

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*  
MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA Y LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

**LUCIA FERNANDA CABRERA DELGADO  
CLAUDIA SOFIA GUEVARA APRAEZ**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
PASTO  
2003**

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*  
MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA Y LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

**LUCIA FERNANDA CABRERA DELGADO  
CLAUDIA SOFIA GUEVARA APRAEZ**

**Trabajo de grado para optar el título de químico**

**Asesor: Ernesto Luque Turriago  
Magíster en Bioquímica**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
PASTO  
2003**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre del 2003

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son de responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1o del acuerdo No.324 del 11 de Octubre de 1.996, emanado del honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Peter Graham, por la donación de dos cepas de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*, del banco de germoplasma de la Universidad de Minnesota

Al Doctor Fernando Garzón, por su valiosa colaboración en el proceso de obtención de los anticuerpos específicos contra las cepas seleccionadas.

Al Doctor Hernando Criollo, director de la granja Experimental Botana, por la donación de los animales utilizados en el desarrollo de este trabajo.

Al doctor Fernando Campuzano, director de CORPOICA, por la donación de las semillas de frijol.

Y en general a todas las personas e instituciones que de una u otra manera colaboraron para el desarrollo satisfactorio de este trabajo.

## CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	16
1.OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
2. MARCO REFERENCIAL	19
2.1 FIJACIÓN DE NITROGENO	19
2.1.1 Sistema enzimático de la fijación de nitrógeno	19
2.2 CARACTERISTICAS GENERALES DE RHIZOBIUM	20
2.3 FIJACIÓN BIOLOGICA DE NITROGENO	21
2.3.1 Proceso de nodulación. Preinfección e Infección.	21
2.3.2 Genes de la nodulación	23
2.3.3 El factor nod	24
2.4 FUNCIONAMIENTO DEL NÓDULO	25
2.5 RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS	26
2.6 TECNICAS DE IDENTIFICACIÓN SEROLOGICAS	27
2.6.1 Prueba de titulo y aglutinación	27
2.6.2 Pruebas inmunoenzimáticas	27
3. MATERIALES Y METODOS	30
3.1 RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS 10 CEPAS NATIVAS	30

3.2 PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS AISLADOS RIZOBIALES	31
3.2.1 Determinación de la infectividad y efectividad de los aislados rizobiales	31
3.3 RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS	33
3.4 PRUEBA DE ELISA	36
3.4.1 Desarrollo de los antisueros específicos	36
3.4.2 Determinación del título por aglutinación	38
3.4.3 Desarrollo de la prueba de ELISA	40
3.4.4 Ensayo de las cepas marcadas frente a los antibióticos seleccionados y a la técnica de ELISA preparada	43
4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	44
4.1 ELECCIÓN DE LOS TRES AISLADOS DE MAYOR INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD	44
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS 301, 308 Y 310 POR RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	48
4.3 DESARROLLO DE LOS ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA LAS CEPAS 301, 308, Y 310.	50
4.4 PRUEBA DE TITULO POR AGLUTINACIÓN	50
4.5 PRUEBA DE ELISA	51
4.6 ENSAYO DE LOS AISLADOS LFBN 301, LFBN 308 Y LFBN 310 MARCADAS, FRENTE A LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS Y LA PRUEBA DE ELISA PREPARADA	54
5. CONCLUSIONES	57
6. PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFIA	59
APENDICES	62

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Procedencia de las cepas nativas	pág. 30
Cuadro 2. Concentraciones de los antígenos utilizadas para la prueba de ELISA	41
Cuadro 3. Promedios del número de nódulos encontrados por tratamiento.	45
Cuadro 4. Promedio del peso seco de la parte aérea de las plantas por tratamiento.	47
Cuadro 5. Patrones de resistencia/sensibilidad de las tres cepas.	49
Cuadro 6. Promedios del peso seco encontrado en plantas inoculadas	54
Cuadro 7. Peso de los nódulos utilizados para la prueba de ELISA, la absorbancia obtenida y la concentración bacteriana aproximada.	55

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema de la actividad de la nitrogenasa en una célula bacteriana.	20
Figura 2. Esquema que muestra como se diluye un caldo de cultivo	34
Figura 3. Fotografía de la siembra en cajas petri por el método de goteo.	35
Figura 4a. Fotografía de la inoculación intramuscular.	37
Figura 4b. Fotografía de la inoculación intraperitoneal.	37
Figura 5. Fotografía del sangrado por punción de la vena yugular.	38
Figura 6. Esquema para diluir una muestra de suero.	39
Figura 7. Fotografía del sangrado por punción cardiaca.	40
Figura 8. Esquema del desarrollo de la prueba de ELISA directa.	42
Figura 9. Fotografía de raíces noduladas de los tratamientos mas efectivos.	46
Figura 10. Fotografía de 4 plantas inoculadas con las cepas 301, 306, 308 y 310 (de derecha a izquierda, respectivamente) seguidas por el testigo con nitrógeno y finalmente el testigo absoluto.	48
Figura 11a. Fotografía que muestran el crecimiento de la cepa 308 en medio enriquecido con 10 µg de Str./ ml.	50
Figura 11b. Fotografía del crecimiento de la cepa 310 en medio que contenía spc. 5 µg / ml.	50
Figura 12. Reacción de titulo por aglutinación de los sueros obtenidos de los animales inmunizados con las cepas 301, 308 y 310.	51
Figura 13. Graficas de Absorbancia vs. Concentración de antígeno.	52

## LISTA DE APÉNDICES

	pág.
Apéndice A. Condiciones de asepsia recomendadas.	62
Apéndice B. Medios de cultivo y soluciones.	63
Apéndice C. Estimación de la concentración celular por densidad óptica.	67
Apéndice D. Análisis estadístico.	68
Apéndice E. Regresión lineal de los datos obtenidos en la prueba de ELISA.	74

## GLOSARIO

**SEROLOGÍA:** Estudio de las reacciones del suero con los antígenos externos al animal.

**SUERO:** La fuente más común de anticuerpos es el suero, el cual se obtiene dejando coagular una muestra de sangre y permitiendo que el coágulo se retraiga. El suero se guarda en congelación y se utiliza cuando se desee.

**ANTICUERPOS:** Son proteínas séricas especializadas, llamada antiglobulina, que pueden reaccionar específicamente con el antígeno que desencadenó su producción en un organismo animal.

**ANTÍGENO:** Se denomina así, a toda sustancia que, al penetrar en un organismo maduro inmunológicamente provoca una respuesta inmunitaria y reacciona específicamente con los productos de esta reacción.

**AGLUTINACIÓN:** Proceso mediante el cual los antígenos se enlazan a sus anticuerpos correspondientes.

**NÓDULO:** Estructura que contiene grupos de bacteroides rodeados por una membrana peribacteroidal.

**BACTEROIDES:** Transformación de las bacterias rizobiales, en unas formas ramificadas, hinchadas y deformes que son capaces de fijar nitrógeno.

**NODULACIÓN:** Proceso de formación de nódulos.

**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Técnica que se basa en la unión covalente de enzimas a las moléculas de anticuerpos.

**NITROGENASA:** Enzima que cataliza la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio.

**LEGHEMOGLOBINA:** Proteína específica que controla la concentración de oxígeno durante la fijación biológica del nitrógeno.

**ANTIBIÓTICO:** Sustancia que impide la multiplicación o desarrollo de microorganismos.

**EFFECTIVIDAD:** Habilidad que poseen las cepas rizobiales para fijar nitrógeno.

**INFECTIVIDAD:** Habilidad que poseen las cepas rizobiales para formar nódulos en las raíces de las leguminosas.

## RESUMEN

En este trabajo se caracterizaron las cepas LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310 de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* aisladas de los nódulos de plantas de frijol cultivadas en el municipio de El Peñol (Nariño). Las tres cepas se seleccionaron entre 10 cepas a las que se les determinó su infectividad y efectividad. Se escogieron éstas por ser las más infectivas y efectivas. La caracterización se realizó mediante la resistencia intrínseca a los antibióticos estreptomicina y espectinomicina a concentraciones de 10, 15 y 20 µg/ml y a 5, 10 y 15 µg/ml respectivamente. Las tres cepas presentaron patrones de resistencia/sensibilidad diferentes, lo que permitió identificarlas y diferenciarlas. También se estandarizó y desarrolló la prueba de ELISA directa, una técnica serológica en la que se utilizaron anticuerpos producidos en forma específica en cuyes (*Cavia porcellus*) inmunizados con las tres cepas rizobiales (antígenos). En este inmunoensayo enzimático se utilizó la fosfatasa alcalina para marcar los anticuerpos. Esta enzima reacciona con el p-nitrofenilfosfato, produciendo una coloración amarilla que permite identificar cualitativa y cuantitativamente la presencia del antígeno, ya que la intensidad del color es proporcional a la cantidad de antígeno fijado a la placa.

**Palabras Claves:** *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*, infectividad, efectividad, resistencia intrínseca a antibióticos, prueba de ELISA directa.

## ABSTRACT

Were characterized LFBN 301, LFBN 308 and LFBN 310 *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* strains which were from isolated of nodules of bean plants cultivated in El Peñol (Nariño). The three strains were selected from ten estrains and they were the most infectives and effectives. The intrinsic resistance of the three strains was assayed against two antibiotics, streptomycin and spectinomycin using concentrations of 10, 15 and 20 µg/ml and 5, 10 and 15 µg/ml respectively. The three strains exhibited different resistance and sensibility. This characteristic allowed to identify and two differentiate them. Additionally, the direct ELISA test, a serological technique was standardized and realized using antibody produced of specific manner by guinea pigs (*Cavia porcellus*) immunized with the three rhizobial strains (antigens). In this enzymatic immunoassay was used alcalin phosphatase to mark the antibody. This enzyme reacts with p-nitrophenil phosphate givin a yellow color. This color allows to identify qualitatively and quantitatively the presence of the antigen because the color intensity is proportional to the antigen fixed to the plate.

**Key words:** R. I., infectivity, effectivity, intrinsic resistance to antibiotics, direct ELISA test.

## INTRODUCCION

En el Departamento de Nariño, una región por excelencia agrícola, el cultivo de fríjol (*Phaseolus vulgaris*) ocupa un lugar destacado dentro de su economía. En el año 2001, según la secretaria de agricultura del Departamento, la producción de fríjol fue de 2904,29 toneladas, lo que ubica a Nariño como uno de los primeros productores a nivel nacional.

El fríjol es una leguminosa muy apetecida por su alto valor nutricional. Su contenido de proteínas, superior al 20%<sup>1</sup>, y de otros compuestos nitrogenados, depende de la disponibilidad de nitrógeno por parte de la planta. Este elemento es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, mediante el cual los microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso inerte en nitrógeno combinado. Para ello, las leguminosas se asocian simbióticamente con las bacterias formadoras de nódulos, del género *Rhizobium*. Como resultado de esta asociación las leguminosas reciben el nitrógeno fijado por la bacteria, mientras que ésta se beneficia con compuestos carbonados producto de la actividad fotosintética del hospedero<sup>2</sup>.

La fijación biológica de nitrógeno es una biotecnología respetuosa con el medio ambiente y representa una alternativa a la fertilización nitrogenada, evitando la contaminación de suelos y aguas por nitratos. Los aislados rizobiales se diferencian en características como la especificidad del huésped, la infectividad y la efectividad, pero son indistinguibles unas de otras bajo el microscopio. Para la aplicación comercial de esta tecnología es indispensable poder identificar y distinguir los aislados rizobiales eficientes de las no eficientes.

Una forma de lograrlo es mediante la prueba de ELISA, una técnica muy sensible, específica, versátil y ampliamente utilizada en diagnósticos serológicos para la detección de antígenos microbianos que afectan la salud de personas y animales<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Los Alimentos y Salud. Barcelona : Salvat, 1987. p 412

<sup>2</sup> VARGAS E. Aspectos microbiológicos de la fijación simbiótica de nitrógeno por el *rhizobium*. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá : Dirección Agrológica. 1969. p. 235-237.

<sup>3</sup> GUERRERO, J. y G. CALDERÓN. Modelos experimentales para el estudio de la relación hospedero-parásito. 1 ed. UNMSM-IVITA-American society for microbiology. p.56-59.

Adicionalmente, ELISA permite discriminar gran número de muestras y requiere de pequeñas cantidades de reactivos biológicos<sup>4</sup>. Por las ventajas que ofrece se adaptó esta técnica para caracterizar tres cepas rizobiales (LFBN 301, LFBN 308 Y LFBN 310), las cuales se inocularon en cuyes (*Cavia porcellus*) con el fin de generar en estos una respuesta inmune y así obtener anticuerpos somáticos específicos para cada cepa. ELISA se comparó con la resistencia a los antibióticos estreptomina y espectinomicina de los mismos aislados rizobiales. Esta técnica se fundamenta en la obtención de mutantes rizobiales que se presentan naturalmente a diferentes concentraciones de ciertos antibióticos. En este trabajo se utilizó para aislar mutantes espontáneos de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* resistentes a estreptomina y espectinomicina a concentraciones de 10, 15 y 20 µg/l y a 5, 10 y 15 µg/l respectivamente.

