

Las secuencias obtenidas para cada una de las cepas, fueron modificadas manualmente teniendo en cuenta la calidad del cromatograma (Ver anexo 5 y 6). El resultado de los alineamientos de las secuencias obtenidas que permitió tener una aproximación taxonómica de cada una de las cepas, comparadas con otras secuencias reportadas en las bases de datos de genes de NCBI y CBS se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Comparación de las secuencias de la cepa ICA L9 e ICA J96, con las reportadas en las bases de datos del NCBI y CBS

CEPA	NCBI			CBS		
	Descripción género-especie	% ^β	E ^γ	Descripción género-especie	% ^β	E ^γ
ICA L9	GU429862.1- <i>Rhizobium</i> sp.	100	0,0	N.I	98	0,0
	U50168.1- <i>Rhizobium</i> sp.	100	0,0	U50168,1- <i>Rhizobium</i> sp.	100	0,0
	U50165.1- <i>Rhizobium</i> sp.	100	0,0	U50165,1- <i>Rhizobium</i> sp.	100	0,0
	EU074208.1- <i>Mesorhizobium</i> sp.	99	0,0	EU074208,1- <i>Mesorhizobium</i> sp.	99	0,0
	EU074175.1- <i>Mesorhizobium</i> sp.	99	0,0	EU074175,1- <i>Mesorhizobium</i> sp.	99	0,0
ICA J96	EU841541.1- <i>Rhizobium</i> sp.	99	0,0	EU841541,1- <i>Rhizobium</i> sp.	100	0,0
	N.I	98	0,0	EU637926- <i>Sinorhizobium fredii</i>	98	0,0
	N.I	98	0,0	D14516- <i>Sinorhizobium fredii</i>	98	0,0
	GU591754.1- <i>Rhizobium</i> sp.	100	0,0	N.I	98	0,0

N.I: no identificado; % Identidad (valores < 97 no se incluyen); ° Valor E (valores > 0,0 no se incluyen. Ej: e⁻¹⁷⁰); CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Databases.; CRUB – Centro Regional Universitario Bariloche.

Las dos cepas presentaron porcentaje de similaridad entre 98 y 100%, con secuencias de microorganismos de referencias, encontradas en el GenBank. La cepa ICA L9 según el porcentaje de similitud con secuencias reportadas en las bases de datos de ADN podría ser un *Rhizobium* sp número de accesión: U50168.1, teniendo en cuenta características genotípicas, fenotípicas y especificidad por el hospedero. Para el caso de la cepa ICA J96, esta podría ser un *Rhizobium* sp número de accesión: EU841541.1 o un *Sinorhizobium fredii*, número de accesión: EU637926, especie reportada capaz de asociarse con plantas de soya. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el género *Sinorhizobium* posee una similitud del 95-96% en el gen ARNr 16S de *Rhizobium* y recientemente se ha propuesto denominarlo *Ensifer* (Philippe *et al.*, 1994; Albareda *et al.*, 2009).

En el árbol de similitud construido por medio del programa Mesquite versión 1.9, se incluyeron las secuencias de las cepas ICA L9 e ICA J96; adicionalmente se tomaron 20 secuencias obtenidas del NCBA y CBS para el análisis filogenético, de acuerdo a los porcentajes de similaridad obtenidos en el análisis BLAST. El tamaño de los amplicones para cada una de las cepas estaba en el rango entre 700 y 900 pb (Figura 15).

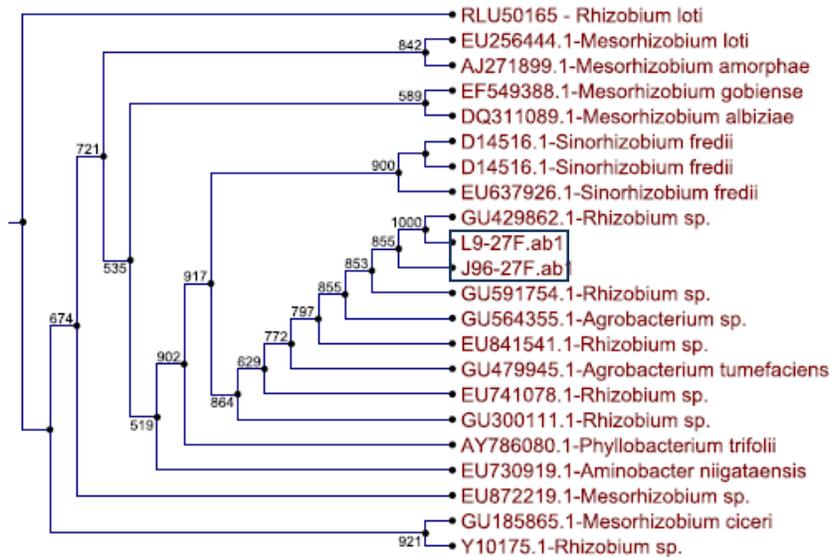


Figura 15. Árbol filogenético empleando la metodología de Neighbour Joining; divergencias entre las secuencias amplificadas del gen ARNr 16S (1000 réplicas)

Sin embargo, aunque el alineamiento por BLAST de las secuencias de bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo descritas en las bases de genes, permitieran una aproximación a la identificación de las cepas ICA L9 e ICA J96 hasta el nivel de género y especie (con una similitud del 98%), se encontraron pequeñas diferencias cuando se usaron las bases de datos de NCBI vs. CBS. Los resultados en ambas bases de datos, mostraron que no todas las identificaciones de microorganismo encontradas en NCBI, corresponden a las encontradas en CBS. Teniendo en cuenta estos resultados, de acuerdo a los porcentajes de similitud (PS) y al valor E (E) obtenidos del análisis BLAST, las cepas ICA L9 e ICA J96 mostraron diferencias entre las dos bases de datos, y se puede considerar que los resultados no son lo suficientemente contundentes para poder afirmar la identificación de estos microorganismos.

Debido al porcentaje de similitud obtenido por medio de la amplificación del gen ARNr 16S y que no permite la identificación de las cepas hasta especie, es necesario hacer nuevos acercamientos moleculares que nos permitan definir completamente el estatus taxonómico de estas bacterias, sin excluir la información relevante de los estudios bioquímicos y fisiológicos, como son características macroscópicas y microscópicas, resistencia intrínseca a antibióticos, pruebas bioquímicas, especificidad por el hospedero y pruebas moleculares en conjunto, que nos permita un mayor acercamiento a la identificación de las cepas hasta nivel de especie.

5.7. Curva de crecimiento de las cepas ICA L9 e ICA J96

Se observó la curva de crecimiento de las cepas ICA L9 e ICA J96 durante 60 y 97 horas, respectivamente. La curva para cada microorganismo se interrumpió cuando el valor de absorbancia en las cuatro últimas lecturas fue similar en todos los casos, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) según el análisis de varianza, evidenciando que las cepas se encontraban en fase estacionaria.

Para la cepa ICA L9 se pudo observar que la fase de adaptación o latencia estuvo comprendida entre la hora 2 y 8 con 8,60 unidades logarítmicas (UL) al inicio y 8,77 UL al final. El incremento del microorganismo reflejado en el número de colonias en el medio LMA puede ser menor comparado con el medio LM que se encuentra en agitación constante, lo cual promueve la multiplicación a mayor velocidad de las células bacterianas (Larcher *et al.*, 2008). La fase exponencial estuvo comprendida entre la hora 10 y 40 con 8,77 y 9,30 UL respectivamente; la fase estacionaria se observó a partir de la hora 42 hasta la hora 60 aproximadamente (Figura 16); el recuento en placa mostró que la máxima población se obtuvo alrededor de la hora 36 con un recuento de 9,50 UL.

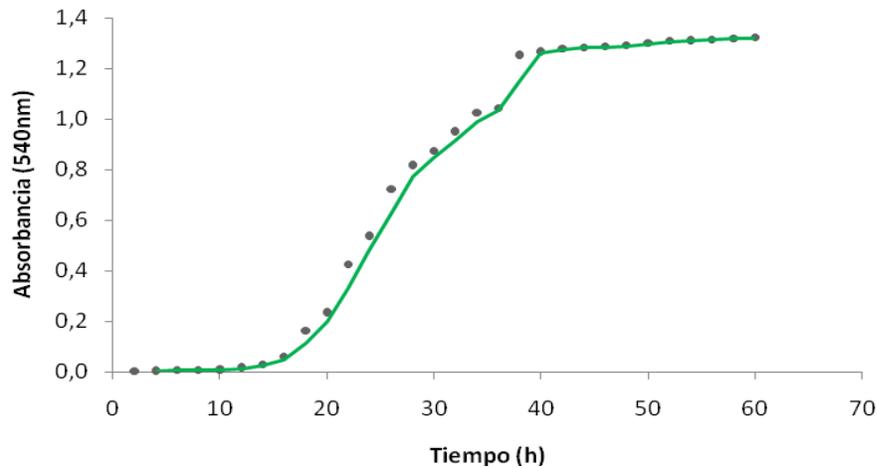


Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa ICA L9 en medio de cultivo LM

La fase de adaptación de la cepa ICA J96, se observó a partir de la hora 0 hasta la 20, seguida por la fase exponencial entre la hora 22 y 50 (Figura 17); el máximo crecimiento se observó a la hora 36 con una absorbancia de 0,568 y un recuento en placa de 3,36 UL. Durante la fase exponencial se presentó un crecimiento balanceado de la cepa en presencia de nutrientes; la bacteria recupera su ciclo celular e incrementa su número exponencialmente con respecto al tiempo (Santos *et al.*, 2005).

Después de la fase exponencial, las cepas bajo estudio presentaron una disminución en la biomasa bacteriana causada posiblemente al agotamiento de uno o más nutrientes en el medio, especialmente la fuente de carbono (manitol) o la acumulación de metabolitos o sustancias tóxicas que inhibieron la multiplicación celular.

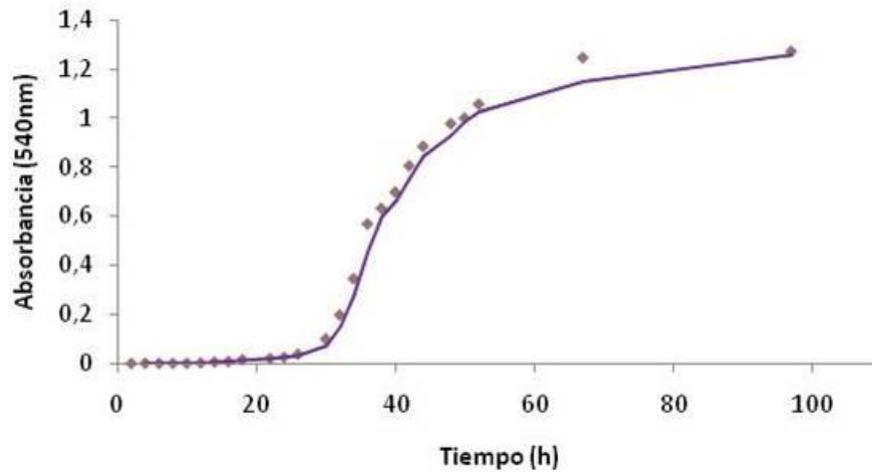


Figura 17. Curva de crecimiento de la cepa ICA J96 en medio de cultivo LM

Se calculó la ecuación de regresión para la cepa ICA L9 tomando los valores de absorbancia desde la hora 10 hasta la 40 (Figura 18) y para la cepa ICA J96 desde la hora 22 hasta la 50 (Figura 19). Se observó que las curvas de crecimiento para cada una de las cepas se ajusta a un modelo lineal, evidenciándose una relación estadísticamente significativa entre las variables ($p < 0,05$). Para la cepa ICA L9 la ecuación de regresión obtenida es: $y = 0,00477x - 0,6018$; $R^2 = 0,9748$

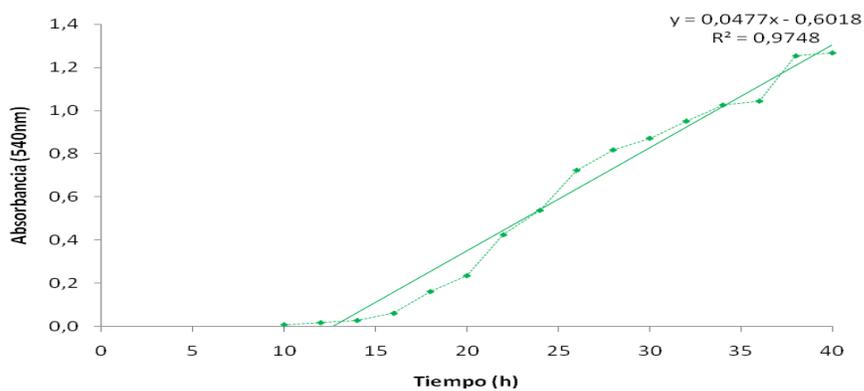


Figura 18. Tiempo (h) vs Absorbancia: ecuación regresión para la cepa ICA L9 tomando valores de absorbancia desde la hora 10 hasta la 40

La ecuación de regresión obtenida para la cepa ICA J96 es: $y = 0,0414x - 1,0003$; $R^2 = 0,9537$

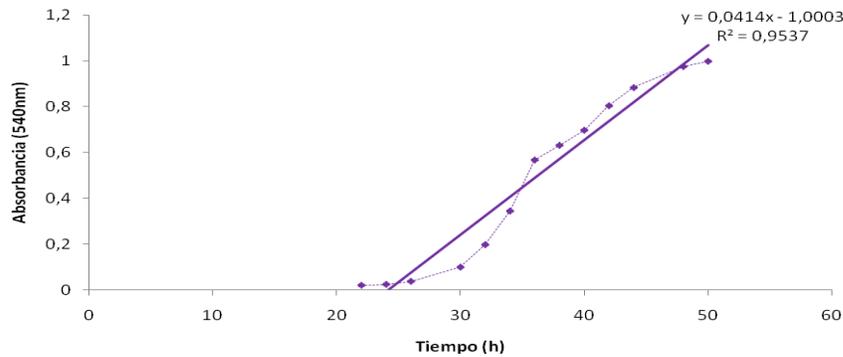


Figura 19. Tiempo (h) vs Absorbancia: ecuación regresión para la cepa ICA J96 tomando valores de absorbancia desde la hora 22 hasta la 50

Para cada una de las cepas, se calculó la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación en el medio de cultivo LMA (Tabla 8) teniendo en cuenta la ecuación: $\mu = (A_f - A_i) / (T_f - T_i)$; $td = \ln 2 / \mu$

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la cepa ICA L9 e ICA J96

Cepa	Velocidad específica crecimiento (μ)	Tiempo duplicación
ICA L9	$0,071h^{-1}$	9,75 h
ICA J96	$0,060 h^{-1}$	11,57 h

La cepa ICA L9 mostró una velocidad específica de crecimiento mayor con respecto a la cepa ICA J96 pero el tiempo de duplicación es menor teniendo en cuenta que la velocidad específica es el cambio en el número de células por unidad de tiempo expresado como fracción de la población ya existente y el tiempo de duplicación como el tiempo necesario para que la población bacteriana se reproduzca al doble de

su número inicial; con la cepa ICA J96 ocurrió lo contrario, mostró una velocidad de crecimiento menor y un tiempo de duplicación mayor en el medio LM. Al comparar este resultado con los obtenidos por Rojas *et al.* (2009) quienes determinaron este parámetro cinético a una cepa perteneciente al género *Rhizobium* y cuyo valor fue de $0,181\text{h}^{-1}$, se puede inferir que las cepas bajo estudio presentaron una velocidad específica de crecimiento menor.

