

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (cp 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Capítulo 3. Aislamiento, identificación y conservación de rizobios

Andrea A. Sirio y Karina R. Ávalos Llano

La población mundial crece en una escala que pone en riesgo la producción de alimentos. Para lograr una mayor productividad alimentaria, el uso de fertilizantes químicos-sintéticos es una alternativa rápida pero no ecológica debido a su toxicidad al contaminar el ambiente, provocar efectos secundarios en la salud humana y modificar la fertilidad del suelo a largo plazo. Como ecoalternativa, el uso de fertilizantes orgánicos fue creciendo, pero sin alcanzar la efectividad de los fertilizantes químicos. En los últimos tiempos se estableció el uso de microorganismos conocidos como PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), que son autóctonos y benéficos, residen en las cercanías de las plantas utilizando metabolitos derivados de ellas, promueven el suministro adecuado de nutrientes a las plantas hospedantes y garantizan su adecuado desarrollo de crecimiento y regulación fisiológica (Van Elsas *et al.*, 2019; Verma, 2019).

La asociación planta-bacteria tiene una gran importancia práctica en la agricultura debido a que la disponibilidad de fuentes nitrogenadas suele ser un factor limitante para el crecimiento de los cultivos. Los rizobios son especies de alfa y betaproteobacterias que pueden crecer libremente en el suelo o pueden infectar leguminosas y establecer una relación simbiótica. La infección de rizobios en las raíces de leguminosas lleva a la formación de nódulos y, en ellos, las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico (N_2), por lo que aquellas leguminosas noduladas pueden crecer bien en suelos no fertilizados, deficientes en nitrógeno.

Hay una marcada especificidad entre las especies de leguminosas y los rizobios con los que establecen simbiosis. Una especie de rizobio particular es capaz de infectar ciertas especies de leguminosas, pero no otras. Un grupo de leguminosas relacionadas que

pueden ser infectadas por una especie particular de rizobios es llamada «grupo de inoculación cruzada».

Se ha visto que inoculando semillas con cultivos puros de rizobios el rendimiento de los cultivos se mejora, debido a que el suelo tiene con frecuencia una deficiencia de estas cepas de bacterias formadoras de nódulos (Park Talaro y Chess, 2012). Si las leguminosas son inoculadas con la cepa de rizobio adecuada, rica en leghemoglobina, fijadora de nitrógeno, desarrollan en sus raíces los nódulos (Madigan *et al.*, 2015; Paul, 2015; Tate, 2021). El proceso de recolección de nódulos, aislamiento e identificación debe obedecer los postulados de Koch (Hungria y Araujo, 1994).

Las bacterias de los nódulos de la raíz de las leguminosas son heterótrofas y capaces de utilizar una amplia variedad de hidratos de carbono. En general, los compuestos inorgánicos de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^-) son suficientes para su desarrollo, pero, según las cepas, pueden requerirse aminoácidos y/o vitaminas para obtener resultados óptimos. Los rizobios son aerobios y se desarrollan mejor a 25-30 °C y en un pH de 6-7. Comúnmente, se agregan elementos inorgánicos importantes aún a medios de cultivos complejos (Vincent, 1975).

El aislamiento de los rizobios a partir de nódulos o de microorganismos que puedan encontrarse en el suelo es una etapa muy importante para su posterior estudio. El advenimiento de las técnicas moleculares que permiten su identificación precisa es un gran logro, pero para poder llegar al mismo se debe realizar un correcto aislamiento, siguiendo los pasos adecuados para alcanzar un cultivo puro, factible de analizarse con técnicas moleculares.

3.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El aislamiento de los rizobios a partir de nódulos o de microorganismos, a través de técnicas moleculares que permiten su identificación precisa y un correcto aislamiento al seguir los pasos adecuados para alcanzar un cultivo puro, es factible de análisis. Los procedimientos aquí detallados son aquellos que pueden ser llevados a cabo en un laboratorio microbiológico de baja complejidad. La prueba en planta como procedimiento de autenticación de los rizobios, además, permite evaluar su capacidad de nodulación.

3.2. OBJETIVOS DE LA DETERMINACIÓN

El objetivo de la determinación permitirá conocer diferentes técnicas de aislamiento de rizobios a partir de muestras de suelo y/o nódulos de leguminosas, así como obtener cultivos puros, identificarlos con técnicas de microbiología básica y autentificarlos a través de pruebas en plantas. Por último, se podrá conocer cómo conservar los cultivos obtenidos utilizando diferentes técnicas.

3.3. EQUIPAMIENTOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Los equipos, materiales y reactivos necesarios para la toma de muestras son las siguientes, desagregadas en pasos.

1. Muestreo de suelo y plantas

- Bolsas plásticas
- Hilo
- Etiqueta
- Fibra permanente/birome
- Pala
- Alcohol 96°
- Encendedor

2. Conservación de nódulos

- Bolsas plásticas
- Colador
- Tubos con tapón o tapa a rosca
- Desecante
- Algodón
- Heladera

3. Acondicionamiento de los nódulos

- Alcohol 96°
- Sodio hipoclorito (50-60 g Cl/L)
- Hidrógeno peróxido (30 volúmenes)
- Agua destilada estéril
- Pinza estéril
- Solución fisiológica estéril
- Varillas de vidrio estéril
- Tips estériles
- Placas de Petri estériles o frascos pequeños
- Mechero o esterilizador de ansa

4. Procesamiento de los nódulos

- Solución fisiológica estéril
- Tips estériles
- Tubos Eppendorf
- Placas de Petri
- Ansa o espátula de Drigalsky
- Mechero o esterilizador de ansa
- Medio de cultivo agarizado

5. Aislamiento de los rizobios

- Placas de Petri
- Medio de cultivo agarizado
- Estufa de incubación
- Ansa
- Mechero o esterilizador de ansas

