

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS RIZOBIANOS DE ACACIA (*Acacia sp.*) Y RETAMO (*Teline monspessulana*)

Edna Patricia Alarcón¹, Amanda Lozano de Yunda¹, Héctor Chaparro²

Recibido: Agosto 14/97 - Aceptado: Octubre 27/97

Keywords: *Acacia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Teline monspessulana*.

RESUMEN

Se efectuaron 20 aislamientos nativos rizobianos de *Acacia decurrens* (DQ6-01 a DQ6-29) y 15 aislamientos de Retamo (*Teline monspessulana*), (DQ7-01 a DQ7-15) y se compararon culturalmente con cepas extranjeras. La mayoría de ellos presentaron crecimiento lento en medio LMA (5-13 días) y reacción alcalina. Solo el aislamiento nativo DQ6-29 y las cepas NifTAL 1881, 1450, 940, 1388 y USDA 3840, 3841, 3003, 3476 presentaron reacción ácida.

Se caracterizaron fenotípicamente, diez aislamientos nativos de *A. decurrens*, ocho de retamo y seis cepas extranjeras con base en diez pruebas bioquímicas y las características culturales, mediante un análisis numérico. Se elaboró un dendrograma y se obtuvieron nueve grupos de clasificación jerárquica, cuatro de ellos formados por solo una cepa, de los cuales tres son aislamientos nativos cuya planta hospedera es retamo (*Teline monspessulana*), el restante grupo está conformado por una cepa extranjera de *Acacia decurrens*. De acuerdo a los resulta-

dos existe una gran diversidad entre las cepas que nodulan *A. decurrens* y *Teline monspessulana* y sus características fenotípicas son independientes del sitio geográfico del cual provienen, encontrándose estrecha similitud entre aislamientos nativos y cepas de diferentes latitudes. Se escogió el nivel de 0,750 en el dendrograma como límite para diferenciar los aislamientos pertenecientes al género *Rhizobium* de los de *Bradyrhizobium*; por lo cual se concluyó que posiblemente la mayoría de los aislamientos realizados pertenecen al género *Rhizobium* (83,4%) y solo 16,6% al género *Bradyrhizobium*.

ABSTRACT

Twenty native rhizobial isolates from root nodules of *Acacia decurrens* (DQ6-01 to DQ6-29) and fifteen from *Teline monspessulana* (DQ7-01 to DQ7-15) were obtained and they were compared with NifTAL and USDA strains. Most of the isolates were slow growing bacteria (5-13 days) and presented basic reaction in YMA medium. Only one native isolate DQ6-29 and the strains NifTAL 1881, 1450, 940, 1388 and USDA 3840, 3841, 3003, 3476 presented acid reaction. Ten of the native isolates from *A. decurrens* and eight from *Teline monspessulana* were characterized by performing a numerical analysis of ten biochemistry properties and the cultural characteristics. Nine cluster were formed from the dendrogram, four with only one native strain, three are native strains isolated from *Teline monspessulana* and the last is a strain from *A. decurrens*. Our results indicated that the strains from

¹Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. A. A. 14490. Santa Fe de Bogotá, Colombia.

²Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR.

A. decurrens. and *Teline monspessulana* were diverse and it was not a consequence of their geographical origins, because strains from different latitudes were similar. We select the boundary level 0,750 in the dendogram to separate the reference Bradyrhizobium and *Rhizobium* species and then most of the isolates were possibly *Rhizobium* and only 16,6% were *Bradyrhizobium*.

INTRODUCCIÓN

La acacia es una especie arbórea dominante que crece en suelos áridos y sitios secos inadecuados para los cultivos. Esta especie estabiliza suelos arenosos y erosionados, proporcionando sombra, forraje, leña, carbón de leña y goma. El *Rhizobium* que infecta acacia, es promiscuo para la infección, puesto que se ha encontrado que la nodulación puede darse por bacterias de crecimiento rápido (*Rhizobium*) como de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*), pero específico en su acción porque su asociación es efectiva con una determinada especie de planta.

Por regla general la caracterización de las especies en los sistemas biológicos se basa en caracteres fenotípicos, de más fácil determinación como lo son los estructurales y anatómicos que pueden observarse directamente. La clasificación de las bacterias constituye la excepción a esta regla, debido a que su extrema simplicidad estructural implica un rango reducido de caracteres para una adecuada caracterización. Por este motivo se buscan características bioquímicas y fisiológicas; por tanto la clasificación de las bacterias se basa en gran parte en atributos funcionales (1).

Con relación a la apariencia, se relaciona tanto el tiempo de crecimiento, como el diámetro de sus colonias y su forma. El género *Rhizobium* es de crecimiento rápido en medio con extracto de levadura y manitol LMA (3-5 días),

diámetro de las colonias entre 2 y 4 mm y de forma circular, convexas, semitranslúcidas, levantadas y mucilaginosas. El género *Bradyrhizobium* presenta tiempo de crecimiento en medio LMA de 5 a 7 días, diámetro de colonias de 1 mm, con respecto a su forma y apariencia pueden ser puntiformes, opacas, blancas convexas y gomosas.