---

<sup>4</sup> SUMPTION, K.J. ELISA test for antibody detection in veterinary diagnosis: exercises and examples. Central for Tropical Vet. Med. University of Edingurg. p. 1-7. 1996.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* mediante la técnica de ELISA y la resistencia a antibióticos.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Recolectar 10 aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a partir de plantas noduladas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) que se encuentran en cultivos del noroccidente del Departamento de Nariño.
- Evaluar la infectividad y la efectividad de los 10 aislados rizobiales nativos, conjuntamente con dos cepas rizobiales introducidas procedentes del banco de germoplasma de la Universidad de Minnesota USA, utilizando como plantas hospederas frijol.
- Seleccionar, previo un análisis estadístico, los tres aislados rizobiales de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* de mayor infectividad y efectividad.
- Ensayar la viabilidad de los tres aislados rizobiales seleccionados frente a estreptomomicina, a concentraciones de 10, 15 y 20 µg/l y a espectinomomicina, a concentraciones de 5, 10 y 15 µg/l.
- Caracterizar, mediante la técnica de ELISA, los tres aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* de mayor infectividad y efectividad.
- Inocular plantas de frijol con los cepas marcadas y ensayarlas frente a los antibióticos seleccionados y a la técnica de ELISA preparada.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 FIJACION DE NITROGENO

Como se sabe, el nitrógeno molecular es tan inerte en reacciones químicas comunes que se le ha considerado casi como un gas noble. La alta energía del triple enlace, 945 KJ/mol, hace que la energía de activación sea demasiado grande, por esto, para obtener amoníaco por el proceso Haber común se requiere una presión de 20 Mpa y una temperatura de 500 °C, aun en presencia del mejor catalizador<sup>5</sup>. Además de obtener las enormes cantidades de compuestos nitrogenados necesarias para usos industriales y agrícolas a un costo tan bajo como sea posible, el químico se ha interesado en la posibilidad de investigar procesos que se lleven a cabo en condiciones menos difíciles; es el caso del sistema enzimático que promueve la fijación del dinitrógeno atmosférico. Dicho sistema despierta considerable interés por diversas razones: es un paso muy importante en el ciclo del nitrógeno y hace aprovechable dicho elemento para la nutrición de las plantas y resulta un proceso interesante dado que se lleva a cabo fácilmente en diversas bacterias, algas azul verdosas, levaduras y en asociaciones simbióticas entre bacterias y leguminosas<sup>6</sup> (Vargas, 1969).

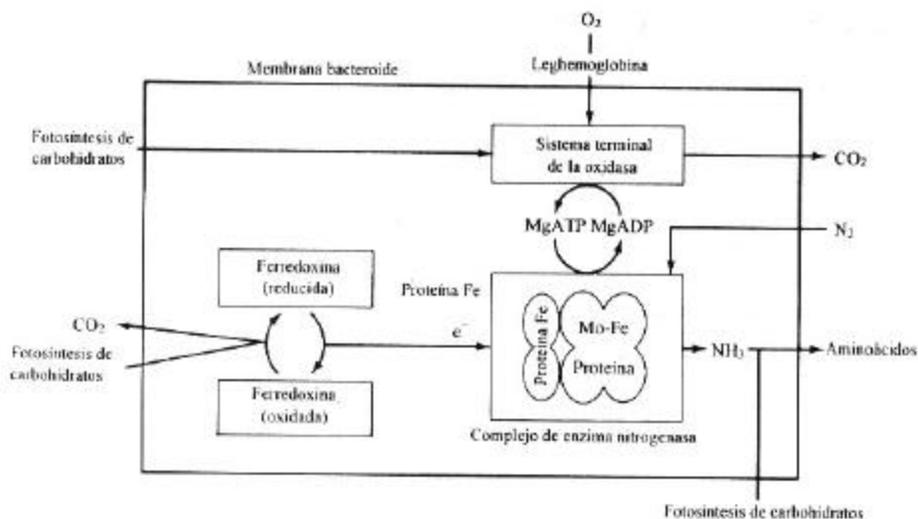
**2.1.1 Sistema enzimático de la fijación de nitrógeno.** El sistema enzimático conocido como nitrogenasa, cataliza la transferencia de electrones al nitrógeno molecular y su reducción a amonio. Está constituido por dos proteínas oligoméricas; la proteína mas grande, ferromolibdoproteína o componente I, es un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$  con un peso molecular de aproximadamente 220.000-240.000 daltons, que tiene dos átomos de molibdeno, 30 átomos de hierro y cerca de 30 iones sulfuro lábiles. La más pequeña, ferroproteína o componente II, tiene un peso molecular de 57.000 a 73.000 daltons y contiene un cúmulo de  $Fe_4S_4$ . Los cúmulos de hierro y azufre probablemente actúan como centros redox y parece que el sitio activo para el enlace del dinitrógeno incluye al átomo de molibdeno. En la figura 1 se presenta un diagrama esquemático para la producción de compuestos fijadores de nitrógeno, incluyendo el origen de las sustancias y de la energía, así como todas las reacciones que se efectúan. Se observa la presencia de la leghemoglobina. Esta es una molécula monomérica que enlaza de manera muy fuerte a cualquier molécula de oxígeno que se encuentre presente, y de ese modo, protege a la nitrogenasa, la cual no puede operar en presencia de oxígeno. Por otra parte, permite tener una reserva de oxígeno a fin de que se realice la respiración y se suministre energía para el proceso de fijación de nitrógeno.

---

<sup>5</sup> HUHEEY, J. KEITER, E. y KEITER, R. Química inorganica. Principios de estructura y reactividad. Oxford University Press. Harla. Cuarta edicion. Mexico 1997. Pp 911,913.

<sup>6</sup> VARGAS, Op cit. p. 235-237

**Figura 1. Esquema de la actividad de la nitrogenasa en una célula bacteriana**



Fuente: Huheey. Química inorgánica. Principios de estructura y reactividad.

## 2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE RHIZOBIUM

El género *Rhizobium* se caracteriza por su habilidad para producir nódulos en las raíces de las leguminosas y vivir en asociación simbiótica con estas plantas mientras fija el nitrógeno libre. Las bacterias de *Rhizobium* son bacilos gram (-), de tamaño medio, que habitan en el suelo y son capaces de cambiar a una forma bacteroidal en los tejidos nodulares<sup>7</sup>.

Los cepas de *Rhizobium* se pueden describir de acuerdo a su crecimiento en medios líquido y sólido, el tamaño, la forma, el color y la textura de sus colonias y la habilidad que tienen para alterar el pH del medio. Son características generalmente estables que se usan para definir los cepas o cepas. Somasegaran y Hoben<sup>8</sup> afirman que las colonias típicas que crecen sobre un medio estándar de Levadura-Manitol-Agar (LMA) tienen las siguientes características:

- **Forma:** Las colonias tienen una forma de lenteja típica, discreta y sobre la superficie del agar las colonias circulares varían de forma plana a convexa y cónica.

<sup>7</sup> VARGAS, Op cit. p. 235-237

<sup>8</sup> SOMASEGARAN, P. HOBEN, H. Methods in legume-rhizobium technology. University of Hawaii NifTAL project and MIRCEN. Department of Agronomy and Soil Science Hawaii. Institute of Tropical Agriculture and Human Resources College of Tropical Agriculture and Human Resources. s l : s n, s f. p 412

- **Color y textura.** Las colonias pueden ser blanco-opacas o pueden verse de lechosas a acuosas translúcidas. El crecimiento de las colonias opacas es generalmente firme con poca goma, mientras que las colonias menos densas son usualmente gomosas y suaves. Estas pueden ser brillantes o sin brillo, opacas aplanadas o translúcidas.
- **Tasa de crecimiento:** Es generalmente de 3 a 5 días para las bacterias de crecimiento rápido y de 5 a 7 días para las de crecimiento lento y de 7 a 12 días para alcanzar el tamaño máximo en agar o crecimiento en medio líquido. Las tasas de crecimiento varían según la temperatura de incubación (óptima: 26-30°C), origen (cultivo o nódulo), aireación (en cultivos líquidos) y la composición del medio.
- **Tamaño.** Cuando las colonias están bien separadas en las cajas con agar, el tamaño de la colonia puede variar desde 1mm, para muchas cepas rizobiales de crecimiento lento, a 4-5 mm para los cepas de crecimiento rápido. En cajas con un gran número de colonias, estas permanecen más pequeñas y discretas pero con crecimiento confluyente.
- **Crecimiento en medio LMA + rojo congo:** Los rizobios generalmente no absorben el rojo congo cuando las cajas son incubadas en la oscuridad, mientras que los organismos contaminantes si lo absorben. Las colonias rizobiales permanecen blancas, opacas u ocasionalmente rosadas. Sin embargo, las reacciones dependen de la concentración del rojo congo y de la edad del cultivo. El rizobio puede absorber el tinte si las cajas son expuestas a la luz durante la incubación.

## 2.3 FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

**2.3.1 Proceso de nodulación. Preinfección e infección.** La primera señal implicada en la interacción planta-bacteria la provee la planta, por medio de moléculas de bajo peso molecular (flavonoides, isoflavonoides y betainas) secretadas por raíz, las cuales estimulan la multiplicación de la bacteria a una velocidad superior a la normal<sup>9</sup>.

El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. En la superficie del rizobio se localiza una proteína específica de adherencia, la ricasina. Otras sustancias, como las lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia

---

<sup>9</sup> PEREZ, S. TORALBA, A. La fijación del nitrógeno por los seres vivos. Seminario fisiología vegetal. Facultad Biología Oviedo. 1997. p 21.

planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de pelos radicales y en la superficie de las células de rizobio<sup>10</sup>.

Después de la unión, los pelos radicales se enroscan debido a la acción de sustancias específicas secretadas por la bacteria, que se conocen como factores Nod. Algunos pelos radicales se enroscan hasta 360° formando una estructura a la que se llama "cayado de pastor". La bacteria penetra entonces en el pelo radical y forma canales de infección, recubiertos por un nuevo material de pared celular, que avanzan por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales, y los factores Nod estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo<sup>11</sup>.

Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis. Los rizobios quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora que se llama la membrana peribacteroidal (MPB). A continuación, hay una división continua y sincronizada de los rizobios rodeados de MPBs. Al cesar la división las bacterias se transforman en unas formas ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas bacteroides. Estos quedan rodeados, individualmente o en pequeños grupos por la MPB. A esta estructura se le llama simbiosoma o nódulo<sup>12</sup>.

Los bacteroides pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que los bacilos a partir de los cuales se desarrollan, y hasta varios miles se encuentran en una sola célula vegetal. La fijación de nitrógeno no se inicia hasta que se han formado los bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Cuando el nódulo se deteriora las bacterias pasan al suelo. En algunos casos las formas bacteroidales no tienen capacidad de división, pero los nódulos contienen siempre algunos rizobios en estado de latencia. Estas formas proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo<sup>13</sup>.

---

<sup>10</sup> WANG, T. MARTINEZ, J. LOPEZ, L. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. México : Universidad Autónoma de México 2001. p. 458.

<sup>11</sup> SPAINK, H.P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Ann. Rev. Microbiol. The Netherlands. 2000. p 288.

<sup>12</sup> WANG, Op cit., p. 458

<sup>13</sup> SPAINK, H.P., A. KONDOROSI, AND P. HOOYKAAS. The rhizobiaceae: Molecular Biology of model plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda : The Netherlands.1998. p. 789.

**2.3.2 Genes de la nodulación.** Allen y Allen<sup>14</sup>, afirman que la planta huésped tiene la información genética para la infección simbiótica y para la nodulación. El papel de la bacteria es sólo el de disparar el proceso.

Los elementos genéticos del genero *Rhizobium* que intervienen en la infección simbiótica estan colocados en megaplásmidos<sup>15</sup>. Los plásmidos que contienen la información para la asociación se llaman plásmidos pSym y en ellos se encuentran los genes responsables de la nodulación (genes nod) y los de la fijación de nitrógeno (genes nif y fix).

Según Freiberg y Perret<sup>16</sup> se pueden distinguir cinco grupos de genes involucrados en la fijación del nitrógeno a nivel de la bacteria:

- Genes «nod comunes»: (nodABC) son genes imprescindibles para la nodulación, están conservados en todos los rizobios y pueden intercambiarse entre especies y géneros. Su ausencia impide el proceso de infección.
- Genes «nod específicos» (nodFE, nodH, nodPQ) no necesariamente presentes en todos los rizobios. Son los responsables de la especificidad de huésped: mutaciones en ellos alteran o amplían el rango de especificidad y otras lo reducen impidiendo que un rizobio determinado infecte una planta dada.
- Genes responsables de la síntesis del exopolisacárido (exo), del lipopolisacárido (lps), de glucanos y de polisacáridos capsulares (antígenos K). Los productos de estos genes son importantes para formar los canales de infección.
- Genes que permiten una ocupación más eficiente del nódulo.

La expresión de los genes bacterianos que intervienen en el establecimiento de la simbiosis se produce como consecuencia de que la planta libera al medio flavonoides (Flavonas e Isoflavonas) que en la bacteria interaccionan con la proteína Nod D. Esta proteína es un factor de transcripción presente en todas las especies de rizobios<sup>17</sup> (Freiberg y Perret, 1997).

El factor Nod D responde a la unión de flavonoides o de betaínas a uno de los extremos de su cadena peptídica, el extremo más variable. Se trata de una

---

<sup>14</sup> ALLEN, O. y ALLEN, E. The leguminosae. University of Wisconsin press, Madison. London : Macmillan Publishing Company, 1991. P.45,46.

<sup>15</sup> WANG, Op cit., p 460.

<sup>16</sup> FREIBERG, F y PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. London : Nature. 1997. p 401.

<sup>17</sup> FREIBERG, F. Op cit. p 387.

proteína de membrana que recibe la señal del flavonoide a través de la capa lipídica. Para que se produzca la infección la proteína Nod D tiene que ser activada y para esto tiene que interactuar con el flavonoide específico. Por esto, los factores Nod D son determinantes de la especificidad de huésped. Se han encontrado mutaciones puntuales en Nod D que amplían el rango de infección a especies no leguminosas.

Los genes nod dejan de expresarse cuando el rizobio es liberado en el nódulo y se transforma en bacteroide.

**2.3.3 El factor nod.** Una de las funciones de los genes nodABC es formar el factor NOD, que libera la bacteria como respuesta a la presencia de flavonoides. Los factores NOD funcionan de una forma similar a como lo hacen las hormonas vegetales de las que son análogos estructurales. Los factores de nodulación tienen una estructura básica común que consiste en un oligómero de N-acetil-D-Glucosamina unidos por enlaces 1→4 que lleva unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor<sup>18</sup>.

La composición de las cadenas laterales de los factores NOD es específica de cada tipo de rizobio. Los genes nodEF, nodM y nodPQ modifican el factor NOD haciéndolo específico. No se sabe donde actúa el factor NOD en la planta; pero la presencia de los factores NOD es imprescindible para que tengan lugar los cambios de la planta durante las fases tempranas de la infección, aunque su sola presencia no es suficiente para que se produzcan todos los efectos de la inducción del nódulo<sup>19</sup>.

En la rizosfera pueden existir quitinasas y otras enzimas capaces de degradar selectivamente factores NOD determinados. De esta forma se logra también una especificidad de infección.