6. Identificación presuntiva de los rizobios aislados

- Medios de cultivos
- Ansa
- Estufa de incubación
- Kit de coloración (tinción de Gram)
- Portaobjetos
- Solución fisiológica
- Mechero

7. Autenticación del rizobio

- Sustrato estéril (perlita, vermiculita)
- Suelo
- Vasos
- Bandejas
- Agua destilada estéril
- Semillas a testear
- Medio agarizado para plantas
- Pinzas estériles
- Solución de Jensen

8. Conservación del cultivo puro

- Protector (glicerol)
- Medio de cultivo líquido
- Tubos Eppendorf
- Vórtex
- Micropipetas automáticas
- Tips estériles
- Varillas estériles

3.4. PROCEDIMIENTO

Los procedimientos que se explican aquí deberán seguirse de acuerdo al objetivo del trabajo, no necesariamente siguen una organización lineal. Debe preguntarse cuál es el objetivo que se quiere alcanzar, si se desea utilizar el suelo como inoculante de semillas o utilizarlo en maceta, si se desea aislar los microorganismos desde el suelo o a partir de nódulos de una planta o si se desea autenticar un cultivo a través de una prueba en planta.

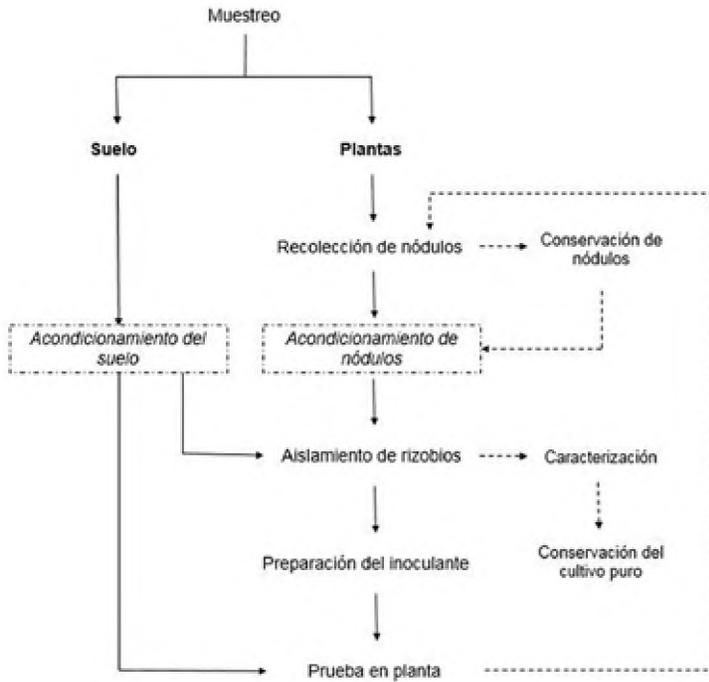


Figura N° 1. Esquema de procedimientos.

3.4.1. Muestreo de suelo

En el capítulo 1 se establecen las condiciones necesarias para obtener una muestra representativa de análisis, por lo que aquí destacaremos algunos puntos clave del mismo, basados en la ISO 10381-6:2009 (Margesin y Schinner, 2005).

Para el estudio de microorganismos en el suelo, se necesitan satisfacer ciertas condiciones: 100 g de suelo mínimo –de acuerdo con su uso, para usar en macetas, para aislar microorganismos desde esa muestra, para realizarse además otros análisis, etcétera–, debe ser homogéneo y representativo del área en estudio, entre otras. La profundidad con frecuencia es de 0-20 cm, donde se concentra la mayor parte del sistema radicular activo y la mayor actividad microbiana.

Se recomienda que los instrumentos de muestreo se desinfecten con alcohol 96° y sean flameados. Este procedimiento se debe repetir cuando se refiera a diferentes profundidades, a diferentes parcelas experimentales y a muestras para ser usadas como inoculantes.

Luego del muestreo, las bolsas plásticas (rotuladas) deben ser cerradas con un hilo (sin cierre total) y colocadas en la sombra. El transporte de las muestras debe ser en un recipiente refrigerado, en el mismo día en lo posible (Yates *et al.*, 2016).



Figura N° 2. Muestra de suelo con raíces de un cultivo de *Vicia sp.*

Si el suelo será utilizado como inoculante, se recomienda que esto ocurra dentro de las 48 h después de muestreado –sin necesidad de refrigerar en ese caso–, de manera de minimizar las alteraciones en la viabilidad de los rizobios. Las muestras se pueden conservar en la heladera hasta 15 días luego de obtenidas, pero el recuento se deberá hacer antes de los 8 días desde la colecta.

Se recomienda, además, tamizar en una malla no menor a 4 mm. Se deben tener los mismos cuidados con respecto a la contaminación, como los considerados en los instrumentos utilizados en la toma de muestra. El valor de la humedad, de 105-110 °C, será necesaria para relacionarla con el recuento de rizobios en el suelo.

En este caso, se pueden sembrar las semillas de la leguminosa (estériles) en cuestión en el suelo muestreado o se inoculan muestras de suelo en suspensión con agua estéril en macetas o tubos con soporte inerte, así se espera la aparición de los nódulos en el tiempo correspondiente y se procede como se explica a continuación en el apartado de recolección de nódulos (Hungria y Araujo, 1994).

3.4.2. Recolección de nódulos

Los nódulos de las raíces de las leguminosas varían en su forma (esféricos, alargados o ramificados) y en su tamaño (de 0,5 a 50 mm de diámetro), pero siempre se destacan fácilmente de las raíces. El color interno de un nódulo vivo y activo varía de rojo claro a oscuro y su consistencia es firme y, al abrirlo, sus tejidos liberan una savia de color rojo. Los nódulos muertos tienen consistencia esponjosa y coloración interna oscura o negra. Los nódulos vivos que tienen una coloración interna verde o blanca son inactivos. Los nódulos de coloración roja/rosada no siempre son activos, pero tienen mayor probabilidad de serlo (Centro Internacional de Agricultura Tropical [Ciat], 1988; Drew *et al.*, 2012).

