

**DETERMINACIÓN DE MORFOTIPOS NATIVOS DE *Rhizobium*
ASOCIADOS A LA LEGUMINOSA *Teramnus volubilis* Sw EN FINCAS
GANADERAS DEL MUNICIPIO DE TOLÚ EN EL DEPARTAMENTO DE
SUCRE**

**MORPHOTYPE DETERMINATION OF NATIVE TO *Rhizobium* LEGUME
Teramnus volubilis Sw ON CATTLE FARM IN THE MUNICIPALITY OF TOLU
THE DEPARTMENT OF TO SUCRE**

PEREZ, C. ALEXANDER Dr.^{1*}, GRISALES, O. TATIANA Biol.¹, FUENTES,
B. JULIO Biol.¹

¹ Docente Universidad de Sucre, líder grupo de investigación en Bioprospección Agropecuaria, Universidad de Sucre, ² Biólogos, Universidad de Sucre.

*Correspondencia: alexpcor@yahoo.com

Recibido: 16-11- 2010; Aceptado: 20-03- 2011.

Resumen

El presente estudio se realizó, en fincas ganaderas del municipio de Tolú, Departamento de Sucre, Colombia, establecidas con la leguminosa *Teramnus volubilis*, con el objetivo de identificar los morfotipos de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* nativas asociados a esta especie. Fueron evaluadas las características de los nódulos formados en las raíces de la leguminosa, encontrándose formas redondeadas con coloraciones internas (rojas, verde oscuro y blanco) y externas (café claro y café oscuro), un número de nódulos/raíz de medio a alto, con tamaño variado y amplia distribución en raíces secundarias. La densidad poblacional de *Rhizobium* determinada en medio de cultivos arrojó un alto número de colonias (22×10^8 UFC/ml) en la zona de Pita Abajo, en contraste a la densidad hallada en la zona de Santa Lucía de (15×10^8 UFC/ml). Se realizaron 28 aislamientos de los cuales 14 compartieron características del género *Rhizobium*. Los resultados del Análisis de Correspondencias Múltiples clasificaron los aislamientos en 5 grupos de morfotipos de *Rhizobium*, teniendo en cuenta la morfología, tamaño y color de las colonias. El Análisis de clúster aglomerativo mostró 4 grupos de aislamientos basada en los contenidos de fosforo y la capacidad de intercambio catiónico de los suelos y el número de nódulos formado. El presente estudio muestra que

existe una alta diversidad de bacterias del género *Rhizobium* asociadas a raíces de *Teramnus volubilis* en condiciones edáficas de los suelos del municipio de Tolú.

Palabras claves: leguminosa, nodulación, *Rhizobium*, suelo

Abstract

This study was conducted in cattle farms in the municipality of Tolú, Sucre Department, Colombia, established with the legume *Teramnus volubilis*, to identify the morphotypes of nitrogen-fixing bacteria of the genus Native *Rhizobium* associated to this specie. To do this it was necessary to evaluate the characteristics of the nodules formed on legume roots, being rounded forms internal colours (red, dark green and white) and external (light brown and dark brown), number of nodules /root medium to high, with varying size and wide distribution in secondary roots. The population density of specific *Rhizobium* in culture medium showed a high number of colonies (22×10^8 CFU / ml) in the area of Pita Abajo, in contrast to the density found in the Santa Lucia (15×10^8 CFU / ml). 28 isolates were made of which 14 shared characteristics of the genus *Rhizobium*. The results of the Multiple Correspondence Analysis of isolates classified in five groups of morphotypes of *Rhizobium*, taking into account the morphology, size and colour of the colonies. The agglomerative cluster analysis showed four groups of isolates based on the contents of phosphorus and cation exchange capacity of soils and the number of nodules formed. This study shows there is a high diversity of *Rhizobium* bacteria associated with roots of *Teramnus volubilis* in soil conditions of the soil of the town of Tolú.

Key words: legume, nodulation, *Rhizobium*, soil

Introducción

La ganadería doble propósito es la principal actividad económica del Departamento de Sucre, en el cual el 84.9% de su territorio está dedicado exclusivamente al pastoreo de ganado donde la fuente exclusiva de alimento animal la constituyen las leguminosas forrajeras nativas y las gramíneas (VIOLRIA, 2003; AGUILERA, 2005). En el grupo de leguminosas forrajeras predominantes en el Departamento de Sucre se destaca el bejuco de chivo (*Teramnus volúbilis* Sw); por crecer silvestre en las fincas y ser nativa, además vive en una amplia gama de suelos y se establece rápidamente, es

resistente a la sequía, pisoteo y ataque de nematodos, manteniéndose verde durante la época de lluvias y es alternativa de alimentación por constituirse en un buen forraje para bovinos y equino ya que contiene un 16.83% de proteína bruta (BERMÚDEZ, 1973). Además, contribuye al manejo sostenible de la tierra ya que ayudan a regenerar los suelos degradados, reducir la erosión y controlar las plantas indeseables.

Los suelos de las fincas ganaderas del Departamento de Sucre, se caracterizan por tener altos niveles de compactación, erosión, bajos niveles de fertilidad y uso indiscriminado de agroquímicos, dando como resultado praderas degradadas, con baja producción y oferta de forraje con bajos contenidos nutricionales. Los suelos de Tolú tienen un relieve plano, sujetos a inundaciones, niveles de fertilidad y saturación de bases de mediana a alta, y cantidades variables de sodio (ESPITIA y MARTÍNEZ, 2003). Sin embargo, en estos suelos existen unas bacterias simbióticas denominadas *Rhizobium*, las cuales permiten la obtención de biológica de nutrientes nitrogenados a las leguminosas, contribuyendo así con una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra, permitiendo a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos (MARTÍNEZ y LÓPEZ, 2000).

Por tal motivo, las leguminosas forrajeras juegan un papel importante en la producción agropecuaria como fuente alternativa de alimento para el ganado. Estas es consideradas en la ag iltura sostenible como cultivo de importancia en el sistema de rotación y en la reducció de la fertilización nitrogenada debido a su capacidad de formar simbiosis con bacterias diazotróficas del genero *Rhizobium* y fijar nitrógeno atmosférico, lo que les confiere un efecto beneficioso en los cultivos (PERALTA, 2002). En general se ha estimado que la simbiosis leguminosa – *Rhizobium* tiene un potencial de fijación entre 52-320 Kg/N/ha dependiendo de la planta y de las condiciones ambientales (CIAT, 1987).

Sin embargo no todos los suelos agrícolas poseen las bacterias del género *Rhizobium* u otras simbióticas necesarias para promover un desarrollo adecuado en las leguminosas y algunas de estas plantas requieren socios específicos con esta bacteria para producir buenos resultados en cuanto a la fijación del nitrógeno. Es así, como cada leguminosa necesita su propia cepa específica de rhizobios para formar eficientemente nódulos de nitrógeno en sus raíces (STODDARD, 1975).

Las investigaciones actuales en microbiología del suelo están encaminadas a descubrir el papel que juegan los microorganismos en los fenómenos degradativos que ocurren en el seno del suelo y poner en evidencia la especie o grupos de especies de microorganismos que participan en ellos y que estos pueden utilizar en el suelo, todas las materias orgánicas que se hallen presentes (KEENEY y NELSON, 1982). Estudios que se han realizado con *Rhizobium* indican que las razas nativas de bacterias de leguminosas más efectivas pueden aumentar el contenido o el rendimiento de proteína en estas hasta un 20% más en cultivos de leguminosas tradicionales como lentejas, chícharo, garbanzo, soya, frijol y leguminosas de pradera (ERDMAN, 1968).