---

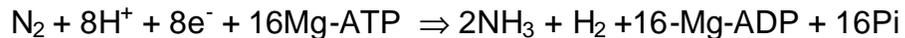
<sup>18</sup> HOYOS, Op cit. p.110

<sup>19</sup> YANG. Op cit. p 228

Como se ha descrito en las secciones anteriores, los factores Nod tienen un papel clave en la inducción de las etapas iniciales de nodulación. Sin embargo, otros requerimientos son necesarios para la formación de nódulos simbióticamente efectivos. De hecho, en estados más tardíos del proceso de infección tales como la formación y elongación del canal de infección, así como la liberación de bacterias en el citoplasma de las células infectadas requieren constituyentes de superficie de los rizobios. Los polisacáridos que han sido estudiados en relación con su función en simbiosis son: exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs), antígenos de tipo K (KPSs) y glucanos cíclicos<sup>20</sup>.

## 2.4 FUNCIONAMIENTO DEL NODULO

Según Castillo y Cardemas<sup>21</sup>, la fijación simbiótica de nitrógeno se lleva a cabo en los bacteroides que se encuentran en el citoplasma de las células del nódulo. La enzima nitrogenasa cataliza la reacción:



La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consiste de dos componentes, la proteína homodimérica que contiene Fe y es codificada por *NifH*, y la proteína tetramérica que contiene Fe y Mo, codificada por los genes *nifD* y *nifK*. La nitrogenasa de los nódulos radiculares posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, incluyendo la sensibilidad al O<sub>2</sub> y la capacidad de reducir acetileno y N<sub>2</sub><sup>22</sup>.

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos succinato, malato y fumarato. Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y, tras su conversión en piruvato, como última fuente de electrones, para la reducción del N<sub>2</sub>. El primer producto estable que se obtiene en la fijación del N<sub>2</sub> es el amonio, y varias pruebas indican que la asimilación del amonio para formar compuestos de

---

<sup>20</sup> PUTNOKY, PETROVICS, P. KERESZT, A. GROSSKOPF, E. CAM, D. BANFALVI, A. KONDOROSI, A. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J. Bacteriol. 1990. p 5458.

<sup>21</sup> CASTILLO, F. y CARDEMAS, J. *Biología molecular de la fijación simbiótica del nitrógeno. Perspectivas biotecnológicas.* España : Servicio de publicaciones Universidad de Córdoba. 1990. P 301.

<sup>22</sup> HARDY, R. HAVELKA, U. In *Symbiotic nitrogen fixation in plants* (ed. P.S. Nutman) USA : Cambridge University Press. 1996. p.102.

nitrógeno orgánico en los nódulos radicales lo lleva a cabo principalmente la planta. El amonio también se puede asimilar en los bacteroides y puede ser transferido a la planta en forma de alanina<sup>23</sup>.

Durante el proceso de simbiosis la planta también expresa proteínas específicas del nódulo a las que se llama nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina tiene la función de aportar O<sub>2</sub> a los bacteroides y de controlar los niveles de este. La leghemoglobina se localiza en el citosol de las células de la planta infectada por bacteroides y es la que confiere el típico color rojo o rasado de los nódulos funcionales.

## 2.5 RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

La capacidad de resistencia a antibióticos que presentan los microorganismos, puede ser una característica intrínseca o bien puede resultar de la presión selectiva que surge en un ambiente alterado por el uso de antimicrobianos. Estas mutaciones bacterianas espontáneas son aleatorias y afectan a un gen cualquiera con frecuencias dentro del rango de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-10</sup> por célula y división<sup>24</sup>. Por tanto, es posible utilizar esta característica para marcar cepas rizobiales y aislar este tipo de microorganismos utilizando medios selectivos que contengan el antibiótico al cual ellos son resistentes.

Existe una gran variedad de compuestos químicos naturales, sintéticos y semisintéticos capaces de impedir el crecimiento de las bacterias. A estos compuestos se les ha denominado agentes antimicrobianos o antibióticos. En la naturaleza se encuentran bacterias que son por sí mismas resistentes a los antibióticos y bacterias que pueden llegar a serlo debido a mutaciones en diversos genes o a la adquisición de material genético heterólogo<sup>25</sup>.

La estreptomycinina es un antibiótico que pertenece al grupo de los aminoglucósidos, que se caracterizan por ser policones de aminoazúcares en unión glucosídica, cuya polaridad es en parte responsable de sus propiedades farmacocinéticas<sup>26</sup>. Su espectro antimicrobiano actúa interfiriendo la síntesis proteica, posiblemente por enlaces irreversibles a la subunidad 30s y a algunas

---

<sup>23</sup> NOTI, J. DUDAS, A. Isolation and characterization of noduling genes from Bradyrhizobium hedysary in different rhizobium species. FEMS Microbiol. Ecology, 1995. p 144.

<sup>24</sup> PELCZAR, M.J. Elementos de Microbiología. ESC Chan. México : McGraw -Hill. 1984. p. 356.

<sup>25</sup> LEON, S. ZUÑIGA, D. Aislamiento y caracterización de mutantes de bradyrhizobium sp. (Phaseolus lunatus) resistentes a estreptomycinina y espectinomycinina. España : s n, 1997. p. 123,124.

<sup>26</sup> BEYNON, J. Demonstration of heterogeneity in a natural population of rhizobium phaseoli using variation in intrinsic antibiotic resistance. J. Gen. Microbiol. 1980. p 442.

extensiones de la 50s de los ribosomas bacterianos, aunque la forma en que los mismos llevan a cabo la muerte celular no se conoce completamente<sup>27</sup>.

La espectinomicina es un antibiótico aminociclitol, producido por el *Streptomyces spectabilis*, que tiene propiedades similares a las de la estreptomycin; la espectinomicina es un antibiótico bacteriostático que se une a la subunidad 30s de los ribosomas e inhibe así la síntesis proteica bacteriana<sup>28</sup>. Es activa contra un amplio rango de bacterias gramnegativas.

## 2.6 TECNICAS DE IDENTIFICACION SEROLOGICAS

La serología es la ciencia que estudia la detección de anticuerpos específicos en los líquidos corporales, producidos por la respuesta inmune a un antígeno. Esto quiere decir que los anticuerpos o las células inmunes originadas por el estímulo de un antígeno, reaccionan exclusivamente contra él. Cambios pequeños en la configuración estructural o química de un antígeno pueden ser suficientes para impedir que se produzca la reacción de los anticuerpos<sup>29</sup>.

### Reactivos empleados en las pruebas serológicas

- **Suero:** La fuente mas común de anticuerpos es el suero, el cual se obtiene dejando coagular una muestra de sangre y permitiendo que el coagulo se retraiga. El suero se guarda en congelación y se utiliza cuando se desee.
- **Anticuerpos:** Son proteínas séricas especializadas, llamada antiglobulina, que pueden reaccionar específicamente con el antígeno que desencadeno su producción en un organismo animal.
- **Antígeno:** Se denomina así, a toda sustancia que, al penetrar en un organismo maduro inmunológicamente provoca una respuesta inmunitaria y reacciona específicamente con los productos de esta reacción.

**2.6.1 Prueba de titulo y aglutinación.** El titulo, es una forma de medir la concentración de un anticuerpo presente en un suero. Para obtener el titulo se hacen una serie de diluciones decrecientes en un conjunto de tubos. Posteriormente en cada uno de los tubos se prueba la actividad de la solución en el sistema de ensayo. La recíproca de la mas alta de las diluciones que produce

---

<sup>27</sup> IAÑEZ, E. Curso de Microbiología General. Resistencia Bacteriana a los Antibióticos. España : Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 1998. p.16

<sup>28</sup> LEON Y ZUÑIGA. Op cit. p 123.

<sup>29</sup> BASUALDO, J. TORRES, J. Microbiología Biomédica. Bacteriología, micología, virología, parasitología e inmunología. Buenos aires : Atlante S.R.L. 1996. p.23.

una reacción positiva frente al antígeno recibe el nombre de título, y proporciona una estimación de la cantidad de anticuerpo que se encuentra presente en el suero<sup>30</sup>.

Los anticuerpos también pueden establecer uniones cruzadas con los antígenos, en un proceso mediante el cual los antígenos se enlazan a sus anticuerpos correspondientes haciendo que estos se agrupen o aglutinen. El enlazamiento del antígeno se puede visualizar como apiñamientos, aglutinados o agregados, tanto microscópica como macroscópicamente. La reacción de aglutinación, como se conoce este proceso, depende de una firme relación estructural entre el antígeno y el anticuerpo. Esta aglutinación se logra mezclando una suspensión de partículas del antígeno; por ejemplo, bacterias con suero. Los anticuerpos se combinan con rapidez con las partículas (interacción primaria) pero la aglutinación es un proceso mucho más lento, ya que la adherencia entre las partículas solo se produce cuando se tocan unas con otras. Normalmente estas suspensiones son estables, y se evita que sus partículas se agrupen por una carga negativa que existe en su superficie, a la cual se la llama "potencial zeta". Sin embargo, las inmunoglobulinas tienen cargas positivas y cuando cubren las partículas neutralizan este potencial zeta. En consecuencia, las partículas se aproximan muy cerca unas de otras, y aparece una aglutinación<sup>31</sup>.

**2.6.2 Pruebas inmunoenzimáticas.** Dentro de las técnicas inmunológicas para la detección de antígenos, una de las más específicas es la llamada ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Esta prueba, puede utilizarse para detectar y para cuantificar tanto los anticuerpos como los antígenos.

En la prueba indirecta de ELISA para anticuerpos, se llenan unos pozos en placas de poliestireno con una solución de antígeno. Los antígenos proteicos se unen con firmeza al poliestireno, de modo que después se pueda extraer el antígeno no unido aplicándole un lavado. Este permite que los pozos de la placa permanezcan cubiertos con el antígeno. Estas placas, así cubiertas, pueden guardarse hasta el momento en que se necesiten. El suero que se va a probar se coloca dentro de los pozos, de manera que los anticuerpos específicos del suero puedan unirse al antígeno que se encuentra colocado en las paredes de los pozos. Después de la incubación y un lavado para extraer el anticuerpo no unido, la presencia de los anticuerpos que se unieron se puede detectar agregando una antiglobulina químicamente unida a una enzima. Este complejo inmunoenzimático se mide con solo agregar el sustrato para la enzima correspondiente. La enzima y el sustrato se seleccionan de una manera que en cada pozo se obtenga un producto que tenga un cierto color. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de

---

<sup>30</sup> TIZARD, J. Inmunología Veterinaria. México : McGraw Hill-Interamericana. 2000. p. 249.

<sup>31</sup> Ibid, p. 248

antiglobulina unida a la enzima que se haya captado, la cual, a su vez será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero que se está ensayando. La intensidad del color se puede estimar a simple vista o, lo que es preferible, mediante espectrofotometría<sup>32</sup>.

Una modificación de esta técnica, es ELISA en emparejado o ELISA directo. En este método altamente sensible para la determinación de antígenos. Se cubren algunos tubos de poliestireno con el anticuerpo específico (captura del anticuerpo). Luego se agrega la solución de antígenos, la cual va seguida, después del lavado, de la antiglobulina marcada con enzimas, el anticuerpo específico y el sustrato, al igual como se describió en la técnica indirecta. En esta prueba, la intensidad de la reacción de color se relaciona directamente con la cantidad de antígeno captado. Debido a que estas pruebas incluyen la formación de capas anticuerpo-antígeno-anticuerpo, se les denomina técnica de ELISA en emparejado<sup>33</sup>.

---

<sup>32</sup> PELCZAR. Op cit. p 356

<sup>33</sup> JOKLI, W. WILLETT, H. AMOS, B. WILFERT, C. Zinsser Microbiología. Buenos Aires : Medica Panamericana. 1994. p. 606

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 RECOLECCION Y AISLAMIENTO DE DIEZ AISLADOS RIZOBIALES NATIVAS

Para la recolección de nódulos en campo se siguió la metodología descrita por Somasegaran y Hoben<sup>34</sup>. Los nódulos se recolectaron a partir de plantas de frijol noduladas, cultivadas en diferentes sitios del municipio de El Peñol. Las plantas de las cuales se tomaron los nódulos estaban en el periodo de prefloración (entre 45 y 50 días de cultivo) y se escogieron además, por ser las plantas más grandes y sanas, que presentaban un color verde intenso. En el cuadro 1 se muestra la procedencia de cada uno de los aislados rizobiales, a los cuales se les asignó un número entre 301-310 y la sigla LFBN correspondiente a las letras iniciales de "Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno" de la Universidad de Nariño, en donde se purificaron los aislados.

Además de los 10 aislados rizobiales, también se trabajó con los dos aislados introducidos, procedentes del banco de germoplasma de la Universidad de Minnesota USA, las cuales se designaron como 1481 y 1478.

Los nódulos aislados en el campo, se almacenaron en frascos con tapa rosca que contenían algodón y silicagel como desecante. De esta manera, los bacteriodes permanecerían en estado de latencia, hasta llegar al laboratorio.

**Cuadro 1. Procedencia de los aislados rizobiales nativos**

<b>CEPA</b>	<b>PROCEDENCIA VEREDAS MUNICIPIO DE EL PEÑOL</b>
LFBN. 301	PUEBLO VIEJO
LFBN 302	PUEBLO VIEJO
LFBN 303	PUEBLO VIEJO
LFBN 304	PEÑOL VIEJO
LFBN 305	PEÑOL VIEJO
LFBN 306	COCHAS
LFBN 307	COCHAS
LFBN 308	COCHAS
LFBN 309	ORQUETA
LFBN 310	ORQUETA

<sup>34</sup> SOMASEGARAN, P. Op cit. p. 413.

En el laboratorio, los nódulos se sometieron a hidratación durante dos horas en agua estéril; luego se desinfectó su superficie con alcohol etílico al 96%, hipoclorito de sodio al 3% y agua estéril.

Sobre un medio de cultivo LMA (Apéndice 2) y teniendo en cuenta las medidas de asepsia correspondientes (Apéndice 1) se dispersó el jugo de un nódulo desinfectado. El mismo proceso se siguió con los demás nódulos procedentes del campo. El conjunto se incubó a 27°C durante tres días, tiempo después del cual se observan las colonias típicas de *Rhizobium*.