Nápoles *et al.* (2006) reportaron la velocidad específica de crecimiento de dos cepas de *Bradyrhizobium* sp. (ICA 8001 y 6134) cultivadas en medio LM con unos valores de $0,018\text{ h}^{-1}$ y $0,020\text{ h}^{-1}$ respectivamente, estos datos son menores comparados a los obtenidos para las cepas ICA L9 e ICA J96. Para estudios cinéticos de crecimiento bacteriano es importante tener en cuenta que la velocidad específica en función de la concentración de sustratos contenidos dentro del medio está directamente relacionada con las propiedades de cada cepa para asimilarlos.

5.8 Pruebas biológicas de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96

Las características físico-químicas de la turba Growing Mix utilizada para la preparación de los inoculantes elaborados con base en las cepas ICA L9 e ICA J96, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Características fisicoquímicas de la turba Growing Mix utilizada para la elaboración de los inoculantes

Textura	Ph	% M.O	P mg/kg	S mg/kg	AL+H cmol/kg	Sat. Al %	Al	Cationes cambio					CICE	C.E dS/m	Elementos menores				
								Ca	Mg	K	Na	Fe			Cu	Mn	Zn	B	
								cmol(+)/kg							mg/kg				
F	7,3	22,6	31	36,5	0	0	0	20,6	1,45	0,36	0,41	22,8	2,34	79	1	2	4,1	0,17	
Franco	N		M			NL		A	B	M	A			A	M		A	B	

N: neutro, M: medio, NL: no limitante, A: alto y B: bajo

5.8.1. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 sobre el pH y el porcentaje de humedad hasta los 180 días de evaluación

A los inoculantes almacenados a temperaturas de 4 ± 2 , 18 ± 3 y $28\pm 2^\circ\text{C}$ se les determinó el pH y el porcentaje de humedad a los 60 y 180 días de evaluación. Así mismo se realizó un control de calidad a los 15, 60, 120 y 180 días para verificar la pureza y viabilidad de las cepas observada en el número de UFC/g de inoculante expresado en Log_{10} . El pH y el porcentaje de humedad inicial para todos los inoculantes fue de 7,30 y 60,0% respectivamente.

El efecto de las temperaturas de almacenamiento sobre el pH y el porcentaje de humedad a los 60 y 180 días, se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes sobre el pH y el porcentaje de humedad a los 60 y 180 días de evaluación

Cepa/Temperatura	pH	pH	% H	% H
	(60 días)	(180 días)	(60 días)	(180 días)
ICA L9/ $4\pm 2^\circ\text{C}$	7,32	7,53	35,42	32,20
ICA L9/ $18\pm 3^\circ\text{C}$	7,52	7,84	60,12	64,76
ICA L9/ $28\pm 2^\circ\text{C}$	7,56	7,90	30,74	26,53
ICA J96/ $4\pm 2^\circ\text{C}$	7,43	7,72	66,59	66,17
ICA J96/ $18\pm 3^\circ\text{C}$	7,61	7,95	59,98	63,81
ICAJ96/ $28\pm 2^\circ\text{C}$	7,36	7,97	38,50	47,83
TA/ $4\pm 2^\circ\text{C}$	7,32	7,36	51,48	53,65
TA/ $18\pm 3^\circ\text{C}$	7,37	7,30	20,15	20,93
TA/ $28\pm 2^\circ\text{C}$	7,35	7,33	10,78	8,78

Para los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9, no se observó variación en el valor de pH a los 60 días de almacenamiento a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 mostraron un aumento de 0,13 unidades de pH a los 60 días de almacenamiento a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ con respecto al valor inicial de 7,30. A los 180 días de almacenamiento, los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 mostraron un aumento de 0,23; para la cepa ICA J96 el valor fue de 0,42 unidades de pH. Al determinar el pH de los inoculantes almacenados a temperatura $18\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ se puede observar que hubo un aumento en dichos valores desde los 60 hasta 180 días; sin embargo, este cambio en el pH pudo no tener un efecto negativo sobre la concentración bacteriana ya que se encuentra en el rango de pH entre 4,0 y 10,0 óptimo para la multiplicación de rizobios (Kuykendall *et al.*, 2005). El cambio de pH en inoculantes bacterianos puede verse afectado por la presencia de productos metabólicos secretados por las cepas, tales como ácidos orgánicos y exopolisacáridos extracelulares.

El porcentaje de humedad de los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA L9 almacenados a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, presentó una disminución entre el día 60 y 180 con valores de 35,42% y 32,20% respectivamente. Para la cepa ICA J96, el porcentaje de humedad se mantuvo con valores entre 66,59% a los 60 días y 66,17% a los 180 días, lo cual no evidencia diferencias significativas ($p < 0,05$). El menor contenido de agua en el producto final (20-30%) es responsable de la supervivencia de los microorganismos almacenados a largo plazo. De esta manera, las bacterias en el producto pueden permanecer inactivas, resistir el estrés hídrico, ser menos sensibles a la contaminación especialmente por hongos y más compatibles con la aplicación de fertilizantes en el suelo; sin embargo, la humedad por debajo del 10% puede interferir en la multiplicación de los rizobios (Díaz-Franco & Pérez, 2008).

El resultado obtenido para los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA L9 es similar a los obtenidos por Estrada (2008), quien evidenció que el almacenamiento bajo condiciones ambientales y refrigeración aumento el porcentaje de humedad de 3

a 5% y de 4 a 9% respectivamente en todos los inoculantes elaborados con base en bacterias diazotróficas.

En los inoculantes almacenados a $18\pm 3^{\circ}\text{C}$, elaborados con la cepa ICA L9 no se evidenció una disminución en el porcentaje de humedad entre los días 60 y 180 (60,12% y 64,76%, respectivamente) con respecto al porcentaje inicial (60,0%) tomado a los 5 días de elaborado el producto. Sin embargo, este porcentaje de humedad pudo haber afectado la sobrevivencia de los rizobios disminuyendo el número de células viables a los 180 días de almacenamiento; según Temprano *et al.* (2002) el porcentaje de humedad del 40% en inoculantes con base en *Bradyrhizobium* sp en turba estéril, mantiene la población bacteriana en 10^9 UFC/g de inoculante después de un año de almacenamiento a 25°C ; esto sugiere que la disminución de células bacterianas es más pronunciada cuando el contenido de humedad es mayor al 60%. Por otra parte, la cantidad de contaminantes, especialmente hongos, puede aumentar en los inoculantes biológicos cuando el porcentaje de humedad en el soporte se incrementa.

El porcentaje de humedad en los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 almacenados a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ se redujo casi a la mitad desde los 60 hasta 180 días con respecto al porcentaje inicial del 60,0%, perdiéndose más humedad con respecto a los inoculantes conservados a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $18\pm 3^{\circ}\text{C}$. Un bajo porcentaje de humedad ($< 30\%$) en inoculantes puede disminuir la multiplicación de los rizobios, inhibir la infección y la formación de nódulos. Caso contrario ocurre cuando hay exceso de humedad ($> 80\%$), esta puede reducir la cantidad de oxígeno molecular requerido para la multiplicación de los rizobios en el soporte. Para que los rizobios sobrevivan en el inoculante, el producto debe mantener una humedad del 60% (Valbuena, 1990 citado por Moya, 2004). La turba por sus características como alto contenido de materia orgánica, por su capacidad higroscópica y gran superficie específica ofrece protección física a las bacterias permitiendo una mayor sobrevivencia en condiciones de déficit hídrico y temperaturas elevadas (Hungría *et al.*, 2001).

Es importante tener en cuenta que muchas veces el porcentaje de humedad de los productos almacenados, disminuye cuando las bolsas de polipropileno están rotas, afectando la población de rizobios presentes en el inoculante. Según Hungria *et al.* (2005), las bolsas que van a ser empleadas en la elaboración de inoculantes deben ser resistentes a la esterilización, retener el mayor porcentaje de humedad sin interrumpir el intercambio gaseoso y garantizar el transporte seguro del inoculante con el objetivo de mantener la viabilidad de las cepas.

5.8.2. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 sobre el número de unidades formadoras de colonia hasta los 180 días de evaluación

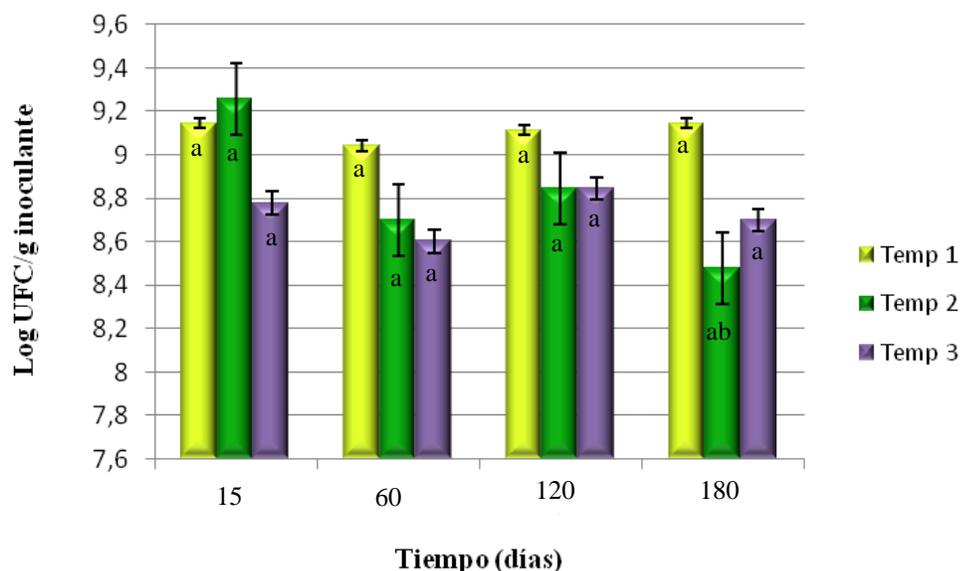
Los resultados obtenidos a partir del control de calidad realizado sobre la turba después de la inoculación con ICA L9 e ICA J96 e incubación por 5 días a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Control de calidad de la turba inoculada con las cepas ICA L9 e ICA J96; número de UFC/ml expresado en Log_{10}

Cepa	Log UFC/ml Inóculo inicial	Log UFC/ml Inoculantes
ICA L9	8,47	8,90
ICA J96	8,60	8,60

Se puede observar que la cepa ICA L9 se multiplicó en la turba aumentando el número de células en 0,43 unidades logarítmicas, mientras que la cepa ICA J96 aparentemente no se multiplicó después de 5 días de incubación; este resultado se debe al cambio drástico medioambiental al que son sometidas las cepas y está relacionado con el tiempo y capacidad de adaptación y utilización de los diferentes nutrientes encontrados en el soporte, generando en algunos casos la disminución de la biomasa celular.

Al evaluar el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las bacterias en los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA L9, se observó que a los 15 días de almacenamiento en nevera a temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, hubo un incremento en la concentración celular pasando de 8,90 UL/g de inoculante a 9,14 UL; sin embargo, a los 60 días se observó una disminución en el número de UL/g y luego se estabilizó la concentración manteniéndose en 10^9 hasta los 180 días de almacenamiento; sin embargo, no se evidenció diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p < 0,05$) en el número de rizobios presentes en los inoculantes hasta los 180 días (Figura 20). El incremento inicial en la concentración celular puede estar relacionado con los nutrientes encontrados en la turba, que permitieron el desarrollo y multiplicación de las bacterias; posteriormente, después de 60 días de almacenamiento, estos nutrientes pudieron agotarse paulatinamente, especialmente el manitol utilizado por los rizobios como fuente de carbono, disminuyendo la concentración celular. Al finalizar el período de evaluación (180 días), los microorganismos que se encontraban en estado de latencia como consecuencia de la temperatura de almacenamiento, pudieron reactivar su metabolismo manteniendo el número de células viables en una concentración por encima de 10^8 .

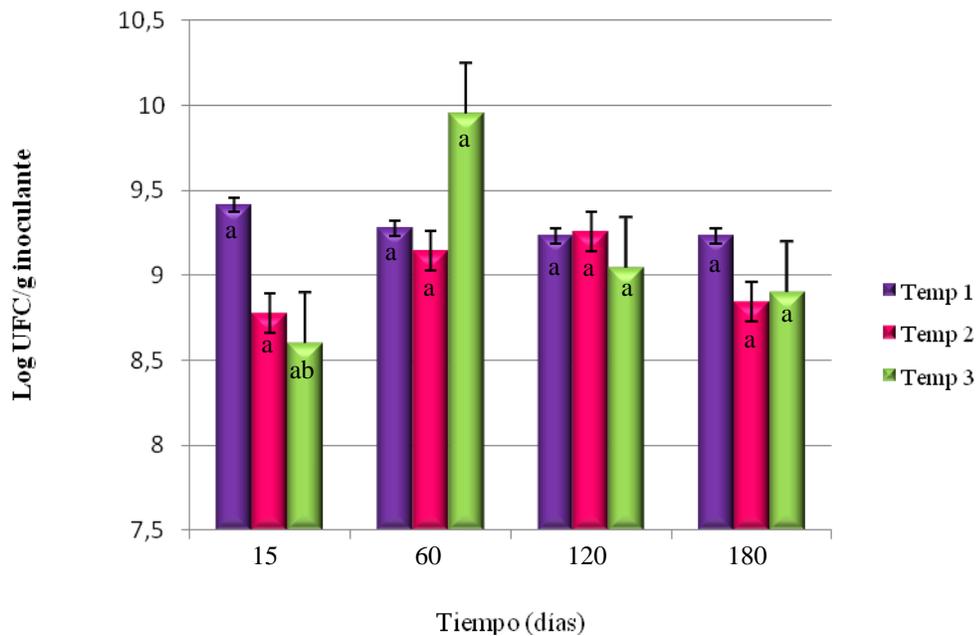


Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$)
 Temperatura 1: $4 \pm 2^\circ\text{C}$; Temperatura 2: $18 \pm 3^\circ\text{C}$; Temperatura 3: $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Las barras indican la diferencia media significativa

Figura 20. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA L9 a 4 ± 2 , 18 ± 3 y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sobre el número de UFC/ml expresado en Log_{10} , hasta los 180 días de evaluación

En los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 se observó que a los 15 días de almacenamiento a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ hubo un aumento en el número de UFC/g pasando de 8,60 UL hasta 9,41 UL; luego se evidenció una disminución hasta el día 60 de 0,14 UL y luego se estabilizó el crecimiento desde los 120 hasta los 180 días de evaluación con 9,23 UL/g de inoculante en 10^9 , no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (Figura 21). El incremento inicial de la población bacteriana se pudo dar por la presencia de nutrientes encontrados en la turba ya que está se caracteriza por tener un alto contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua y aireación. Así mismo, el agotamiento de los nutrientes y/o acumulación de catabolitos tóxicos, explicarían la disminución de ambas poblaciones a los 180 días (Cuzcano & Dávila, 2003).