Debido a los problemas planteados y que hasta la fecha no se han reportado los tipos de *Rhizobium* nativos de los suelos del Departamento de Sucre, este trabajo contribuye a determinar los principales morfotipos de *Rhizobium* asociados a la especie *Teramnus volubilis* Sw, y así crear un punto de partida de futuras investigaciones en el ámbito genético, fisiológico, ecológico, bioquímico y a su uso como biofertilizante en cultivos de importancia económica para la ganadería, mejorando así el forraje consumido por el ganado incrementándose las producciones, ya que en los sistemas de pastoreo las leguminosas son la mayor y más barata fuente de proteína para el ganado de carne y leche, generando divisas a través de la producción animal. Dada la importancia de las leguminosas forrajeras en el sistema agropecuario de la región, se planteó determinar los diferentes morfotipos de *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* Sw en fincas ganaderas de Tolú, en el Departamento de Sucre, Colombia.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El presente estudio fue realizado en fincas ganaderas del municipio de Tolú, Departamento de Sucre. Este municipio se encuentra localizado en el noroccidente del Departamento en la denominada llanura costera aluvial del Golfo del Morrosquillo, a 9° 31' latitud norte y 75° 35' longitud oeste a 3.0 msnm, con temperatura promedio de 28° C y precipitación pluvial anual de 500-1200 mm. La estación lluviosa va desde finales de abril hasta finales de noviembre, con algunas disminuciones sustanciales entre junio y agosto,

denominado veranillo de San Juan; la época seca tiene duración aproximada de 5 meses (Diciembre-Abril). La formación vegetal corresponde al bosque seco tropical, se encuentra en clima cálido seco, los materiales que conforman los suelos están constituidos por sedimentos aluviales, marinos o combinaciones de los dos. En algunos sectores hay sedimentos orgánicos (INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI, 1998).

Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en fincas ganaderas establecidas con la leguminosa *Teramnus volubilis* ubicadas según el plan de Ordenamiento Territorial y el Instituto Geográfico Agustín Codazzi, en cinco zonas (Tabla 1).

Tabla 1. Zonas y Fincas Ganaderas del municipio de Tolú establecidas con *Teramnus volubilis*.

Zona	Corregimiento	Nº Fincas con <i>Teramnus volubilis</i>
1	Nueva Era	7
2	Cabecera Municipal	8
3	Pita Abajo	6
4	Santa Lucia	5
5	Puerto Viejo	7
Total		33

En las fincas ganaderas seleccionadas aleatoriamente, se realizó un muestreo representativo tomando entre 15 – 20 submuestras al azar siguiendo un patrón en W o zig-zag a una profundidad de 5 – 20 cm, tomando al tiempo suelo y raíces para evitar desecamiento de los nódulos. Posteriormente se llevaron las submuestras a bolsas plásticas individuales y se rotularon con el número de la muestra, ubicación y fecha de recolección (ESPITIA y MARTÍNEZ, 2003). A cada muestra de suelo se hizo análisis físico-químico de suelos, caracterización y salinidad y microbiológico. A cada finca muestreada se le diligenció un formato encuesta.

Análisis microbiológico.

Las muestras de suelo fueron colocadas en un balde con agua por un periodo de tiempo de 3 a 5 días, para la disolución del mismo. Posteriormente se retiraron las raíces y se lavaron. Cada raíz por separado, fue observada en estereoscopio para determinar el tamaño de los nódulos, distancia entre ellos; el color tanto interno como externo; el número de nódulos y su distribución en la raíz (RAMÍREZ, 1992). Una vez analizados fueron retirados de la raíces para posterior aislamientos en medios de cultivos de bacterias del género *Rhizobium* (WEAVER y GRAHAM, 1994). El aislamiento de los diferentes morfotipos de *Rhizobium* fue realizada, utilizando mediante técnica propuesta por CIAT (1997), la cual consistió en el lavado de los nódulos, desinfección mediante sumersión en solución de hipoclorito de sodio (NaClO_3 4%) por 4 a 5 minutos. Posteriormente se colocaron los nódulos en agua estéril por 1-2 minutos y se repitió la operación por siete veces para asegurar una total limpieza de residuos de hipoclorito de sodio en la superficie de los nódulos. Los nódulos desinfectados fueron colocados en mortero estéril y se maceraron para obtener la liberación de los bacteroides. Con ayuda de una micropipeta se agregaron 200 μl de la solución de macerado en cajas de petri (tres replicas por muestra) con el medio A.L.M, esparcieron y se incubaron la siembra a 37°C por un tiempo de 2-9 días. Se realizaron nuevos aislamientos a partir del cultivo inicial hasta obtener un cultivo puro de *Rhizobium* (RAMÍREZ, 1992).

Para la identificación del género *Rhizobium* se utilizó la técnica de tinción de Gram, la cual permitió observar la característica de Gram-negativas y las diferentes morfologías presentadas por las bacterias. Se realizó prueba de confirmación, la cual consistió en tomar muestra del cultivo en un portaobjeto y se le agregó una gota de azul de bromotimol, si se observa un cambio a amarillo se comprueba la presencia de *Rhizobium*, en caso negativo corresponde a *Bradyrhizobium* (RAMÍREZ, 1992). Para determinar la población de *Rhizobium* presente en las muestras de las diferentes fincas se realizaron diluciones seriadas de los nódulos. Se tomaron 0.2ml de macerado y se depositaron en tubos con caldo Triptófano enriquecido con extracto de levadura y glucosa e incubación de la siembra por 3 a 5 días, a 30°C de acuerdo a metodología propuesta por ALAMI *et al.*, (2000). Una vez obtenido el aislamiento, la muestra se agitó y se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} . A partir de la dilución 10^{-6} y por triplicado, se sembraron alícuotas de 1ml en medio Y.M.A, se incubaron a temperatura de 30°C de 2-5 días. La densidad población se determinó fue determinado mediante

conteo de colonia en placas y la densidad final fue expresad en UFC/mL (VALENZUELA y SILVESTRE, 1991).

Análisis estadístico

Para correlacionar características culturales entre los diferentes morfotipos aislados (forma, color, tamaño) por zonas, aplicó análisis de correspondencias múltiples y de componentes principales (APC) en programa SAS 6.1.2 (Statistical Analysis System). Para obtener grupos de características compatibles entre los morfotipos, fue realizado el análisis de clúster aglomerativo de distancias euclidianas ligado al método de Ward. Para predecir el establecimiento de *Rhizobium* por tipo de suelo, se hizo agrupamiento de morfotipos en relación al número de nódulos formados por zona y en función de los parámetros físico-químicos del suelo de las diferentes zonas estudiadas fue realizada mediante análisis de componentes principales.

Resultados

De acuerdo a los resultados de los análisis físico-químicos, los suelos de las fincas objetos del presente estudio, presentaron un rango de pH de moderadamente ácido a moderadamente alcalino, contenido de materia orgánica de media a alta (2.8-5.8%), porcentaje de fosforo de alto a muy excesivo, cantidad de potasio de medio a alto, magnesio de alto a muy alto, sodio de medio a alto al igual que el elemento Calcio, textura de franco arenosa en su mayoría a franco y franco arcillosa. Al momento del muestreo en estas fincas había realizado aplicación de agroquímicos y fertilización. Entre los productos químicos de mayor uso, se encuentra la Urea, herbicidas, Mina 780, Round up y Galope en aspersión. Los resultados de las encuestas diligenciadas a cada finca muestreada, indica que la mayoría de las fincas analizadas, presentan un relieve plano, con suelos agrietados y tendencia a encharcarse durante el periodo de lluvias. La leguminosa *Teramnus volubilis* se encuentra en estado de fructificación principalmente en los meses de Febrero a Marzo y, al finalizar el mes de Junio se observa en estado vegetativo, sin semillas ni flores y enredadas al pasto angletón.

Los nódulos encontrados presentaron una forma redondeada y su coloración externa fue similar a la de la raíz (Fig.1A), variando de café claro a café oscuro, con una superficie costrosa (Fig.1B). Su coloración interna varió de un color rojo ladrillo (Fig.1C) pasando por verde oscuro (Fig.1D) y blanco, los cuales se presentaron en gran cantidad. En cuanto al número de nódulos, en general registró valores de medio a alto en un rango mínimo promedio de 3 a 37 nódulos por raíz. El tamaño de los nódulos se encontró en un rango de medio alto (0.76mm a 1.16mm de diámetro). Los nódulos se distribuyeron con mayor frecuencia en las raíces secundarias que en las primarias en proporción de 5:1.