En Colombia, la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR) es la entidad encargada de realizar programas de recuperación de suelos, en la zona central del país. En particular, en la Cuenca del Embalse de Tominé (Guatavita) se está desarrollando actualmente un trabajo de reforestación, con especies leguminosas principalmente *Acacia decurrens* y Retamo; hasta el momento, estas especies han sido poco estudiadas, en cuanto a su simbiosis con fijadores de nitrógeno. El presente trabajo forma parte del programa de la CAR y tuvo como objetivo aislar y caracterizar fenotípicamente cepas nativas de *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium* que nodulan *Acacia decurrens* y Retamo y compararlas con cepas extranjeras, con el fin de utilizarlas en el programa de reforestación de la Cuenca del Embalse de Tominé.

PARTE EXPERIMENTAL

Cepas extranjeras.

Se obtuvieron de las colecciones internacionales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Beltsville, Maryland y del Proyecto NIFTAL de la Universidad de Hawai (NifTAL).

Muestreo de nódulos.

Los muestreos se efectuaron en nueve sitios del departamento de Cundinamarca, en vivero y en plantaciones de acacia y retamo de la CAR situados en los municipios de Simijaca, Guatavita,

Zipaquirá, Madrid, La Calera y Mosquera. En cada uno de los sitios se escogieron plantas sanas representativas de la zona de aproximadamente la misma edad y condiciones de suelo, se les cortaron pedazos de raíz con nódulos que se conservaron en tubos provistos con cloruro de calcio hasta el aislamiento de la bacteria.

Aislamiento y purificación de *Rhizobium*.

Los nódulos se separaron de la raíz, se esterilizaron superficialmente (2). Cada uno de los nódulos se presiono sobre una caja de petri que contenía medio con agar - manitol - extracto de levadura (LMA) y rojo congo, las placas invertidas se incubaron a 28 °C. Se observó el crecimiento bacteriano, repicándose hasta obtener crecimiento homogéneo, libre de contaminación. Se observaron las características culturales como aspecto, forma, color, tamaño, reacción ácida o alcalina y tiempo de crecimiento. Posteriormente se guardaron en tubos con medio inclinado de LMA.

Características fenotípicas de los aislamientos.

Pruebas bioquímicas.

Se seleccionaron 25 aislamientos a los cuales se les efectuaron las pruebas bioquímicas. Los aislamientos se crecieron en medio líquido LM hasta fase logarítmica, para conservarlos se esterilizaron frascos de 20 mL, con 2 mL de glicerol se añadieron ocho mL de cultivo y se guardaron en nevera a una temperatura de -5 °C.

Para efectuar las pruebas se tomaron alícuotas de 0,3 mL del medio conservado, las cuales se colocaron en tubos estériles y haciendo uso de un inoculador múltiple (25 muestras/por inoculación), se aplicaron sobre las cajas de petri con los medios respectivos para cada ensayo. Se colocaron cuatro

réplicas por aislamiento. Se incubó a 28 °C hasta observar crecimiento. Se consideró positiva la prueba cuando el crecimiento era idéntico al del testigo sin aplicación de tratamiento. Se utilizó la cepa CIAT 899 perteneciente a *Rhizobium tropici* como patrón en todas las pruebas.

Se realizaron los siguientes ensayos:

Crecimiento a diferentes temperaturas.

Los aislamientos se hicieron crecer en medio LMA a dos temperaturas diferentes 28 °C y 44 °C.

Crecimiento a diferentes pH en medio LMA.

Los aislamientos se sembraron en este medio ajustando el pH señalado con ayuda de los siguientes indicadores adicionados al medio: para pH 5,5 verde de bromocresol y para pH 8,5 fenoltaleína.

Hidrólisis de úrea.

La prueba se efectuó en medio LMA con 2% de úrea y 0,012% de rojo fenol como indicador.

Reducción de nitratos.

La prueba se realizó en medio líquido LM, se cambió el extracto de levadura por nitrato de amonio (1,6 g/L), los frascos de la prueba contenían 25 mL de medio, se inocularon con 0,3 mL de cultivo conservado en glicerol a -5 °C y se incubaron a 28 °C. Los cultivos que presentaban turbidez a los 11 días de crecimiento se les efectuó la prueba de nitritos con el reactivo de Tromsdorf's; ocho días después se repitió la prueba para su confirmación.

Tolerancia a sales.

Los aislamientos se crecieron en medio LMA con 0, 1, 2 y 3 % de NaCl respectivamente.

Tolerancia a Aluminio.

El medio utilizado fue el LMA, se incluyó en cada prueba 30, 50, 100 y 200 μM de AlCl_3 .

Resistencia intrínseca a metales pesados.

Los ensayos se realizaron en medio LMA, para cada prueba se adicionó una de las siguientes sales: $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ZnCl_2 : 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; HgCl_2 : 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Resistencia intrínseca a antibióticos.

Se sembraron los aislamientos en medio LMA, con adición de uno de los siguientes antibióticos: Sulfato de estreptomicina: 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Eritromicina: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Espectinomicina: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los antibióticos (SIGMA) se esterilizaron por medio de filtro milipore de 0,45 μm y se adicionaron al medio luego de ser éste esterilizado en autoclave.

Utilización de fuentes de carbono.