### **3.2 PURIFICACION Y CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS RIZOBIALES AISLADAS**

Para la purificación de los aislados rizobiales se tomaron colonias aisladas con características típicas de *Rhizobium* (color, forma y textura), se reaislaron sobre medio LMA con rojo congo (Apéndice 2) y se incubaron en la oscuridad a 27 °C, durante 3 días. Con los aislados rizobiales introducidos, se realizó el mismo procedimiento. Mediante la tinción de Gram (Apéndice 2), como criterio de pureza, se verificó que los cultivos únicamente contenían bacilos Gram negativos.

Los aislados rizobiales purificados se pasaron a tubos con tapones de algodón que contenían medio LM (Apéndice 2). En este medio se hicieron crecer aislados puros, con agitación constante, a temperatura ambiente, hasta que se observó turbidez en el medio. Al caldo de cultivo se transfirieron 10 perlas de porcelana por cepa y se dejaron en contacto con el caldo de cultivo durante tres horas, con agitación constante. A continuación, los tubos se invirtieron para que el medio fuera absorbido por el algodón y posteriormente se transfirieron las perlas impregnadas con bacterias rizobiales a otro tubo de tapa rosca que contenía silicagel y algodón, con lo cual se logra que las bacterias permanezcan en estado de latencia por un tiempo aproximado de 6 meses.

#### **3.2.1 determinación de la infectividad y efectividad de los aislados rizobiales.**

Después de que los aislados rizobiales fueron purificados, se procedió a evaluar su habilidad para formar nódulos (infectividad) y su capacidad para fijar nitrógeno (efectividad). Como criterio de efectividad se tuvo en cuenta el peso seco de la parte aérea de la planta de frijol inoculada con una cepa rizobial.

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, que constó de 14 tratamientos con 5 replicas cada uno, para un total de 70 unidades experimentales.

Los tratamientos fueron:

T1= Testigo sin inoculante y con aplicación de nitrógeno en forma de  $\text{KNO}_3$  para una concentración final en la solución nutriente de 70 ppm.

T2 = Testigo Absoluto (sin nitrógeno y sin inoculante)

T3 = cepa LFBN 301      T4= Cepa LFBN 302      T5= Cepa LFBN 303

T6 = cepa LFBN 304      T7= Cepa LFBN 305      T8= Cepa LFBN 306

T9 = cepa LFBN 307      T10= Cepa LFBN 308      T11= Cepa LFBN 309

T12 = cepa LFBN 310      T13= Cepa USA 1478      T14= Cepa USA 1481

La unidad experimental constaba de una maceta con arena estéril en la que se hizo crecer la planta huésped.

Como planta huésped se utilizó frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad Mortiño. Las semillas fueron certificadas y donadas por CORPOICA. Se seleccionaron aproximadamente 300 semillas, de tamaño uniforme y sin daños en su superficie. Se las colocó en un vaso de precipitados y se esterilizó su superficie, mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado, en cantidad suficiente para que todas las semillas quedaran inmersas. Aquí se modificó la metodología propuesta por Somasegran y Hoben<sup>35</sup> en el sentido de aumentar el tiempo de desinfección de 5 a 15 minutos. Después de este tiempo se escurrió el ácido y se enjuagó con 6 cambios de agua estéril. En el último enjuague se agregó suficiente agua para sumergir todas las semillas y se las dejó durante 4 horas en hidratación.

Las semillas esterizadas, se sembraron en macetas plásticas que contenían arena de río estéril, a razón de 3 semillas por maceta.

En el momento de la siembra se realizó la primera inoculación con los aislados rizobiales. Se utilizaron como inoculantes los diez aislados rizobiales y los dos aislados introducidos. Todos los aislados rizobiales se cultivaron previamente, durante cinco días, en un erlenmeyer de 125 ml que contenía 30 ml de medio LM y se incubaron a 27 °C con agitación periódica, hasta cuando el cultivo alcanzó una densidad aproximada de  $1 \times 10^9$  células/ml (Apéndice 3). La inoculación de las semillas se realizó con pipetas de 1 ml estériles, distribuyendo 1 ml del cultivo rizobial gota a gota sobre la semilla y alrededor de ésta. Con el fin de evitar contaminaciones, para cada inoculación se utilizó una pipeta diferente.

---

<sup>35</sup> SOMASEGRAN. Op cit. 413

La segunda inoculación, para asegurar un proceso de infección óptimo, se realizó a los tres días de la siembra, cuando las semillas ya habían germinado. La semilla de mejor apariencia se dejó en la maceta, y las otras dos semillas se retiraron. La cantidad de inoculante y el procedimiento seguido fueron los mismos que para la primera inoculación.

El cultivo se desarrolló dentro del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, donde se controlaban algunas variables, como temperatura y humedad. Cada unidad experimental o planta huésped se hizo crecer en macetas con arena estéril, a razón de 5 macetas por tratamiento, para un total de 70 muestras (14 tratamientos y 5 macetas por tratamiento). 65 de estas macetas se regaron con solución Jensen (Apéndice 2) libre de nitrógeno (para los tratamientos con inoculante, T3 a T14 y el testigo absoluto, T2) y las 5 restantes se regaron con solución Jensen pero con 70 ppm de  $\text{KNO}_3$  (testigo nitrogenado, T1).

La solución Jensen utilizada para regar por primera vez las macetas, se preparó con 10 ppm de  $\text{KNO}_3$  con el objetivo de proporcionar una fuente mínima de nitrógeno mientras las bacterias establecían la simbiosis con la raíz de la planta y así asegurar su supervivencia.

Desde el momento de la siembra fue necesario adicionar frecuentemente solución Jensen para que las plantas tuvieran los nutrientes adecuados para su desarrollo normal. Además, se realizaron observaciones periódicas de las hojas y raíces para evidenciar si se había establecido la simbiosis.

Cuando las plantas llegaron a la etapa de prefloración, entre 45 y 50 días después de la siembra, se cortó la parte aérea de las plantas. Las plantas se colocaron en bolsas de papel y se secaron a  $65\text{ }^\circ\text{C}$ , durante dos días; se determinó el peso seco de la parte aérea y con estos datos se realizó un análisis de varianza. Se ha demostrado que el peso seco de la parte aérea de las plantas está altamente correlacionado con el nitrógeno total fijado y con la actividad de la nitrogenasa. Por lo tanto conociendo el peso seco de la parte aérea de las plantas se puede determinar la efectividad fijadora de nitrógeno de los aislados rizobiales nativos e introducidos.

La capacidad infectiva de los aislados rizobiales se determinó mediante conteo de nódulos. Con estos datos se realizó otro análisis de varianza para establecer si existían diferencias significativas entre la capacidad infectiva de los aislados rizobiales y determinar cuáles eran las de mayor infectividad.

### **3.3 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

Con las tres aislados de mayor capacidad infectiva y efectiva se desarrollaron mutantes espontáneos resistentes a los antibióticos estreptomycinina y a espectinomycinina.



A 6 porciones de 500 ml de medio LMA (en erlenmeyers de 1 litro) que se conservaron fundidos en un baño de agua a 50 °C, se agregaron 2.5 , 1.87 y 1.25 ml de solución patrón de str, para obtener concentraciones finales de 20, 15 y 10 µg de str/ml de medio, respectivamente. A las otras tres porciones de medio se agregaron 1, 2 y 3 ml de solución patrón de espectinomicina, para una concertación final de 5, 10 y 15 µg de spc/ml de medio. Después de mezclar bien, pero evitando la formación de burbujas de aire, se vertieron los medios en cajas petri perfectamente marcadas con la respectiva concentración del antibiótico que contenían y con el número de la cepa con la cual se las sembraría. Con un marcador se dividió cada caja en 8 secciones iguales (para obtener el mayor numero de réplicas con un gasto mínimo de reactivos), y una vez que el medio solidificó se llevaron a una estufa a 37 °C, durante 3 horas.

En cada sección de las cajas petri se depositó con una micropipeta una gota de la dilución mas alta ( $10^{-4}$ ) de los caldos de cultivo que contenían la respectiva cepa, teniendo cuidado de depositarla en el centro de cada sección, como se muestra en la figura 3.

**Figura. 3 Fotografía de la siembra en cajas petri por el método de goteo**



Adicionalmente, se prepararon 6 cajas petri con medio LMA sin antibiótico y se las sembró de igual forma. Estas cajas sirvieron como punto referencial del crecimiento de cada cepa. Cuando todas las cajas fueron sembradas se incubaron a 27 °C y se hicieron observaciones durante 5 días. Finalmente se realizaron los conteos de las unidades formadoras de colonias y se estableció el número de mutantes resistentes a cada concentración de los dos antibióticos.

### 3.4 PRUEBA DE ELISA

La técnica serológica escogida en este trabajo, para la caracterización de los aislados rizobiales seleccionados, fue la prueba de ELISA. El primer paso en esta prueba es disponer de los antisueros específicos.

**3.4.1 Desarrollo de los antisueros específicos.** Para el desarrollo de los antisueros se escogieron 9 hembras de cuyes (*Cavia porcellus*) de tres meses de edad, del criadero de cuyes que tiene la Universidad de Nariño en la Granja Experimental Botana.

Estos animales fueron trasladados a las instalaciones de la Universidad de Nariño dos meses antes de proceder a la inmunización de los mismos. De este modo se logró adaptar a los animales a las nuevas condiciones de hábitat en las que pasarían los siguientes cuatro meses y además acostumbrarlos a la presencia de personas y a ser manipulados, ya que en gran parte, el éxito del procedimiento depende de mantener a los animales en niveles mínimos de estrés.

Pasado el período de adaptación de los animales, se procedió a su inmunización con los respectivos aislados. Para esto se cultivaron las tres aislados seleccionados sobre medio Bersergen (Apéndice 2) durante 5 días, a 27 °C. Después de este tiempo, el cultivo se recolectó con 5 ml de solución salina (NaCl al 0.85 %) estéril y filtrada a través de un filtro milipor estéril. La suspensión de cada cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 ml de solución salina. Este procedimiento de centrifugación y resuspensión se repitió tres veces para eliminar los antígenos solubles y flagelares. La concentración celular se ajustó aproximadamente a  $1 \times 10^9$  células/ml y se transfirieron las soluciones a tubos estériles que se sometieron a calentamiento, durante una hora en un baño de agua en ebullición.

Cuando el antígeno estuvo listo se procedió a inyectar los cuyes, a razón de tres animales por cepa. En la primera inoculación se aplicó 1 ml de antígeno (suspensión de cepa rizobial purificada) en el músculo de una de las patas traseras del animal (Figura. 4a). Diez días después de la primera inoculación, se aplicó una inyección intraperitoneal (Figura. 4b) de refuerzo, para inducir en el animal una respuesta inmune mayor y así, producir un suero de título suficientemente alto.

**Figura 4a. Fotografía de la inoculación intramuscular**



**Figura 4b. Fotografía de la inoculación intraperitoneal**



Siete días después de la inyección de refuerzo se realizó un ensayo de sangrado para conocer el título del suero. La muestra de sangre se tomó de la vena yugular (Figura. 5), para lo cual fue necesario anestésiar parcialmente a los animales con una mezcla de ketamina y atropina que se aplicó intramuscularmente 5 minutos antes del realizar el procedimiento. La cantidad de anestésico aplicado varió de acuerdo con el peso de cada animal. Con esto se logró tener al animal relajado y tranquilo durante todo el procedimiento. Antes de tomar la muestra, fue necesario rasurar la zona del cuello de los animales y desinfectarla con una solución de yodo y posteriormente con alcohol. Se tomaron 2 ml de sangre por animal, con agujas calibre 24 G.

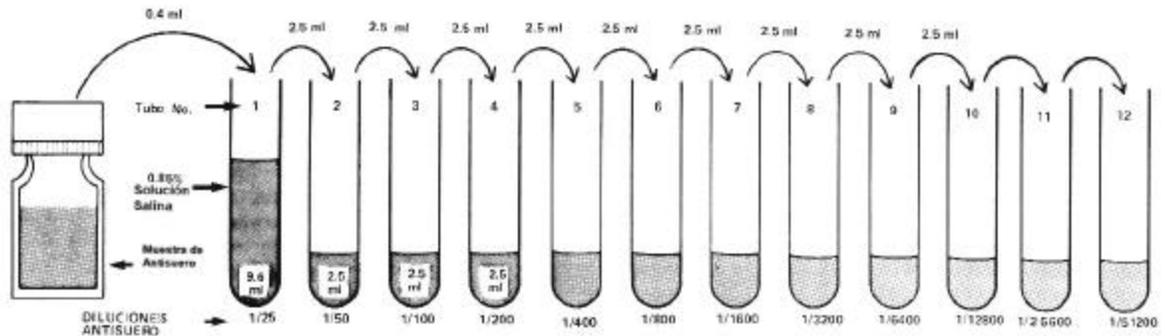
**Figura 5. Fotografía del sangrado por punción de la vena yugular**



La sangre se transfirió a tubos estériles con tapa rosca, se dejó coagular a temperatura ambiente durante 2 horas y después se refrigeró durante toda la noche. Cuando el coagulo estuvo bien solidificado se decantó el suero claro en otro tubo estéril, evitando al máximo el paso de células sanguíneas rojas. Al final del proceso, se consiguieron 9 muestras de suero, tres muestras por cada cepa rizobial (antígeno) inoculada. Para poder identificar mejor cada muestra, las tres aislados seleccionadas se enumeraron del 1 al 3 y los tres animales inoculados con la misma cepa, con las letras A, B y C. De tal manera que al suero obtenido del primer animal inoculado con la cepa numero 1 se designo como 1A y así sucesivamente.

**3.4.2 Determinación del titulo por aglutinación.** Para determinar el titulo por aglutinación, de cada uno de los sueros aislados, en una gradilla se dispusieron 12 tubos en fila, los que se rotularon del 1 al 12. En el tubo numero 1 se pipetearon 9,6 ml de solución salina al 0,85 % y en los tubos 2 al 12 se depositaron 2,5 ml de la misma solución. Posteriormente al tubo numero 1 se le agregaron 0,4 ml de suero, para obtener una dilución 1/25 y se mezcló bien. Se tomaron 2,5 ml del tubo 1 y se transfirieron al tubo 2, para obtener una dilución de 1/50. Del tubo 2 se tomaron nuevamente 2.5 ml y se pasaron al tubo 3 para obtener una dilución de 1/100, usando una nueva pipeta cada vez. Se repitieron las diluciones hasta completar la serie. Siempre se transfirieron 2.5 ml del suero previamente diluido al tubo siguiente, hasta llegar al tubo 12, en el cual se tiene una dilución final de 1/51200, tal como se muestra en la Figura 6.