Figura 1. Características de los nódulos de *Teramnus volubilis*. 1: nódulo en raíz primaria (2.0x10), 2: en raíz secundaria (2.5x10), 3: corte transversal de nódulo joven (6.0x10) y 4: corte transversal de nódulo viejo (3.5x10)

En Tabla 2, se observa los resultados de los cósenos cuadrados realizados a las características culturales (color, forma, ancho, largo y diámetro) de los morfotipos aislados. En la tabla, se muestra que en la dimensión 1, la variable más incidente fue la forma de la colonia y en la dimensión 2, se observa que el color de las colonias y el largo de las colonia son las características de mayor valor.

Tabla 1. Cosenos cuadrados resultantes del Análisis de Correspondencia Múltiple

Características	Dimensión 1	Dimensión 2
Forma	0,982996*	0,15171
Color	0,201359	0,787789*
Ancho	0,190938	0,123478
Largo	0,097600	0,711902*
Diámetro	0,383348	0,201632

El análisis de correspondencia múltiple realizado a partir de la información obtenida de la tabla 1, clasificó 5 grupos de morfotipos de bacterias del género *Rhizobium* en función a características culturas de los aislamientos (color, forma largo, ancho y diámetro) (fig. 3). En el primer grupo se observa que los morfotipos (M0001, M002 y M006a) están clasificados por el color de las colonias; en el grupo 2 aparecen los morfotipos (M004, M007 y M011a) agrupados en función del ancho y diámetros de las colonias; los morfotipos (M009 y M008) corresponden al grupo 3 clasificados por la forma, en el grupo 4 se encuentran los morfotipos (M003, M010, M012, M013a, M013b) agrupados forma y el largo y en el grupo 5 aparece un solo (M006b) clasificado con base a largo de la colonia (tabla 3).

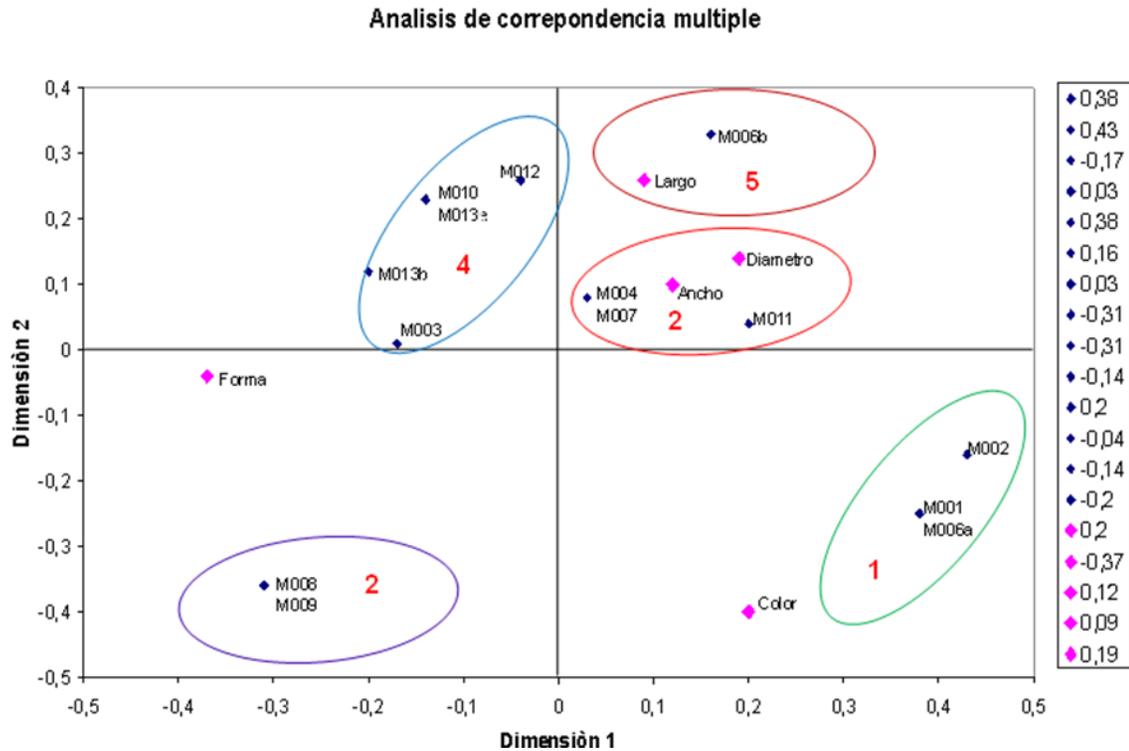


Figura 3. Agrupamiento de aislamientos de *Rhizobium* por características culturales mediante análisis de correspondencia múltiple

La tabla 3, se observa que el morfotipo 1, se caracteriza por presentar células de formas elipsoidales, tamaño de (entre $1.5\mu\text{m}$ - $2.0\mu\text{m}$ de largo) y color blanco-crema. El morfotipo 2 contiene células de formas bacilares alargadas con colonias de diámetro ($>2\text{mm}$) y color translúcido. El morfotipo 3 está integrado por células de formas esferoidales pequeñas (largo $<1.5\mu\text{m}$ y ancho $1\mu\text{m}$), al igual que sus colonias cuyos diámetros son $<2\text{mm}$ y presentan un color blanco-crema. El morfotipo 4 está conformado por células de formas bacilares alargadas de gran longitud, la cual supera las $2\mu\text{m}$, con colonias de diámetro pequeño ($<2\text{mm}$) y color blanco. El morfotipo 5, con un único aislamiento, presenta células de formas ramificadas o irregulares (x o y), grandes $>2\mu\text{m}$ y ancho $>1\mu\text{m}$, con colonias de diámetro grande ($>2\text{mm}$) y coloración blanca.

Tabla 3. Descripción de las características de los morfotipos de *Rhizobium* establecidos mediante el método estadístico del Centroide

Morfotipos	Muestra	Macroscópicas		Microscópicas		
		Diámetro	Color	Largo	Ancho	Forma
1	M001	1	3	2	1	1
	M002	2	3	2	1	1
	M006a	1	3	2	1	1
2	M004	2	2	3	1	3
	M007	2	2	3	1	3
	M011a	1	1	1	1	1
3	M008	1	3	1	1	5
	M009	1	3	1	1	5
4	M003	1	2	3	3	1
	M010	1	1	3	3	1
	M012	2	1	3	1	3
	M013a	1	1	3	1	3
	M013b	1	1	2	1	3
5	M006b	2	1	3	2	2

DIÁMETRO: 1= ≤ 2 , DIÁMETRO 2= ≥ 2 ; LARGO: 1= menores ≤ 1.5 , 2= entre 1.5 y 2; COLOR:1: Blanco,2; traslucida, 3: blanco-crema);FORMA 1= Elipsoidales, 2= Irregulares,3= Alargadas,4= Esferoidales, 5= mayores a 2; forma (ancha 1: ≤ 2 , ancho 2; ≥ 2)

Para establecer relación entre los diferentes morfotipos de bacterias aisladas de las raíces en función de la modulación (número de nódulos, tamaño, distancia,) y de parámetros físico-químicas del suelo (pH, materia orgánica (MO), fósforo (P), capacidad de intercambio catiónico (CIC), calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K) y sodio (Na), se realizó Análisis de Componentes Principales. La tabla 4, muestra los resultados de las principales variables clasificadas, se observa que para la componente 1, el elemento Fósforo es la variable de mayor valor, así mismo se detalla que en la segunda y tercera componente, el Número de nódulos formado por raíces y la CIC, respectivamente, fueron las variables de mayor significancia.