Se utilizó el medio químicamente definido de Bergersen (2), cambiando la fuente de nitrógeno por NH_4Cl (1g/L), como fuente de carbón se utilizó manitol. Se ajustó el pH a 7,0 y se añadió como indicador azul de bromotimol en una concentración de 0,0025%. Se ensayaron las siguientes fuentes de carbón para cada caso: rafinosa, D-galactosa, lactosa, glicerol, glucosa y sacarosa en concentración de 0,2%.

Utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno.

Los aislamientos crecieron en medio Bergersen (2), el testigo incluyó glutamato de sodio y para las demás pruebas se cambió éste por: L-arginina, L-prolina, L-cisteína, L-valina y glicina. La concentración final del aminoácido fue de 10 mM en todos los casos.

Análisis estadístico.

Los resultados de caracterización fenotípica de los aislamientos se trataron con el Sistema Taxonómico Numérico (NTSYS), con el fin de construir el árbol de clasificación jerárquica (dendrograma).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan las características culturales de las cepas extranjeras y los aislamientos nativos logrados para acacia y retamo, como también el origen, el hospedero y los grupos de clasificación según los tiempos de crecimiento necesario para observar las colonias que varió entre 3 y 13 días. Dentro de las características culturales se presentaron tanto colonias secas como también gomosas; la reacción de la mayoría de los aislamientos resultó ser alcalina excepto para el DQ6-29, que fue ácida. De acuerdo con el manual de Bergey el DQ6-29 se puede catalogar como de crecimiento rápido y los demás de crecimiento lento.

En algunos casos se presentaron diferentes características para un mismo aislamiento proveniente del mismo nódulo, como por ejemplo el aislamiento DQ6-19 que se identifica como a y b, puede tratarse de diformismo de las colonias, lo cual ya se ha visto reportado o de dos cepas invadiendo el mismo nódulo, hecho factible en un ambiente natural. En la continuidad del trabajo se utilizó la forma más estable, que en el caso antes mencionado resultó ser DQ6-19b.

En las cepas extranjeras, al igual que para los aislamientos nativos, se aprecian diversos tiempos de crecimiento, así: USDA 3841, USDA 3840, TAL 940, TAL 1450, TAL 1881, TAL 1388, se comportan como cepas de crecimiento rápido. Las demás corresponden a crecimiento lento.

Tabla 1. Caracterización de aislamientos y cepas extranjeras.

Origen	Identificación	Hospedero	Tiempo de incubación medio LMA	Carácter. culturales	Reacción	Grupo
DQ6-5	Guatavita	<i>A. decurrens</i>	5 días	gm, l, p, i	Alcalina	II
DQ6-9	Guatavita	<i>A. decurrens</i>	7 días	p, s, l, e	Alcalina	II
DQ6-10 a	Guatavita	<i>A. decurrens</i>	5 días	p, gm, l	Alcalina	II
DQ6-10 b	Guatavita	<i>A. decurrens</i>	5 días	p, s, l	Alcalina	II
DQ6-19 a	Madrid	<i>A. decurrens</i>	6 días	p, s, t, i	Alcalina	II
DQ6-19 b	Madrid	<i>A. decurrens</i>	6 días	p, s, l, i	Alcalina	II
DQ6-20 a	Madrid	<i>A. decurrens</i>	6 días	p, s, t	Alcalina	II
DQ6-22 a	Madrid	<i>A. decurrens</i>	13 días	g, gm, ros, b, l, ag	Alcalina	III
DQ6-23 a	Madrid	<i>A. decurrens</i>	5 días	p, s, t, ag	Alcalina	II
DQ6-24 a	Madrid	<i>A. decurrens</i>	13 días	g, gm, ros, l	Alcalina	III
DQ6-24 b	Madrid	<i>A. decurrens</i>	13 días	p, s, ag, t	Alcalina	III
DQ6-25 a	Madrid	<i>A. decurrens</i>	6 días	s, l, ag, m	Alcalina	II
DQ6-25 b	Madrid	<i>A. decurrens</i>	6 días	g, l, i	Alcalina	II
DQ6-26 a	Mosquera	<i>A. decurrens</i>	5 días	s, t, p, ag	Alcalina	II
DQ6-27	Mosquera	<i>A. decurrens</i>	13 días	g, m, l	Alcalina	III
DQ6-28	Mosquera	<i>A. decurrens</i>	13 días	g, gm, l	Alcalina	III
DQ6-29 a	Mosquera	<i>A. decurrens</i>	3 días	m, gm, l	Ácida	I
DQ6-29 b	Mosquera	<i>A. decurrens</i>	3 días	s, t, p	Ácida	I
DQ7-0	Guatavita	Retamo	6 días	gm, l	Alcalina	II
DQ7-1	Madrid	Retamo	6 días	gm, l, m	Alcalina	II
DQ7-2	Madrid	Retamo	5 días	gm, l, m	Alcalina	II
DQ7-4	La Calera	Retamo	10 días	gm, ros, ag,	Alcalina	III
DQ7-5	La Calera	Retamo	9 días	gm, t, p	Alcalina	III
DQ7-8	Guatavita	Retamo	9 días	gm, t, m	Alcalina	III
DQ7-9	Guatavita	Retamo	9 días	gm, l, red	Alcalina	III
DQ7-12	Guatavita	Retamo	9 días	gm, l, m	Alcalina	III
DQ7-15	Guatavita	Retamo	9 días	gm, t, p	Alcalina	III
Cepas Extranjeras						
USDA 3001		<i>A. decurrens</i>	14 días	p, gm, ros, i	Alcalina	III
USDA 3002		<i>A. decurrens</i>	14 días	p, s, pf	Alcalina	II
USDA 3327		<i>A. decurrens</i>	7 días	g, gm, ros, i	Alcalina	II
USDA 3003		<i>A. linifolia</i>	7 días	p, s, l,	Alcalina	I
USDA 3326		<i>Acacia sp</i>	7 días	m, r, gm	Alcalina	II
USDA 3325		<i>Acacia sp</i>	7 días	p, gm, r	Alcalina	II
USDA 3475		<i>A. melanoxylon</i>	14 días	p, s, t	Alcalina	III
USDA 3476		<i>A. stenoptera</i>	13 días	gm, l, red	Alcalina	III
USDA 3838		<i>A. constricta</i>	10 días	g, gm, l	Alcalina	III
USDA 3840		<i>A. constricta</i>	2 días	g, gm, b	Ácida	I
USDA 3841		<i>A. constricta</i>	2 días	g, gm, b	Ácida	I
Niftal 309	Zimbawe	<i>Macrotyloma africana</i>	7 días	s, l, ag	Alcalina	II
Niftal 569	Zimbawe	<i>Desmodium uncinatum</i>	7 días	m, gm, l, ag	Alcalina	II
Niftal 850	Malasia	<i>Crotalaria sp</i>	7 días	gm, p, l	Alcalina	II
Niftal 940	Kenia	<i>A. mearnsii</i>	3 días	gm, l, red	Ácida	I
Niftal 941	Kenia	<i>A. mearnsii</i>	13 días	p, s, l	Alcalina	III
Niftal 1388	Hawai U.S.A	<i>A. mearnsii</i>	3 días	gm, p, l	Alcalina	I
Niftal 1460	Hawai U.S.A.	<i>A. auriculaeformis</i>	3 días	gm, b, red	Ácida	I
Niftal 1867	Filipinas	<i>A. mangium</i>	3 días	gm, l	Ácida	I
Niftal 1881	Wisconsin U.S.A.	<i>A. decurrens</i>	3 días	gm, red, b	Ácida	I