**Figura 6. Esquema para diluir una muestra de suero**



**Fuente: Somasegaran y Hoben (1985), pag. 86**

Cuando las diluciones estuvieron listas se procedió a realizar la reacción de aglutinación en una placa de micro-titulación. Esta placa cuenta con 96 pozos distribuidos en 8 filas (designadas con las letras A-H) y 12 columnas numeradas del 1-12. Por lo tanto, la ubicación de cada pozo se indica señalando la letra de la fila y el número de la columna a la que pertenece.

En cada uno de los pozos de la fila A se depositaron con una micropipeta, 0.06 ml de cada dilución del suero 1A, conservando siempre el mismo orden numérico del tubo del que se tomó la muestra, y el del pozo en el que se la depositó, de tal manera que la muestra del tubo 1 se depositó en el pozo 1, la del tubo 2 en el pozo 2 y así, sucesivamente, teniendo cuidado de utilizar siempre una punta diferente para cada muestra. Después, a cada pozo se le agregaron 0.06 ml del antígeno, o sea, una suspensión bacteriana de la cepa I (la misma utilizada para la inmunización de los animales). Utilizando un tubo capilar cerrado por ambos extremos se mezclaron bien las soluciones presentes en cada pozo y después de cubrir la placa de micro-titulación con papel cristal se llevó a incubación a 37 °C durante 2 horas, y luego se dejó en refrigeración toda la noche, después de lo cual se observó la placa para establecer en que pozos se dio una reacción de aglutinación positiva. El título de cada suero es la dilución más alta a la que se observó una reacción positiva. Después de determinar que los sueros tienen un título suficientemente alto, se procedió a tomar las muestras para realizar la prueba de ELISA. Para esta prueba se requería de una cantidad mayor de suero. Para obtenerlo fue necesario realizar una punción cardiaca (Figura 7) a los cuyes, en este procedimiento fue necesario anestesiarse completamente a los animales, para lo cual se utilizó una dosis más alta de ketamina y atropina. Esta dosis dependió del peso de cada animal. Para separar el suero de las células sanguíneas rojas se centrifugó a 5000 rpm.

**Figura 7. Fotografía del sangrado por punción cardiaca**



**3.4.3 Desarrollo de la prueba de ELISA.** Para la prueba de ELISA directa se utilizaron bandejas de micro-titulación de poliestireno "Immulon 2 HB" de marca DYNEX. Debido al alto costo comercial de la fosfatasa alcalina, la cantidad adquirida fue mínima, lo que limitó la realización de la estandarización de las condiciones de la prueba (Tiempos y temperaturas de incubación). Por lo tanto, se tomaron como referencia las condiciones reportadas por Triviños<sup>36</sup>.

A cada pozo de la fila A de la bandeja de micro-titulación se agregaron 100  $\mu$ l del antisuero I, que contenía los anticuerpos específicos contra la cepa 1, con un título de 1/12800 y se incubó durante 12 horas a temperatura ambiente. De igual manera se procedió con las filas B y C, a las que se les agregaron los antisueros de los aislados rizobiales 2 y 3 respectivamente. Se retiró el contenido de los pozos y se realizaron tres lavados con buffer PBS-Tween al 0,05 % y pH 7.4 (Apéndice 2). Cada solución de lavado se dejó actuar durante diez minutos. Posteriormente, a cada pozo se agregaron 100  $\mu$ l del antígeno correspondiente, o sea, a los pozos de la fila A se agregó una suspensión bacteriana de la cepa 1 a una concentración determinada. A las filas B y C se agregó la correspondiente suspensión bacteriana de los aislados rizobiales 2 y 3 en las concentraciones que se indican en el cuadro 2.

Se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas y después de lavar con buffer PBS-Tween durante 10 minutos, para eliminar el material no asociado, se

---

<sup>36</sup> TRIVIÑOS M. C. Aplicación de la técnica de ELISA en la identificación de aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. vicia. Bogotá : Tesis de pregrado Dpto. de Química. Universidad Nacional de Colombia. 1992. p. 88-105.

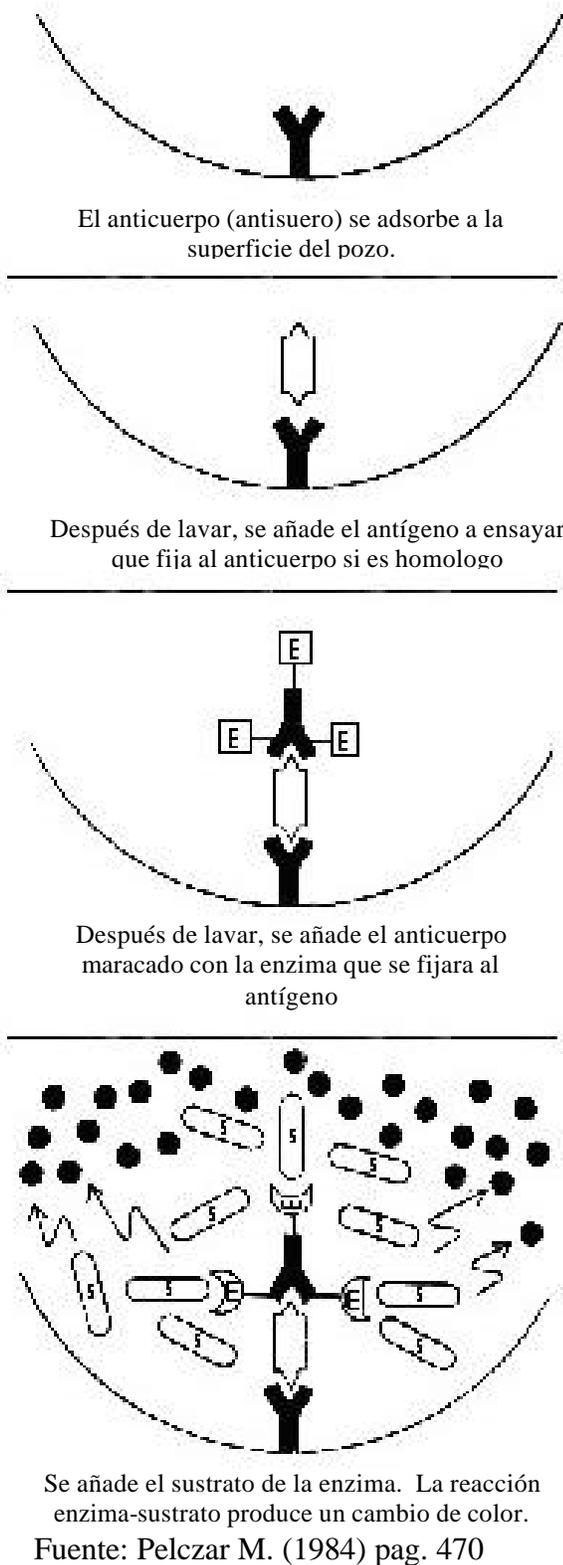
agregaron 100  $\mu$ l/pozo del complejo anticuerpo-enzima, el cual se obtuvo mezclando en porciones iguales fosfatasa alcalina (0.540 mg/ml tipo VII Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) con el respectivo antisuero de cada cepa.

**Cuadro 2. Concentraciones de los antígenos utilizadas para la prueba de ELISA**

Pozos Fila A	Concentración Cepa I	Pozos Fila B	Concentración Cepa II	Pozos Fila C	Concentración Cepa III
1	$5.8 \times 10^4$	1	$1.2 \times 10^5$	1	$1.4 \times 10^4$
2	$5.8 \times 10^4$	2	$1.2 \times 10^5$	2	$1.4 \times 10^4$
3	$1.3 \times 10^4$	3	$2.8 \times 10^4$	3	$9 \times 10^3$
4	$1.3 \times 10^4$	4	$2.8 \times 10^4$	4	$9 \times 10^3$
5	$2.5 \times 10^3$	5	$6.6 \times 10^3$	5	$2.6 \times 10^3$
6	$2.5 \times 10^3$	6	$6.6 \times 10^3$	6	$2.6 \times 10^3$
7	$1.3 \times 10^3$	7	$1.3 \times 10^3$	7	$1.2 \times 10^3$
8	$1.3 \times 10^3$	8	$1.3 \times 10^3$	8	$1.2 \times 10^3$

Se dejó incubar durante 4 horas a temperatura ambiente y nuevamente se eliminó el material no asociado por medio de un lavado con buffer BPS-Tween. Enseguida se agregó el sustrato de la enzima, 100  $\mu$ l/pozo de p-nitrofenilfosfato (1 mg por ml de buffer de dietanolamina al 10% pH 9.8, Apéndice 2). Se dejó desarrollar la reacción enzima-sustrato durante 30 minutos. Después de este tiempo se agregaron 25  $\mu$ l/pozo de NaOH 3N para detener la reacción. Al producto coloreado desarrollado en cada pozo se le determinó su absorbancia, a 405 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer. Con los datos obtenidos de las lecturas se realizó la grafica Absorbancia vs. Concentración de antígeno. En la figura 8 se muestra un diagrama que resume el procedimiento de la prueba de ELISA directa realizada.

**Figura 8. Esquema del desarrollo de la prueba de ELISA directa**



Se añade el sustrato de la enzima. La reacción enzima-sustrato produce un cambio de color.

Fuente: Pelczar M. (1984) pag. 470

**3.4.4 Ensayo de los aislados rizobiales marcados frente a los antibióticos seleccionados y a la técnica de ELISA preparada.** Para realizar este ensayo, fue necesario sembrar nuevamente plantas de fríjol e inocularlas con las tres aislados seleccionadas y marcadas con la resistencia a antibióticos. El procedimiento de escogencia de semillas, desinfección, siembra y cosecha, se realizó igual como se describió en el punto 4.2.2.

El diseño experimental que se realizó contó con 8 tratamientos, 2 testigos, uno absoluto (sin nitrógeno y sin inoculante) y otro testigo control (con nitrógeno en forma de  $\text{KNO}_3$ ) y 5 tratamientos con inoculante. Los inoculantes utilizados fueron los aislados rizobiales cultivados en medio LM enriquecido con la concentración mas alta del antibiótico al cual fueron resistentes, así, la cepa 301 se cultivo en medio LM que contenía 15  $\mu\text{g}$  de estreptomina/ml y en LM conteniendo 10  $\mu\text{g}$  de espectinomicina por ml de caldo de cultivo. La cepa 308 se cultivo en medio LM con 20  $\mu\text{g}$  de estreptomina por ml y la cepa 310 se cultivo separadamente en un caldos que contenía 15  $\mu\text{g}$  de espectinomicina y en otro que tenia 10  $\mu\text{g}$  de estreptomina por ml de medio. Cada tratamiento se replicó tres veces.

El objetivo de realizar este diseño experimental es conocer si la infectividad y efectividad de los aislados rizobiales se afectó al ser marcadas con la resistencia a antibióticos. Después de coleccionar los nódulos, se procedió a realizar el aislamiento de las bacterias directamente sobre medio LMA enriquecido con el antibiótico a la respectiva concentración con la cual la cepa fue marcada.

Si las bacterias presentan crecimiento abundante sobre el respectivo medio, se comprueba que las bacterias que infectaron la raíz, fueron las que se marcaron con la resistencia a antibióticos. Los nódulos restantes se utilizaron para ser ensayados frente a la prueba de ELISA preparada, para lo cual se tomaron dos nódulos por cepa, se pesaron y se oprimieron hasta obtener todo el jugo nodular posible, el cual se diluyo en 10 ml de PBS. Este jugo diluido fue utilizado como antígeno y el procedimiento que se siguió fue el mismo descrito en el punto 4.4.3. Los datos obtenidos de la absorbancia se compararon con la curva encontrada en la prueba de ELISA preparada. De este modo se pudo estimar la población bacteriana (antígeno) presente en el nódulo.

Para establecer la especificidad de la prueba de ELISA, se realizaron ensayos de reacción cruzada, para lo cual se procedió de igual manera a como se describió en el punto 4.4.3 pero los antígenos utilizados no correspondían a los utilizados para la inmunización de los animales, de tal manera que el antisuero de la cepa 1 fue probado contra la cepa 2 y 3, el suero de la cepa 2 se probó contra los aislados rizobiales 1 y 3 y el antisuero de la cepa 3 se probó contra los aislados rizobiales 1 y 2. De esta manera se puede establecer si los aislados rizobiales tienen los mismos determinantes antigénicos.

## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los 10 aislados y las dos aislados introducidas se caracterizan por presentar colonias típicas, cuya forma varia entre planas y convexas. Su color es blanco lechoso, muy gomosas, suaves y brillantes. Los aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* aisladas e introducidas son bacterias de crecimiento rápido (2-3 días con incubación a 27 °C) y son bacilos Gram negativos.

### 4.1 ELECCIÓN DE LOS TRES AISLADOS DE MAYOR INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD.

Para escoger los tres aislados de mayor infectividad y efectividad se sembraron plantas de frijol que fueron inoculadas con los aislados aisladas e introducidas, tal como se describió en el punto 4.2.2.

Las plantas de frijol se cultivaron dentro del laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, donde era más fácil controlar variables como temperatura y humedad. Así, la temperatura del laboratorio se mantuvo entre 20 y 25 °C. La disposición del laboratorio, ocasiono un fototropismo hacia la entrada de luz, pero los procesos fotosintéticos no se vieron afectados ya que el desarrollo general de las plantas fue normal.

La recolección de las plantas se hizo en la etapa de prefloración ya que el nitrógeno se encuentra distribuido de una manera uniforme en toda la planta, después, la mayor parte del nitrógeno es utilizado para la producción de semillas. La infectividad o habilidad que poseen los aislados rizobiales para producir nódulos en las raíces de las leguminosas se determinó por medio del conteo de nódulos presentes en las raíces de las plantas. El análisis estadístico que se realizó con los datos recogidos (Apéndice 4) permitió establecer que existen diferencias significativas entre los tratamientos o los aislados utilizadas como inoculantes.

