

27. Agroalimentos

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE AISLADOS NATIVOS DE *Bradyrhizobium* sp. Y TOLERANCIA A CONDICIONES DE ESTRÉS

Caballero Romero, Pablo César; Ferreira Arce, Richard Abel; Nakayama Nakashima, Héctor David

pabloc_333@hotmail.com; richardabelf@gmail.com; hnakayama@rec.una.py

Universidad Nacional de Asunción - Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica - Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas

Resumen

En el laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica dependiente de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), se llevó a cabo la evaluación de aislados nativos de *Bradyrhizobium* sp. sometidos a diferentes condiciones de estrés (pH, temperatura, salinidad, velocidad de crecimiento) con el objetivo de seleccionar aislados tolerantes a diferentes condiciones ambientales. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, los 7 aislados evaluados fueron: NF 1.4B; NF 3.4; CAL -1 B*5; BX2C; CAL 2.2; BX9 y BX13. Los tratamientos fueron: temperatura 25°C; temperatura 40°C; pH 4,84; salinidad 2% NaCl en dos repeticiones por tratamiento. Se evaluaron las características morfológicas (opaca; translúcida; gomosa y poco gomosa) y velocidad de crecimiento en las condiciones de estrés. Según los resultados obtenidos, las bacterias seleccionadas de *Bradyrhizobium* sp., se distribuyeron en dos grupos, el grupo I, los aislados NF 1.4B, NF 3.4, CAL -1 B*5 y BX2C con característica de crecimiento rápido; mientras que el grupo II, los aislados CAL 2.2, BX9 y BX13 con crecimiento lento. Los aislados CAL -1 B*5, BX2C, CAL 2.2, BX9 y BX13 se desarrollaron a temperatura de 25 °C, mientras que CAL 2.2 y BX9 se desarrollaron a 40 °C. El aislado CAL -1 B*5 se desarrolla en pH 4,84 , mientras que el aislado BX9 se desarrolló en medio salino con 2% de NaCl.

Palabras clave: Condiciones de estrés, Biofertilizantes, *Bradyrhizobium* sp.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE AISLADOS NATIVOS DE *Bradyrhizobium* sp. Y TOLERANCIA A CONDICIONES DE ESTRÉS

Introducción

Los microorganismos son seres vivos de gran importancia en el ambiente, la mayor cantidad de especies se encuentran desarrollados en los suelos, llegando a interactuar con el medio ambiente, una de las funciones principales es la descomposición de la materia orgánica, al igual que la fijación y ciclaje del nitrógeno atmosférico (Montaño et al. 2010).

Los mismos autores mencionan que los principales microorganismos fijadores de nitrógeno en el suelo son las bacterias simbióticas: *Rhizobium* sp. y *Frankia* sp., además de bacterias de vida libre como *Azospirillum* sp., *Thiobacillus* sp., entre otros. Las mismas se encargan de absorber el nitrógeno atmosférico para luego transformarlo en nitrógeno apto para la absorción de las plantas y animales.

Rhizobium sp. y *Bradyrhizobium* sp. son bacterias presentes en leguminosas, se encargan de fijar el Nitrógeno atmosférico, el objetivo principal de estas bacterias es la de transformar el nitrógeno atmosférico en nitrógeno apto para la planta, llegando a producir nodulaciones en las raíces mientras que, las plantas protegen y alimentan al microorganismo.

Sin embargo, ciertos suelos presentan deficiencias nutricionales de nitrógeno, fósforo, potasio que son indispensables para el desarrollo de las plantas, además de las alteraciones de otros factores como el pH, alta concentración de sales, exceso de temperatura, los cuales además de afectar el crecimiento de las plantas, también afectan a los microorganismos que necesitan ciertas condiciones para su desarrollo.

Cuadrado et al. (2009), mencionan que al someter bacterias del género *Rhizobium* a estrés salino, temperatura y pH, obtuvieron buenos resultados con relación al crecimiento, por lo tanto, estos factores son de gran importancia para el estudio de la interacción de rizobios con los diferentes ecosistemas presentes.

Bécquer et al. (2016) concluyen que al aplicar las cepas de *Bradyrhizobium* sp. en el cultivo de triticale (*X. triticosecale* Wittmack) bajo condiciones de sequía a temperaturas de 22 a 25° C no propiciaron un alto rendimiento de grano, pero resultó interesante observar, que a pesar del estrés por sequía, igual constituye una mejor opción que la aplicación de fertilizantes químicos en las mismas condiciones.