p: pequeñas, s: secas, b: brillantes, g: grandes, gm: gomasas, r: roja, t: translúcida, l: lechosa, ag: agrupadas, i: separada, m: mediana, ros: rosada, e: escasa, pf: puntiforme, red: redonda.

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas con los aislamientos nativos y las cepas extranjeras

Pruebas	Aislamientos de Acacia DQ6									Aislamientos de Retamos DQ7									USDA									Nifal	C8
	05	09	10	19	20	24	25	26	28	29	01	02	04	05	08	09	12	15	01	02	27	41	69	81	99				
Efecto pH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
pH 5,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
pH 6,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
pH 8,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Red Nitratosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
11-20 días																													
Temperatura																													
28 C.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
44 C.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Conc. NaCl																													
0,01%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
1%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
3%	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0				
Conc. Aluminio																													
30 µM	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
50 µM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Met. Pesados																													
Plomo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Cadmio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Cinc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Antibióticos																													
Entromicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Espectromicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Estreptomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Fuentes de C																													
Manitol	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Rafinosa	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Sacarosa	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Galactosa	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Lactosa	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Glucosa	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Glicerol	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Fuentes de N																													
Glutamato.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Glicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Arginina	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1				
Cisteina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Prolina	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Valina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
Urea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				

Aún no se han realizado muchos estudios de clasificación de las cepas que nodulan acacia (3). De acuerdo con los resultados obtenidos, algunos aislamientos tendrían las características típicas del género *Rhizobium* y otras de *Bradyrhizobium*, pero algunos como DQ6-22 presentan características intermedias: de acuerdo a la forma de la colonia pertenece a *Rhizobium* (gomosa, lechosa, 3 mm) pero su tiempo de crecimiento (13 días) es muy largo, aun mayor al establecido para *Bradyrhizobium*.

Los aislamientos nativos y las cepas extranjeras, de crecimiento rápido y reacción ácida corresponden al género *Rhizobium* y las de crecimiento lento y reacción alcalina al género *Bradyrhizobium* y otros no pertenecen a ninguno de los dos, lo cual confirma los resultados obtenidos por otros investigadores sobre la nodulación de acacia por varios géneros de bacterias fijadoras (4).

Con base en estas características se efectuó una clasificación preliminar de las cepas y aislamientos estudiados en grupos I, II, y III, como se observa en las tabla 1.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se presentan en la tabla 2. Para cada una de ellas, el número 0 significa que no hubo crecimiento (respuesta negativa) y el número 1 que el crecimiento fue igual al testigo (respuesta positiva).

Crecimiento a diferentes pH.