Tabla 4. Vectores propios resultantes del Análisis de Componentes Principales

Características	COMP 1	COMP 2	COMP 3
P	0,973861*	-0,40551	-0,172844
Número de nódulos	-0,040393	0,914289*	-0,161061
CIC	0,143675	0,102640	0,837878*
Tamaño	-0,002205	-0,001191	-0,020626
Distancia	0,072047	0,089207	0,330330
PH	-0,009635	-0,007049	-0,003137
MO	0,023672	0,013764	0,099475
Ca	0,054704	0,0737718	0,343663
Mg	0,139666	0,370580	-0,010793
K	0,007630	-0,002178	-0,012727
Na	-0,030253	0,030486	0,065679

COMP: componente.

Los resultados de la tabla anterior fueron utilizados para establecer agrupamiento de morfotipos en función a las variables (fosforo, numero de nódulos, CIC), mediante el análisis de clúster aglomerativo. Teniendo en cuenta los resultados del análisis de clúster aglomerativo, (Fig. 4), se observa que existen 4 grupos morfológicos de bacterias del género *Rhizobium* con características homogéneas y de confiabilidad del 88% relación a las variables analizadas.

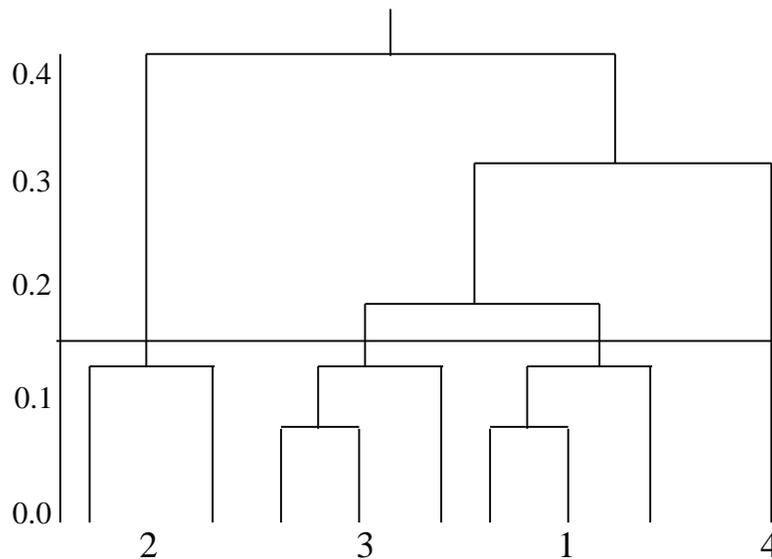


Figura 4. Análisis de Clúster aglomerativo de agrupamiento de los morfotipos en relación a las variables (fósforo, número de nódulos y CIC)

En la tabla 5, se describen las características homogéneas de los 4 grupos de morfotipos clasificados mediante el análisis de componentes principales, en función de las variables clasificadas (fosforo, numero de nódulos, CIC. En el grupo 1, se encuentran los morfotipos mas variable; están presentes cuando existen niveles muy altos de fósforo, una capacidad de intercambio catiónico (CIC) moderada en los suelos, poseen un número de nódulos de bajo a medio. El grupo 2 es el más homogéneo células de forma alargadas, las cuales están asociadas con niveles de P excesivamente altos, alta CIC y bajo N° de nódulos. El grupo 3 es similar al grupo 2, forman células alargadas) y elipsoidales, están asociados a niveles de P muy altos. CIC alta y con un número de nódulos bajo. El grupo 4 se encuentran morfotipos formando células esferoidales, con un alto número de nódulos, y presentes cuando en los suelos existen alto niveles de P y una CIC media.

Tabla 5. Descripción de las características homogéneas de los grupos obtenidos a partir de los resultados del Análisis de Componentes Principales

Grupo	Muestra	Nº Nódulos	P	CIC	Morfotipo
1	M006a	9	83.46	16.5	1
	M006b	9	83.46	16.5	5
	M007	6.67	72.91	19.28	2
	M008	22.5	72.91	19.25	3
2	M001	7.67	112.31	27.5	1
	M004	6.5	117.82	26.68	2
	M0012	13	112.31	27.5	4
	M0013a	19.33	121.93	26.95	4
	M0013b	19.33	121.93	26.95	4
3	M002	4.67	92.74	25.8	1
	M003	8.33	90.96	28.88	4
	M010	4.67	93.55	17.93	4
	M011	21.67	96.2	23.65	2
4	M009	22	43.53	19.25	3

En la fig. 5, se observa el agrupamiento de los 4 grupos de morfotipos encontrados en relación a las variables clasificadas (fósforo, CIC y número de nódulos) y guardando relación a las características mostradas en la tabla 5.

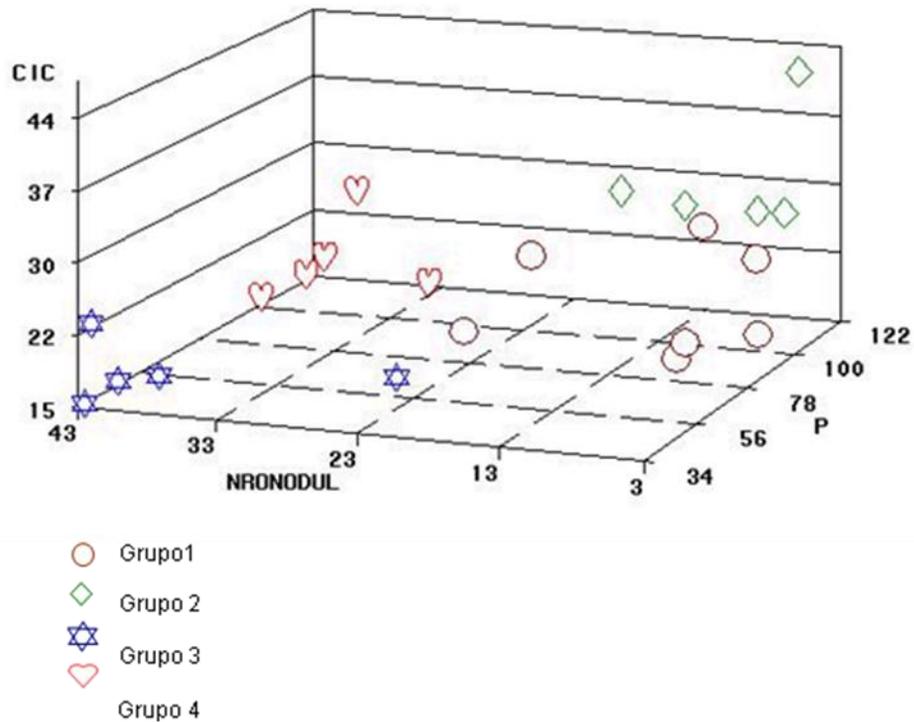


Figura 5. Agrupamiento de los morfotipos con relación a las componentes clasificatorias (P, número de nódulos y CIC)

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos de la densidad poblacional mediante técnica de conteo de colonias en placa de los diferentes morfotipos aislados. La densidad en UFC/mL, osciló de 11×10^8 para el morfotipo M012, aislado de la zona 5 a 3.0×10^8 para M004 en la zona 2. Teniendo en cuenta los promedio, la zona que mostro una mayor densidad poblacional correspondió a la zona 3, perteneciente al corregimiento de Pita Abajo, en contraste la a zona de menor densidad (15×10^8 UFC/ml) la cual correspondió a los morfotipos aislados en suelos del corregimiento de Santa Lucía.

Tabla 6. Densidad poblacional de morfotipos de *Rhizobium* en UFC/mL.

Zona	Aislamiento	Conteo (UFC/ml)	Promedio (UFC/ ml)
1	MOO1	19x10 ⁸	18x10 ⁸
	MOO2	25x10 ⁸	
	MOO3	10x10 ⁸	
2	MOO4	30x10 ⁸	21x10 ⁸
	MOO8	20x10 ⁸	
	MOO9	14x10 ⁸	
3	MOO6a	24x10 ⁸	22x10 ⁸
	MOO6b	30x10 ⁸	
	MOO7	12x10 ⁸	
4	MO13a	15x10 ⁸	15x10 ⁸
	MO13b	16x10 ⁸	
5	MO10	20x10 ⁸	16x10 ⁸
	MO11	18x10 ⁸	
	MO12	11x10 ⁸	

En la Fig. 6, se detallan las características macroscópica y microscópica de los 5 grupos de morfotipos con características similares al género *Rhizobium* aislados a partir de nódulos de *Teramnus volubilis* en condiciones de fincas ganaderas del municipio de Tolú.