En la parcela experimental. Una vez identificada y seleccionada la planta, se debe demarcar un círculo alrededor de la misma (correspondiente al sistema radicular). En el caso de leguminosas herbáceas, un círculo de 15 cm (aproximadamente) es suficiente, pero en el caso de arbóreas, pueden ser necesarios dos círculos (uno cercano a la raíz principal y otro más distante, para las raíces secundarias). Para las leguminosas herbáceas, cavar a una profundidad de unos 30 cm. En el caso de arbóreas, se pueden encontrar nódulos a mayor profundidad. El suelo debe removerse con cuidado para no dañar el sistema radicular, nunca debe halarse la planta porque dañaría los nódulos. Colocar la planta o las raíces en una bolsa plástica, siguiendo las mismas indicaciones que para la muestra de suelo (Ciat, 1988; Hungria y Araujo, 1994).



Figura N° 3. Muestra de raíces de cultivo de *Vicia sp.*

En el laboratorio (prueba en planta). Se «desarma» el ensayo, con cuidado de no perder nódulos ni dañar el sistema radicular. Revisar nódulos en la raíz principal y raíces secundarias.

3.4.3. Conservación de nódulos

Para obtener una buena muestra de nódulos, se seleccionan de 10 a 20 nódulos vivos e intactos de la misma planta y se colocan completos, adheridos a la raíz, lo que facilita su manejo.

La localización de los nódulos en el sistema radical depende de la especie hospedante y de las condiciones ambientales. En ciertas condiciones, los nódulos se hallan muy alejados de la corona; algunos se encuentran a considerable profundidad, mientras que otros se localizan, en su mayor parte, en las raíces laterales. Sin embargo, en la mayoría de las leguminosas de uso agronómico, los nódulos se encuentran cerca de la raíz principal y se los puede obtener fácilmente.

Cuando el material (raíces y/o nódulos) se obtuvo recientemente, lavarlo cuidadosamente, en lo posible sobre un colador, para evitar la pérdida de nódulos pequeños. Los nódulos frescos pueden ser guardados hasta 2 días en la heladera, no en el freezer (Somasegaran y Hoben, 1994).

Si los nódulos recolectados no se van a analizar inmediatamente, pueden colocarse en un tubo (con tapa/tapón) con material desecante en el fondo (cloruro de calcio anhidro o silica gel). El material desecante es cubierto con algodón y sobre él se depositan los nódulos. El desecante permite remover la humedad de los nódulos rápidamente, de manera de evitar el crecimiento de otros microorganismos. Se recomienda que no pasen más de 12 meses (Ciat, 1988).

Para reacondicionarlos deben ser rehidratados. Si estuvieron por un corto período de tiempo desecados, hidratarlos en un frasco con agua por 1 o 2 h a temperatura ambiente es suficiente; si el tiempo fue mayor, hidratarlos en un frasco con agua por la noche, dejando el frasco en la heladera (Vincent, 1975; Hungría y Araujo, 1994).

3.4.4. Acondicionamiento de los nódulos

Para el procesamiento de los nódulos, se pueden utilizar placas de Petri estériles, tubos de poca profundidad o frascos pequeños que permitan introducir las pinzas estériles si fuera necesario. Luego, seleccionar los nódulos que se utilizarán para el aislamiento posterior de microorganismos, puesto que se los puede separar por raíz principal/secundaria o hacer un *pool* de nódulos.

Hay varias combinaciones factibles de usar para lograr el acondicionamiento de los nódulos. En este procedimiento se utiliza



Figura N° 4. Muestra de raíces de cultivo de Caupí.



Figura N° 5. Muestra de raíces de cultivo de *Glycine max* L.



Figura N° 6. Fotografía de nódulos de *Prosopis* sp. visualizados en una lupa binocular (aumento 50x).

una combinación de alcohol 96°, hipoclorito de sodio y agua estéril (Somasegaran y Hoben, 1994):

1. Sumergir los nódulos en alcohol 96° por 15 o 30 segundos y eliminar la raíz para evitar el aislamiento de endófitos. La función del alcohol no es desinfectar, sino romper la tensión superficial y remover burbujas de aire del tejido.
2. Enjuagar con agua destilada estéril 5 veces.
3. Agregar una solución de 3 o 5% de hipoclorito de sodio, debe ser la lavandina tradicional con una concentración de 50-60 g Cl.L⁻¹, dejarlos 5 minutos. También se puede utilizar agua oxigenada al 3% (30 volúmenes).
4. Lavar con abundante agua destilada estéril, por lo menos 5 veces. Siempre realizarlo de manera aséptica. Se puede hacer uso de pinzas estériles, trabajando cerca del mechero o en una cabina de seguridad biológica. Las pinzas deberán flamearse entre cada paso.

3.4.5. Procesamiento de los nódulos

Los nódulos acondicionados pueden introducirse en tubos Eppendorf (estériles) –o mayores– con unos microlitros de solución fisiológica estéril o agua destilada estéril. Con ayuda de varillas de vidrio estériles, palillos de madera estériles o tips de micropipeta estériles machacar los nódulos. El macerado de los nódulos con la solución tendrá un aspecto lechoso oscuro.

3.4.6. Aislamiento de los rizobios

Hay muchos medios disponibles para el crecimiento de rizobios, la selección del mismo puede hacerse según el objetivo del trabajo y a qué reactivos se tiene acceso.

Los medios más utilizados por sus ingredientes accesibles son el medio TY (Tripton extracto de levadura) y el medio EMA (Extracto de levadura manitol agar) o YMA (Yeast Mannitol Agar). Según la bibliografía consultada, la composición puede variar en algunos ingredientes (Vincent, 1975; Brenner, Krieg y Staley, 2005; Atlas, 2010; Albanesi *et al.*, 2013).