La tolerancia a pH bajos ha sido utilizado como base para diferenciar entre cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Dentro de las cepas sometidas a prueba de tolerancia al pH, se incluyó la CIAT 899 representante de *R. tropici* que nodula frijol y leucaena e igualmente es tolerante a la acidez. Se observa de los resultados del crecimiento de los aislamientos a diferentes pH en

el medio LMA. que todos los aislamientos crecieron a pH 5,5 y 6,8; toleran pH alcalino los aislamientos: DQ6-28, DQ6-29 de acacia y DQ7-1, DQ7-9, DQ7-15 y DQ7-12, de retamo. La única cepa extranjera que resultó tolerante a este pH fue la U3327 cuyo hospedero original es *Acacia decurrens*. Por tanto se establecieron dos grupos de respuesta:

Grupo I: respuesta positiva de cada uno de los aislamientos en los tres valores de pH.

Grupo II: respuesta positiva de cada uno de los aislamientos a pH: 5,5 y 6,8; y respuesta negativa a pH: 8,5.

Reducción de nitratos y crecimiento en diferentes temperaturas.

En el ensayo realizado, los aislamientos se crecieron en medio líquido LM, sin agitación y a 28 °C, lo que favorece la vía de reducción desasimilativa de nitratos. Como se aprecia en la tabla 2 la prueba de presencia de nitritos con el reactivo de Tromsdorffs fue positiva solo para DQ6-19 y DQ7-12, que son los únicos aislamientos con actividad de nitrato reductasa. Se establecieron dos grupos de respuesta así:

Grupo I: respuesta negativa.

Grupo II: respuesta positiva.

Karanja y Wood (5), encontraron que la habilidad de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* para crecer en medios de cultivo sometidos a altas temperaturas hasta de 47 °C, no está necesariamente relacionada con la fijación de nitrógeno en condiciones de estrés, por efecto de la temperatura.

Igualmente Hungría, Franco y Sprent (6), demostraron que cepas aisladas de árboles leguminosos tropicales a temperaturas altas, son capaces de nodular otras especies como frijol y al mismo tiempo tener la habilidad de mantener

la fijación de nitrógeno semejante a la obtenida en las condiciones de temperatura en que fueron aisladas.

Todos los aislamientos crecieron a 28 °C, por lo tanto son bacterias mesófilas; el único aislamiento que creció a 44 °C fue DQ6-19 con característica de bacteria termófila. Esta respuesta a temperatura alta resulta inusual ya que el aislamiento es proveniente de clima frío, donde la temperatura aproximada del suelo es de 28 °C.

En la prueba de resistencia a la temperatura se establecieron dos grupos:

Grupo I: respuesta positiva a 28 °C respuesta negativa a 44°C.

Grupo II: respuesta positiva a ambas temperaturas.

Tolerancia a sales y a la presencia de aluminio.

La presencia de sal puede afectar el crecimiento y la supervivencia del *Rhizobium* en el suelo disminuyendo la colonización de la raíz, inhibiendo el proceso de infección y por tanto el desarrollo del nódulo deteriorándose el funcionamiento activo de éste y la fijación de nitrógeno (7, 8).

En la tabla 2 se muestra que la mayoría de los aislamientos y las cepas extranjeras son tolerantes a NaCl al 2%, excepto CIAT 899 que crece sólo con 0,01% de NaCl; al 3% de NaCl los aislamientos sensibles son DQ6-10, DQ6-24, DQ6-25 procedentes de *Acacia decurrens* y DQ7-1, DQ7-2, DQ7-4 de *Teline monspessulana*. Las cepas extranjeras sensibles son USDA 3001, USDA 3841.

Los grupos de respuesta de cada uno de los aislamientos a la tolerancia de NaCl fueron tres:

Grupo I: respuesta positiva en todas las concentraciones de NaCl ensayadas.

Grupo II: respuesta negativa en NaCl al 3% y respuesta positiva en las demás concentraciones de NaCl.

Grupo III: respuesta positiva en la concentración de 0,01% y respuesta negativa en las otras concentraciones.

En relación al efecto de la presencia de aluminio ($AlCl_3$) en el medio, con el nivel más bajo (30 μM) se encontró que los aislamientos nativos sensibles fueron DQ6-10 y DQ6-20 originarias de *Acacia decurrens* de Guatavita y Madrid respectivamente y los aislamientos de retamo DQ7-2 y DQ7-4 provenientes de Madrid y la Calera. Todos los aislamientos nativos como las cepas extranjeras son sensibles a concentraciones mayores de 50 μM . Estos resultados son similares a los encontrados por Lesueur y Dianda (9), con cepas aisladas de *Faidherbia albida* que crecen en presencia de aluminio en concentraciones de 10 μM pero se inhibe completamente su crecimiento en concentraciones de 50 μM de $AlCl_3$. Igualmente concentraciones de 100 μM de $AlCl_3$ inhiben el crecimiento de cepas de *A. mangium*.

Con la aplicación de aluminio los grupos de respuesta de los aislamientos fueron dos:

Grupo I: respuesta positiva a la concentración de 30 μM y negativa en las demás concentraciones.

Grupo II: respuesta negativa en todas las concentraciones ensayadas.

Resistencia intrínseca a metales pesados.

El mecanismo de los procesos de transporte de solutos en los microorganismos, pueden ser afectados por ciertos venenos metabólicos, como cualquier agente que reaccione químicamente con una proteína o un lípido de la membrana, generalmente los iones de metales pesados disminuyen la ve-

locidad de incorporación de los solutos e inhiben por tanto el crecimiento.