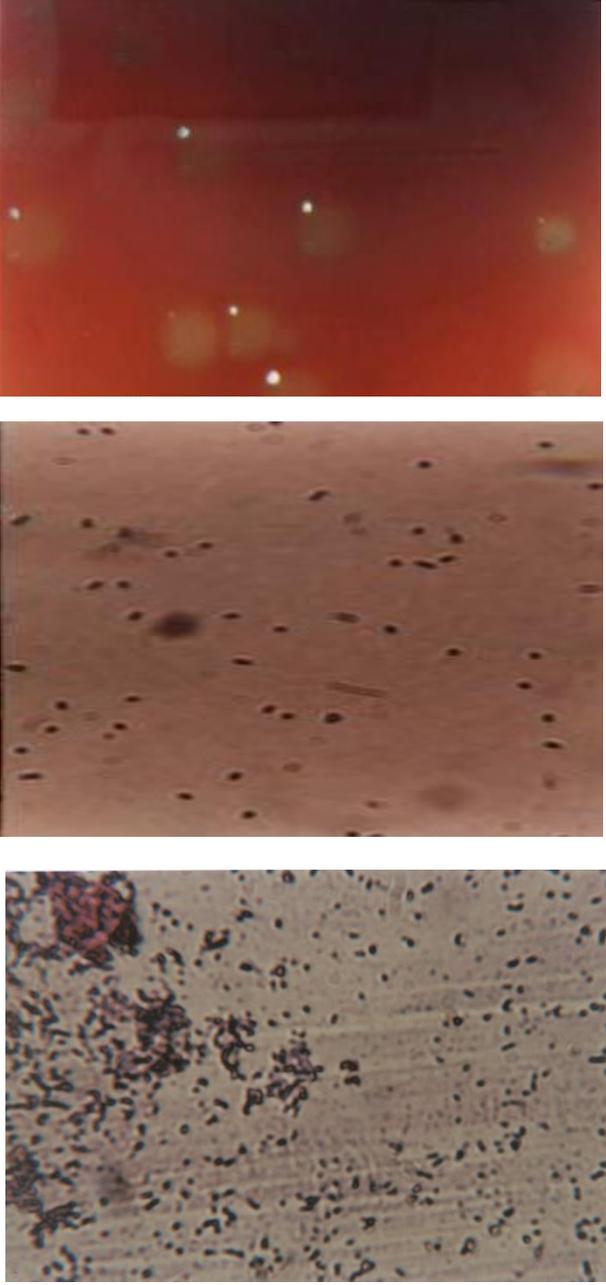
Fig. 6.1. Morfotipo 1.	OBJ 100 X OC 10X
DESCRIPCIÓN DEL MORFOTIPO:	
<p>Características de las colonias</p> <p>Diámetro (mm): 2 Color: Beige</p> <p>Características complementarias: Forma: Redonda Borde: Liso Elevación: Consistencia: Mucilaginosa</p> <p>Características de las bacterias</p> <p>Forma: Células elipsoidales Largo: 1.5µm-2.0µm Ancho: 0.9µm-1.0µm</p>	 <p>Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i></p>
<p>Observaciones adicionales: Tiempo de incubación menor a 5 días</p>	

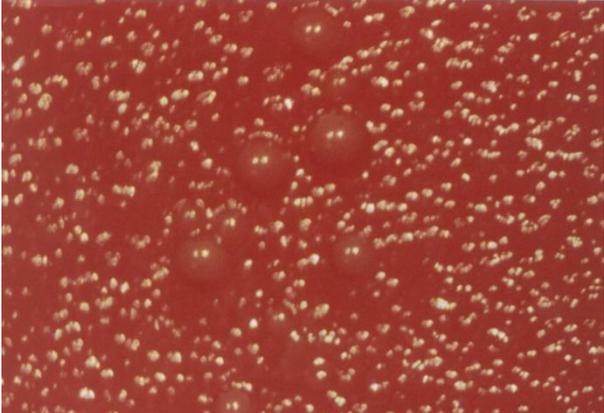
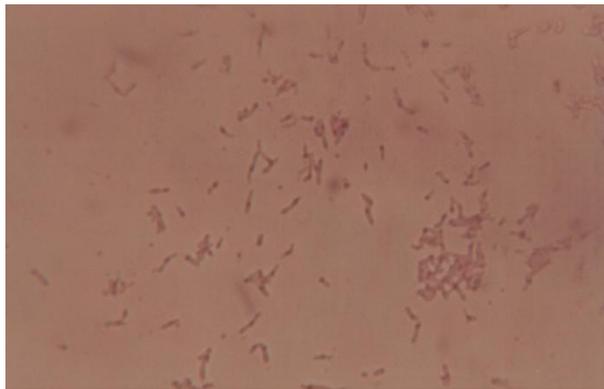
Fig. 6.2. Morfotipo 2.	OBJ 100 X OC 10X
DESCRIPCIÓN DEL MORFOTIPO:	
<p>Características de las colonias</p> <p>Diámetro (mm): 2 - 2.5 Color: Translúcidas brillantes</p> <p>Características complementarias: Forma: Redonda Borde: Liso Elevación: Pulvinada Consistencia: Mucilaginosa</p> <p>Características de las bacterias</p> <p>Forma: Células bacilares alargadas Largo: 2.0 μm-2.5 μm Ancho: 1.0 μm</p>	   <p>Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i></p>
<p>Observaciones adicionales: Células que presentan septos transversales teñidos positivamente con la tinción de Gram. Tiempo de incubación de 5 a 7 días.</p>	

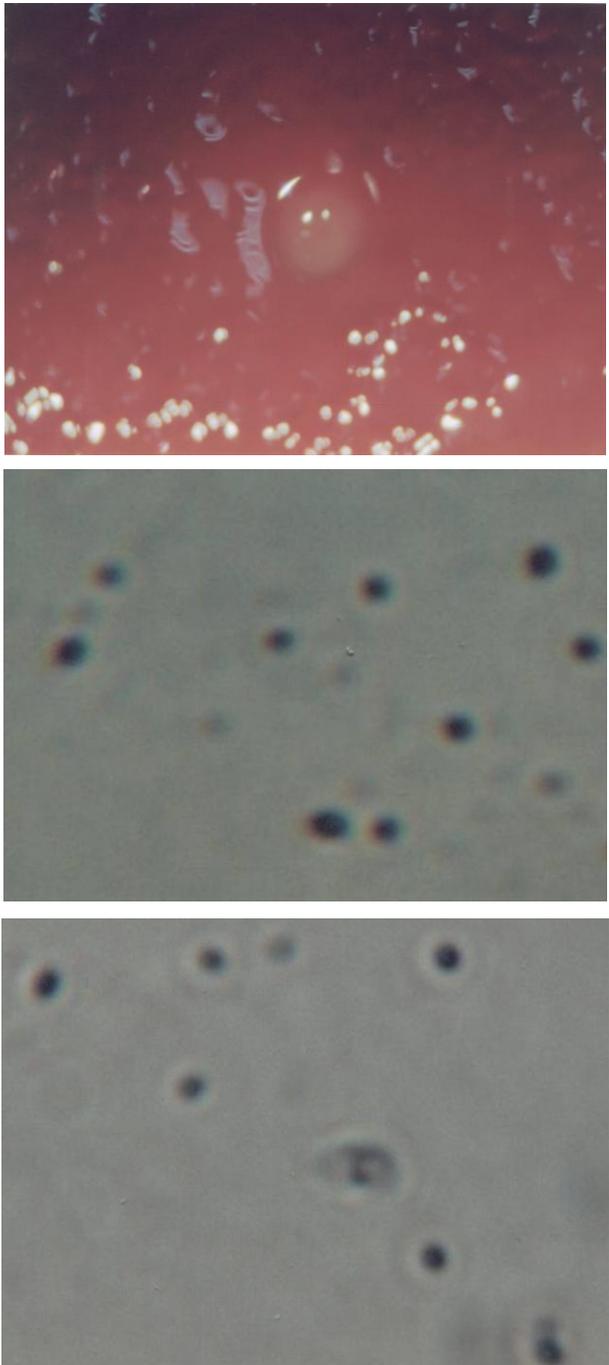
Fig. 6.3. Morfotipo 3.	OBJ 100 X OC 10X
DESCRIPCIÓN DEL MORFOTIPO:	
<p>Características de las colonias</p> <p>Diámetro (mm): 1.8 - 2.0 Color: Beige</p> <p>Características complementarias: Forma: Redonda Borde: Liso Elevación: Pulvinada Consistencia: Suave</p> <p>Características de las bacterias</p> <p>Forma: Células esferoidales Largo: 0.9 μm-1.0 μm Ancho: 0.9 μm-1.0 μm</p>	
<p>Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i></p>	
<p>Observaciones adicionales: Tiempo de incubación mayor a 6 días.</p>	