Temprano *et al.* (2002) afirmaron que inoculantes elaborados con base en *Rhizobium* sp. (*Hedysarum*) Hc3, preparados con turba estéril, almacenados a temperatura de 4°C presentan una alta densidad bacteriana durante las primeras 4 semanas; luego se estabiliza el crecimiento con una concentración de 10^{10} UFC de rizobios y esta se mantiene hasta el final del ensayo (32 semanas).



Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$)
 Temperatura 1: $4 \pm 2^\circ\text{C}$; Temperatura 2: $18 \pm 3^\circ\text{C}$; Temperatura 3: $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Las barras indican la diferencia media significativa

Figura 21. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA J96 a 4 ± 2 , 18 ± 3 y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sobre el número de UFC/ml expresado en Log_{10} , hasta los 180 días de evaluación

Estrada en el 2008, evaluó diferentes temperaturas para el almacenamiento de inoculantes con base en bacterias diazotróficas, entre ellas *A. brasilense*, *A. amazonense*, *H. seropedicae* y *Rhizobium tropici* (SP245) encontrando que los inoculantes elaborados con base en *H. seropedicae* y *Rhizobium tropici* (SP245) almacenados a 4°C mantuvieron la concentración celular por encima de 10^8 UFC/g de inoculante durante los 150 días de evaluación comparado con las otras bacterias evaluadas. Este resultado es similar al obtenido con las cepas ICA L9 e ICA J96, donde a los 180 días de almacenamiento, aún mantuvieron un número de UFC/g de inoculante en 10^8 .

En los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 almacenados a $18\pm 3^\circ\text{C}$, se presentó un aumento en la concentración bacteriana de 8,47 UL (inóculo inicial) hasta 9,25 UL después de 15 días de almacenamiento del producto; luego se evidenció una disminución a los 60 días de 0,56 UL. A pesar de presentarse este descenso en la concentración bacteriana, a los 180 días se encontraron 8,47 UL/g en 10^8 . Esta característica es importante ya que la calidad de los inoculantes sólidos está expresada por el número de UFC; en general, se considera que los inoculantes preferiblemente elaborados con turba estéril deben contener un mínimo de 1×10^8 de células viables de rizobios (*Rhizobium* sp y/o *Bradyrhizobium* sp) por gramo de inoculante en fabrica, y 1×10^8 UFC/g hasta el término de su vida útil. Sin embargo, este requerimiento varía de acuerdo a las legislaciones vigentes para cada país (Rossi, 2005). En Colombia, el ICA exige que los inoculantes elaborados con base en bacterias fijadoras de nitrógeno contengan una concentración mínima de 1×10^8 UFC/g de inoculante, para su comercialización.

Los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96, por el contrario mostraron un aumento en el número de células viables a partir de los 15 días de almacenamiento con 8,77 UL, hasta los 60 y 120 días con valores de 9,14 y 9,25 UL respectivamente, evidenciándose colonias bacterianas hasta 10^9 . A los 180 días, el crecimiento bacteriano disminuyó una unidad exponencial encontrándose 8,84 UL en 10^8 UFC/g de inoculante. Estos resultados indican que la temperatura ambiente puede no tener

un efecto marcado sobre la población bacteriana ya que hasta el final de la evaluación para cada una de las cepas se mantuvo el número de UFC/g de inoculante en el rango de 10^8 ; esta concentración hace que el inoculante sea apto para la comercialización.

En los inoculantes elaborados con base en la cepa ICA L9 almacenados a $28\pm 2^\circ\text{C}$, se puede observar que se presentó una disminución en el número de UFC desde el día 15 hasta 60 con valores de 8,77 y 8,60 UL respectivamente; luego se evidenció un crecimiento constante hasta los 180 días de almacenamiento con un número de células viables de 8,69 UL en 10^8 . La temperatura óptima para el crecimiento de rizobios en medio de cultivos e inoculantes sólidos puede variar entre cepas y especies, con valores entre 27°C y 39°C . Las temperaturas máximas se encuentran en el rango de $35\text{-}39^\circ\text{C}$, sin embargo, se ha observado un aumento en la proliferación celular de rizobios con temperatura hasta los 42°C . Esta característica es importante ya que cepas adaptadas a altas temperaturas de almacenamiento pueden sobrevivir a altas temperaturas encontradas en suelos tropicales, las cuales oscilan entre 27 y 50°C (Abdulland & Al-falih, 2002).

Los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 almacenados a $28\pm 2^\circ\text{C}$ mostraron un aumento paulatino en una unidad exponencial desde el día 15 hasta el día 60 con valores de 8,60 y 9,95 UL respectivamente, con un posterior declive hasta los 120 y 180 días de evaluación; sin embargo, se mantuvo el número final en 8,90 UL/g de inoculante en 10^8 . Temprano *et al.* (2002) encontraron que inoculantes elaborados con *Rhizobium* sp almacenados a $25\pm 3^\circ\text{C}$, presentaron un incremento inicial en el número de células viables a las dos semanas de almacenamiento; luego este se redujo durante las ocho semanas siguientes por debajo de 10^8 UFC/g turba. Con base en los resultados obtenidos con los inoculantes de *Rhizobium* almacenados a $28\pm 2^\circ\text{C}$ se puede inferir que son aptos para su comercialización ya que se conservan durante 180 días con un número de UFC/g en 10^8 . Según Kuykendall *et al.* (2005) la temperatura óptima para el crecimiento y multiplicación de rizobios es entre 25 y 30°C .

Kremer y Peterson (1983) evaluaron diferentes soportes para la preparación de inoculantes entre ellos turba, carbón vegetal, bentonita y aceite vegetal, encontrando que la turba y el aceite vegetal puede mantener un alto número de rizobios ($> 10^8$) almacenados a temperatura entre 30 y 60°C después de 6 meses; para el caso del aceite vegetal, observaron que la alta supervivencia y viabilidad de los rizobios se debe a que este soporte puede proteger a las células contra el calor y las condiciones de sequía por el uso de altas temperaturas de almacenamiento.

Aarons y Ahmad (1996) observaron el crecimiento y supervivencia de cepas nativas de *Rhizobium* sp. (JRW3, JRC29) obtenidas a partir de suelos de Jamaica y cepas introducidas (IRC291, MI-SOA) aisladas a partir de suelos de África Occidental, en plantas de *Vigna unguiculata*, inoculadas con biofertilizantes elaborados con turba estéril almacenados a 30°C; los resultados obtenidos muestran que las cepas nativas (JRW3, JRC29) sobrevivieron mejor con respecto a las cepas introducidas (IRC291, MI-SOA) después de seis meses de almacenamiento a 30°C, con valores de 8,60-8,70 UL/g y 7,80-7,20 UL/g de inoculante, respectivamente. Estos autores concluyeron que la supervivencia de los rizobios en los inoculantes almacenados a temperatura de 30°C va a depender de cada cepa, su capacidad de establecer una baja tasa de metabolismo endógeno y utilizar reservas energéticas para mantenerse bajo condiciones de estrés.

Tittabutr *et al.* (2007) encontraron que cepas de crecimiento lento pueden sobrevivir más tiempo (> 6 meses) almacenadas en inoculantes sólidos con base en turba, e incluso en inoculantes líquidos, comparadas con cepas de crecimiento rápido; sin embargo, la eficiencia de los rizobios puede disminuir con el tiempo de almacenamiento. Largos períodos de almacenamiento (> 1 año) puede traer cambios fisiológicos en las células, reducción en la viabilidad y tasa de multiplicación, interferir en la síntesis de proteínas, ADN, ARN, disminución del vigor celular por la pérdida de genes dispensables *ex planta* posiblemente ligados a plásmidos portadores de genes simbióticos y aumentar el tiempo de nodulación en las raíces de las

leguminosas, disminuyendo la eficiencia de los rizobios en los inoculantes (León *et al.*, 1986). A mayor temperatura de almacenamiento de los inoculantes, se aceleran los procesos biológicos, específicamente la respiración de los microorganismos dentro del empaque, agotando en menor tiempo el sustrato y disminuyendo la cantidad de carbono disponible (Pérez & Torralba, 1997 citado por Jiménez, 2007).

Albareda *et al.* (2008) evaluaron diferentes sustratos para la preparación de inoculantes con base en *Sinorhizobium fredii* SMH12 (*Ensifer*) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, observando que el compost de corcho, perlita y turba son soportes eficaces ya que permitieron la supervivencia de altas poblaciones de rizobios alrededor de 10^{10} UFC/g inoculantes y se mantuvo sin cambios durante 90 y 120 días de incubación a temperatura de 25°C. Al final del período de almacenamiento, el número de células viables para SMH12 y USDA110 fue superior a 10^9 y 5×10^8 UFC/g, respectivamente para los inoculantes elaborados con turba.

5.8.3. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre la actividad biológica, evaluada en plantas de arveja

El peso fresco de la parte aérea y radical de las plantas de arveja inoculadas con los productos almacenados durante 15, 60, 120 y 180 días, se muestran en la tabla 12.

Para la variable peso fresco de la parte aérea de plantas de arveja inoculadas con los productos almacenados durante 15, 60, 120 y 180 días a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 3^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ se observó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados con la cepa ICA L9 pero sí comparado con el testigo químico (TQ) y testigo absoluto (TA). Con respecto al peso fresco radical podemos observar que el producto almacenado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ a los 60 días, muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a la temperatura de almacenamiento de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con valores de 0,23g y 0,42g, respectivamente. Cuando los inoculantes están almacenados en nevera, los rizobios tienden a disminuir su actividad metabólica, este resultado

puede estar correlacionado con el número de UFC/g ya que al evaluar este parámetro en los inoculantes almacenados a temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ se encontró que hubo una disminución en la multiplicación de los rizobios a los 60 días lo cual pudo afectar la nodulación y la FBN en las plantas evaluadas con este tratamiento. Los inoculantes almacenados a las temperaturas evaluadas durante 180 días e inoculados en arveja no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo químico y absoluto.

Tabla 12. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre el peso fresco de la parte aérea y radical en plantas de arveja

Fuente variación	TIEMPO (días)							
	15		60		120		180	
	PFA	PFR	PFA	PFR	PFA	PFR	PFA	PFR
L9 ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$)	0,82a	1,06a	0,81a	0,23b	2,45a	2,36a	1,22a	0,95a
L9 ($18\pm 3^{\circ}\text{C}$)	0,89a	1,17a	0,87a	0,31ab	2,21a	2,34a	1,26a	0,88a
L9 ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$)	0,77a	1,03a	0,80a	0,42a	2,58a	2,44a	1,34a	1,13a
TA	0,53c	0,36b	0,38c	0,26b	1,01b	1,13b	0,74c	0,70a
TQ	0,66b	0,40b	0,46b	0,36a	0,97b	1,01b	1,12a	0,86a
C.V	33.68	37.52	27.63	97.89	34.45	32.78	58.49	73.81

PFA: peso fresco de la parte aérea; PFR: peso fresco radical. Unidades: gramos. Letras diferentes indican: Diferencias estadísticamente significativas ($p\leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Las plantas inoculadas con rizobios tienden a tener mayor capacidad fotosintética expresada en el área foliar con respecto a las plantas no inoculadas. Peñaranda (2004) evaluó plantas de arveja variedad “Santa Isabel” inoculadas con la cepa ICA L9, encontrando un mayor peso de la parte aérea de las plantas inoculadas con respecto al testigo químico y absoluto, 99 días después de la siembra del cultivo. Esta característica se vio reflejada en una mayor capacidad productiva por el cultivo, generando plantas con mayor tasa absoluta de crecimiento e índice de área foliar aumentando la biomasa vegetal.

Las variables de peso seco de la parte aérea y radical de las plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9 en los productos almacenados a diferentes temperaturas se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre el peso seco de la parte aérea y radical en plantas de arveja

Fuente variación	Tiempo (días)							
	15		60		120		180	
	PSA	PSR	PSA	PSR	PSA	PSR	PSA	PSR
L9 (4±2°C)	0,11a	0,07a	0,16a	0,06a	0,35a	0,13a	0,32a	0,18a
L9 (18±3°C)	0,09a	0,06a	0,17a	0,06a	0,34a	0,14a	0,36a	0,16a
L9 (28±2°C)	0,08a	0,06a	0,17a	0,06a	0,39a	0,14a	0,28a	0,16a
TA	0,05b	0,04b	0,05b	0,03b	0,12b	0,07b	0,22b	0,12b
TQ	0,06b	0,04b	0,07b	0,04b	0,10b	0,04c	0,28a	0,16a
C.V	75.97	79.26	45.77	43.01	35.64	37.10	42.41	47.63

PSA: peso seco de la parte aérea; PSR: peso seco radical. Unidades: gramo. Letras diferentes indican: Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Para la variable peso seco de la parte aérea y radical, no se observaron diferencias estadísticamente significativas según la prueba de comparación múltiple de Duncan ($p < 0,05$) entre los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 almacenados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 3^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ a los 15, 60, 120 y 180 días. El testigo químico y el testigo absoluto sin inocular, presentaron menores valores de peso seco foliar y radical con respecto a los tratamientos inoculados con la cepa ICA L9. El testigo químico mostró un valor menor para la variable de peso seco radical de 0,04g con respecto al testigo absoluto de 0,07g en los ensayos de evaluación de 120 días de almacenamiento de los productos. Las plantas de arveja inoculadas con los productos almacenados durante 180 días a diferentes temperaturas no presentaron diferencias significativas para las variables de peso seco de la parte aérea y radical con respecto al testigo químico. Este

resultado muestra la necesidad de las plantas de incluir dentro de su nutrición al nitrógeno como elemento esencial para llevar a cabo sus funciones celulares, el cual como podemos observar en estos ensayos, pudo ser tomado bien sea por la FBN a través de los rizobios o el nitrógeno contenido dentro de la fertilización. En el caso de las plantas en simbiosis, la sustitución del nitrógeno es del 100% y no se requiere la aplicación de este elemento. Lo anterior se confirma por los menores valores obtenidos para esta variable, con el testigo absoluto.