Con una composición semejante al medio extracto de levadura manitol agar, se encuentra el Medio Rhizobium 1 (Atlas, 2010), que es útil para el cultivo de miembros de *Rhizobiaceae*. Para preparar una solución de 1000 ml, lleva las mismas cantidades de todos los reactivos, excepto que no contiene ni manitol ni Rojo Congo y se le agregan 0,002 g de hierro cloruro (III) hexahidratado (FeCl₃.6H₂O), ajustando el pH a 7,2 ± 0,2 a 25 °C.

Tabla N° 1. Medio extracto de levadura manitol agar

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 ml
Fosfato dipotásico (K_2PO_4H)	0,5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0,1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,4 g
Agar	15 g
Solución acuosa de Rojo Congo	10 ml

Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ a 25 °C. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Deben evitarse los calentamientos repetidos, por lo que se recomienda preparar la cantidad de medio necesaria. Como guía: para una placa de Petri de 90 mm de diámetro, se agregan 15 ml aproximadamente.

Observaciones: 1. Agregar 4 g de $CaCO_3$ en exceso a medios para mantener el cepario y aquellos donde la neutralización de la acidez puede ser importante (Yeast Mannitol Agar modified); 2. Solución de Rojo Congo: 0,5 g en 200 ml de agua destilada; 3. Para la preparación del medio YMA líquido, se agregan los mismos ingredientes, excepto el agar y el Rojo Congo; 4. Si desea demostrar una variación del pH en el medio, se agregan 5 ml de una solución alcohólica de Azul de bromotimol al 0,5% por litro.

Fuente: Atlas (2010) y Vincent (1975).

Tabla N° 2. Medio TY

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 ml
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de calcio 2-hidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,9 g
Triptona	5 g
Agar	15 g

Fuente: Atlas (2010).

Para la siembra del macerado, se deben tomar unos microlitros con ayuda de una micropipeta (con tips estériles), sembrar en las placas de Petri conteniendo el medio de cultivo correspondiente (medio YMA, medio TY, etc.) y estriar con la ayuda de un ansa estéril o ayudarse con una espátula de Drigalsky estéril para sembrar toda la superficie de la placa de Petri (Ciat, 1988). Puede tomarse una ansada directamente de la solución y sembrarse de igual manera. Es recomendable sembrar 2 a 3 placas.

La temperatura adecuada para su crecimiento es de 25 a 30 °C. El crecimiento se debe verificar diariamente. Los rizobios de crecimiento rápido suelen crecer entre los 3 y 5 días, mientras que los de crecimiento lento suelen tardar entre 7 y 10 en crecer (Vincent, 1975; Hungría y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005).

Puede ocurrir que, si los nódulos estuvieron mucho tiempo desecados o el repique provenga de un cultivo «viejo», el crecimiento sea más lento que lo normal.

Para el aislamiento de rizobios desde el suelo, se recomienda sembrar semillas esterilizadas superficialmente y observar luego la formación de nódulos en las plantas emergentes. Otra opción es agregar suspensiones de las muestras de suelo a plántulas provenientes de semillas esterilizadas superficialmente, en condiciones bacteriológicamente controladas. Solo en casos excepcionales habrá rizobios en cantidad suficiente para aislarlos con cierta confianza (Vincent, 1975; Organización de las Naciones Unidas [FAO], 1995).

3.4.7. Identificación presuntiva de los rizobios aislados

Para facilitar su identificación, el medio de cultivo suele contener Rojo Congo o Azul de bromotimol en su composición. El Rojo Congo permite identificar posibles contaminantes presentes, ya que estos absorben el color rojo, mientras que los rizobios no lo absorben o lo hacen muy poco, especialmente si son repiques recientes. Cultivos «viejos» o algunos cultivos pertenecientes a algunos rizobios tropicales de crecimiento lento, sin embargo, pueden llegar a absorberlo (Vincent, 1975; Hungría y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005). El Azul de bromotimol a pH 6,8 deja el medio de un color verdoso y sirve para mostrar variación en el pH del medio: si las bacterias acidifican el medio, este se vuelve de color amarillo; si las bacterias lo alcalinizan, se volverá de color azul (Vincent, 1975).

Se deben preparar frotis una vez aisladas las colonias de cultivos puros. Con la tinción de Gram deberán observarse bacilos gram negativos y, según el género, estos bacilos podrán ser mayores o menores hasta asemejarse a formas cocobacilares.

3.4.7.1. Tiempo de crecimiento y producción de ácidos/álcalis
El género *Rhizobium* (por ejemplo, *R. leguminosarum* *bv.* *phaseoli*) tiene crecimiento rápido, con un tiempo de generación de 1,5 a 5,0 h, mientras que el género *Bradyrhizobium* (por ejemplo, *B. japonicum*) tiene crecimiento lento, con un tiempo de generación de 9,0 a 18 h (Hungría y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005; Frioni, 2011).

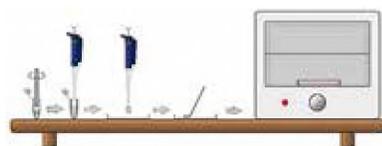


Figura N° 7. Esquema del macerado de nódulos extraídos en un tubo Eppendorf y siembra en una placa de Petri.

En medios de sales minerales con manitol u otros carbohidratos, el género *Rhizobium* produce una reacción ácida, mientras que el género *Bradyrhizobium* produce una reacción alcalina en esas condiciones.

3.4.7.2. Morfología colonial

El género *Rhizobium* forma colonias usualmente blancas o beige, circulares, convexas y semitranslúcidas u opacas, elevadas y mucilaginosas, usualmente de 2 a 4 mm de diámetro, a los 3 o 5 días de incubación en medio YMA agar. El crecimiento en medios con presencia de carbohidratos usualmente viene acompañado de una abundante cantidad de polisacárido extracelular. En medios líquidos aireados, desarrolla una pronunciada turbidez luego de 2 o 3 días de incubación.