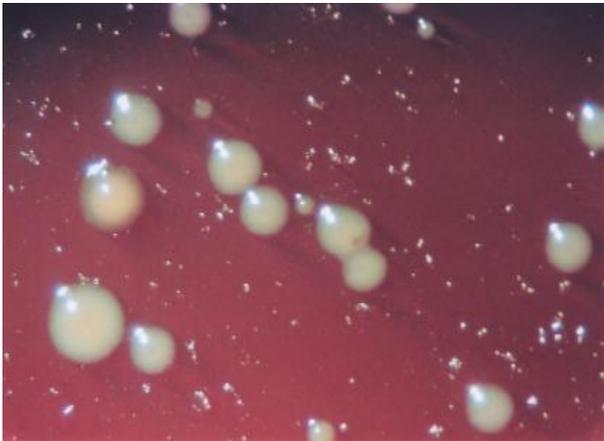
Fig. 6.4. Morfotipo 4.	OBJ 100 X OC 10X
DESCRIPCIÓN DEL MORFOTIPO:	
<p style="text-align: center;">Características de las colonias</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 - 2.0 Color: Blanca</p> <p>Características complementarias: Forma: Redonda Borde: Liso Elevación: Elevada Consistencia: Suave</p> <p style="text-align: center;">Características de las bacterias</p> <p>Forma: Células bacilares alargadas Largo: 2.25 μm-3.8 μm Ancho: 0.9 μm-1.0 μm</p>	   <p>Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i></p>
<p>Observaciones adicionales: Tiempo de incubación de 4 a 7 días.</p>	

Fig. 6.5. Morfotipo 5.	OBJ 100 X OC 10X
------------------------	------------------

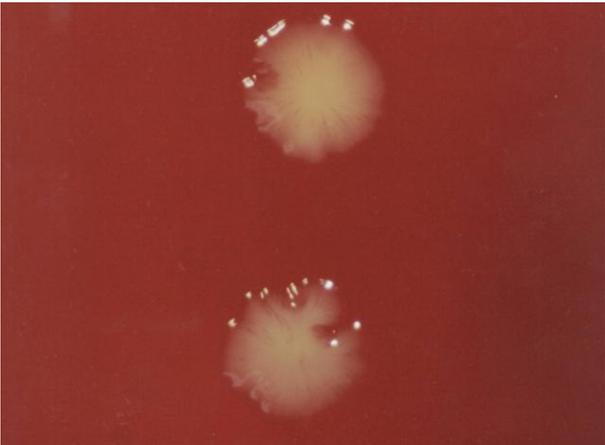
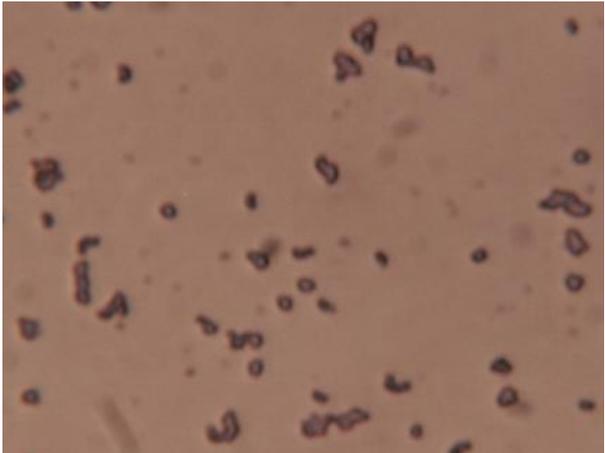
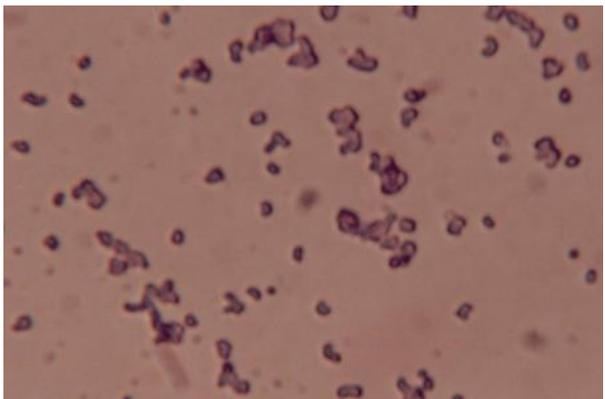
DESCRIPCIÓN DEL MORFOTIPO:	
<p>Características de las colonias</p> <p>Diámetro (mm): 3.6 Color: Beige</p> <p>Características complementarias: Forma: Redonda Borde: Irregular Elevación: Convexa Consistencia: Suave</p> <p>Características de las bacterias</p> <p>Forma: Células ramificadas o irregulares (X y Y). Largo: 2.5 µm Ancho: 1.4 µm</p>	  
	<p>Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i></p>
<p>Observaciones adicionales: Bacteroides pleomórficos de gran tamaño. Tiempo de incubación de 2 días.</p>	

Figura 6. Morfotipos (1-5) con características similares al género *Rhizobium* aislados a partir de nódulos de *Teramnus volubilis* Sw en condiciones de fincas ganaderas del municipio de Tolú

Del total de muestras analizadas, se obtuvieron 28 aislamientos de los cuales 14 resultaron con características similares al género *Rhizobium* y los cuales de acuerdo a los análisis anteriores fueron agrupados en 5 morfotipos. En la fig. 7, se observa el porcentaje de participación de cada morfotipos aislamientos en el presente estudio. En la fig, se muestra que el morfotipo 4 presento el mayor porcentaje de participación (35.7%) con relación al resto de morfotipos encontrado.

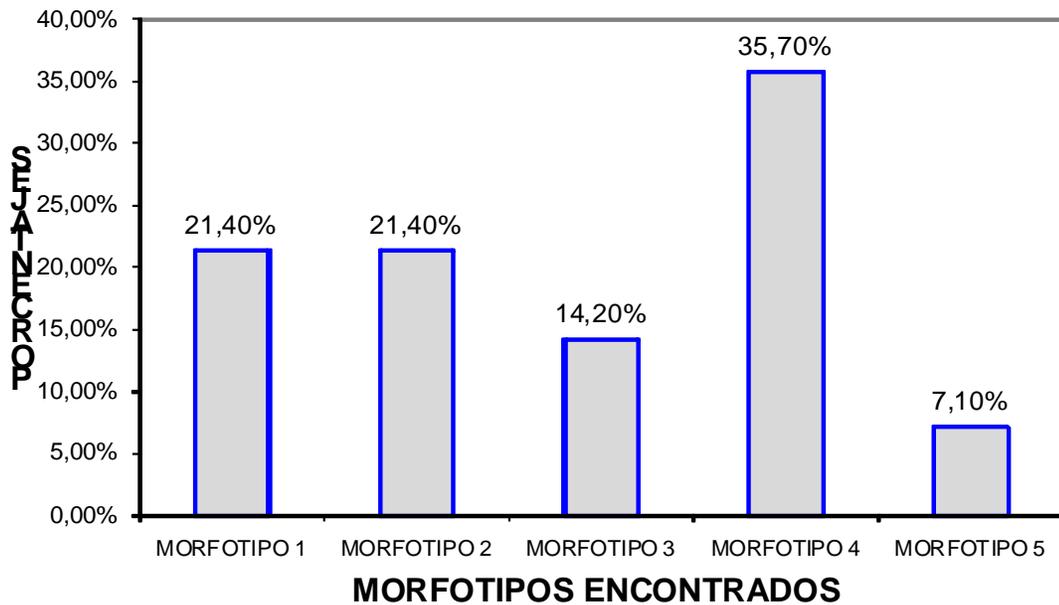


Figura 7. Distribución porcentual de los 5 morfotipos de *Rhizobium* asociados a *T. volubilis* en el municipio de Tolú