De la misma manera Nápoles et al. (2014), mencionan que al aplicar las cepas de *Bradyrhizobium* sp. en plantas de soja sometidas a estrés de temperatura, acidez del suelo y exceso de agua, influyó positivamente sobre los parámetros de nodulaciones evaluados en las condiciones de estrés, llegando a demostrar que los bioinoculantes poseen un efecto anti estrés ante tales condiciones ambientales.

Ciertas cepas de *Bradyrhizobium* sp. y *Rhizobium* sp., pueden llegar a desarrollarse en ciertos suelos con problemas de fertilidad, tal es así que Hernández et al. (2012) mencionan que la identificación de cepas de bacterias resistentes a diferentes concentraciones de NaCl y a diferentes temperaturas, obteniendo así microorganismos con óptimas características para ser utilizados como biofertilizantes, con el fin de un desarrollo sostenible para el cultivo, cubrir la deficiencia nutricional del suelo y la adaptación de los mismos a diferentes condiciones ambientales.

Tiniutti et al. (2015) afirman que la caracterización fenotípica de los rizobios nativos adaptados a condiciones estresantes en los suelos constituye una de las primeras etapas para la obtención de un inoculante efectivo, que permita un mejor establecimiento de las leguminosas y con ello incrementar la producción agropecuaria y reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados.

Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue evaluar los aislados de *Bradyrhizobium* sp. sometidos a diferentes condiciones de estrés con el fin de seleccionar bacterias para la producción de biofertilizantes.

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos del presente trabajo fueron la observación de la velocidad de crecimiento, desarrollo de los aislados en medio salino, ácido, temperatura 25°C, 40°C y evaluación de las características morfológicas.

Materiales y Métodos

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) dependiente de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Asunción,

ubicado en la ciudad de San Lorenzo, departamento Central. El mismo se realizó en el periodo comprendido entre los meses de mayo y junio de 2018.

Fueron evaluados aislados de bacterias del género *Bradyrhizobium* sp. pertenecientes a la colección de microorganismos del laboratorio de Biotecnología del CEMIT-DGICT-UNA; El diseño utilizado fue el completamente al azar (DCA), fueron evaluados 7 aislados a cuatro condiciones de estrés (Cuadro 1), para el experimento fueron empleadas dos placas de Petri de vidrio de 11 cm de diámetro conteniendo los aislados de bacterias en medio de cultivo.

Cuadro 1. Condiciones de estrés a que fueron sometidas los aislados de *Bradyrhizobium* sp.. CEMIT-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2018.

Tratamiento	Condición de estrés
1	Temperatura media (25°C)
2	Temperatura alta (40°C)
3	pH ácido (4.84)
4	Salinidad (2% NaCl)

Los aislados del género *Bradyrhizobium* sp. empleados en el experimento fueron: NF 1.4B, NF 3.4, CAL -1 B*5, BX2C, CAL 2.2, BX9 y BX13. Los aislados control: NF 1.4B y NF 3.4, fueron aislados de formulados comerciales. El medio utilizado fue el medio 79, adaptado de la metodología propuesta por Fred y Waksman, citado por Moreira et al. (2012). El medio fue distribuido en Erlenmeyers para la esterilización, previamente, al medio a ser utilizado para determinar la salinidad, se aplicó 2% de NaCl; en otro Erlenmeyer conteniendo el medio se agregó ácido clorhídrico hasta obtener un pH 4,84; mientras que los demás Erlenmeyers con medio de cultivo se mantuvieron sin modificación alguna (Moreira et al. 2012; Cuadrado et al. 2009; Hernández et al. 2012).

Los medios fueron esterilizados a 121 °C durante 20 minutos para su uso. Posteriormente, se procedió a distribuir los medios en placas de Petri, una vez distribuidos fueron sembrados los aislados de bacterias con ayuda de un ansa previamente esterilizada.

Finalizada la siembra, las placas fueron selladas y almacenadas a 25 °C, a excepción de las placas que fueron sometidas a alta temperatura (40 °C). Todas la placas fueron incubadas durante 7 días, realizándose observaciones cada 48 horas (Cuadrado et al. 2012).

Los parámetros evaluados fueron:

- Velocidad de crecimiento de las bacterias en el medio de cultivo. Para clasificar a las bacterias según la velocidad de crecimiento se empleó la escala de Cuadrado et al. (2009); Hernández et al. (2012) y Tiniutti et al. (2015), la cual se observa en el Cuadro 2.
- Desarrollo de las bacterias al medio salino.
- Desarrollo de las bacterias al medio ácido.
- Desarrollo de los aislados de bacterias a temperatura de 25 °C y 40 °C.
- Características morfológicas(opaca; translúcida; gomosa y poco gomosa)

Para determinar el desarrollo, se realizaron observaciones del crecimiento de las colonias bacterianas en las placas.