En general todos los aislamientos ensayados fueron sensibles a plomo, cadmio y cinc excepto DQ7-1 y la cepa CIAT 899 que presenta resistencia a cadmio y plomo; USDA 3841 es sensible a mercurio. Se formaron tres grupos de respuesta de cada uno de los aislamientos:

Grupo I: resistente a mercurio y sensible a los demás metales.

Grupo II: resistente a mercurio, plomo y cadmio; sensible a cinc.

Grupo III: sensible a todos los metales ensayados.

Resistencia intrínseca a antibióticos.

En la prueba se efectuaron ensayos de resistencia a niveles bajos, se encontró que tanto los aislamientos como las cepas extranjeras son sensibles a eritromicina (30 µg/mL) y sulfato de estreptomina (3 µg/mL) y resistentes a espectinomina (5 µg/mL) excepto DQ7-1 que es sensible a espectinomina y resistente a estreptomina. CIAT 899 y TAL 1881 son resistentes a estreptomina. Se obtuvieron cuatro grupos de respuesta por parte de los aislamientos así:

Grupo I: resistencia a espectinomina y sensibilidad a eritromicina y sulfato de estreptomina.

Grupo II: resistencia a sulfato de estreptomina y sensibilidad a eritromicina y espectinomina.

Grupo III: sensibilidad a todos los antibióticos ensayados.

Grupo IV: sensibilidad a eritromicina y resistencia a espectinomina y sulfato de estreptomina.

Crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

En esta prueba se utilizó el medio definido de Bergersen, incluyendo cloruro de amonio, como fuente de nitrógeno. Se encontró que en manitol crecieron todos excepto: DQ6-10, DQ6-29, DQ7-4, USDA 3001 en este caso es posible que se haya presentado interferencia de la fuente de nitrógeno puesto que todos los aislamientos se habían obtenido en cultivos con manitol como fuente de carbono; en rafinosa crecieron todos menos: DQ6-10, DQ6-24, DQ6-28, DQ6-25, DQ7-4; en sacarosa crecieron todos excepto: DQ6-25; en galactosa todos crecieron con excepción de DQ6-10 y DQ6-25; en lactosa no crecen DQ6-9, DQ6-10, DQ6-25, DQ7-4, DQ7-5, DQ7-8, DQ7-12, las demás crecen con esta fuente carbonada. En glucosa y glicerol no crecen DQ6-25, DQ6-28, DQ6-29, DQ7-4; en glicerol solamente no crecen DQ6-24 y USDA 3001.

La prueba permite diferenciar más los diferentes aislamientos y cepas extranjeras, ya que se obtuvieron nueve grupos de respuesta.

Grupo I: respuesta positiva en presencia de todas las fuentes carbonadas.

Grupo II: respuesta positiva con todas las fuentes y negativa con lactosa.

Grupo III: respuesta positiva sólo en sacarosa y glucosa.

Grupo IV: respuesta positiva con manitol, sacarosa, galactosa, glucosa y negativa con el resto de fuentes.

Grupo V: respuesta positiva con manitol y respuesta negativa con todas las demás.

Grupo VI: respuesta negativa en presencia de rafinosa, glucosa y glicerol; positiva con el resto.

Grupo VII: respuesta negativa en presencia de manitol, glucosa y glicerol; positiva con los demás.

Grupo VIII: respuesta positiva en presencia de sacarosa y galactosa; negativa para los demás.

Grupo IX: respuesta negativa en presencia de manitol y glicerol; positiva en presencia del resto.

Crecimiento con diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno.

Dentro de los diversos factores de crecimiento requeridos por los microorganismos están los aminoácidos; pueden ser auxotrofos para uno o más de los veinte aminoácidos que están incorporados en las proteínas. En ésta prueba también se utilizó el medio definido de Bergersen, se cambió el glutamato de sodio por los diferentes aminoácidos y se utilizó como fuente de energía manitol.

Los resultados presentados en la tabla 2 muestran la utilización de glutamato, glicina, prolina, valina y arginina por la mayoría de los aislamientos excepto: DQ6-10 y DQ6-25 para arginina y prolina; DQ6-24, DQ6-28, DQ7-4, DQ7-12 para arginina; DQ7-1, DQ7-8 y TAL 569 para glicina. DQ7-4 no utiliza glutamato. DQ7-2 no utiliza glicina y arginina. Ninguno utiliza cisteína.

Los grupos de respuesta de los aislamientos fueron siete así:

Grupo I: respuesta positiva en todos, negativa en cisteína.

Grupo II: respuesta positiva en glutamato, glicina y valina; respuesta negativa en las demás.

Grupo III: respuesta negativa en arginina y cisteína; positiva en las demás.

Grupo IV: respuesta positiva en

glutamato, arginina, prolina y valina; negativa en glicina y cisteína.

Grupo V: respuesta positiva en glutamato, arginina y valina; negativa para las demás fuentes.

Grupo VI: respuesta positiva en glicina, prolina y valina; negativo en las demás.

Grupo VII: respuesta positiva en glutamato, prolina y valina.

Hidrólisis de úrea.

Se presenta también el resultado de los aislamientos con respecto a la adición en el medio de úrea, el cual fue negativo para todos los aislamientos como para las cepas extranjeras, por lo tanto no tienen actividad ureásica. Se presenta un grupo de respuesta.

Dendrograma.