Las colonias características del género *Bradyrhizobium* son circulares, opacas, raramente translúcidas, blanquecinas, convexas y suelen presentar una textura granular, sin exceder el mm de diámetro, apareciendo en no menos de 5 o 6 días. En medios líquidos aireados se desarrolla luego de 3 o 4 días de incubación (Hungria y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005).

Debido a esta diferencia en los tiempos de crecimiento, es que se deben controlar a diario las placas de Petri. Las colonias de rizobios de crecimiento rápido pueden llegar a enmascarar aquellas colonias de crecimiento lento que, además, son más pequeñas en tamaño. Esperar el tiempo recomendado antes de descartar las placas, ya que si el aislamiento contiene solo colonias de crecimiento lento, estas tardan en poder visualizarse y tienen un tamaño que no suele exceder el milímetro de diámetro.

3.4.7.3. Tinción diferencial

La tinción de Gram es uno de los pasos iniciales para iniciar la identificación de los rizobios y es un método simple que permite distinguir dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas. Esta técnica detecta diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias, visualizándose en el frotis como coloración violeta (grampositivas) y rosa (gramnegativas), de acuerdo con Hungria y Araujo (1994), Cappuccino y Welsh (2018), Gamazo, Sánchez y Camacho (2013).

Utilizar portaobjetos limpios y secos para la tinción. Siguiendo los pasos a continuación:



Figura N° 8. Medio con Azul de bromotimol, reacción ácida en tubos y en placas de Petri.



Figura N° 9. Medio con Azul de bromotimol, reacción alcalina en tubos y en placas de Petri.



Figura N° 10. Medio con Azul de bromotimol, reacción ácida. Vista superficial del aislamiento en una placa de Petri.

1. Colocar una gota de solución fisiológica estéril o agua estéril y una ansada del cultivo o muestra a evaluar.
2. Homogeneizar y extenderlo a lo largo del portaobjetos, de manera que no quede una película gruesa. Dejar secar al aire.
3. Pasar durante unos segundos el frotis sobre la llama de un mechero, de 4 a 5 veces, para fijar la muestra. Dejar enfriar.
4. Colocar cristal violeta cubriendo la muestra y dejar 1 minuto. Enjuagar con agua corriente.
5. Colocar Lugol y dejar 1 minuto. Enjuagar con agua corriente.
6. El próximo paso es importante hacerlo de manera rápida para evitar que se lave el preparado. Colocar unas gotas de decolorante alcohol-acetona o alcohol 96° durante 5 segundos y enjuagar rápidamente con agua corriente.
7. Cubrir la muestra con safranina y dejar 45 segundos. Enjuagar con agua corriente y dejar secar.

Al observar al microscopio, se debe comenzar con la platina alta, con el menor aumento (10x) e ir bajando la platina (con el tornillo macrométrico) hasta enfocar la muestra con ayuda del tornillo micrométrico. Luego, pasar al aumento 40x, para posteriormente agregar aceite de inmersión para pasar al aumento 100x y anotar las características del preparado, después de recorrer varios campos.

Recuerde que una vez que alcanzó el mayor aumento, es necesario el uso del aceite de inmersión. Cuando se encuentra en los aumentos 10x y 40x, puede pasar de uno al otro sin problema, pero cuando llega al aumento 100x, como se agrega el aceite de inmersión, no se puede volver a los aumentos 10x ni 40x. Tenga presente que las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son bacilos gramnegativos de 0,5-0,9 μm x 1,2-3,0 μm (Brenner, Krieg y Staley, 2005).

3.4.8. Conservación del cultivo puro

Según Vincent (1975), si bien la multiplicación y en consecuencia el riesgo de variaciones puede atenuarse mediante la conservación a bajas temperaturas, los cultivos en agar suelen ser propensos a ser genéticamente inestables. Es común observar dos o más formas en cultivos que se mantuvieron de esa forma –a veces en pocos meses– y también puede perderse muy rápidamente la capacidad simbiótica (virulencia o efectividad).

3.4.8.1. Tubos-agar inclinado

Estos cultivos son los más convenientes por su simplicidad, puesto que no presentan dificultades para la conservación de muchas

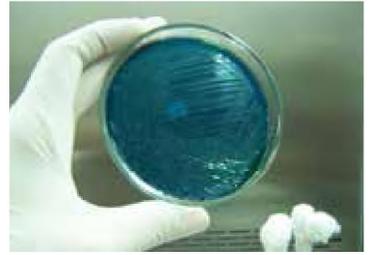


Figura N° 11. Medio con Azul de bromotimol, reacción alcalina. Vista superficial del aislamiento en una placa de Petri.



Figura N° 12. Medio YMA. Vista superficial del aislamiento en una placa de Petri.



Figura N° 13. Medio YMA. Fotografía de las colonias aisladas en superficie, visualizadas en una lupa binocular (aumento 50x).

cepas, no ocupan mucho espacio y utilizan poco medio de cultivo. A 15 °C pueden mantenerse durante 6 meses y a bajas temperaturas (2 °C), pueden conservarse hasta 2 años en condiciones aceptables. La desecación constituye la amenaza más seria contra la viabilidad, pero puede reducirse su efecto utilizando tubos con tapa a rosca o tubos de ensayo con una capa aislante de parafina líquida estéril. Los tubos con tapón de algodón pueden sufrir más problemas relacionados a la condensación de la humedad y al desarrollo de mohos.

3.4.8.2. Placas de Petri

Esta forma de conservación se suele ocupar cuando los cultivos serán utilizados en un corto período de tiempo. De la misma manera que con los tubos de agar inclinado, los problemas de este tipo de conservación están relacionados a la condensación de la humedad, a la desecación del medio de cultivo y al desarrollo de mohos, en tiempos mayores a los aconsejados.