El peso seco de la parte aérea es un parámetro útil para determinar la influencia de los tratamientos, en este caso la inoculación de la cepa ICA L9 sobre la producción de materia verde en las plantas de arveja. Es importante anotar que la disponibilidad de nitrógeno procedente de la fijación biológica se inicia aproximadamente 20 días después de la siembra, lo cual ha generado una controversia entre diferentes investigadores y asistentes técnicos, ya que algunos consideran necesario adicionar una pequeña cantidad de N mineral (30kg/ha), para estimular el crecimiento inicial de las plántulas, favorecer el establecimiento de las cepas en el cultivo y estimular la formación de los nódulos en la raíz (Silvestre 1983 citado por Mora, 1995). Sin embargo, en estudios realizados por Corpoica y en este trabajo de investigación, no se adicionó nitrógeno en ninguno de los ensayos evaluados a través del tiempo, razón por la cual se puede pensar que la asociación entre los rizobios y la leguminosa se presentó de forma natural con la formación de nódulos en las raíces de arveja estimulada quizá por el nitrógeno presente en el soporte o por el contenido dentro de la semilla, necesario en la etapa de crecimiento y desarrollo de las plantas.

Ramírez *et al.* (2007) realizaron ensayos de eficacia con la cepa ICA L9 de *Rhizobium*, en arveja (*Pisum sativum*) a nivel de campo, donde observaron que la inoculación mostró un beneficio en el desarrollo y crecimiento de las plantas, viéndose reflejado este efecto en el peso fresco y seco de la parte aérea con valores de 328,56 y 37,26g al compararlos con el testigo absoluto con valores de 273,15 y 30,24g respectivamente, observándose una mayor acumulación de biomasa en los

tratamientos inoculados con la cepa ICA L9, en la época de cosecha. Para el caso del testigo químico, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a las plantas inoculadas, para estas variables. Este resultado pudo estar influenciado por la cantidad de nitrógeno presente en el suelo, aplicado en la fertilización. Sin embargo, este resultado no significativo, permite afirmar que la inoculación puede sustituir el 100% del fertilizante nitrogenado.

Para las variables de longitud de la parte aérea, radical y número de nódulos se pudo observar que no hay diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p < 0,05$) entre los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9, almacenados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 3^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15, 60 y 180 días (Tabla 14); sin embargo, es evidente las diferencias entre las plantas inoculadas con respecto al testigo químico y absoluto (Figura 22). Las plantas inoculadas con la cepa ICA L9 independientemente de las temperaturas de almacenamiento del producto, fueron las más vigorosas, con una longitud de la parte aérea y radical mayor. Este resultado muestra el beneficio proporcionado a las plantas con la inoculación, disminuyendo o sustituyendo en un 100% la fertilización química nitrogenada y reduciendo los costos de producción (Alfonso *et al.*, 2005). Es evidente que el nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, este efecto se vio claramente en las plantas no inoculadas (testigo absoluto) donde la no aplicación del mismo produjo un efecto negativo sobre las variables evaluadas (Figura 23).

Tabla 14. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 sobre la longitud de la parte aérea, radical y número de nódulos en plantas de arveja

Fuente variación	TIEMPO (días)											
	15			60			120			180		
	LA	LR	NN	LA	LR	NN	LA	LR	NN	LA	LR	NN
L9 (4±2°C)	22,37a	20,67a	42,73a	30,50a	26,56a	27,90a	34,22a	11,34b	27,86a	29,96a	16,41a	15,86a
L9 (18±3°C)	21,57a	20,17a	50,86a	29,74a	26,88a	24,80a	33,72a	12,05ab	22,63a	30,21a	16,11a	13,96ab
L9 (28±2°C)	20,19a	19,53a	42,06a	27,00a	25,20a	32,70a	35,68a	12,29a	22,13a	30,88a	17,20a	10,63b
TA	14,61c	15,12b	0,00b	15,43b	17,37b	0,00b	12,99b	9,69b	0,00b	25,32b	14,42b	0,00b
TQ	17,43b	20,30a	0,00b	15,55b	16,57b	0,00b	12,98b	9,18b	0,00b	29,15a	15,51a	0,00b
C.V	26.63	20.01	51.74	38.49	23.94	54.56	19.14	14.16	59.09	27.85	21.70	71.63

LA: longitud de la parte aérea; LR: longitud radical; NN: número de nódulos. Unidades: centímetros. Letras diferentes indican: Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

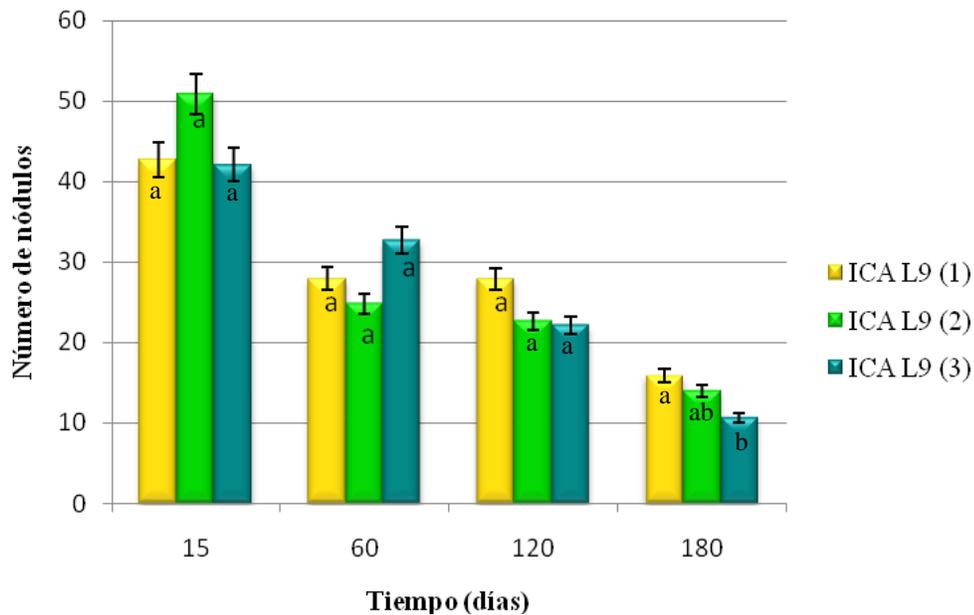
Los inoculantes almacenados durante 180 días a temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$, mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de nódulos con valores de 15,86 y 10,63 respectivamente (Figura 24). Aunque se evidenció un menor número de nódulos en los inoculantes almacenados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, se observó un mayor tamaño y coloración interna, característica que indica la efectividad en la FBN (Figura 25). Es importante tener en cuenta que el número de nódulos no determina la eficiencia en la FBN ya que en el suelo se pueden encontrar cepas de rizobios altamente efectivas que pueden formar pocos nódulos en las raíces de leguminosas (Bécquer, 2009).



Figura 22. Longitud de la parte aérea de las plantas de arveja inoculada con la cepa ICA L9, testigo químico y absoluto



Figura 23. Longitud radical de las plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9 y testigo químico, comparadas con el testigo absoluto



Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$)
 (1) Temperatura almacenamiento $4 \pm 2^\circ\text{C}$: (2) Temperatura almacenamiento $(18 \pm 3^\circ\text{C})$: (3) Temperatura almacenamiento $(28 \pm 2^\circ\text{C})$

Figura 24. Número de nódulos en las plantas de arveja inoculadas con productos almacenados durante 180 días a diferentes temperaturas

El menor número de nódulos en las raíces de arveja observados en los ensayos de evaluación de los inoculantes almacenados durante 180 días, puede estar relacionado con la humedad del sustrato, en este caso la vermiculita; debido a las altas temperaturas ($30\text{-}32^\circ\text{C}$) presentadas al final del periodo de evaluación donde fue necesario regar las plantas todos los días; en algunas ocasiones se presentó acumulación de agua en los vasos, lo cual pudo afectar considerablemente la nodulación, ya que porcentajes de humedad mayor al 80% puede reducir la cantidad de oxígeno molecular requerido para la multiplicación de los rizobios, retardar el proceso de nodulación e interrumpir la eficiente FBN (Hungria *et al.*, 2001). Las altas temperaturas a las que estuvieron expuestas las plantas en el invernadero, pudieron inhibir la formación de raíces laterales y pelos radicales, disminuyendo el número de sitios posibles para la nodulación. Cuando las temperaturas sobrepasan los 30°C , es

recomendable inocular repetidamente a fin de mantener el proceso de fijación de N₂ (Hungria & Vargas, 2000).



Figura 25. Nódulos efectivos encontrados en raíces de arveja

El efecto positivo en el crecimiento de las plantas de arveja puede estar correlacionado con un mayor desarrollo radical estimulado por la inoculación con la cepa ICA L9, permitiendo la extracción de más cantidad de nutrientes que pueden ser traslocados a las plantas para su metabolismo y nutrición (Faiguenbaum, 1993). Las plantas fertilizadas con 200 ppm de nitrógeno inorgánico también presentaron una mayor longitud radical comparada con los testigos absolutos.

Se determinó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) expresado en porcentaje (Beck *et al.*, 1993 citado por León *et al.*, 2002) de los productos almacenados a las tres temperaturas durante 15 días, teniendo en cuenta la siguiente expresión:

IEI = [Materia seca tratamiento inoculado - Materia seca control no inoculado / Materia seca control con nitrógeno - Materia seca control no inoculado, sin N₂] x 100; y se clasifica así:

Inefectivo = Menos del 50% de la materia seca del control con nitrógeno (C/N)

Parcialmente efectivo = 50-75% de la materia seca del control con nitrógeno (C/N)

Efectivo = 75-100% de la materia seca del control con nitrógeno (C/N)

IEI (ICA L9 - temperatura $4\pm 2^{\circ}\text{C}$) = 90%

IEI (ICA L9 - temperatura $18\pm 3^{\circ}\text{C}$) = 60%

IEI (ICA L9 - $28\pm 2^{\circ}\text{C}$) = 50%

Según el IEI, los inoculantes almacenados a temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, fueron los más efectivos, con un porcentaje del 90% con respecto a los almacenados a $18\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los microorganismos cuando se encuentran almacenados en nevera, tienden a entrar en estado de latencia disminuyendo las actividades metabólicas; este estadio se refleja en la disminución en el consumo de nutrientes encontrados en el soporte, soportando así varios periodos de almacenamiento; cuando son inoculados en el suelo, activan su maquinaria enzimática para llevar a cabo las diferentes funciones como la FBN. Los microorganismos que se encuentran almacenados a temperaturas más altas dentro del producto, utilizan los nutrientes encontrados en el soporte y llevan a cabo sus funciones metabólicas de acuerdo a sus requerimientos, pasando por la etapa de adaptación, exponencial, latencia y decline dentro del mismo sustrato. Es posible que cuando inoculamos estos productos en las leguminosas, el número de rizobios haya disminuido por efecto de la temperatura y humedad en el invernadero durante el tiempo de evaluación, el proceso de nodulación sea menos eficiente y así mismo, la FBN; lo cual se puede ver reflejado en una menor producción de biomasa fresca en las plantas inoculadas.

5.8.4. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre la actividad biológica, evaluada en plantas de soya

El peso fresco de la parte aérea y radical de las plantas de soya inoculadas con los productos almacenados a diferentes temperaturas, se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre el peso fresco de la parte aérea y radical en plantas de soya

Fuente variación	TIEMPO (días)							
	15		60		120		180	
	PFA	PFR	PFA	PFR	PFA	PFR	PFA	PFR
J96 (4±2°C)	1,02a	0,92a	2,33a	2,09a	2,07a	2,49a	1,02a	0,92a
J96 (18±3°C)	1,30a	1,21a	2,22a	2,01a	1,96a	2,10a	1,30a	1,21a
J96 (28±2°C)	1,19a	1,20a	2,66a	2,37a	2,21a	1,66a	1,19a	1,20a
TA	0,85b	0,60b	1,08b	1,38b	1,39c	1,16b	0,85b	0,60b
TQ	0,89b	0,80b	1,25b	0,97b	1,70b	1,37b	0,89b	0,80b
C.V	67,93	73,62	36,11	44,21	43,21	93,87	67,93	73,62

PFA: Peso fresco de la parte aérea; PFR: peso fresco radical. Unidades: gramo. Letras diferentes indican: Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Para las variables de peso fresco de la parte aérea y radical de las plantas de soya inoculadas con los productos almacenados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 3^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los productos inoculados con la cepa ICA J96 almacenados a 15, 60, 120 y 180 días; pero sí se evidenciaron diferencias entre los tratamientos inoculados con respecto al testigo químico y absoluto. Entre el testigo químico y absoluto se observaron diferencias significativas en la variable de peso fresco de la parte aérea en el ensayo de evaluación de 120 días de almacenamiento de los productos, con valores de 1,70g y 1,39g respectivamente.

Los resultados para las variables de peso seco de la parte aérea y radical, se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre el peso seco de la parte aérea y radical en plantas de soya

Fuente variación	Tiempo (días)							
	15		60		120		180	
	PSA	PSR	PSA	PSR	PSA	PSR	PSA	PSR
J96 (4±2°C)	0,43a	0,11a	0,51ab	0,16a	0,44a	0,13a	0,43a	0,11a
J96 (18±3°C)	0,45a	0,13a	0,47b	0,14a	0,44a	0,12a	0,45a	0,13a
J96 (28±2°C)	0,46a	0,11a	0,60a	0,17a	0,47a	0,14a	0,46a	0,11a
TA	0,32b	0,10a	0,17c	0,06b	0,25c	0,08b	0,32b	0,10a
TQ	0,35b	0,11a	0,25b	0,07b	0,33b	0,09b	0,35b	0,11a
C.V	39,82	62,38	43,08	45,78	47,27	53,26	39,82	62,38

PSA: peso seco de la parte aérea; PSR: peso seco radical. Unidades: Centímetros. Letras diferentes indican: Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Con respecto a la variable peso seco de la parte aérea no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas de soya inoculadas con los productos almacenados a diferentes temperaturas durante 15, 60, 120 y 180 días según el ANOVA ($p < 0,05$). Para la variable peso seco radical, se pudo observar que los inoculantes utilizados en soya almacenados durante 15 y 180 días a diferentes temperaturas, no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo químico y absoluto. Este resultado puede estar relacionado con la dinámica de crecimiento y establecimiento de los rizobios en el soporte después de 15 días de elaborado los productos y la disminución en el número de células viables después de 180 días de almacenamiento.