Los valores presentados en el cuadro 3 son la media de cinco réplicas por tratamiento, y los literales se encontraron después de realizar un análisis de varianza con un limite de confianza del 95%. Se utilizó como prueba de significancia la "Prueba de Tukey". Valores con literales iguales indican que no existen diferencias significativas entre ellos, por lo tanto se puede decir que los tratamientos T3, T8, T10 y T12 correspondientes a los aislados 301, 306, 308 y 310 son iguales y además, por presentar los promedios más altos, son los tratamientos de mayor infectividad.

**Cuadro 3. Promedios del número de nódulos encontrados por tratamiento**

TRATAMIENTO AISLADO	T3 301	T4 302	T5 303	T6 304	T7 305	T8 306	T9 307	T10 308	T11 309	T12 310	T13 1478	T14 1481
No. DE NÓDULOS	1104 A	730 B	686 B	790 B	459 C	993 A	774 B	1175 A	812 AB	1045 A	817 AB	798 AB
COLOR DE LOS NODULOS	R.*	R.T.*	B.***	R.T	B.	R.T	R.T	R.	B.	R.	R.T.	R.T.

\* Rosado \*\*Rosado Tenue \*\*\*Blanco

El aislado 305 es la que presenta un menor número de nódulos; por lo tanto, es el aislado con menor capacidad infectiva. Los tratamientos restantes, incluidas los dos aislados introducidos, presentaron una gran infectividad con un número de nódulos por planta superior a 686.

En el apéndice 4 se muestra el número de nódulos encontrados en cada una de las cinco réplicas de cada tratamiento, su desviación estándar y su promedio. Como se puede observar, todas las unidades experimentales inoculadas nodularon, lo que no ocurrió en ensayos realizados con anterioridad. Además, las desviaciones estándar bajas, indican un proceso de infección homogéneo y con un alto grado de repetitividad. Estos mejoramientos notorios en el proceso de infección de las plantas, se pueden atribuir a los cambios realizados a la metodología sugerida por Somasegaran y Hoben<sup>37</sup> en lo que se refiere a:

- El tiempo de desinfección de las semillas: Al tener las semillas por más tiempo en contacto con ácido sulfúrico concentrado, la corteza de la semilla se vuelve mas suave permitiendo, que el proceso de germinación sea mucho más rápido. Adicionalmente se asegura la eliminación de cualquier microorganismo y de esporas de hongos contaminantes que pueden estar presentes sobre la superficie de las semillas.
- La germinación de las semillas Al hacer germinar las semillas en las macetas, se evitó un gasto innecesario de tiempo y reactivos, ya que la bibliografía seguida, sugiere que las semillas primero se hagan germinar sobre agar nutriente durante dos días.
- Las dos inoculaciones: La primera realizada en el momento de la siembra de las semillas y la segunda, tres días después de la siembra, cuando las semillas ya habían germinado, la raíz principal alcanzaba entre 2 y 3 cm de longitud y se empezaban a observar los primeros brotes de las raíces secundarias;

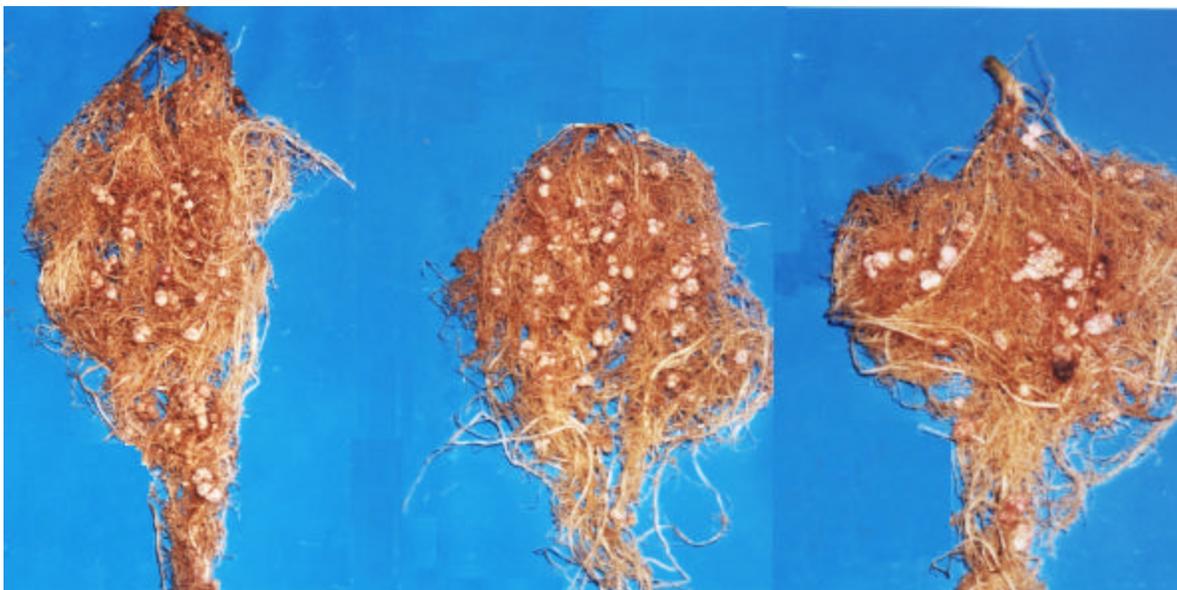
<sup>37</sup> SOMASEGRAN, P. Op cit. p 414

aseguró que el número de bacterias viables fuera suficientemente alto para que se llevara a cabo el proceso de infección.

- La adición de 10 ppm de  $\text{KNO}_3$  en la solución Jensen utilizada para regar por primera vez las materas proporcionó una pequeña fuente de nitrógeno para las bacterias, las cuales son incapaces de fijar el nitrógeno sin estar en simbiosis con la raíz y se conoce que la formación del simbiosoma o nódulo y su funcionamiento inicia hasta diez días después de la siembra, por lo tanto hay que proveer a las bacterias de una fuente externa de nitrógeno para asegurar que sobrevivan hasta que se establezca la simbiosis.

En la figura 9 se muestran raíces de los tratamientos más infectivos. El color rosado de los nódulos se debe a la presencia de la leghemoglobina, que es otro indicativo de la efectividad de los nódulos ya que se encarga de controlar los niveles de oxígeno dentro del nódulo, asegurando así el buen funcionamiento de la nitrogenasa. Los nódulos blancos no contienen leghemoglobina por lo tanto se puede decir que son inefectivos, porque la nitrogenasa no puede actuar en presencia de oxígeno. Los nódulos de coloración rosada tenue contienen leghemoglobina pero en cantidades bajas.

**Figura 9. Fotografía de raíces noduladas de los tratamientos más efectivos**



Con la parte aérea de las plantas de frijol, se determinó el peso seco para valorar la efectividad de los tratamientos. En el cuadro 4 se muestran los promedios de los pesos secos de las 5 replicas de cada tratamiento. Los literales se encontraron después de realizar el análisis de varianza y la prueba de significancia de Tukey a un límite de confianza del 95%.

**Cuadro 4. Promedio del peso seco de la parte aérea de las plantas por tratamiento**

TRATAMIENTOS	T1*	T2**	T3 301	T4 302	T5 303	T6 304	T7 305	T8 306	T9 307	T10 308	T11 309	T12 310	T13 1478	T14 1481
<b>PESO SECO PARTE AÉREA</b>	<b>6.50</b> A	<b>1.10</b> C	<b>6.08</b> A	<b>3.97</b> B	<b>1.99</b> C	<b>4.89</b> AB	<b>3.30</b> C	<b>3.90</b> B	<b>4.32</b> B	<b>6.11</b> A	<b>2.91</b> C	<b>6.09</b> A	<b>4.06</b> B	<b>3.52</b> B

\* Tratamiento con Nitrógeno

\*\*Tratamiento absoluto

Valores con literales iguales indican que no existen diferencias significativas entre ellos, se observa que los tratamientos 1, 3, 10 y 12; correspondientes al testigo nitrogenado y a los aislados 301, 308 y 310 son estadísticamente iguales, lo que indica que los aislados 301, 308 y 310 son altamente efectivas en la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. En efecto, la capacidad de una aislado para fijar nitrógeno se puede medir mediante el peso seco de la parte aérea (hojas y tallos) de la leguminosa, ya que finalmente el nitrógeno fijado por la bacteria, es aprovechado por la planta para producir sus propias proteínas y otros compuestos nitrogenados que hacen parte de su estructura fisiológica y que aportan al peso seco total de la planta.

Otras características como tamaño de la parte aérea de la planta y el color de las hojas también fueron similares a T1, testigo con nitrógeno. En la figura 10 se puede observar y comparar el desarrollo de 4 plantas inoculadas con los testigos, nitrogenado y absoluto.

Los tratamientos 5, 7 y 11 correspondientes a los aislados 303, 305 y 309 no presentan diferencias significativas con el testigo absoluto, o sea aquel que creció en total ausencia de nitrógeno. Por lo tanto, estas aislados son inefectivas en la fijación del nitrógeno, lo cual se ve corroborado por su apariencia física, ya que sus hojas presentan una coloración amarillenta y son bastante pequeñas comparadas con el testigo nitrogenado, también los nódulos blancos presentes en las raíces de estas plantas ratifican su inefectividad. Los otros tratamientos incluyendo las dos aislados introducidas presentaron una efectividad regular.

**Figura 10. Fotografía de 4 plantas inoculadas con los aislados 301, 306, 308 y 310 (de derecha a izquierda, respectivamente) seguidas por el testigo con nitrógeno y finalmente el testigo absoluto.**



Por ser los aislados LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310 los más efectivos en la fijación de nitrógeno se escogieron para ser caracterizadas por la resistencia a antibióticos y la prueba de ELISA.

#### **4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS 301, 308 Y 310 POR RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

En el cuadro 5 se presentan los patrones de resistencia/sensibilidad de las tres aislados seleccionadas a diferentes concentraciones de los antibióticos estreptomomicina (Str) y espectinomomicina (Spc).

Las columnas "número de colonias" se refiere al número de colonias resistentes encontradas en una gota de 0,03 ml de caldo de cultivo diluido hasta  $10^{-4}$ .

**Cuadro 5. Patrones de resistencia/sensibilidad de los tres aislados seleccionados a estreptomycin y espectinomycin.**

ANTIBIÓTICOS ( $\mu\text{g/ml}$ )	AISLADOS					
	301		308		310	
	# DE COLONIAS	CÉLULAS VIABLES	# DE COLONIAS	CÉLULAS VIABLES	# DE COLONIAS	CÉLULAS VIABLES
Str. 10	11	$4 \times 10^6$	18	$6 \times 10^6$	4	$1 \times 10^6$
Str. 15	7	$2 \times 10^6$	12	$4 \times 10^6$	-	-
Str. 20	-	-	4	$1 \times 10^6$	-	-
Spc. 5	15	$5 \times 10^6$	-	-	20	$7 \times 10^6$
Spc. 10	10	$3 \times 10^6$	-	-	14	$5 \times 10^6$
Spc. 15	-	-	-	-	8	$3 \times 10^6$

Los valores presentados son el promedio de 8 replicas realizadas por cada aislado y por cada concentración de los antibióticos. El numero de células viables, se refiere al numero total de mutantes resistentes que existen en 1 ml de caldo de cultivo que tiene una población aproximada de  $1 \times 10^9$  células (Apéndice 3) y que se calcula a partir del numero de colonias resistentes encontradas a cada concentración de antibiótico ensayado (Apéndice 5).

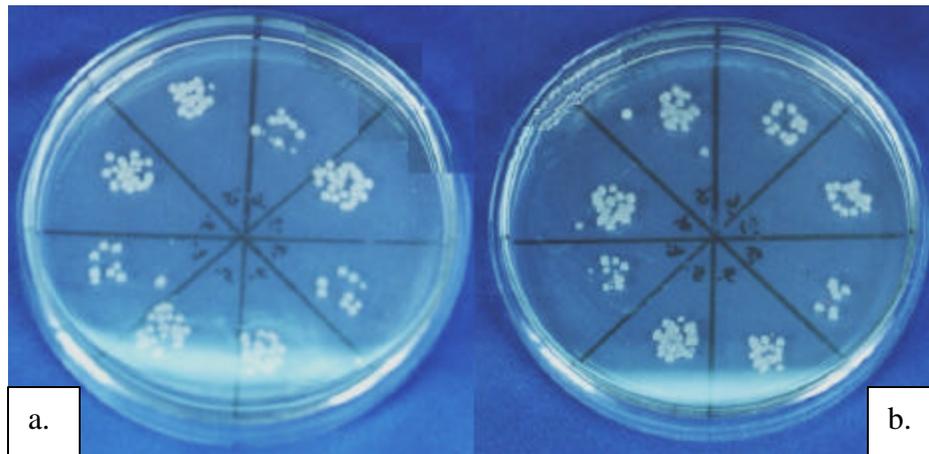
Como se puede observar, cada aislado presenta un patrón de resistencia/sensibilidad diferente frente a cada concentración de antibiótico, que permite diferenciar un aislado de otro. El aislado 301 presentó mutantes espontáneos resistentes a estreptomycin a concentraciones de 10 y 15  $\mu\text{g}$  de str/ml; pero mostró total sensibilidad a 20  $\mu\text{g}$  de str/ml. De igual manera este aislado presentó resistencia a las concentraciones mas bajas de espectinomycin (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y fue sensible a 15  $\mu\text{g}$  de spc/ml. Por lo que se puede decir que el aislado 301 posee resistencia intrínseca a estreptomycin en un rango que no supere los 15  $\mu\text{g/ml}$  y a espectinomycin en un rango no superior a los 10  $\mu\text{g/ml}$ .

El aislado 308 muestra resistencia intrínseca a estreptomycin en un rango que alcanzó los 20  $\mu\text{g/ml}$ , pero presentó total sensibilidad a espectinomycin en un rango de 5 a 15  $\mu\text{g/ml}$ .

El aislado 310 se caracterizó por presentar un gran numero de mutantes resistentes a espectinomycin en las tres concentraciones ensayadas. También presentó resistencia a estreptomycin a 10  $\mu\text{g/ml}$  pero mostró alta sensibilidad a 15 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de este antibiótico. En las figuras 11 se muestran cajas petri sembradas

por el método de goteo, con los aislados 308 y 310 en un medio que contenía estreptomomicina a 10µg/ml y espectinomomicina a 5 µg/ml, respectivamente.