3.4.8.3. Criopreservación

El empleo de bajas temperaturas para mantener células es conocido hace tiempo y su fundamento es la inhibición de la actividad metabólica celular. La supervivencia de las células conservadas por este método depende de las condiciones empleadas: temperatura, protectores usados, método de congelación/descongelación posterior, entre otros.

El protector más utilizado es el glicerol en distintas concentraciones (de 20 a 50% de glicerol) y en distintas relaciones con respecto al medio líquido que contiene el microorganismo a conservar (50:50, 30:70 glicerol/medio líquido). Hay varios medios líquidos que se pueden utilizar, siendo el medio YMA líquido o el medio TY líquido los más utilizados. El microorganismo a conservar debe encontrarse en la fase logarítmica de la curva de crecimiento microbiano.

Para la conservación de los microorganismos, se debe agregar en tubos Eppendorf estériles hasta 1 ml de la mezcla del medio líquido y protector (por ejemplo, 700 µl de medio líquido con el microorganismo a conservar y 300 µl del glicerol). Otra forma es agregar el medio líquido (sin el microorganismo) y el glicerol y, con ayuda de una varilla estéril, tomar varias colonias de una placa de Petri con el aislamiento a conservar. En este último caso, se debe recordar que el aislamiento debe ser homogéneo, cuando se ha verificado que no hay contaminación y que las colonias provienen de un mismo clon (Ciat, 1988; Hungría y Araujo, 1994).

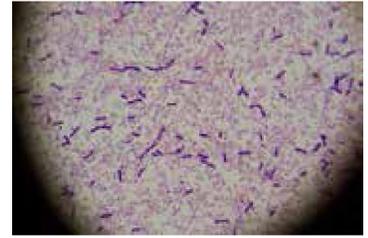


Figura N° 14. Frotis-tinción Gram. Se observan bacilos grampositivos contaminando el preparado de bacilos gramnegativos (aumento 1000x).

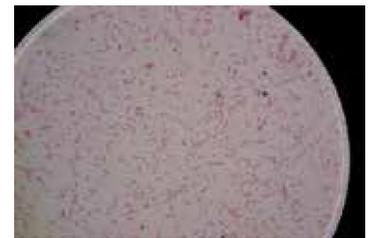


Figura N° 15. Frotis-tinción Gram. Se observan bacilos finos alargados, gramnegativos (aumento 1000x).



Figura N° 16. Frotis-tinción Gram. Se observan bacilos cortos, gramnegativos (aumento 1000x).

3.4.9. Preparación del inoculante

La inoculación es la práctica que implica aplicar microorganismos a los sistemas agrícolas o químicos para producir transformaciones deseables como la fijación mejorada de nitrógeno, la adquisición aumentada del fósforo, una degradación más rápida o una mayor resistencia a las enfermedades. Existen tres factores que garantizan una eficaz inoculación: el inóculo debe ser viable, debe haber suficiente inóculo para producir el cambio deseado y debe garantizarse la capacidad de los microorganismos contenidos en el inóculo para multiplicarse y sobrevivir. En ensayos a campo, las poblaciones extrañas –incluyendo el inóculo– suelen descender debido al antagonismo con las poblaciones nativas (Coyne, 2000).



Figura N° 17. Tubo inclinado con medio con Azul de bromotimol, mostrando una reacción ácida.

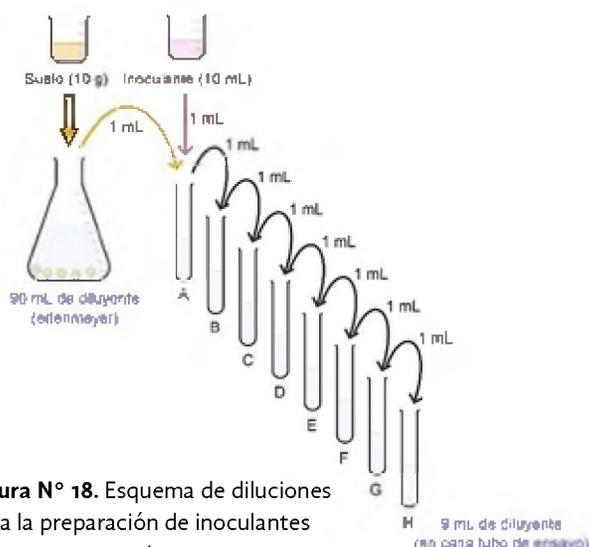


Figura N° 18. Esquema de diluciones para la preparación de inoculantes en ensayos posteriores.

Las diluciones se preparan según el esquema de la Figura N° 16, pudiendo ser la muestra inicial sólida o líquida. En el caso de muestras líquidas, la primera dilución (10^{-1}) será aquella donde se tenga 1 ml de muestra en 9 ml del diluyente, en un tubo de ensayo. Las diluciones serían: tubo A, corresponde a una dilución $1:10$ (10^{-1}); tubo B, corresponde una dilución $1:100$ (10^{-2}); tubo C, (10^{-3}); tubo D, (10^{-4}), y así sucesivamente. En el caso de muestras sólidas, la primera dilución (10^{-1}) será aquella donde se tengan 10 g de muestra en 90 ml del diluyente, en un Erlenmeyer, y las siguientes diluciones se realizan en tubos de ensayo. En este caso, el tubo A tendrá una dilución $1:100$ (10^{-2}), ya que previamente la muestra se diluyó en el Erlenmeyer; el tubo B, corresponde a una dilución $1:1000$ (10^{-3}), y así sucesivamente.

El número de tubos a utilizar (diluciones) variará según el material a evaluar (densidad de rizobios), por lo que se recomienda para inoculantes comerciales, 10 tubos; para suelos con una densidad elevada, 7-8 tubos, y para suelos con baja densidad, 4-5 tubos.

Al Erlenmeyer se le pueden agregar perlas de vidrio estériles –o un dispersante– para facilitar la dispersión de los rizobios. La solución diluyente puede ser una solución fisiológica estéril o agua destilada estéril, entre otras. Los tips a utilizar en el procedimiento deben ser estériles. En lo posible, se recomienda no tardar más de 60 minutos en la preparación de las diluciones para mantener la viabilidad de las células.