De todas las características las que mejor diferencian el tipo de bacteria son la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono, ya que éstas son las que tienen mayor diversidad en la respuesta.

Estos resultados se trabajaron con el programa estadístico NTSYS utilizando todas las características fenotípicas excepto hidrólisis de úrea e incluyendo como variable el tiempo de crecimiento que permite realizar una clasificación jerárquica con la que se construyen árboles o dendrogramas, cuyas ramas terminales representan cada uno de los individuos y el tronco es la clase conformada por todos los individuos (10).

Un dendrograma se dibuja horizontalmente, con las ramas hacia la izquierda, las alturas van en la misma dirección. Un corte en el árbol a una determinada altura, permite agrupar los individuos en clases, el valor de la al-

tura condiciona el número de clases y viceversa. Zhang (11), utilizó el valor de 0,725 como distancia límite para diferenciar entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

El dendrograma obtenido se presenta en el diagrama 1 de acuerdo a los resultados, se escogió el valor de 0,3 para reunir las cepas en nueve grupos (clusters), con características similares (distancias entre ellas mínima o nula); dentro de esta consideración se encuentran cepas iguales como es el caso de DQ6-26 y USDA 3327 así como DQ7-9 con DQ7-15 ya que presentan distancias entre ellas igual a cero. Otras cepas presentan características muy diferentes (distancia mayor a 0,5).

Una de las cepas estudiadas fue CIAT 899, perteneciente a *Rhizobium tropici*, por tal motivo escogimos su nivel (0,750) para poder diferenciar entre cepas de *Rhizobium* y cepas de *Bradyrhizobium*, valor que esta muy próximo al escogido por Zhang (11).

El primer grupo corresponde a las cepas localizadas en la parte superior del dendrograma, cuyas distancias de separación no superan la altura de 0,3 incluye a las siguientes cepas: DQ6-5, DQ6-26, U3327, DQ6-20, DQ7-15, DQ7-9, T1881, DQ6-9, DQ7-5, DQ6-19. De acuerdo a esto, los aislamientos de acacia tienen similitud entre ellos aunque hallan sido aislados de sitios de condiciones fisicoquímicas distintas como lo fue Guatavita (vereda El Choche) y Madrid (viviero). Al mismo tiempo son semejantes a los aislamientos de retamo, originarios de Guatavita. El hospedero de las cepas extranjeras que se encuentran en este grupo U3327 y T1881 es *Acacia decurrens*. Así mismo se obtienen los siguientes subgrupos:

DQ6-5, DQ6-26 y U3327.

DQ6-20, DQ7-9 y DQ7-15.

T1881, DQ6-9, DQ7-5 y DQ6-19.

En este grupo la tolerancia a sal (3%) está de acuerdo a Zhang, (11) y diferente a los resultados de Graham (3), cuyas cepas de *Rhizobium* toleran solo hasta el 2% de NaCl. Igualmente se destaca la sensibilidad a metales pesados, ya que solo resisten Hg (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y aluminio (30 μM de AlCl_3). En este grupo se encuentra la única cepa resistente a altas temperaturas DQ6-19.

El segundo grupo está constituido por: DQ7-8, DQ7-12 y T569 los dos primeros aislamientos son nativos de retamo. La cepa extranjera es originaria de Zimbawe. Son resistentes a 3% de NaCl, a metales pesados (excepto Hg) y a aluminio (30 μM de AlCl_3).

Tercer grupo: DQ6-10, DQ6-25, DQ6-24 Toleran sal hasta 2%;

Cuarto grupo: CIAT 899 (*R. tropici*) y U3841 (*A. constricta*)

Quinto grupo: DQ6-28, DQ6-29, U3001 (*A. decurrens*).

Las cepas que no se agrupan con otras y forman grupos únicos son: U3001, DQ7-1, DQ7-2, DQ7-4, tres de las cuales son aislamientos nativos de retamo.

Se aprecia que en un mismo grupo hay cepas de sitios diferentes, lo cual nos permite concluir que la diversidad de las cepas no depende del lugar geográfico de su procedencia. De acuerdo con los resultados presentados, el valor 0,750 en el dendrograma marca un límite que nos permite diferenciar entre los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Por tanto, la mayoría de las cepas estudiadas posiblemente pertenecen al género *Rhizobium* y las que posiblemente pertenecen al género *Bradyrhizobium* son las que forman los grupos 6, 7, 8 y 9 que corresponden a U3001, DQ7-1, DQ7-2, DQ7-4. Sin embargo, se considera que es indispensable confirmar estos resultados con un número mayor de pruebas bioquímicas y genéticas,