Cuadro 2. Grupos de bacterias conforme a la velocidad de crecimiento. CEMIT-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2018.

Grupo	Tipo de Crecimiento
grupo I	Crecimiento rápido (2-4 días)
grupo II	Crecimiento lento (5-7 días)

Resultados y Discusión

Los aislados sometidos a diferentes condiciones de estrés presentaron diferencias entre sí en cuanto a ciertas características, las cuales se observan en el Cuadro 3.

Los aislados de NF 1.4B y NF 3.4 presentaron la misma velocidad de crecimiento al igual que CAL-1 B*5 y BX2C. El crecimiento de colonias se observó a partir de los 3 días posterior a la siembra, perteneciendo al grupo 1; presentando las siguientes características morfológicas: la cepa CAL-1 B*5 presentó características translúcidas y gomosas, mientras que la cepa BX2C presentó características translúcidas y poco gomosas. Sin embargo, los aislados CAL 2.2; BX9 y BX13 tuvieron características del grupo 2 conforme a la velocidad de desarrollo, presentando características morfológicas: CAL 2.2: opaca y gomosa; BX9: translúcida y poco gomosa y BX13: translúcida y gomosa. Estos resultados concuerdan con Cuadrado et al. (2009) quienes agruparon varios géneros de *Bradyrhizobium* aislados del cultivo de Caupí (*Vigna unguiculata*) obteniendo un 63 % de bacterias del grupo I dentro del

total de 52 muestras. Los mismos mencionan que las bacterias del grupo I pueden producir mayor cantidad de nodulaciones en menor cantidad de tiempo, además pueden presentar características morfológicas como la presencia de menor gomosidad que la del grupo II.

Sin embargo, Tiniutti et al. (2015), mencionan que al aislar cepas de *Bradyrhizobium* de *Macroptilium* fueron agrupados en el grupo 2 llegando a observar crecimiento a partir de los 5 días luego de la siembra. Los resultados obtenidos en cuanto a las características morfológicas no varían conforme a lo expresado por estos autores y con lo propuesto por Cuadrado et al. (2009), considerando a las bacterias del grupo 2 como gomosas y de color blanquecino.

En relación a la temperatura, a 25 °C todos los aislados presentaron desarrollo, pudiendo ser considerada temperatura óptima para el desarrollo de esta bacteria. Florentino et al. (2010), mencionan que el rango óptimo para el crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. es de 28 °C a 36 °C, no coincide con los resultados de este trabajo. Esta diferencia se puede deber a las diferencias genéticas entre las bacterias aisladas de diferentes ambientes. Sin embargo, solo el 28,57% de los aislados se desarrollaron a 40°C. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Florentino et al. (2010), quienes mencionan que estos datos no son sorpresa alguna, ya que la temperatura óptima para el crecimiento de esta bacteria es de 28 a 36 °C, concluyendo que los suelos con temperatura menor a 40 °C son adecuados para la inoculación de *Bradyrhizobium* sp.

Los aislados evaluados que se habían desarrollado en medio ácido, reunieron las características del grupo I y II, observándose 85,71% de crecimiento, mientras que el aislado CAL-1 B*5 no presentó desarrollo en este medio. Estos resultados no concuerdan con Ngo et al. (2015), quienes identificaron que el 91,67% de un total de 12 cepas de *Bradyrhizobium* sp. crecen en un pH ajustado a 5,5, mientras que 66,67% se desarrolló en un rango de pH 3,5 y 4,5. De la misma forma Marquina et al. (2011) mencionan que obtuvieron buen desarrollo de cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de diversas regiones, en un rango óptimo de pH 5,2 a 6,8.

Cuadrado et al. (2009) mencionan que las bacterias del género *Bradyrhizobium* no demuestran buen crecimiento en suelos con pH ácido, esto se debería a que en un suelo con pH ácido también se detecta alto contenido de aluminio, inhibiendo así el desarrollo de

la bacteria, ya que es un metal tóxico que afecta el alargamiento y la división celular de las bacterias.

Cuadro 3. Características de aislados de *Bradyrhizobium* sp. según la velocidad de crecimiento, grupo, morfología, temperaturas (25 °C y 40 °C), pH ácido, salinidad. CEMIT-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2018.