La solución en el Erlenmeyer se debe agitar por 30 minutos a 170-200 ciclos por segundo. Luego se inicia el agregado de 1 ml de la solución (del Erlenmeyer) al primer tubo. Se agita en vórtex. Posteriormente, se toma una alícuota de 1 ml de este tubo y se lleva al siguiente. Se repite esta operación hasta completar la serie de tubos recomendados o las deseadas por el operador (Hungria y Araujo, 1994; Yates *et al.*, 2016).

Se puede verificar el recuento de microorganismos, si se desconoce el número aproximado, sembrando una alícuota de cada dilución en placas de Petri, con algunos de los medios de cultivo anteriormente citados para rizobios, de manera de saber qué concentración de rizobios posee la muestra (suelo, inoculante). El resultado final se expresa en Unidad Formadora de Colonia (UFC) por g de suelo seco o ml de inoculante analizado, sin olvidar la dilución en el cálculo (Tate, 2021). Este resultado nos dará un recuento de células viables. Se puede medir la densidad óptica (método turbidimétrico) utilizando un nefelómetro o un espectrofotómetro; si utilizo esta metodología, obtendré el valor de células totales –viables y no– utilizando una longitud de onda de 625 nm. En esa metodología se utilizan diluciones de una mezcla de Bario cloruro 1,175% con ácido sulfúrico 1% para la obtención de la curva patrón (Tortora, Funke y Case, 2019).

La inoculación se realiza al estar la plántula establecida, 1 o 2 días de la siembra aproximadamente. Se debe transferir la alícuota de la dilución deseada a los vasitos con las plántulas. Se recomienda que el número de repeticiones por dilución no sea inferior a 3. Transferir una alícuota de la dilución a ensayar en la región radicular, recomendándose 0,1 ml para semillas pequeñas y 1 ml para semillas grandes (Hungria y Araujo, 1994).

3.4.10. Autenticación del rizobio: prueba en planta

Para comprobar que el aislamiento es capaz de formar nódulos en la leguminosa, el cultivo puro debe inocularse nuevamente en el hospedero.

Este paso puede verse afectado en el caso de ciertas plantas de las que no se disponen semillas o cuyo ciclo de crecimiento es muy largo. En esos casos a veces son utilizadas otras especies forestales para testear su capacidad de nodulación, ya que muchas de ellas son de nodulación promiscua.

Un indicador de eficiencia de tales bacterias viene dado por el color rojizo (interno) de los nódulos, debido a la presencia de leghemoglobina. Esta coloración se hace evidente en los estadios tempranos de la fijación del nitrógeno, acentuándose en la época del florecimiento (Hungria y Araujo, 1994).

No se debe incorporar a una colección como *Rhizobium* un nuevo aislamiento antes de ser autenticado, de igual manera se debe actuar al usar un cultivo que ha estado conservado por un largo tiempo (Vincent, 1975).

Las condiciones de crecimiento de las plantas son importantes para el buen desarrollo del ensayo. La siembra se realiza en vasos a capacidad de campo, por lo que se debe evitar el riego hasta la emergencia, para evitar que se pudra la semilla. A las bandejas de plantas inoculadas agregar, por bandeja, un testigo positivo y uno negativo.

Hay varios procedimientos disponibles para la desinfección de las semillas. Lo importante es retirar superficialmente la mayoría de los microorganismos—incluso rizobios—sin disminuir o afectar su poder germinativo (Hungria y Araujo, 1994). La semilla de la especie a probar debe ser una semilla nueva, cosechada en el ciclo agrícola del año de empleo, sin ningún tipo de tratamiento, ser de tamaño uniforme y tener el máximo de poder germinativo.

Fuente de luz. Pueden utilizarse lámparas de sodio de 400 W o lámparas led adecuadas.

Altura. Un m al borde de los vasos.

Luminosidad. Más de 8000 lux desde la fuente hasta las plantas.

Fotoperíodo. Por 16/8 (soja, poroto, maní, caupí), 14/10 (alfalfa, arveja, garbanzo y tréboles), en otras especies se debe utilizar el fotoperíodo teórico correspondiente.

Temperaturas. Máxima de 30 °C (para especies primavero-estival, tipo soja) y 25 °C (para especies otoño-invernal, tipo alfalfa); mínima diurna de 25 °C (tipo soja) y 20 °C (tipo alfalfa); mínima nocturna de 20 °C (tipo soja) y 15-20 °C (tipo alfalfa).

Humedad relativa. Mínima del 65%.

Riego. Con agua destilada (pH 7, no menor a 6), en caso de necesidad, antes de la emergencia, hasta 10 ml por maceta, manteniendo una base de 1 cm con agua destilada y el estrato superior del sustrato húmedo. Plantas con más de 15 días de crecimiento,regar

1 vez a la semana con solución de Jensen diluida 1:4 (Albanesi *et al.*, 2013).

Tabla N° 3. Solución de reserva micronutrientes-stock

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 mL
H ₃ BO ₃	0,31 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 g
KI	0,041 g
CaCl ₂	0,001 g

Fuente: Albanesi *et al.* (2013) y Ciat (1988).

Tabla N° 4. Solución de Jensen

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 ml
CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Solución stock	5 ml

Fuente: Albanesi *et al.* (2013) y Ciat (1988).

3.4.10.1. Prueba en planta en sustrato estéril

Los sustratos utilizados para crecimiento de plantas deben tener ciertas características: presentar granulometría uniforme, estabilidad química y no poseer elementos fitotóxicos, estabilidad luego de la esterilización, aireación adecuada, bajo costo, buena retención de humedad y adecuada capacidad de tampón. Los más utilizados son la vermiculita y la perlita, pero también se puede utilizar arena gruesa, tierra y turba estéril.