Mannasila *et al.* (2007) evaluaron cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y *B. elkanii* sobre el crecimiento en plantas de soya (*Glycine max*) y fríjol mongo (*Vigna radiata*), encontrando que hay una relación directa entre el efecto de la inoculación sobre la

materia seca de las plantas, número y peso fresco de nódulos, con respecto a los testigos sin inocular donde los valores son menores; este resultado es similar al obtenido en este trabajo de investigación ya que demuestra claramente el efecto positivo que tienen las plantas de soya inoculadas, en la producción de materia seca, sin haber un efecto directo en las temperaturas de almacenamiento de los productos; lo cual indica que sí hubo una asociación de los rizobios con las plantas y FBN.

Resultados similares han sido encontrados por Lima *et al.* (2005) quienes identificaron la diversidad fenotípica de cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de suelos del Amazonas y evaluaron la eficiencia relativa de la inoculación (ERI) en plantas de caupí (*Vigna unguiculata*); encontrando un efecto positivo en la inoculación con una respuesta superior en la producción de materia seca, cantidad de nitrógeno acumulado, producción de parte aérea y mayor ERI en las plantas inoculadas, con respecto al testigo químico y testigo sin inocular.

Para las variables longitud de la parte aérea, radical y número de nódulos (Tabla 17), se puede observar que no hay diferencias estadísticamente significativas en las plantas inoculadas con los productos almacenados durante 15, 60 y 180 días a diferentes temperaturas; pero sí es evidente un efecto negativo en el testigo químico y absoluto en cuanto al desarrollo radical de las plantas (Figura 26). En el caso de la longitud radical, se observa que las plantas inoculadas con los productos almacenados a $18\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 120 días, mostraron una menor longitud con 11,99 cm, con respecto a los productos almacenados a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ con valores de 14,78 cm y 16,60 cm respectivamente; observándose también diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo químico y absoluto con valores de 15,09 cm y 15,36 cm respectivamente, siendo el tratamiento inoculado el que presentó menores valores de longitud radical evaluado en este tiempo.

Tabla 17. Efecto de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con la cepa ICA J96 sobre la longitud de la parte aérea, radical y número de nódulos en plantas de soya

Fuente variación	TIEMPO (días)											
	15			60			120			180		
	LA	LR	NN	LA	LR	NN	LA	LR	NN	LA	LR	NN
J96 (4±2°C)	23,82a	18,56a	22,30a	30,91a	15,07a	30,83a	22,65a	14,78a	29,20a	23,82a	18,56a	22,30a
J96 (18±3°C)	24,31a	20,44a	19,93a	30,82a	14,62a	25,86a	22,70a	11,99b	22,00b	24,31a	20,44a	19,93a
J96 (28±2°C)	24,76a	20,79a	17,70a	30,48a	15,30a	28,26a	24,54a	16,60a	24,83a	24,76a	20,79a	17,70a
TA	22,86ab	15,98b	0,00b	18,12c	11,74b	0,00b	19,89b	15,36a	0,00b	22,86ab	15,98b	0,00b
TQ	21,92b	17,25b	0,00b	21,28b	12,83b	0,00b	21,25b	15,09a	0,00b	21,92b	17,25b	0,00b
C.V	17,41	38,42	51,14	11,99	21,15	42,64	17,01	27,25	45,27	17,41	38,42	51,14

LA: longitud de la parte aérea; LR: longitud radical; NN: número de nódulos. Unidades: Centímetros. Letras diferentes indican: Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Duncan.

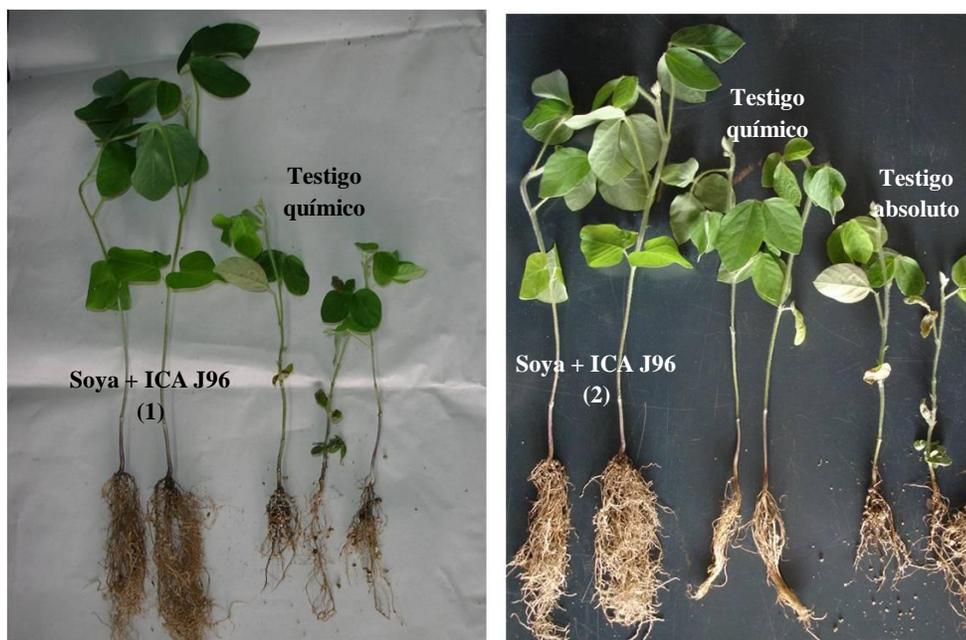
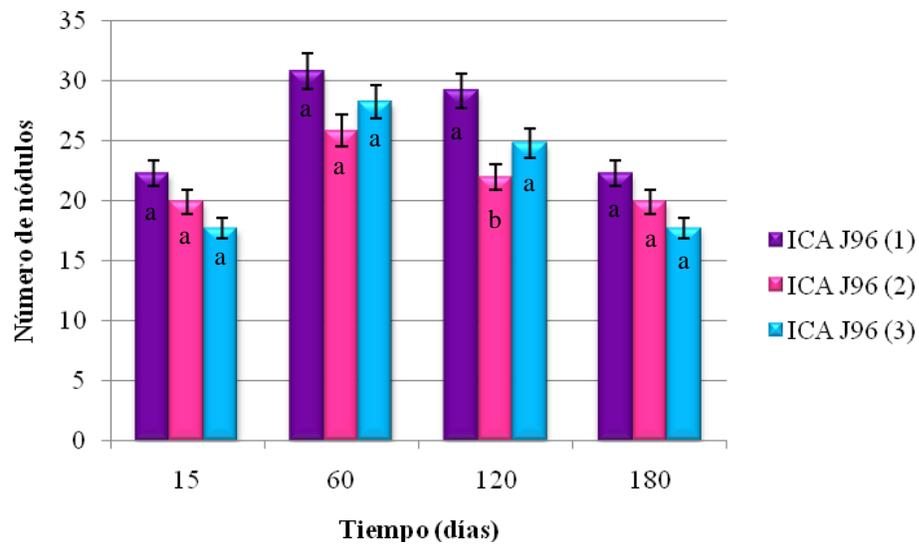


Figura 26. Longitud de la parte aérea y radical de las plantas de soya inoculadas con la cepa ICA J96

En cuanto al número de nódulos formados en las raíces de las plantas, se puede observar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los productos almacenados a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 15, 60 y 180 días (Figura 27), pero sí con respecto al testigo químico y absoluto. Para los inoculantes almacenados durante 120 días a temperatura de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$, inoculados en plantas de soya, se puede observar que el número de nódulos es menor con respecto a la temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, con valores de 22, 29,20 y 24,83 respectivamente. Es importante anotar que en las raíces de los testigos químicos y absolutos, se observaron algunas estructuras nodulares; sin embargo, en su interior no se evidenció el color rojo característico de la actividad de la enzima nitrogenasa, lo cual indica que estos nódulos son inefectivos, debido a que no están llevando a cabo el proceso de FBN; esto se vio reflejado en una menor producción de materia seca y contenido de nitrógeno en las plantas de soya no inoculadas con respecto a las inoculadas. La vermiculita utilizada como soporte, es un

mineral compuesto por filosilicatos hidratados, que se presentan en cristales pequeños o láminas hexagonales (Leibar, 2006); algunas veces el proceso de esterilización por calor, no elimina completamente los microorganismos adheridos entre las láminas de la vermiculita, por esto se puede presentar contaminación con rizobios viables capaces de infectar raíces de leguminosas y formar nódulos; aunque se debe tener en cuenta que la habilidad de algunas cepas de rizobios para formar nódulos, no necesariamente indica la eficiencia en la FBN (Mora, 1995). La incineración a 800°C puede eliminar totalmente los microorganismos adheridos a la vermiculita como bacterias, hongos, esporas y ácaros.



Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$)
 (1) Temperatura almacenamiento $4 \pm 2^\circ\text{C}$: (2) Temperatura almacenamiento $(18 \pm 3^\circ\text{C})$: (3) Temperatura almacenamiento $(28 \pm 2^\circ\text{C})$

Figura 27. Número de nódulos en las plantas de soya inoculadas con productos almacenados durante 180 días a diferentes temperaturas

Los productos elaborados con la cepa ICA J96, almacenados a temperatura $4\pm 2^{\circ}$, $18\pm 3^{\circ}$ y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15, 60, 120 y 180 días, no tuvieron ningún efecto negativo sobre la simbiosis, por el contrario, es evidente que hubo una asociación de los rizobios inoculados y las plantas de soya, en todos los tiempos de almacenamiento evaluados.

Ramírez & Salamanca (2007) evaluaron la eficacia de las cepas ICA J01 e ICA J96 utilizando 4 variedades de soya de la altillanura Colombiana (Sabana 7, Superior 6, Taluma 5 y Libertad 4), encontrando que para la variable número y peso seco de nódulos, los mayores valores se obtuvieron cuando inocularon con la cepa ICA J96 con respecto a la cepa ICA J01, en las variedades de soya Superior 6 y Sabana 7 con valores de 4,53 y 2,77 nódulos/planta⁻¹, superando significativamente a las variedades Libertad 4, Taluma 5 y al testigo químico nitrogenado con valores de 0,18, 0,06 y 0,1 nódulos/planta⁻¹, respectivamente. En cuanto al rendimiento, las variedades Superior 6, Sabana 7 y Taluma 5, inoculadas con la cepa ICA J96 superaron en rendimiento con valores de 1,289-1,281 y 1,068 kg/ha⁻¹ a las plantas inoculadas con la cepa ICA J01 y al testigo químico nitrogenado. Estos resultados indicaron que las variedades de soya Superior 6, Sabana 7 y Taluma 5 presentaron una mayor especificidad por la cepa ICA J96 lo cual se vio reflejado en las variables agronómicas y simbiosis, superando incluso el contenido de nitrógeno encontrado en las plantas.

5.8.5. Determinación de porcentaje de nitrógeno foliar en las plantas de arveja y soya inoculadas con las cepas ICA L9 e ICA J96

La determinación del porcentaje de nitrógeno en plantas de arveja y soya inoculadas con los productos elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 almacenados a temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $18\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 120 días, se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentaje de nitrógeno foliar encontrado en plantas de arveja y soya, inoculadas con las cepas ICA L9 e ICA J96

Cepa/Tratamiento	N (%)	Cepa/Tratamiento	N (%)
ICA L9 ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$)	3,09a	ICA J96 ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$)	3,18a
ICA L9 ($18\pm 3^{\circ}\text{C}$)	3,40a	ICA J96 ($18\pm 3^{\circ}\text{C}$)	3,02a
ICA L9 ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$)	2,98a	ICA J96 ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$)	3,09a
Testigo absoluto	1,26b	Testigo absoluto	1,30b
Testigo químico	1,51ab	Testigo químico	1,30b

Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$)

Para el caso de los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9, se puede observar que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el porcentaje de nitrógeno foliar contenido en las plantas de arveja, inoculadas con los productos con respecto al testigo químico fertilizado con 200 ppm de nitrógeno; sin embargo, se observan diferencias estadísticamente significativas entre estos tratamientos y el testigo absoluto. Estos resultados son similares a los obtenidos por Contreras *et al.* (1994) quienes evaluaron el efecto de la inoculación de *Rhizobium leguminosarum* sp. en dos leguminosas forrajeras, *Pisum sativum* sp. *arvense* L. y *Vicia villosa* Roth., determinando el nitrógeno fijado por FBN y la concentración de nitrógeno foliar en las plantas inoculadas. Estos autores encontraron que el porcentaje de nitrógeno total en la parte aérea de las plantas de *Pisum sativum* sp. *arvense* fue mayor en los tratamientos inoculados con *Rhizobium* sin nitrógeno (N1) e inoculados con

Rhizobium más NH_4NO_3 (N_2) con valores de 3,51% y 3,32% respectivamente, con respecto a los testigos absolutos no inoculados con valor de 2,83%. La comparación de los resultados obtenidos a partir de los tratamientos inoculados sin nitrógeno y los inoculados completamente fertilizados, enfatiza la importancia de la inoculación; no evidenciándose diferencias estadísticamente significativas en las variables medidas en las plantas de *Pisum sativum* sp *arvense* ya que ambos tratamientos tuvieron el mismo porcentaje de nitrógeno total y el mismo porcentaje de nitratos en la parte aérea.

Con respecto al porcentaje de nitrógeno foliar encontrado en las plantas de soya inoculadas con la cepa ICA J96, se puede observar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados con los productos almacenados a diferentes temperaturas de $4\pm 2^\circ\text{C}$, $18\pm 3^\circ\text{C}$ y $28\pm 2^\circ\text{C}$ con valores de 3,18%, 3,02% y 3,09% respectivamente; pero si es evidente las diferencias entre las plantas inoculadas con respecto al testigo químico y absoluto ambos con un valor de 1,30% de nitrógeno foliar. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede inferir que la cantidad de nitrógeno encontrado en el tejido vegetal de las plantas de arveja y soya, inoculadas con las cepas bajo estudio, puede provenir fundamentalmente del proceso de fijación biológica de este elemento.