Discusión

La especie de leguminosa *Teramnus volubilis* es muy abundante y se caracteriza por permanecer verde durante la época de lluvias, en suelos con buena retención de humedad, resiste la sequía de 3 a 4 meses inclusive el pisoteo, tiene una alta producción de semillas, sobre todo entre los meses de febrero a Marzo. La especie de pasto con gran presencia es angletón (*Dichanthium aristatum*), a la cual *Teramnus volubilis* se asocia muy bien. La predominancia de esta leguminosa se explica principalmente por el alto contenido de fósforo (P) de estos suelos, ya que su capacidad competitiva se

ve mejorada por este en relación con las gramíneas asociadas (SHERMAN *et al.*, 1991).

Estos suelos presentan niveles de acidez moderada lo que permite el desarrollo de *Rhizobium*, ya que los suelos demasiados ácidos pueden originar problemas de nutrición mineral (deficiencias de Ca, Mg y K), tanto en *Rhizobium* como en la leguminosa hospedante (SHERMAN *et al.*, 1991; MAYEA *et al.*, 1998; JIMÉNEZ y LAMO, 1998; PÉREZ– GALDONA y KAHN, 1994). Es frecuente encontrar deficiencia de los elementos deficiencia de P y N, lo cual causa una reducción en la fijación de N₂ por efectos específicos en la iniciación y crecimiento del nódulo y la actividad de la enzima nitrogenasa, presente en la célula de especies de *Rhizobium* (MONTES, 1999). Uno de los motivos del escaso crecimiento de ciertas leguminosas en los suelos ácidos puede ser la reducida absorción de Molibdeno (Mo) (MAYEA *et al.*, 1998; JIMÉNEZ y LAMO, 1998; FREY y BLUM, 1994). Sin embargo el crecimiento de la leguminosa y la nodulación son satisfactorios en pH 5.4 a 7.0 (FLECHTER, 1958). Esto concuerda con lo encontrado en el presente estudio, ya que en promedio el número de nódulos fue significativamente alto, asociado también a un tamaño mediano de estos.

La abundancia de nódulos con una coloración interna blanca y asociada con raíces noduladas, se explica principalmente por la falta de Molibdeno (Mo) según lo expuesto por MAYEA *et al.*, (1998) y MARTÍNEZ –VIERA (1986), ya que este es escaso, se forman nódulos, menos eficientes y su estructura se asemeja a la de los nódulos inactivos, debido a que en condiciones de suelos ácidos es difícil la absorción de este nutriente. Sin embargo, la presencia de nódulos con coloración interna roja, se explica por la abundancia de cationes divalentes (Ca y Mg), los cuales se encuentran en niveles altos y no permiten una mala viabilidad nodular (MAYEA *et al.*, 1998). Es por esta razón que la CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico) es una de las características físico-químicas del suelo que clasifican o agrupan los morfotipos obtenidos, dilucidando una importante relación entre esta y el número de nódulos, sobre todo porque estos suelos tienen una CIC alta.

Aunque recientes estudios realizados por CABA *et al.*, (2001) señalan que la planta es la que controla principalmente el número de nódulos, mediante un mecanismo de autorregulación, este también es controlado por factores externos como la presencia de nitratos en el suelo. Las raíces de leguminosas pobremente noduladas o con pocos nódulos pueden deberse a

una abundancia de nitrógeno combinado en el suelo, el cual inhibe la nodulación (NUTMAN, 1956). Por su parte COYNE (2000) afirma que el número de nódulos depende de la fertilidad de el suelo, es decir, de la cantidad de nutrimentos minerales (P, K, Mg, Ca) presentes en él. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde encontró que la presencia de un mayor número de nódulos se asocia a altos contenido de P principalmente y también a altos niveles de Mg, K y CIC. Además los grandes nódulos son casi siempre escasos y los pequeños generalmente abundantes y ampliamente dispersos en la raíz. (SHERMAN *et al.*, 1991; COYNE 2000). Según NUTMAN (1958), la infección por parte de *Rhizobium* se produce en unas cuantas zonas bien separadas de la raíz y no al azar, y el número de pelos infectados varía según la especie de leguminosas y su capacidad de desarrollo de raíces laterales, lo cual depende del genotipo de cada planta.

Adicionalmente, los altos niveles de P tienden a incrementar la absorción de Mn, el cual causa un descenso en el número y el volumen de los nódulos, pero este efecto se ve contrarrestado por la presencia de calcio (SHERMAN *et al.*, 1991; PÉREZ y TORRALBA, 1997). Esto se refleja en aquellos aislamientos asociados a suelos con altos contenidos de P pero un N° de nódulos no tan alto. Sin embargo, el P aumenta el peso seco del nódulo al elevarse sus niveles en el suelo y estimula además el aumento del N° de nódulos y el porcentaje de fijación de nitrógeno. Además, la moderada presencia de este elemento en los suelos de las fincas ganaderas, favorece la actividad del K, el cual aumenta el número y tamaño de los nódulos (LYNCH y SEARS, 1951).

Debido al papel decisivo que juega el P en el establecimiento y desarrollo de *Rhizobium* y la leguminosa, es la principal característica clasificatoria de los morfotipos en cuanto a la relación que estos presentan con las propiedades físico-químicas del suelo y de la nodulación. Los agrupamientos que se formaron teniendo en cuenta estas características, muestran una gran variabilidad sobre todo el primer grupo que presenta casi todos los morfotipos. Esto sugiere que la morfología de la bacteria, es decir el morfotipo es independiente de las características físico-químicas del suelo y más bien depende del genotipo de la bacteria de *Rhizobium* propio de cada cepa. Según JORDAN y COULTER (1965) los bacteroides natural o artificialmente producidos sufren un deterioro en la síntesis de proteína y de la pared celular. La alteración de las capacidades de síntesis y la posible

formación de material anormal en la pared celular, incapaz de conferir rigidez, pueden ser la causa de la morfología externa. Las propiedades físico-químicas están más relacionadas con la capacidad de nodulación de la leguminosa, el desarrollo del nódulo y la fijación de nitrógeno.

En cuanto a la clasificación de los aislamientos de *Rhizobium* en 5 morfotipos, se determinó que la forma de la bacteria es la característica más relevante y por tanto clasificatoria, debido a la gran variabilidad de la misma, ya que según los estudios de DART y MERCER (1966) algunas células bacterianas de *Rhizobium* se expanden muy poco a medida que se desarrolla el nódulo y retienen su forma bacilar, pero otras se expanden enormemente y pierden dicha estructura. De estos dos tipos diferentes de desarrollo de las células se derivan, morfológicamente hablando, varios tipos de bacteroides o células bacterianas de *Rhizobium*: esferoides, elipsoidales, ramificadas o irregulares (Formas curvas, x, y) o en forma de bacilo con numerosos tipos intermedios (alargados, medianos) (BERGENSEN 1957; SPAINK 2000), sin embargo, independientemente de su morfología los bacteroides tienen todos la misma función dentro de él nódulo.