La vermiculita es de reacción neutra, con buenas propiedades de amortiguamiento químico e insoluble en agua, mientras que la perlita no tiene capacidad de amortiguamiento químico ni de intercambio químico y no contiene nutrientes minerales. Se puede utilizar una mezcla de ambos sustratos para las pruebas en planta.



Figura N° 18. Prueba en planta (*Vicia sp.*), utilizando un sustrato compuesto por perlita y vermiculita.



Figura N° 20. Prueba en planta (*Caupi*), utilizando un sustrato compuesto por perlita y vermiculita.

Para su preparación, primero la vermiculita, tamizarla para eliminar el polvo y esterilizarla en autoclave (121 °C por 20 o 60 minutos); segundo la perlita, es un producto estéril, pero se puede esterilizar en estufa (Albanesi *et al.*, 2013).

3.4.10.2. Prueba en planta en medio de Jensen

Para el medio agarizado semisólido, se agrega a la solución de Jensen (Tabla N° 4) y 8 o 10 g de agar.L⁻¹ de medio.

Al preparar los tubos para la prueba en planta, se agrega un cuarto de volumen cubierto con este medio nutritivo agarizado. Se colocan tapones de algodón para permitir la difusión del oxígeno. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e inclinar levemente (Albanesi *et al.*, 2013).

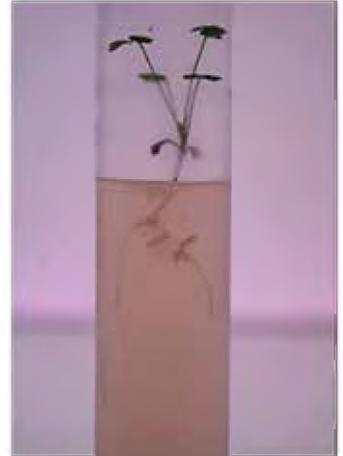


Figura N° 21. Prueba en planta (alfalfa), utilizando medio de Jensen.

En resumen. El aislamiento de rizobios a partir de nódulos o microorganismos debe ser preciso y correcto como etapa fundamental para su posterior estudio con técnicas moleculares. Como en todo análisis, la toma de muestra es una etapa fundamental para lograr el éxito del mismo. Para lograr la autenticación del rizobio, se deben cumplir los postulados de Koch. Con el advenimiento de las técnicas moleculares, la identificación de estos microorganismos se ha visto favorecida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANESI, A.S., Benitende, S., Cassán, F. y Peticari, A. (2013). *Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
- ATLAS, R.M. (2010). *Handbook of microbiological media* (4a ed.) EE.UU.: Ed. ASM Press, CRC Press.
- BRENNER, D.J., Krieg, N.R. y Staley, J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. The Proteobacteria (2a ed.) Nueva York: Ed. Springer.
- CAPPUCCINO, J.G. y Welsh, C. (2018). *Microbiology – A laboratory manual* (11a ed.) EE.UU.: Ed. Pearson.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT], Sección de Microbiología de suelos del Programa de Pastos Tropicales, Sección de Microbiología de suelos del Programa de Frijol y Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno (comps.) (1988). *Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de Métodos de evaluación, selección y manejo agronómico*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- COYNE, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. España: Ed. Paraninfo.
- DREW, E., Herridge, D., Ballard, R., O'Hara, G., Deaker, R., Denton, M., Yates, R., Gemell, G., Hartley, E., Phillips, L., Seymour, N., Howieson, J. y Ballard, N. (2012). *Inoculating legumes: a practical guide*. EE.UU.: Ed. Grains Research and Development Corporation.
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología básica, ambiental y agrícola* (1a ed.). Uruguay: Orientación Gráfica Editora.
- GAMAZO, C., Sánchez, S. y Camacho, A.I. (2013). *Microbiología basada en la experimentación*. España: Ed. Elsevier.
- HUNGRÍA, M. y Araujo, R.S. (1994). *Manual de métodos empregados em estudos de Microbiología agrícola*. Brasilia: Ed. Embrapa.
- ISO (2009). *Soil quality. Sampling. Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory* [ISO 10.381-6:2009]. Disponible en <https://www.iso.org/standard/43691.html>
- MADIGAN, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. y Stahl, D.A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14a ed.) EE.UU.: Ed. Pearson.
- MARGESIN, R. y Schinner, F. (2005). *Manual for soil analysis. Monitoring and assessing soil bioremediation*. EE.UU.: Ed. Springer.
- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación [FAO] (1995). *Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa*. Ed. FAO.
- PARK TALARO, K. y Chess, B. (2012). *Foundations in Microbiology* (8a ed.) EE.UU.: Ed. Mac Graw Hill.
- PAUL, E.A. (2015). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (4a ed.) EE.UU.: Ed. Academic Press.
- SOMASEGARAN, P. y Hoben, H.J. (1994). *Handbook for Rhizobia. Methods in legume-Rhizobium Technology*. EE.UU.: Ed. Springer-Verlag New York.
- TATE, R.L. (2021). *Soil Microbiology* (3a ed.) EE.UU.: Ed. Wiley Blackwell.
- TORTORA, G.J., Funke, B.R. y Case, C.L. (2019). *Microbiology – an introduction* (13a ed.) EE.UU.: Ed. Pearson.
- VAN ELSAS, J.D., Trevors, J.T., Soares Rosado, A. y Nannipieri, P. (2019). *Modern soil Microbiology* (3a ed.) EE.UU.: Ed. CRC Press.
- VERMA, D.K. (2019). *Microbiology for sustainable agriculture, soil health, and environmental protection*. EE.UU.: Ed. Apple Academic Press.
- VINCENT, J.M. (1975). *Manual práctico de Rizobiología*. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur.
- YATES, M.V., Nakatsu, C.H., Miller, R.V. y Pillai, S.D. (2016). *Manual of environmental microbiology* (4a ed.) EE.UU.: Ed. ASM Press.