La productividad del cultivo de soya está fuertemente condicionada por la acumulación de nitrógeno en la biomasa, y por la proporción relativa del nitrógeno proveniente del suelo y de la atmósfera, que a su vez, es el resultado de la interacción de la planta con los microorganismos simbióticos y el ambiente en que crece y se desarrolla (Racca & Collino, 2004).

5.9. Determinación de la actividad de la nitrogenasa

La actividad de la enzima nitrogenasa en los nódulos de las plantas de arveja inoculadas con los productos elaborados con base en la cepa ICA L9 y soya con la cepa ICA J96 almacenados durante 120 días a diferentes temperaturas, se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Actividad de la enzima nitrogenasa, determinada por medio de la técnica de reducción de acetileno (ARA) para inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 e

ICA J96

Cepa/Tratamiento	$\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$
ICA L9 (4±2°C)	2,45b
ICA L9 (18±3°C)	2,28b
ICA L9 (28±2°C)	3,22a
ICA J96 (4±2°C)	0,633 ^a
ICA J96 (18±3°C)	0,476 ^a
ICA J96 (28±2°C)	0,518 ^a

Según los resultados obtenidos en la prueba de reducción de acetileno para la cepa ICA L9, se observa que la mayor actividad de la enzima nitrogenasa se estimó en las plantas inoculadas con los productos almacenados a 28±2°C con un valor de 3,22 $\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$, seguido de las plantas inoculadas con los productos almacenados a 4±2°C y 18±3°C, con valores de 2,45 y 2,28 $\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$ respectivamente. Para el caso de los testigos químicos y absolutos, no se observó la actividad de esta enzima indispensable para la FBN (Figura 28).

Ayala (2005) evaluó el efecto de 8 cepas de *Rhizobium* sp, sobre la actividad específica de la enzima nitrogenasa en plantas de maní variedad Red Starr, a los 40 días de edad; encontrando que 2 cepas (VII-VII) aisladas a partir de *Arachis*

hypogaea y *Centrosema pubescens*, presentaron la mayor actividad de la enzima con valores de 12,83 y 13,84 $\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$ respectivamente; el valor menor obtenido en la evaluación de la nitrogenasa fue de 4,36 $\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$, sin embargo, se vio un efecto positivo de la fijación biológica de nitrógeno sobre la producción de biomasa en las plantas evaluadas.

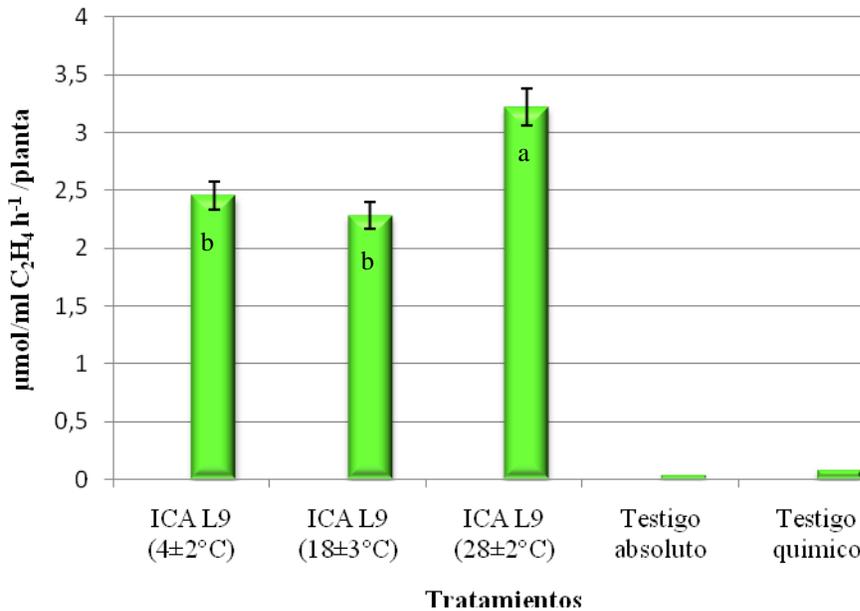


Figura 28. Actividad de la enzima nitrogenasa en plantas de arveja inoculadas con la cepa ICA L9

Jiménez en el 2007, evaluó la actividad de la enzima nitrogenasa en árboles de *E. cyclocarpum*, *S. saman*, *P. carbonarium*, *P. indicus*, *C. farchildiana* y *Flemingia macrophylla* sembrados en suelos con poblaciones nativas de rizobios, observando que los árboles que presentaron la mayor actividad total de la nitrogenasa fueron los de *C. farchildiana* y *Flemingia macrophylla* con valores de 3,23 y 3,97 $\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$, respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos para la cepa ICA L9, donde el valor mayor observado para la actividad de la nitrogenasa fue de 3,22 $\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$.

Para el caso de las plantas inoculadas con la cepa ICA J96, se puede observar que la mayor actividad de la enzima nitrogenasa se evidenció en las plantas inoculadas con los productos almacenados a $4\pm 2^\circ\text{C}$ con valor de $0,633 \mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$, seguido de las plantas inoculadas con los productos almacenados a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y $18\pm 3^\circ\text{C}$ con valores de $0,518$ y $0,476 \mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$, respectivamente (Figura 29).

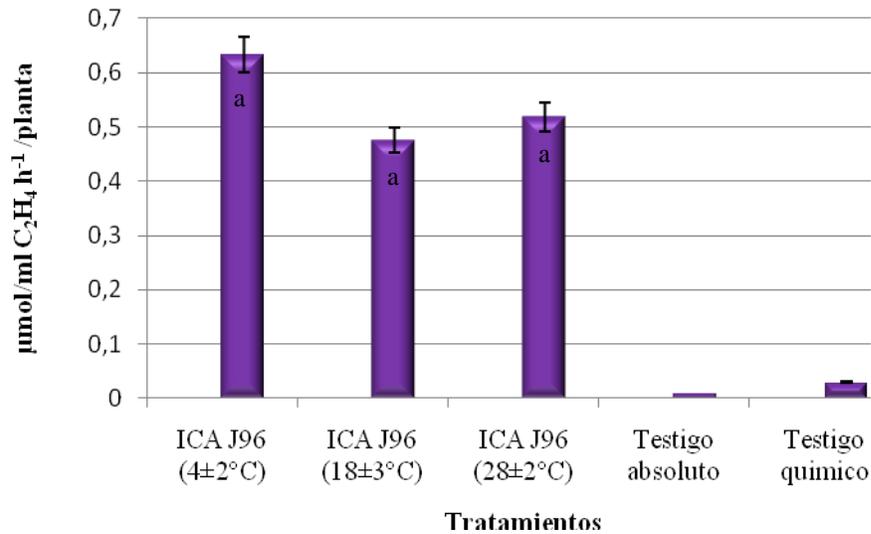


Figura 29. Actividad de la enzima nitrogenasa en plantas de soya inoculadas con la cepa ICA J96

Estos resultados son similares a los obtenidos por Rey *et al.* (2005) quienes evaluaron la actividad de la enzima nitrogenasa en cepas nativas aisladas e inoculadas en *Leucaena leucocephala* y una cepa de referencia perteneciente al Banco de Germoplasma de Corpoica, codificada como C50, encontrando que el mayor valor matemático lo reportó la cepa nativa C-202 con valor de $0,90 \mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$, seguido de la cepa control C-50 con valor de $0,82 \mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{planta}$. Este resultado muestra la efectividad de la cepa ICA J96 inoculada en las plantas de soya.

La actividad de la enzima nitrogenasa puede incrementarse con la edad del cultivo en las plantas inoculadas. Herdina & Silsbury (1989) observaron que la temperatura, concentraciones de NO_3^- y los días después de la siembra influyeron en los valores obtenidos de $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ en plantas de *Vicia faba* inoculadas con rizobios. Los mayores valores se obtuvieron a medida que aumentaban los días después de la siembra (dds) y la concentración de NO_3^- presente en el sustrato; a los 38 dds el valor obtenido fue de $0,78 \mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ planta y a los 63 dds se obtuvo un valor de $11,67 \mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ planta.

Finalmente al observar el efecto de las temperaturas de almacenamiento de $4\pm 2^\circ\text{C}$, $18\pm 3^\circ\text{C}$ y $28\pm 2^\circ\text{C}$ sobre la viabilidad de los rizobios en los inoculantes elaborados con base en las cepas ICA L9 e ICA J96 y la actividad biológica del producto evaluado en plantas de arveja y soya, se puede pensar que las temperaturas utilizadas en este trabajo de investigación no tuvieron un efecto negativo sobre la supervivencia de las bacterias ya que hasta el final del tiempo de evaluación (180 días), se mantuvo una concentración de 10^8 UFC/g de inoculante. De igual manera, en las pruebas biológicas se puede observar que los inóculos evaluados presentaron un efecto positivo en las plantas que se vio reflejado en el aumento de la biomasa de la parte aérea y radical, lo cual lleva a pensar que fue producto de la simbiosis de los rizobios con las plantas evaluadas y la fijación biológica de nitrógeno.

Conclusiones

1. La cepa ICA L9 pertenece al género *Rhizobium* y la cepa ICA J96 a *Rhizobium* o *Sinorhizobium* capaz de asociarse con plantas de soya.
2. Las cepas estudiadas crecen en condiciones de laboratorio, en rangos de pH semejantes a las de los suelos donde normalmente se cultivan arveja y soya. Esta característica está relacionada con la capacidad que tienen los rizobios de secretar al medio de cultivo ácidos orgánicos o exopolisacáridos de carácter ácidos o neutros productos del metabolismo, que pueden influir en el cambio del pH.
3. La prueba de resistencia intrínseca a antibióticos permite diferenciar las cepas bajo estudio bajo condiciones controladas, por lo cual esta metodología puede ser aplicada a estudios de diversidad de rizobios y pruebas de competencia entre cepas.
4. Las cepas ICA L9 e ICA J96 son estables y viables al rango de temperatura 4 ± 2 °C a 28 ± 2 °C, manteniendo su concentración en el nivel requerido para su comercialización hasta aproximadamente 6 meses, lo cual sugiere que estos productos no requieren cadena de frío para su almacenamiento y son aptos para la comercialización.
5. Los inoculantes elaborados con la cepa ICA L9 e ICAJ96 son eficaces en la fijación biológica de nitrógeno, esto se evidenció con el incremento significativo de la biomasa aérea y radical de las plantas, con respecto al testigo absoluto.
6. Contar con un perfil de identificación, permite hacer seguimiento a la eficiencia y capacidad competitiva de las cepas, aporta al control de calidad y protección de la identidad del inoculante.

7. Las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 tuvieron un efecto directo sobre el pH y el porcentaje de humedad del sustrato.
8. No se evidenció un efecto negativo de las temperaturas de almacenamiento de los inoculantes elaborados con las cepas ICA L9 e ICA J96 sobre el establecimiento de la simbiosis con plantas de arveja y soya; la asociación de los rizobios se evidenció a los 30 días después de la inoculación mediante la formación de nódulos en las raíces de las plantas.
9. El efecto benéfico de la asociación de arveja y soya con las cepas ICA L9 e ICA J96 bajo condiciones de invernadero, se reflejó en el incremento significativo de la biomasa aérea y radical de las plantas inoculadas y en el porcentaje de nitrógeno foliar, comparado con el testigo absoluto.
10. A nivel de invernadero, la inoculación con las cepas ICA L9 e ICA J96 permite sustituir el 100% de la aplicación de nitrógeno en las plantas de arveja y soya, confirmándose la eficiencia y beneficio del inoculante en la FBN.

Recomendaciones

- Evaluar el crecimiento de las cepas ICA L9 e ICA J96 en presencia de metales pesados, Al y Cu; con el fin de determinar el comportamiento de estos microorganismos en suelos que presenten estas condiciones y el efecto sobre la simbiosis y fijación biológica de nitrógeno.
- Emplear técnicas moleculares que permitan identificar con mayor exactitud, bacterias fijadoras de nitrógeno a nivel de género y especie. Esto con el objeto de realizar estudios de competencia de cepas en el suelo, establecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en diferentes nichos ecológicos, estudios de impacto ambiental debido al uso de biofertilizantes y, adicionalmente, permitirían tener una herramienta de control de calidad del inoculante.
- Determinar la producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal como hormonas y sideróforos en las cepas evaluadas en este estudio.
- Evaluar la capacidad de asociación y efectividad de las cepas, en la fijación biológica de nitrógeno bajo condiciones de campo.
- Evaluar la supervivencia de rizobios inoculados en diferentes soportes para la utilización en cultivos de leguminosas de interés agrícola.
- Evaluar la estabilidad de inoculantes elaborados con bacterias fijadoras de nitrógeno, almacenados a diferentes temperaturas durante un período de tiempo más prolongado.

BIBLIOGRAFIA

- Aarons, S., Ahmad, M. 1996. Examining growth and survival of cowpea rhizobia in Jamaican peat. *Letters in Applied Microbiology* Vol. 2: 115-118
- Abdulland, M., Al-falih, K. 2002. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. Vol. 5 (11): 1277-1279.
- Agrawal, R., Bajoria, S., Pareek, B. 2009. DNA isolation from *Rhizobium* by phenol chloroform method. [en línea] <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Method-3440.html> [Consulta: 5 de Marzo 2009].
- Agronet, 2007. Producción nacional por producto: Arveja. [en línea] <<http://www.agronet.gov.co>> [Consulta: 11 Julio de 2009].
- Albareda, M., Rodríguez, D., Temprano, J. 2009. Use of *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* for soybean inoculants in South Spain. *Europ. J. Agronomy* 30: 205–211
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D., Camacho, M., Temprano, J. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 40:2771–2779.
- Alfonso, E., Leyva, A., Hernández, A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) *Rev. Colombiana de Biotecnología*, Vol. 2 (2):47-54.
- Allaway, D., Lodwig, E., Crompton, M., Parsons, R., Wheeler, T., Poole, S. 2000. Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Molecular Microbiology*, Vol 36(2): 508 – 515.
- Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. Journal of systematic bacteriology* Vol 47 (4): 996-1006p.

Amer, M. 2008. Monitoring variation among faba bean *rhizobium* isolates. Growth curve, exo-polysaccharides and antibiotic resistance. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. Vol 4(5): 462-470.

Anuario estadístico del sector agropecuario. 2006. Dirección política sectorial. Grupo sistemas de información. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Arjona, H. 1977. El cultivo de la Arveja (*Pisum sativum*). Segunda edición. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía.