**Figura 11a. Fotografía que muestran el crecimiento del aislado 308 en medio enriquecido con 10 mg de Str. / ml. Fig. 11b. Fotografía del crecimiento del aislado 310 en medio que contenía spc. 5mg/ml.**



#### **4.3 DESARROLLO DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA LOS AISLADOS 301, 308 Y 310**

La respuesta de los cuyes a la primera inoculación fue notoria: el día siguiente de la inoculación, se observó un malestar general en los animales, caracterizado por falta de apetito, inactividad y secreciones leves por nariz y ojos. Estos síntomas mejoraron al tercer día después de la inoculación, lo que indicó que los animales habían superado la infección y empezaban a crear anticuerpos contra los antígenos inoculados.

A los diez días siguientes a la primera inoculación se aplicó intraoeritonealmente una segunda inyección de refuerzo, sin que se observara ninguna reacción negativa en los animales, lo que permitió concluir que efectivamente los animales habían desarrollado anticuerpos específicos contra los aislados rizobiales LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310 aplicadas. Al recibir una nueva dosis de antígeno, la respuesta inmune de cada animal fue mayor, incrementándose así la concentración de anticuerpos en el suero. Para establecer el título de los anticuerpos en la sangre de cada animal, se tomó una muestra sanguínea de la vena yugular de cada animal.

#### **4.4 PRUEBA DE TÍTULO POR AGLUTINACIÓN**

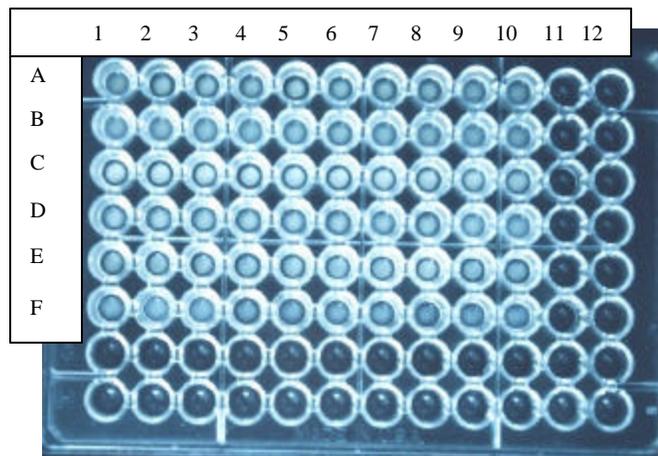
De cada muestra sanguínea se separó el suero y se diluyó tal como se indica en el punto 4.4.2. A continuación se determinó el título de cada suero. En la figura 12.

se muestra la fotografía de la placa de microtitulación en donde se desarrolló la reacción de aglutinación. Los pozos contenían diluciones de los sueros en orden ascendente, de tal manera que los pozos de la columna 1 contienen la dilución más baja correspondiente a 1/25 y los pozos de la columna 12 la dilución más alta correspondiente a 1/51200. Los pozos de la filas A y B contienen sueros específicos contra la aislado 301, los de las filas C y D, contienen antisueros de la aislado 308 y las filas E y F tienen antisueros contra la aislado 310.

La reacción de aglutinación fue positiva para todos los sueros hasta los pozos de la columna 10. Correspondiente a la dilución 1/12800. En los pozos siguientes no se observa reacción, por lo tanto en estas diluciones ya no hay una concentración de anticuerpos suficientes para reaccionar con el antígeno (los aislados rizobiales 301, 308 y 310).

El título de todos los sueros, 1/12800, indica una concentración bastante alta de anticuerpos específicos en el suero de la sangre de los cuyes, comparado con el título del suero de la sangre de conejo, con los que trabajó Triviños<sup>38</sup>, que fueron 1/1600 y 1/1800. en principio indicaría que los cuyes producen anticuerpos con un título mayor que el que producen los sueros de conejo, aunque sería necesario realizar pruebas adicionales que ratifiquen o nieguen este resultado.

**Figura 12. Reacción de título por aglutinación de los sueros obtenidos de los animales inmunizados con los aislados 301, 308 y 310.**



#### 4.5 Prueba de ELISA

La prueba de ELISA directa es un inmunoensayo enzimático, que en este trabajo se adaptó para detectar cualitativa y cuantitativamente aislados rizobiales utilizados con antígenos en cuyes (*Cavia porcellus*).

<sup>38</sup> TRIVIÑOS M. C. Op cit p 100.

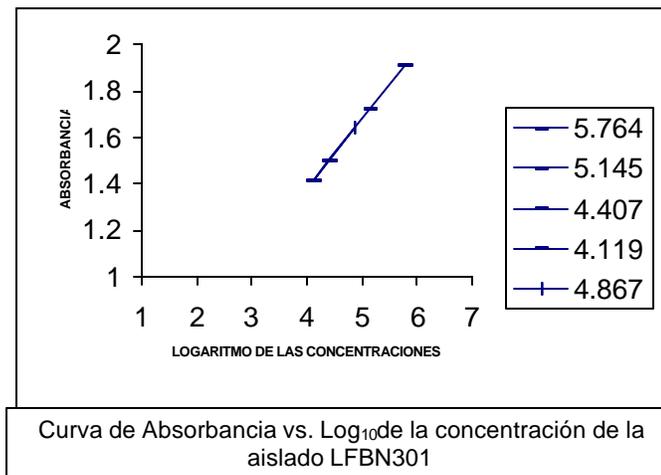
Con la prueba de ELISA se observó una reacción positiva de los anticuerpos producidos contra los tres aislados rizobiales seleccionados (LFBN 301, 308 y 310). Al agregar el p-nitrofenilfosfato (sustrato de la enzima) a los pozos de la placa de inmediato se desarrolló una coloración amarilla, la cual se debe a la formación del p-nitrofenol, producto de la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina:

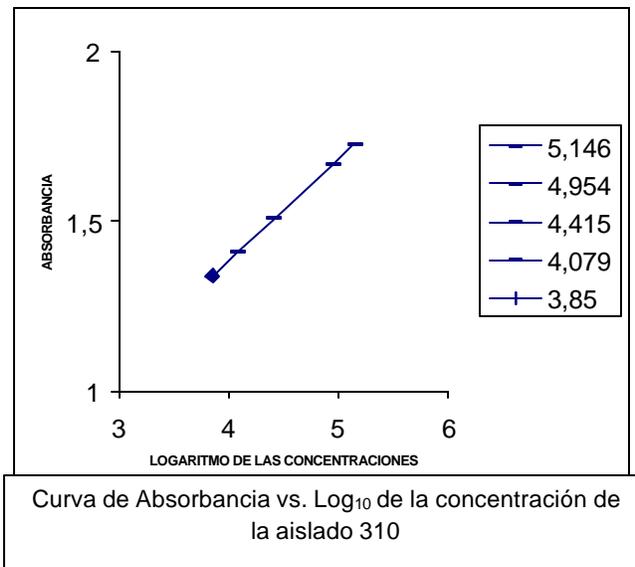
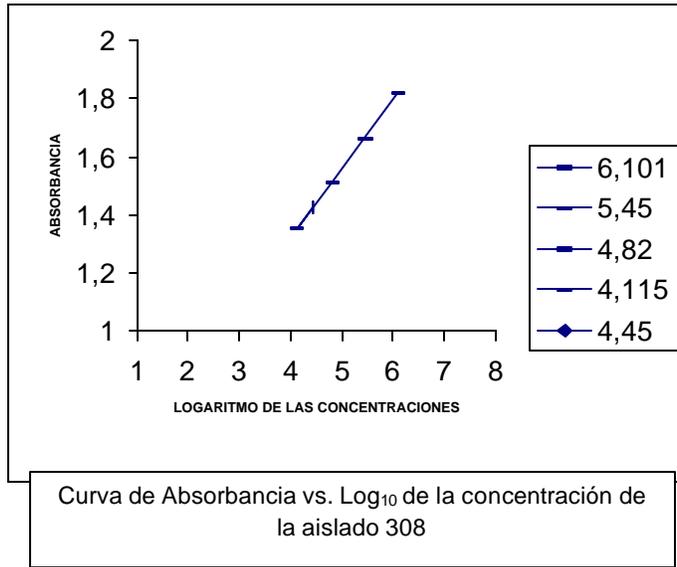
**p-Nitrofenilfosfato fosfatasa alcalina p-Nitrofenol + Fosfato**

El desarrollo de la coloración amarilla permitió establecer que la reacción es positiva y por lo tanto permite comprobar la presencia del antígeno (el aislado rizobial inoculado).

Para cuantificar la población de un nódulo radical se determinó, mediante espectrofotometría visible, la intensidad del color producido, la cual es proporcional a la cantidad de antígeno fijado a la placa.

**Figura 13. Graficas de Absorbancia vs. Concentración de antígeno**





Las rectas obtenidas (Figura 13) en los tres casos demuestran que la concentración del antígeno es proporcional a la intensidad del color producido.

El punto señalado con  $\blacklozenge$  en cada grafica, corresponde al valor del logaritmo de la concentración obtenida en el análisis del jugo nodular de cada aislado, lo que se analiza mas adelante. Los datos utilizados para realizar las graficas se muestran en el Apéndice 5, junto con la ecuación de la regresión lineal encontrada para cada aislado rizobial.

#### 4.6 ENSAYO DE LOS AISLADOS LFBN 301, LFBN 308 Y LFBN 310 MARCADAS, FRENTE A LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y LA PRUEBA DE ELISA PREPARADA

Finalmente, para comprobar que las dos técnicas, la resistencia a antibióticos y la prueba de ELISA, si permiten identificar y diferenciar los aislados LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310, se sembraron nuevamente plantas de frijol, como se describe en el punto 4.4.4.

El número de nódulos observados en los tratamientos inoculados fue bastante grande, y todos se caracterizaron por presentar una coloración rosada, lo que indica que hay presencia de leghemoglobina y que los nódulos son efectivos. Con la parte aérea se determinó el peso para compararlo con el peso del testigo nitrogenado, los valores obtenidos se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6. Promedios del peso seco encontrado en plantas inoculadas con los 3 aislados marcadas con resistencia a antibióticos**

Tramiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Peso seco	6.58 A	1.06 B	6.11 A	6.13 A	6.03 A	6.14 A	6.05 A

T1= Testigo con nitrógeno

T2=Testigo absoluto sin inoculante y sin N<sub>2</sub>

T3= LFBN 301 resistente a 15µg str/ml

T4= LFBN 301 resistente a 10µg spc/ml

T5= LFBN 308 resistente a 20 µg str/ml

T6= LFBN 310 resistente a 10µg str/ml

T7= LFBN 310 resistente a 15 µg spc/ml

Los datos presentados en la Tabla anterior son el promedio de tres replicas por tratamiento. Valores con literales iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas a un limite de confianza del 95% (Apéndice 4). Como se puede observar, los tratamientos con inoculante (T3,T4,T5,T6 y T7) resultaron estadísticamente iguales a T1, o sea al testigo al que se le suministro nitrógeno durante su desarrollo. Los datos de la tabla 6 indican que los aislados rizobiales al ser tratadas con los antibióticos estreptomycin y espectinomycin no perdieron su efectividad ni tampoco se afecto su infectividad.

Después de establecer la infectividad y efectividad de los aislados, se caracterizó cada aislado teniendo en cuenta los patrones de resistencia/sensibilidad que cada uno de los aislados rizobiales presentó. Se realizaron aislamientos de los nódulos directamente sobre los medios enriquecidos con los antibióticos ensayados, todos los aislamientos se caracterizaron por presentar crecimiento rápido (2 días con incubación a 27 °C) y colonias típicas de color blanco lechoso, muy gomosas, suaves y brillantes.

Cuando se realizaron los aislamientos sobre medio LMA enriquecido con las concentraciones de los antibióticos a las cuales presentaron sensibilidad, efectivamente no se observó crecimiento. Además, se inocularon estos aislados en medios enriquecidos con mezclas de los dos antibióticos, sin que se observara crecimiento. Por lo tanto, los patrones de resistencia/sensibilidad encontrados en los tres aislados permiten separarlas, identificarlas y hacer un seguimiento fácil de ellas si se utilizan para inoculaciones en campo.

Los nódulos obtenidos de esta siembra, también se utilizaron para ser ensayados frente a la prueba de ELISA preparada. El jugo nodular fue utilizado como antígeno y después de desarrollar la prueba de ELISA tal como se describió en el punto 4.4.3 se observó una reacción positiva para los tres aislados, indicando que realmente los aislados inoculados y responsables de la fijación del nitrógeno en la planta son las mismas que desencadenaron la producción de anticuerpos en los animales inoculados. Además, se comprobó que las mutaciones espontáneas de las bacterias a nivel genético para generar resistencia a los antibióticos, en nada afectan los determinantes antigénicos contra los cuales se dirige la acción de los anticuerpos, ya que a pesar de haber utilizado como antígeno los aislados marcados con la resistencia a antibióticos, los anticuerpos que generaron los cuales reconocieron los determinantes antigénicos uniéndose a ellos.

En el cuadro 7 se muestra el peso de los nódulos utilizados para realizar la prueba, la absorbancia obtenida y la concentración aproximada de bacterias presente en cada nódulo, la que se calculó a partir de la curva obtenida en la estandarización de la prueba.

**Cuadro 7. Peso de los nódulos utilizados para la Prueba de ELISA, la absorbancia obtenida y la concentración bacteriana aproximada.**

AISLADOS	PESO DE NÓDULOS (g)	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN BACTERIAL APROXIMADA
LFBN 301	0.098	1.641	$7.3 \times 10^3$
LFBN 308	0.075	1.428	$2.8 \times 10^3$
LFBN 310	0.046	1.333	$7 \times 10^2$

Los nódulos de la aislado LFBN 310 utilizados para esta prueba, fueron pequeños, por eso presentan el peso más bajo y era de esperar que también tuvieran la concentración bacteriana más baja, como efectivamente se comprobó. Con esto también se verificó la alta sensibilidad de la prueba, ya que fue capaz de detectar una concentración más baja que las utilizadas para la estandarización de la prueba. Los valores de concentración bacteriana que se encontraron se corroboraron por conteo en cámara de Neubauer y efectivamente se encontraron las mismas concentraciones. Por tanto la prueba de ELISA si es eficiente para detectar tanto cualitativa como cuantitativamente antígenos rizobiales.