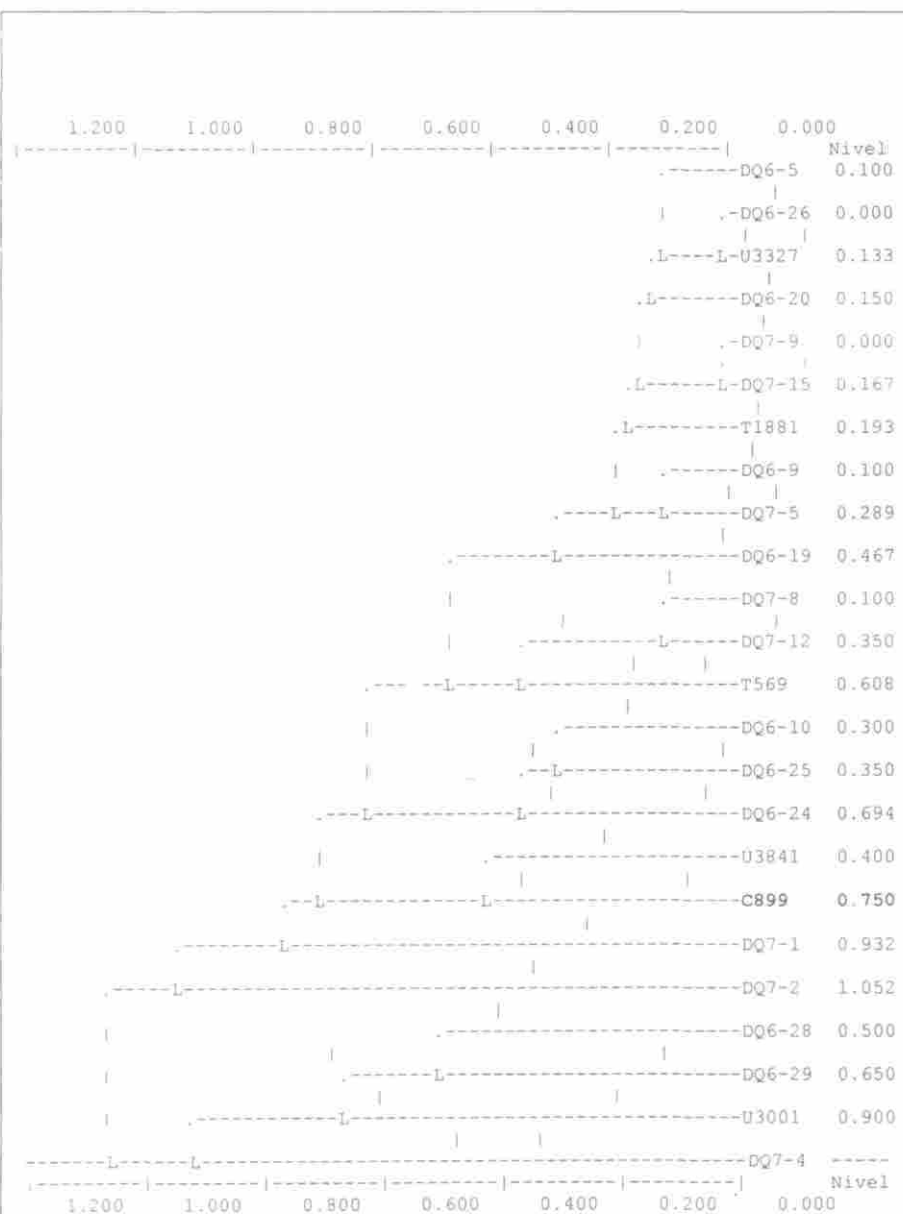


Diagrama 1.
Dendrograma de clasificación jerárquica de las cepas y aislamientos.

dada la diferencia aparente con la clasificación por características culturales, que permitan asegurar una clasificación más precisa y una posición taxonómica más estricta.

AGRADECIMIENTOS

A la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR, al Instituto de Biotecnología IBUN y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del trabajo. Al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos USDA y al Proyecto Niftal de la Universidad de Hawaii por el suministro de las cepas extranjeras. Al Profesor Campo Elías Campo del Departamento de Estadística de la Universidad Nacional de Colombia por la asesoría en el uso del programa NTSYS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stanier, R.; Adelberg, E. *Microbiología*. Editorial Reverté, S.A. España. 1984.
2. Somasegaran, P.; Hoben, H.J. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. University of Hawaii Niftal Project and Mircen, Departement of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resource. 1985.
3. Graham, P. *Can. J. Microbiol.* 1994, 40, 198-207.
4. Dreyfus, B.L.; Dommergues, Y.R. *Appl. Env. Microbiol.* 1981, 41, 97-99.
5. Karanja, N.K.; Wood, M. *Plant and Soil*, 1988, 112, 15-22
6. Hungría, M.; Franco, A.; Sprent, J. *Plant and Soil*. 1992, 149, 103-109.
7. Kassem, M. *Mircen J.* 1985, 1, 63-75.
8. Singleton, P.W. *Appl. Env. Microbiol.* 1982, 44, 884-890.
9. Lesueur, D.; Diem, H.G.; Dianda, M.; Le Roux, C. *Plant and Soil* 1993, 149, 159-166.
10. Pardo, C.E. "Análisis de la Aplicación del Método de Ward de Clasificación Jerárquica al caso de variables cualitativas". Tesis Magister. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Matemáticas y Estadística. Santa Fé de Bogotá, Colombia. 1992.
11. Zhang, X.; Harper, R.; Karsisto, M.; Lindstrom, K. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, 104-113.
12. Alarcón Castro, E.P.. "Caracterización y Comportamiento Simbiótico de aislamientos de *rizobium* y *bradyrizobium* que nodulan *Acacia decurrens* y *Cytisus s.p.* para ser utilizados en programas de reforestación". Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Santa Fé de Bogotá Colombia 1997.