Ayala, L. 2005. Estudio de algunos aspectos de la fijación biológica de nitrógeno por el maní (*Arachis hypoagea*): Evaluación bioquímica de la fijación y factores relacionados en la asociación Maní-*Rhizobium* sp. Agronomía tropical. Vol. 27 (4): 427-449.

Bécquer, J. 2004. Descripción y Clasificación de rhizobios “Enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Sancti-Spíritus - Cuba. Revista Biología. Vol. 18 (1).

Bécquer, J. 2009. Estación experimental de Pastos y Forrajes, Sancti-Spíritus - Cuba. *Comunicación personal*.

Bergersen, F.J. 1980. Measurement of nitrogen fixation by direct means. En Methods for evaluating biological nitrogen fixation, Bergersen F.J. (Eds.), John Wiley and Sons Ltd N.Y. 701pp.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2005. 2da Edición, Release 5.0. [en línea] <<http://www.dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310.2005>> [Consulta: 7 de Febrero de 2009].

Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., Luna, V. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. Appl Microbiol Biotechnol 74:874–880.

- Bordeleau, L., Prevost, D. 1982. Strain identification in *Rhizobium meliloti* using the antibiotic disk susceptibility test. *Plant and Soil*. 66:45-50.
- Bordeleau, L., Prevost, D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environmental. *Plant and Soil*. 161:115-125.
- Buitrago, J., Duarte, C., Sarmiento, A. 2006. El cultivo de la arveja en Colombia. Produmedios y Fondo Nacional de Leguminosas. Bogotá, Colombia. 83 p.
- Caicedo, S., Botero, R. 1999. Cosecha de Soya a granel en los Llanos Orientales. CORPOICA C.I. La Libertad. Regional 8. Documento interno.
- Carlson, R., Price, N., Stacey, G. 1994. The biosynthesis of Rhizobial lipooligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol Plant Microbe Interact*. Vol. 7 (6): 684-695.
- Chen, w., Tan, Z., Gao, J., Li, Y., Wang, T. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. Journal of systematic bacteriology* Vol 47 (3): 870-873.
- Chica, Q. 1998. Identificación de cepas nativas de *Rhizobium* asociadas con leguminosas de la zona cafetera. *Tesis Maestría*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Postgrado en Microbiología. 185p.
- Contreras, V., Thomason, R., Wilson, W. 1994. Diferenciación biométrica y cuantificación del nitrógeno simbióticamente fijado en *Pisum sativum* sp. arvense L. y *Vicia villosa* Roth. como respuesta a la inoculación y la fertilización nitrogenada. *Agronomía Tropical* Vol. 46(2):189-207.
- Crespi, M., Gálvez, S. 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *J. Plant Growth Regulation*. Vol 19: 155-166.
- 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. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1): 78-104.

Cuenca, G., Cáceres, A., Oirdobro, G. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *INCI*. Enero Vol.32 (1): 23-29.

Cuzcano, G., Dávila, D. 2003. Viabilidad de cepas de Rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. *Ecología Aplicada*. Vol 2(1): 1-5.

Davies, J. 1962. Resistance of rhizobia to antimicrobial agents. *Journal of Bacteriology*. 84:187-188.

De Felipe, M., Fernández, P., Sánchez, L., Fedorova, E., Golvano, P., Herrero, A., González, A., Pereira, G., Carretero, C., Pozuelo, J., Dabad, J., Rodríguez, A. 2006. Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp y *Lupinus* (*Lupinus*). *An. R. Acad. Nac. Farm* 72: 423-442.

DeJong, M., Brewin, J., Johnston, A., Phillips, A. 1982. Improvement of Symbiotic Properties in *Rhizobiurn leguminosarurn* by Plasmid Transfer. *Journal of General Microbiology*. 128:1829-1838.

Díaz-Franco, A., Pérez-Mayek, N. 2008. Los biofertilizantes como tecnología sostenible. ISBN: 978-970-722-706-4. Impreso en México.

Drevon, 2009. Manual técnico de la fijación biológica del nitrógeno, Leguminosa/*Rhizobium*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma 1-5p. [en línea] [Consulta: 25 Marzo 2009].

Ernst, O. 2004. Leguminosas como cultivo de cobertura. *Informaciones agronómicas del Cono Sur*. Vol. 2: 1-9.

Espinosa, Y., Malpica, L. 2007. El género *Rhizobium* como inoculante para leguminosas. *Rev. Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias*:

También disponible en <<http://www.ceniap.gov.ve>> [en línea] [Consulta: 15 Marzo 2009].

Estrada, G. 2008. Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto. *Tesis Pregrado*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 63p.

Faiguenbaum, H. 1993. Cultivo de arveja. Curso “Producción de leguminosas hortícolas y maíz dulce. Pontificia Católica de Chile, facultad de Agronomía. Departamento de ciencias vegetales. Santiago-Chile. P: 1-23.

Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas – FENALCE (Colombia). Catálogo automatizado de Fenalce [en línea] <<http://fenalce.net/pagina>> [Consulta: 10 Abril 2009].

Fernández, M. 2003. Manual de Nodulación. Quinta edición.

Fernández, W. Fijación biológica del Nitrógeno. En. Monografías. [en línea] <<http://www.monografias.com/trabajos60/fijacion-biologica-nitrogeno/Image25568.jpg>> [Consulta: 23 Junio 2009].

Forero, C. 2006. Rendimiento de ocho genotipos promisorios de arveja arbustiva (*Pisum sativum*) bajo sistema de agricultura protegida. Revista Fitotecnia Colombiana. Vol. 6 (2): 52 - 61.

Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina.

Fujiraha, S., Terakado, J., Nishibori, N. 2006. Accumulation of an aromatic amine, β -phenethylamine, in root nodules of adzuki bean *Vigna angularis*. Plant and soil 280: 229-237.

Galindo, R., Clavijo, J. 2009. Fenología del cultivo de la arveja (*Pisum sativum* L. var. Santa Isabel) en la Sabana de Bogotá en campo abierto y bajo cubierta plástica. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (10) 1: 5-15.

George, T., Singleton, P. 1992. Nitrogen Assimilation Traits and Dinitrogen Fixation in Soybean and Common Bean. Agronomy Journal. Vol. 84 (6): 62-67.

Giller, K. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2^{da} Edición. [en línea] [Consulta: 15 Noviembre de 2009].

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Frank, W., Chang, WS., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C., Sadowsky, M., 2007. Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science 316:1307-1312.

González, B., González López, J. 1998. Utilización de *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae cepa Z25 como inoculante para el cultivo de plantas leguminosas. PATENTE DE INVENCION. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS.

Guerrero, R. 1993. Fertilización de cultivos de clima cálido. En: Monómeros Colombo Venezolano S.A. Barranquilla, Atlántico, 276 p.

Gutiérrez, E., Forero, M. 2007. Soya (*Glycine max*) Alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquía Colombiana. Plan estratégico de investigación y desarrollo tecnológico de soya. Villavicencio, Meta. 24 p.

Herdina, M., Silsbury, H. 1989. Nodulation and Early Growth of Faba Bean (*Vicia faba* L.) and Pea (*Pisum sativum* L.) as Affected by Strain of *Rhizobium*, NO₃-Supply, and Growth Temperature. Aust. J. Axric. Res. Vol. 40: 991-1001

- Hill, S. 1988. How is nitrogenase regulated by oxygen?. Reviews Published in Netherlands. FEMS. Vol. 4: 111-129.
- Hungría, M., Campo, R., Mendes, I. 2001. Fixacao biológica do nitrogenio na cultura da soja. Embrapa, Circular Técnica N° 35. ISSN1516-7860.
- Hungría, M., Loureiro, M., Mendes, I., Campo, R., Graham, H. 2005. Inoculant preparation, production and application. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environmental: 223-253.
- Hungría, M., Vargas, M. 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field crops research, Vol. 65(2-3):151-164.
- Jiménez, M. 2007. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas arbóreas para la sombra de café en Puerto Rico. *Tesis Maestría*. Universidad de Puerto Rico. Facultad de Ciencias en Agronomía. 103p.
- Kneen, B., Lauren, T. 1983. Congo red absorption for *Rhizobium leguminosarum*. Applied and Environmental Microbiology, Vol 45 (1): 340-342.
- Kremer, R., Peterson, H. 1983. Effects of Carrier and Temperature on Survival of *Rhizobium* spp. in Legume Inocula: Development of an Improved Type of Inoculant. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 45 (6): 1790-1794.
- Kumari, B., Ram, M., Mallaiah, K. 2009. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from Indigofera. African Journal of Microbiology Research. Vol. 3(1):10-14.
- Kuykendall, D., Young, J., Martinez, E., Kerr, A., Sawada, H. 2005. *Rhizobium*. Frank 1889, 338. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US Vol. II 2^{da} Edition.

- Kuykendall, L., Dazzo, F. 2003. Genus *Allorhizobium*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US Vol. II 2^{da} Edition.
- Larcher, L., Togo, S., Cattaneo, C. 2008. Simulación de crecimiento de microorganismos bajo distintas condiciones de movilidad. *Rev. Mecánica computacional*. Vol. 27: 3381-339.
- Lee, K., Watanabe, I. 1977. Problems of the acetylene reduction technique applied to water saturated paddy soils. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 35(6): 654-650.
- Leibar, I. 2006. La vermiculita, un aislante termo-reflector de barro. *Probico*, comunicado técnico.
- León, E., Acuña, O., Ramírez, C. 1986. Evaluación de la reproducción y sobrevivencia de bacterias del género *Rhizobium* en suelo de turba de la zona de medio queso, Los chiles, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* Vol.10:1/2: 33-41.
- León, O., Silva, P., Acevedo, P. 2002. Respuesta a la inoculación de *Rhizobium* en dos especies de *Lupinus* (*Lupinus albus* L y *Lupinus angustifolius* L.). Universidad de Chile. Facultad de ciencias agronómicas.
- Lima, A., Pereira, J.P., Moreira, F. 2005. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, Vol.40 (11):1095-1104.
- Lindstrom, K., Martinez-Romero, E. 2007. International committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: minutes of the meeting, 26 July 2006, Toulouse, France. *Int J of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol 57: 1365-1366. DOI 10.1099/ijs.0.63744-0.
- Manassila, M., Nuntagij, A., Kotepong, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. 2007. Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (12):1393-1402.

Manual de procedimientos técnicos para el control de calidad de inoculantes. Corpoica, 2007. Documento interno, Laboratorio Microbiología de suelos.

Martins, L., Xavier, G., Neves, M., Rumjanek, N. 2004. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colonias de rizobio. EMBRAPA 190: 1-14. ISSN 0104-8945. Comunicado técnico.

Mayz, J. 2004. Fijación Biológica de Nitrógeno. Revista Científica UDO Agrícola, Vol. 4 (1):1-20.

Meghvansi, K., Kamal, P., Mahna, S. 2005. Identification of pH tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains and their symbiotic effectiveness in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in low nutrient soil. *Full Length Research Paper*. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (7):663-666.

Milicic, D., Delic, D., Kuzmanovic, D., Stajkovic, O., Josic, D. 2006. Intrinsic antibiotic resistance of different *Bradyrhizobium Japonicum* and *Rhizobium Galegae* strains. Roumanian Biotechnological letters. Vol 11 (3): 2723-2731.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). 2005. Manual de exportador de frutas, hortalizas y tubérculos en Colombia. Bogotá, 221-225.

Molouba, F., Lorquin, J., Willems, A., Hoste, B., Giraud, E., Dreyfus, B., Gillis M., DeLajudie, P., Boivin, C. 1999. Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* spp. Are Specific to Stem-Nodulated Species and Form a Separate 16S Ribosomal DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Group. *Applied and Environmental Microbiology* Vol 65(7): 3084-3094.

Mora, F. 1995. Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* eficientes en la fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* Vol.6: 68-74.

Morales, R. 1992. Atrapamiento y caracterización de cepas de rizobios procedentes de suelos del Alagorral del Monte. *Multequina* 1: 181-188.

Moya, L. 2004. Inoculación con *Rhizobium*; una alternativa para biofertilizar el cultivo de arveja. Folleto convenio DAMA-Corpoica.

Moyano, S., Yagueta, M., Salmerón, J. 2004. Las leguminosas de grano en la agricultura moderna. Boletín N° 3. Publicado por Mundi Prensa. 31p.

Munévar, F., Ramírez, M. 1990. Uso correcto de inoculantes para soya. Plegable divulgativo N° 223. Bogotá - Colombia.

Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. The Plant and cell Vol 7: 869-885.

Nápoles, M., Martínez, J., Costales, D., Gómez, G. 2006. Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. Cultivos tropicales. Vol 27(1): 35-38.

Norris, D. 1965. Acid production by *Rhizobium* a unifying concep. Plant and soil Vol 2 (2): 143-166.

Pacheco, J., Canul, R., Cabrera, A. 2002. Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. Artículo de Divulgación., Revista Ingeniería. Vol. 6 (3):73-81.

Pearson, W. 1988. Search for DNA homologies was performed wiyh the FASTA program. Proc. Natl. Acad. Sci Vol. 85: 2444-2448.

Peñaranda, A. 2004. Evaluación de las interacciones *Rhizobium* y Micorrizas Arbusculares en el cultivo de la Arveja (*Pisum sativum* var. arvense). Tesis de Pregrado. Universidad Francisco de Paula Santander. Facultad de ciencias agrarias y del ambiente.

Philippe de Lajudie., Willems, A., Pot, B. 1994. Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti*

comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 3 (12): 715-733.

Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussin, M., Lucas, M., De Felipe, M., Harrison, J., Vanaker, H., Foyer, C. 2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signaling in the orchestration of the natural aging process. New Phytologist 165: 683-701.

Racca, W., Collino, D. 2004. Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soya. IFFIVE- INTA. Córdoba.

Rae, A., Bonfante, P., Brewin, N. 1992. Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. The Plant Journal Vol. 2(3): 385-395.

Ramírez, J. 2004. Producción de biopolímeros vía fermentativa utilizando cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería y arquitectura. Departamento de Ingeniería química. 67p.

Ramírez, M. 1991. "Studies of genetic variation and competitive ability of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii". Tesis *Magister*. University College of Wales Department of Agricultural Sciences. 223p.

Ramírez, M. 1995. Caracterización de cepas de *Rhizobium leguminosarum* b.v trifolii utilizando la resistencia intrínseca a antibióticos. Revista Suelos Ecuatorianos. Vol. 25: 127-135.

Ramírez, M. 1995. Caracterización de cepas de *Rhizobium leguminosarum* b.v trifolii utilizando perfiles de isoenzimas. Revista Suelos Ecuatorianos. Vol. 25: 118-126.