El largo o longitud de la bacteria ayuda a definir también la morfología de la misma, ya que dependiendo de este la bacteria puede ser esferoidal si su longitud es pequeña, incluso igualando su ancho, si su largo es mediano puede ser elipsoidal y si su longitud es bastante grande ($> 2.8 \mu\text{m}$) pueden ser irregulares o pleomórficos ya que según COYNE (2000) estas formas pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan. El color es la característica microscópica o de las colonias más importantes según nuestro análisis ya que es la que más variabilidad presenta, encontrándose, traslúcidas, semitranslúcidas, blanco-crema y blancas. Las traslúcidas y semitranslúcidas se observan así debido a la monocapa de liposacáridos (lípidos A, núcleo sacárido y antígeno O) que produce el *Rhizobium*, la cual se proyecta al exterior y le da una coloración transparente y una consistencia mucosa o mucilaginosa (SPAINK *et al.*, 1998). Esto se produce más abundantemente si el medio contiene manitol el cual estimula su producción (VARGAS, 1969). Algunos de nuestros aislamientos producen menos cantidad de lipopolisacáridos dando una coloración que varía de beige a blanca.

Las características de los aislamientos, concuerdan con los resultados de investigaciones como DART y MERCER (1996), SPAINK (2000) y COYNE

(2000), ya que estos presentaban consistencia mucosa por los lipopolisacáridos y las formas de las bacterias obtenidas variaron desde esferoidales a bacilares alargadas, incluyendo irregulares. El resto de características tomadas se consideraron como complementarias ya que el análisis estadístico considero que su variabilidad no era mayor que la de las anteriores, estas eran más bien uniformes para la mayoría de los aislamientos y no se trataron como relevantes para obtener la clasificación o agrupamiento de los morfotipos.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al laboratorio de microbiología de la Universidad de Sucre por la realización del experimento.

Referencias

AGUILERA, DM. 2005. *Documento de trabajo sobre Economía Regional: La Economía del Departamento de Sucre: Ganadería y Sector Público*. Cartagena de Indias: Banco de la República; 2005. <http://www.banrep.gov.co/documentos/publicaciones/pdf/DTSER-43.pdf>

ALAMI, Y.W.; ACHOUAK. C.L.; THEULIN, M. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide producing *Rhizobium* sp. Strain isolated from sunflower roots. *Applied and environmental microbiology* 66 (8):3393-3398.

BERGERSEN, F.J.1957. Some features of the forms of *Rhizobium* found within the host cell of legume root nodule. *Soil sci.* 1: 78(1):213-234.

BERMÚDEZ. L.A. 1973. *Leguminosas espontáneas de posible valor forrajero en Colombia*. Ministerio de agricultura. ICA. Colombia.

CABA, J.M.; POVEDA, J.L.; LIGERO. F. 2001. Control de la nodulación en las leguminosas: Implicación de las fitohormonas, disponible en:<http://193.146.205.198/sefin/Ligero.html>

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 1987. *Simbiosis leguminosas–Rhizobium. Manual de métodos evaluación, selección y manejo. Sección microbiología de suelos.* Programa de pastos tropicales y Programa de frijol. CIAT, Cali-Colombia.

COYNE, M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio.* Editorial Paraninfo. España.

DART, P.J.; MERCER, F.V. 1966. Fine structure of bacteroids in root nodules of *Vigna sinensis*, *Acacia longifolia*, *Viminaria juncea* and *Lupinus anguatifolius*. J. Bact. 91:1314-1319.

ERDMAN, L.W. 1968. Inocule sus leguminosas. Agricultura de las Americas, U.S.A. 17(6):45-48.

ESPITIA, F.G.; MARTINEZ, E. 2003. Identificación de géneros de hongos formadores de micorrizas arbusculares (H.M.A) en las especies de pasto colosoana (*Bothrichloa pertuosa* (L) A .camus) y àngleton (*Dichanthium benth*) en los municipios de corozal y Tolú, departamento de Sucre.Trabajo de grado, Departamento de Biología, Universidad de sucre, Colombia.112 p.

FLETCHER, W.W. 1958. The effect of pH on nodulation of *Trifolium pratense* growing in Liquid culture. Phytopatology 10:129-134.

FREY, S.D.; BLUM, L.K.. 1994. Effect of pH on competition for nodule occupancy by type I and type II strains of *Rhizobium leguminosarum b.v. phaseoli*. Plant Soil 163: 157-164.
<http://www.springerlink.com/content/f675874m24138364/>.

INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI (IGAC). 1998. *Estudio general de suelos y zonificación de tierras.* Departamento de sucre. Ediciones IGAC. Bogotá.

JIMÉNEZ, R.; LAMO, J. 1998. *Agricultura Sostenible.* Condición Agrofuturo Life. Ediciones Mundi – Prensa. España.

JORDAN, D.C.; COULTER, W.H. 1965. On the cytology and synthetic capacities of natural and artificial produced bacteroids of *Rhizobium spp* . J. Gen. Microbial 5:592-595.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. Plant soil, 170: 75-86.

LYNCH, D.L.; SEARS, O.H. 1951. Differential response of Strains of Lotus nodule bacteria to soil treatment practices. Proc. Soil. Sci. Soc. Am. 15: 176-180.

MARTINEZ, T. J.; LOPEZ, I. 2000. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. 198p.

MARTÍNEZ-VIERA, R. 1986. *Ciclo biológico del nitrógeno. Cap. I y II*. Ed. Científico técnica. La Habana.

MAYEA, S.; CARONE, M.; R.NOVO, B.I.; SILVEIRA, E.; SORIA. M.; MORALES. Y.; VALIÑO, A. 1998. *Microbiología Agropecuaria*. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana.

MONTES, L. 1999. Efecto del fósforo en la nutrición nitrogenada del frijol común (*P. vulgaris*). Disponible en: <http://www.cartuja.csic.es/SEFV99/abstracts/nutricion/s.3-6.html>.

NUTMAN, P.S. 1956. The influence of the legume root nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and functions. Biol. Rev. 31:109-151.

PERALTA, O. 2002. *Manejos de pasturas, información básica formación YVY*, ediciones limusa. Paraguay.

PEREZ, S.; TORRALBA, A. 1997. La fijación del nitrógeno por los seres vivos. *Scriptus Naturae*, seminario 21(01):21p.

PEREZ-GALDONA, R.; KAHN, M.L. 1994. Effects of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. *Microbiology* 140: 1231-1235. <http://mic.sgmjournals.org/cgi/reprint/140/5/1231.pdf>.

RAMÍREZ, M. 1992. *Técnicas de microbiología de suelos aplicadas a la fijación simbiótica de nitrógeno*. Sección Recursos Naturales Instituto Colombiano Agropecuario. Bogotá.

SHERMAN, P.J.; CAMEROM, D.G.; RIVEROS, F. 1991. *Leguminosas Forrajeras Tropicales*. Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y alimentación (FAO). Colección FAO; Producción y Protección Vegetal N° 2. Roma.

SPAINK, H. P. 2000. Root Nodulation and Infections Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 54:257-288. http://www.ufv.br/dbv/pgfvg/BVE684/htms/pdfs_revisao/estresse/infectionfact_ors.pdf.

STODDARD, C.D. 1975. Leguminosas: Mayores y Mejores cosechas, como aprovechar el nitrógeno del aire. *Agricultura de las Américas* 8(24): 28-29.

VALENZUELA, M.E.; SILVESTRES, J.H. 1991. *Microbiología de alimentos*. UNISUR, Bogotá.

VARGAS, E. 1969. *Aspectos Microbiológicos de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno por el Rhizobium*. Instituto geográfico "Agustín Codazzi". Bogotá.

VILORIA, HJ. *Documento de trabajo sobre economía regional: La ganadería bovina en las llanuras del Caribe Colombiano*. Cartagena de Indias: Banco de la República; 2003.
<http://www.banrep.gov.co/documentos/publicaciones/pdf/DTSER-43.pdf>.

WEAVER, R.W.; GRAHAM, P.H. 1994. *Legume nodule Symbionts*. En *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, R. W. WEAVER y Cols. (eds) Madison, WI: Soil Science Society of America. Nueva York.