Aislados	Velocidad de crecimiento	Grupo (género)	Morfología	25°C	40 °C	pH ácido	NaCl
NF 1.4B	3 días	I	t; pg	+	-	+	-
NF 3.4	3 días	I	o; g	+	+	+	-
CAL 2.2	5 días	II	o; g	+	+	+	-
CAL-1 B*5	3 días	I	t; g	+	-	-	-
BX9	5 días	II	t; pg	+	+	+	+
BX2C	3 días	I	t; pg	+	-	+	-
BX13	5 días	II	t; g	+	-	+	-

+: crecimiento

o: opaca, t: translúcida

-: no crecimiento

g: gomosa; pg: poco gomosa

Con relación al medio salino, se observó que solo el aislado BX9 se desarrolló en esta condición, mientras que los demás aislados no se desarrollaron. Estos resultados concuerdan con Cuadrado et al. (2009) quienes mencionan que solo 20 cepas del total de 52 se desarrollaron en NaCl al 3%, siendo estos identificados en el grupo de crecimiento lento. El mismo autor menciona que a medida que aumenta la concentración de NaCl en el suelo, el desarrollo de las bacterias del grupo II tienen mejor tolerancia a esta condición que las del grupo I.

Conclusión

Las bacterias evaluadas de *Bradyrhizobium* sp. se distribuyen en dos grupos, el grupo I con característica de crecimiento rápido, el mismo conformado por los aislados: NF 1.4B, NF 3.4, CAL -1 B*5 y BX2C; mientras que el grupo II, con crecimiento lento se encuentra conformado por: CAL 2.2, BX9 y BX13.

Los aislados de *Bradyrhizobium* sp. CAL -1 B*5, BX2C, CAL 2.2, BX9 y BX13 presentaron tolerancia a 25 °C., mientras que el aislado NF 3.4 tolera a 40 °C. El aislado CAL -1 B*5 presenta tolerancia al pH ácido mientras que el aislado BX9 tolera al medio salino con 2% NaCl.

Los aislados que presentaron tolerancia a condiciones de estrés pueden ser sometidos a otras evaluaciones con el fin de ser utilizados para la producción de biofertilizantes.

Bibliografía

- Bécquer Granados, C.J., Puentes Pérez, A.B., Ávila Cordovi, U., Quintana Sanz, M., Galdo Rodríguez, Y., Medinilla Nápoles, F., Mirabales Valdés, A. (2016). Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en triticale (*X.Triticosecale wittmack*), en condiciones de estrés por sequía. Pastos y forrajes, 39 (1), 19-264
- Cuadrado B., Rubio, G., Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Revista Colombiana de Química y Farmacia, 38 (1), 78-104
- Florentino, L.A., de Sousa, P.M., Savana Silva, J., Barroso Silva, K., Souza Moreira, M.F. (2010). Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* Strains isolated from soil samples collected From around *sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. Revista Brasileira de ciências do solos. 34, 1113-1123
- Hernández Flores, L., Munive Hernández, J.A., Sandoval Castro, E., Martinez Carrera, D., Villegas Hernández, M.C. (2012). Poblaciones bacterianas nativas: alternativa sustentable para la agricultura. Terra Latinoamericana. 30 (2), 129-138
- Marquina, M.E., Gonzales, N.E., Castro, Y. (2011). Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. Revista Biología Tropical. 59 (3), 1017-1036

- Nápoles García, M.C., Gonzáles Anta, G., Ferreira, A., Rossi, A., Hernandez Forte, I., Costales Menendez, D. (2014). Efecto de diferentes inoculantes sobre la nodulación de la soya cultivada en condiciones de estrés. 35 (4), 45-51
- Montaño Arias, N.M., Sandoval Pérez, A. L., Camargo Ricalde, S.L., Sánchez Yañez, J.M. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos: Ciencia y Cultura. 77 (17), 15-23
- Moreira F., Jeroen Huising E. Bignell D. (2012). Manual de Biología de suelos tropicales. Muestreo y Caracterización de la Biodiversidad bajo suelo. Instituto Nacional de Ecología. México
- Ngo Nkot, L., Ngo Bisseck M., Fankem H., Adamou S., Kamguia K., Ngakou A., Nwaga D., Etoa, F. X. (2015). Isolation and Screening of Indigenous Bambara Groundnut (*Vigna Subterranea*) Nodulating Bacteria for their Tolerance to Some Environmental Stresses. American Journal of Microbiology research. 3 (2), 65-75
- Tiniutti M.A., Fornasero L.V., Trod B.S., Zuber N.E., Córdoba M.S. (2015). Caracterización fenotípica y funcional de rizobios noduladores de dos especies del género *Macroptilium*. Revista FAVE Ciencias Agrarias. 14 (1), 105-117