Ramírez, M., Munévar, F. 1987. Bases técnicas para la entrega de la cepa ICA J01 de *Bradyrhizobium* como inoculante para soya en los llanos orientales. (Documento interno ICA).

Ramírez, M., Salamanca, C. 2007. Eficacia de las cepas ICA J01 y J96 de *Bradyrhizobium japonicum*, en nuevas variedades de soya de la altillanura Colombiana. Informe técnico-Documento interno. Corpoica.

Ramírez, M., Valbuena, I., Arguelles, J. 2007. Ensayo de Eficacia de la cepa ICA L9 de *Rhizobium leguminosarum* en Arveja. Centro de Investigación Corpoica – Tibaitatá. Bogotá, Colombia. 23pg.

Ramos, J., Bisseling, T. 2004. Symbiotic nitrogen fixation. In Amâncio S and Stulen I, eds, Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands: 99-131.

Reigh, G., O’Connell, M. 1993. Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology Vol 175(1): 94-102.

Rey, A., Chamorro, D., Ramírez, M. 2005. Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas en la producción y calidad del forraje de *Leucaena leucocephala*. Revista Corpoica Vol. 6 (2): 52-59.

Reyes, A. 1994. Caracterización de algunas cepas de *Rhizobium* spp que nodulan frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Postgrado en Microbiología. Bogotá – Colombia. 223p.

Reyes, I., Alvarez, L., Hind, E., Alexis, V. 2008. Selección y Evaluación de Rhizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro: 20(1):37-48.

Rojas, D., Garrido, M., Bonilla, R. 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. Rev. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria Vol. 10 (1): 70-80.

Romeiro, R. 2001. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em una suspensão. Universidade Federal de Vicosa. Departamento de Fitopatología. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Brasil.

Romero, G., Bernal, G. 2008. Caracterización y evaluación de la efectividad de cepas de rizobios, asociadas a Pueraria (*Pueraria phaseoloides*), como cultivo cobertura de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq). XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Quito.

Rossi, A. 2005. Producción y control de calidad de inoculantes. Programa y resúmenes: I Taller latinoamericano sobre normatividad y control de calidad de inoculantes para la agricultura. Centro de pesquisas Gonzalo Moniz-Brasil.

Salamanca, C., Baquero, J. 2006. Soya "*Glycine max*". Alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquia Colombiana. En: Nutrición y fertilización con macro y micronutrientes en el cultivo de la soya. 151-161 pg.

Salisbury, B., Ross, C. 1992. Fisiología vegetal. Editorial Iberoamericana. México. 759p.

Sánchez, E., Mosquera, T. 2006. Establecimiento de una metodología para la inducción de regenerantes de arveja (*Pisum sativum*) variedad Santa Isabel. Agronomía Colombiana. 24(1):17-27.

Santillana, N., Arellano, C., Zuñiga, D. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento vegetal en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Ecología aplicada. Vol. 4(1-2).

Santos, J., Ferrat, G., Eichelmann, C. 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol 47(3-4): 92-101.

Schmidt, W., Martin, P., Omay, H., Bangerth, A. 1988. Influence of *Azospirillum brasilense* on nodulation of legumes. In: Klingmuller, W. (editor). *Azospirillum* IV. Genetics, physiology, ecology: 92-100.

SEMICOL (Colombia). Catálogo automatizado de SEMICOL [en línea] <<http://www.semicol.com.co/index.php>> [Consulta: 15 Marzo 2009].

Somasegaran, P., Hoben, J. 1985. Methods in legume *Rhizobium* technology. University of Hawaii NifTAL* Project and MIRCEN* Department of Agronomy and Soil Science. Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources College of Tropical Agriculture and Human. Resources.

Temprano, J., Albareda, M., Camacho, M., Daza, A. 2002. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. Int. Microbiol. Vol.5: 81-86.

Timmers, A., Soupene, E., Auriac, M., De Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., Truchet, G. 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. Mol Plant Microbe - Interact 13: 1204 -1213.

Tittabutr, P., Payakaponga, W., Teaumroonga, N., Singletonb, W., Boonkerda, N. 2007. Growth, Survival and Field Performance of Bradyrhizobial Liquid Inoculant Formulations with Polymeric Additives. *ScienceAsia* 33: 69-77.

Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung C. M., Crawford, D.L., Salove, M.H., Deobald, L. A., J., Bailey, J. F., Morra, M.J. 2002. Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). Appl Environ Microbiol Vol.68: 2161-2171.

Trainer, M., Trevor, C. 2006. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. Appl Microbiol Biotechnol Vol. 3 (7): 377 - 386.

Universidad Politécnica de Valencia. Parte IV: Tema 20. Familia leguminosa. [en línea] <<http://www.etsmre.upv.es/Temas%20Angiospermas/>>. (Consulta: Marzo 11 de 2009)

Urzúa, H. 2005. Beneficios de la Fijación simbiótica de Nitrógeno en Chile. Departamento de Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal Pontificia Universidad Católica de Chile.

Valencia, R. 2003. Informe técnico “Desarrollo de variedades mejoradas de soya para zonas productoras y potenciales de Colombia”. Convenio CORPOICA (C.I. La Libertad) - COAGRO. Villavicencio, Meta.

Valencia, R. 2005. *Glycine max* L. “La libertad 4”. Descripción de la variedad y características para su cultivo en la Altillanura Colombiana. Villavicencio, Meta. Boletín N° 51.

Valencia, R. 2006. Variedad de Soya “CORPOICA Superior 6”. Plan de Investigación y desarrollo tecnológico de soya. Villavicencio, Meta. Boletín N° 45.

Vance, C., Pladys, D. 1993. Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant physiology* 103: 379-384.

Vasse, J., De Billy, F., Camut, F., Truccher, G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroides and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal Bacteriology* 172: 4295-4306.

Vincent, J. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publicatioos, Oxford.

Vineusa, P., Jan, L., Rademaker, W., Frans, J., Wernwr, D. 1998. Genotypic Characterization of Bradyrhizobium Strains Nodulating Endemic Woody Legumes of the Canary Islands by PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rRNA) and 16S – 23S Rdna Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindrome PCR Genomic Fingerprinting and Partial 16S Rdna Sequencing. *Appl. Environ Microbiol* 64:2096-2103.

Wang, T., Romero, J., Lara, I. 1999a. Taxonomía de *rhizobium*. Departamento de Microbiología Agrícola. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Universidad Nacional Autónoma de México.

Wang, T., Romero, J., Lara, I. 1999b. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Departamento de Microbiología Agrícola. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Universidad Nacional Autónoma de México.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo utilizado para la extracción de ADN de las cepas ICA L9 e ICA J96

1. Crecer las cepas en 5 ml de medio LM a 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 600nm
2. Sedimentar las células por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos
3. Lavar el pellet con Buffer TE (10T/1E)
3. Disolver el pellet en 400 µl de Buffer TE
5. Adicionar 40 µl de SDS AL 10% y 5 µl de proteinasa K (20mg/ml)
6. Incubar a 56°C por 45 minutos
7. Adicionar 400 µl de Tris Fenol saturado (pH: 8,0)
8. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos
9. Tomar el sobrenadante, dispensarlo en un tubo eppendorf nuevo y adicionar 200 µl de Tris Fenol saturado y 200 µl de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
10. Tomar de nuevo el sobrenadante y repetir el paso anterior
11. Tomar el sobrenadante y adicionarle 400 µl de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
12. Repetir el paso anterior
13. Tomar el sobrenadante y adicionar 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío
14. Incubar a -20°C por 2 horas
15. Centrifugar a 15000 rpm por 30 minutos en una centrifuga refrigerada a 10-15°C
16. Decantar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 70%, centrifugar a 10000 rpm por 15 minutos
17. Decantar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente
18. Resuspender el pellet en 50 µl de Buffer TE

Anexo 2. Preparación de la solución nutritiva de McClure e Israel

1. Preparación de las soluciones patrón

MI-2: Disolver 0,659g de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ en 60 ml de H_2O desmineralizada destilada estéril. Agregar a 0,480 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y mezclar bien. Transferir en un balón aforado de 100 ml completando a volumen

MI-3: Disolver 8,713 g de K_2SO_4 en 60 ml de H_2O destilada y desmineralizada estéril, transferir a balón aforado, completando a volumen de 100 ml

MI-4: Disolver 13,609 g de KH_2PO_4 en 60 ml de agua destilada y desmineralizada, completando en balón aforado a 100 ml

MI-5: Disolver 17,418 g de K_2HPO_4 en 60 ml de agua destilada y desmineralizar. Transferir a un balón aforado de 100 ml y completar a volumen

MI-6: En 600 ml de agua destilada y desmineralizada, disolver lo siguiente:

MnSO_4 : 0.453 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,0393 g

H_3BO_3 : 0,105 g

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,0302 g

NaCl : 0,329 g

Completar a 1000 ml de volumen en balón aforado

MI-7: Disolver 24,648 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 60 ml de agua destilada y desmineralizada, completar a 100 ml de volumen en balón aforado

Las soluciones MI-2 a MI-7 deben almacenarse en botellas plásticas en la nevera.

2. Preparación de un litro de la solución final

B1: Disolver 1,12 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 800 ml de agua destilada y desmineralizada

B2: Agregar las soluciones patrón en las siguientes proporciones: MI-1: 1.0 ml; MI-3: 2,0 ml; MI-4: 0,25 ml; MI-5: 0,625 ml; MI-6: 1,0 ml; MI-7: 2,0 ml.

B3: Completar a volumen de 1000 ml

3. Preparación de un litro de solución con 200 ppm de nitrógeno

C1: Siga el mismo procedimiento hasta el paso B2

C2: Agregar 518 mg de KNO_3

C3: Completar a volumen de 1000 ml

Anexo 3. Determinación de nitrógeno en tejido vegetal por el método de Kjeldhal

Reactivos

1. Ácido Sulfúrico concentrado (Grado reactivo)

2. Catalizador

Mezclar 0,3g de dióxido de titanio TiO_2 (oxidante), 0,3g de sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (catalizador) y 16g de sulfato de sodio Na_2SO_4 .

3. Indicador mixto

Pesar 0,25g de verde de bromocresol y 0,05g de rojo de metilo y afore en un balón de 100 ml con etanol absoluto

4. Ácido Bórico al 4%

Pesar 40g de H_3BO_3 y afore en un balón de 1000 ml con agua destilada; antes de completar el volumen, adicionar 800 gotas de indicador mixto

5. Ácido clorhídrico

Pipetear 11,97ml de HCL grado reactivo en un balón aforado y completar a 1000 ml

Procedimiento

1. Digestión

✓ Pesar 0,2g de la muestra vegetal seca en un balón para digestión Kjeldhal de 100 ml, adicionar 2g de catalizador y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado

✓ Colocar en el digestor y calentar hasta que la formación de espuma cese y se mantenga en ebullición activa de 15 a 20 minutos, hasta que la solución clarifique a un verde esmeralda

✓ Dejar enfriar y agregar 30 ml de agua destilada

2. Destilación

✓ Adicionar 5 ml de ácido bórico con indicador en un erlenmeyer de 50 ml, colocar en el destilador asegurándose que la punta del condensador quede totalmente sumergida en el ácido

✓ Añadir al balón Kjeldhal 2 granallas de zinc, 8 ml de hidróxido de sodio al 60% cuidadosamente por sus paredes, permitiendo la formación de dos capas

✓ Conectar el balón al destilador y agitar su contenido

✓ Calentar hasta obtener 30 ml del destilado y apagar el condensador

- ✓ Realizar una prueba en blanco para todos los reactivos, cada vez que se haga una determinación o que cambie de reactivos

3. Titulación

- ✓ Titular el contenido del erlenmeyer utilizando el agitador magnético con una solución de ácido clorhídrico al 0,1N, hasta observar un cambio de color de azul a rosado; leer el volumen de ácido gastado y restar la cantidad de este utilizada en el blanco

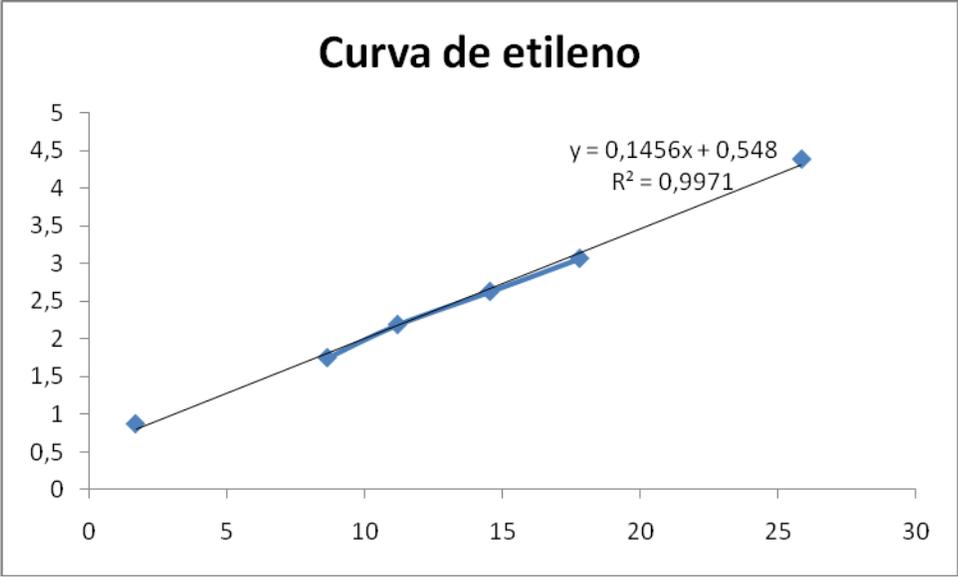
La cantidad de ácido sulfúrico necesario para obtener la digestión completa es variable y depende de la composición de la muestra; aproximadamente 1 g de grasa consume 12 ml y 1 g de carbohidratos, 6 ml.

- ✓ Por cada 10 ml de ácido sulfúrico usado o su equivalente en ácido diluido, agregar 15 g de hidróxido de sodio para alcalinización fuerte
- ✓ Recoger el destilado de ácido bórico y titular inmediatamente, ya que a temperaturas superiores a 25°C, hay pérdida de nitrógeno

Cálculos

% Nitrógeno: [(ml de ácido bórico x normalidad del ácido) x 0,014/peso de la muestra)] x 100

Anexo 4. Curva de calibración para la determinación de actividad reductora de acetileno (ARA) en bacterias simbióticas



Anexo 5. Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S con el primer 27F de la cepa ICA L9



Anexo 6. Cromatograma obtenido a partir de la secuencia del gen ARNr 16S con el primer 1544R de la cepa ICA J96