Adicionalmente se estableció que no existieron reacciones cruzadas entre los aislados. Por lo tanto, los determinantes antigénicos de cada aislado son completamente diferentes. Se comprueba que por medio de la prueba de ELISA los aislados LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310 pueden ser identificadas y diferenciadas en cualquier momento.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se aislaron y purificaron 10 aislados rizobiales. De ellas, tres (LFBN 301, LFBN 308, LFBN 310) resultaron ser muy efectivas por lo cual podrían ser utilizadas como inoculantes en el campo.
2. Los aislados autóctonos LFBN resultaron ser más infectiva y efectivas que los aislados introducidas provenientes de la universidad de Minnesota.
3. Las modificaciones realizadas a la metodología sugerida por Somasegaran y Hoben (1994) en cuanto a la desinfección de las semillas, su germinación, su inoculación y la adición de 10 ppm de KNO<sub>3</sub> en la solución Jensen, dieron buenos resultados, por lo que se las puede recomendar para futuros trabajos en este campo.
4. Se introdujeron en el medio regional dos nuevas técnicas para el reconocimiento de microorganismos; la resistencia a antibióticos y la prueba de ELISA directa.
5. Los diferentes patrones de resistencia sensibilidad que presentaron los aislados LFBN 301, LFBN 308, LFBN 310 frente a los antibióticos espectinomycin y estreptomycin permitieron identificarlas y diferenciarlas.
6. Se recomienda el uso de cuyes (*cavia porcellus*) para la producción de anticuerpos específicos contra aislados rizobiales por ser animales de fácil manejo que producen sueros con títulos bastante altos en comparación con los conejos.
7. La prueba de ELISA directa se adaptó en este trabajo para la detección de antígenos rizobiales. Permite detectar cualitativa y cuantitativamente estos antígenos, además se caracteriza por ser altamente sensible y específica para los aislados LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310 ya que permitió identificarlas, diferenciarlas y estimar la concentración bacteriana presente en el jugo nodular.

## 6. PERSPECTIVAS

1. Preparar previos ensayos de campo, un inoculante para fríjol, con los aislados rizobiales efectivas (LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310). Para determinar su capacidad de adaptación a las condiciones agronómicas bajo las cuales se cultiva normalmente el fríjol y además verificar si a través de la fijación biológica de nitrógeno se incrementa la producción del cultivo. Si estas aislados cumplen con estas dos condiciones se podrían utilizar como un inoculante comercial.
2. Adaptar las técnicas utilizadas en este trabajo, resistencia a antibióticos y la prueba de ELISA directa, a la identificación de otros microorganismos de importancia.
3. Realizar pruebas comparativas con los anticuerpos contra aislados rizobiales producidas por cuyes, conejos y eventualmente otras especies animales para determinar cual provee una mejor respuesta inmunológica.
4. Establecer perfiles de plásmidos de los aislados ya que muchas de las funciones relacionadas con la fijación biológica de nitrógeno, la resistencia a antibióticos y la formación de pigmentos, están controladas por los genes contenidos en los plasmidos.

## BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, O. y ALLEN, E. The leguminosae. University of Wisconsin press, Madison. London : Macmillan Publishing Company, 1991. 185 p.
- BASUALDO, J. y TORRES, J. Microbiologia Biomedica. Bacteriologia, micologia, virologia, parasitologia e inmunologia. Buenos aires : Atlante S.R.L, 1996. 200 p
- BEYNON, J. Demonstration of heterogeneity in a natural population of rhizobium phaseoli using variation in intrinsic antibiotic resistance. J. Gen. Microbiol. 1980. 442 p.
- BIRCHARD, S. SHERDING, R. manual clínico de pequeñas especies. V 2. México : McGraw Hill-Interamericana, 2000 230 p.
- CASTILLO, F. y CARDEMAS, J. Biología molecular de la fijación simbiótica del nitrógeno. Perspectivas biotecnológicas. España : Servicio de publicaciones Universidad de Córdoba, 1990. 306 p
- FREIBERG, F. PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. Londres : Nature, 1997. 437 p.
- GUERRERO, J. y G. CALDERÓN. Modelos experimentales para el estudio de la relación hospedero-parásito. 1 ed. s I : UNMSM-IVITA-American society for microbiology. 1985. 285 p.
- HARDY, R. y HAVELKA, U. In Symbiotic nitrogen fixation in plants (ed. P.S. Nutman) USA : Cambridge University Press, 1996. 200 p.
- HOYOS, G; ROZO, L. y RAMIREZ, M. Estudio de las fases tempranas de la asociación simbiótica leguminosa-Rhizobium. En : Revista suelos ecuatoriales. Vol. 27. 1997.
- HUHEEY, J.; KEITER, E. y KEITER, R. Química inorgánica. Principios de estructura y reactividad. 4 ed. Mexico : Oxford University Press. Harla, 1997. 913 p
- IAÑEZ, E. Curso de Microbiología General. Resistencia Bacteriana a los Antibióticos. España : Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 1998. 100 p.
- JOKLI, W. et al. Zinsser Microbiología. Buenos Aires : Medica Panamericana. 1994. 650 p.

LEON, S. y ZUÑIGA, D. Aislamiento y caracterización de mutantes de *bradyrhizobium* sp. (*Phaseolus lunatus*) resistentes a estreptomicina y espectinomicina. España : s n, 1997. 150 p.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Gobernación de Nariño. Secretaría de Agricultura. Consolidado Agropecuario Acuicola y Pesquero. Sección Informática y Estadística 2001.

NOTI, J. DUDAS, A. Isolation and characterization of nodulating genes from *Bradyrhizobium hedysary* in different rhizobium species. *FEMS Microbiol. Ecology* 1995. 190 p

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Los Alimentos y Salud. Barcelona : Salvat, 1987. 430 p.

PELCZAR, M.J. Elementos de Microbiología. ESC Chan. Mexico : McGraw-Hill, 1984. 400 p.

PEREZ, S. y TORALBA, A. La fijación del nitrógeno por los seres vivos. En : Seminario fisiología vegetal. Facultad Biología Oviedo. 1997. 21:1-21.

PUTNOKY, et al. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* 1990.

SOMASEGARAN, P. HOBEN, H. Methods in legume-rhizobium technology. University of Hawaii NifTAL project and MIRCEN. Department of Agronomy and Soil Science Hawaii. Institute of Tropical Agriculture and Human Resources College of Tropical Agriculture and Human Resources. 450 p

SPAINK, H.P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol. The Netherlands* : 54:257-288. 2000.

SPAINK, H.P., A. KONDOROSI, AND P. HOOYKAAS. The rhizobiaceae: Molecular Biology of model plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands : 1998.

Sumption, K.J. ELISA test for antibody detection in veterinary diagnosis: exercises and examples. Central for Tropical Vet. Med. University of Edingurg. 1996. 150 p.

TIZARD, J. Inmunología Veterinaria. México : McGraw Hill-Interamericana. 2000. 300 p.

TORRALBA A. y PEREZ E. La fijación de nitrógeno por los seres vivos. En : Seminario de fisiología vegetal. Facultad de Biología . Oviedo. 1997

TRIVIÑOS M. C. Aplicación de la técnica de ELISA en la identificación de aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. vicia. Bogotá : Tesis de pregrado Dpto. de Química. Universidad Nacional de Colombia. 1992. 150 p.

VARGAS E. Aspectos microbiológicos de la fijación simbiótica de nitrógeno por el *rhizobium*. Bogotá : Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Dirección Agroológica. 1969. 250 p.

WANG, T.; MARTINEZ, J. y LOPEZ, L. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México D.F. : Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Autónoma de México. 2001. 480 p.

YANG, G. et al. Structure of the Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated N-acyl substitutions. *Mol. Microbiol.* 34:227-237. 1999.

## **Apéndice A. Condiciones de asepsia recomendadas**

Todos los materiales de vidrio y los medios de cultivo, sin excepción, se esterilizaron en autoclave ---- a 121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos.

Las soluciones de antibióticos utilizadas para enriquecer los medios de cultivo se esterilizan por filtración al vacío a través de un filtro milipor estéril, con un tamaño de poro de 0.20 micras; cuando el medio LMA o LM este a una temperatura aproximada de 50°C se adiciona al medio la cantidad necesaria de la solución de antibiótico para obtener la concentración adecuada.

Para condiciones de asepsia optimas se trabaja siempre en una cámara de flujo laminar, también se utiliza un mechero bunsen para esterilizar en su llama asas y pinzas metalicas.

## Apéndice B. Medios de cultivo y soluciones.

### MEDIO DE LAVADURA MANITOL ( LM)

Manitol	10.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.0 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0 ml
NaCl	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agua destilada	1 litro

### MEDIO LEVADURA, MANITOL, AGAR (LMA)

Medio de levadura, manitol	1 litro
Agar nutriente	20 g

### MEDIO LMA CON ROJO CONGO

Solución patrón: 0.25 g de rojo congo / 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada  
Se agregaron 10 ml de patrón por 1 litro de LMA  
Concentración final de rojo congo: 25 ppm

### MEDIO LMA CON ANTIBIÓTICOS

#### ESTREPTOMICINA (str)

Solución patrón: 400mg str/ 100 ml agua ( 4 mg str/ ml)

#### ESPECTINOMICINA (spc)

Solución patrón: 1.25 g spc/ 50 ml agua (25 mg spc/ml)

### MEDIO BERGERSEN PARA CULTIVAR RHIZOBIUM QUE SERA USADO COMO ANTIGENO

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.25 g
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.1 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.01 g
Glutamato de sodio	1.10 g
Manitol	10.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1 litro

## MEDIO JENSEN (SOLUCIÓN NUTRIENTE PARA LEGUMINOSAS)

Cantidades usadas por litro de solución preparada

CaHPO <sub>4</sub>	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl <sub>3</sub>	0.1 g
Solución patrón de micronutrientes	1.0 ml

## SOLUCIÓN PATRÓN DE MICRONUTRIENTES

Cantidades de reactivos por litro de solución:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.780 g
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.540 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.210 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	4.360 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	5.000 g
CoSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.004 g
Ácido láctico (88%)	580.0 ml
Agua destilada	420.0 ml

## SOLUCIONES PARA TEÑIDO DE GRAM. (Vincent, 1970)

Solución 1: Solución cristal violeta

Cristal violeta	10 g
Oxalato de amonio	4 g
Etanol	100 ml
Agua destilada	400 ml

Solución 2: Solución de Yodo

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Etanol	25 ml
Agua destilada	100 ml

Solución 3: Etanol al 95%

Solución 4: Revelador

Safranina al 2.5% en etanol	10 g
Agua destilada	100 g

## Determinación de las reacciones de teñido de Gram. en bacterias de Rhizobium

1. Hacer manchas delgadas con las bacterias sobre un porta objetos y fije al calor.
2. Teñir las manchas con la solución 1 durante 1 minuto.
3. Lavar ligeramente con agua y agregar la solución 2.
4. Escurrir inmediatamente y agregar de nuevo la solución 2, durante 1 minuto.
5. Escurrir la solución 2 y decolorar con la solución 3, durante 60 segundos.
6. Lavar con agua y secar la mancha cuidadosamente.
7. Restituir el teñido con la solución 4 durante 5 minutos.
8. Lavar con agua y secar al aire.

Observar la preparación bajo aceite de inmersión, con el objetivo de 100.

## SOLUCIONES BUFFERS PARA LA PRUEBA DE ELISA

### BUFFER DE CARBONATO Y BICARBONATO 0.05 M (PH 9.6)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

Disolver en 1 litro de agua destilada; almacenar a 4 °C, no por mas de 2 semanas

### BUFFER DE DIETANOLAMINA AL 10% (Buffer sustrato - enzima para ELISA)

Dietanolamina	97 ml
NaN <sub>3</sub>	0.2 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	100 mg

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el PH a 9.8 con HCl. Aforar a 1 litro con agua destilada, almacenar en un recipiente ámbar a temperatura ambiente.

### PBS, 0.015 M (pH 7.4)

NaCl	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	2.9 g
KCl	0.2 g
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

Disolver en 1 litro de agua destilada y almacenar a 4 °C.

PBS-Tween

Tween 20

0.5 ml

Disolver en un 1 litro de PBS a almacenar a 4 °C

### **Apéndice C. Estimación de la concentración celular por siembras en fondo**

Prepare soluciones seriadas de los caldos de cultivo como se explica en el esquema 2 (pag.28). Para conseguir un rango contable para conteo en cajas de 30 a 300 células/ml se realizan las diluciones hasta  $10^{-8}$ . Una vez realizadas las diluciones del caldo de cultivo se transfiere asépticamente 1 ml a una caja petri estéril. Abra la caja de petri solo lo suficiente para permitir que la pipeta entre y libere la muestra. Similarmente transfiera alícuotas de 1 ml , por duplicado a partir de diluciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  en otras cajas petri.

Vierta 15 a 20 ml de LMA asépticamente sobre cada una de las suspensiones celulares en las cajas de petri. Para dispersar las células uniformemente, se mueve en forma suave cada caja. Deje que el agar solidifique, invierta las cajas e incube a 27 °C. Para calcular la concentración celular del caldo original, multiplique el número promedio de colonias por el factor de dilución y por el volumen del inóculo (1 ml).

## Apéndice D. Análisis estadístico

### Determinación de la Infectividad por conteo de nódulos

#### CUADRO ORDENADO DE DATOS

T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
1104	727	691	795	456	1000	778	1170	816	1040	817	792
1100	734	695	788	462	993	775	1185	812	1048	826	804
1108	726	686	800	459	996	764	1168	814	1045	812	806
1107	730	676	790	454	993	779	1175	814	1053	820	798
1103	733	682	802	462	985	774	1177	806	1039	810	790
3.20*	3.53*	7.44*	6.08*	3.57*	3.50*	5.95*	6.67*	3.84*	5.78*	6.40*	5.98*

\*Desviación estándar de los datos dentro de cada tratamiento

T3= aislado 301

T4= aislado 302

T5= aislado 303

T6= aislado 304

T7= aislado 305

T8= aislado 306

T9= aislado 307

T10= aislado 308

T11= aislado 309

T12= aislado 310

T13= aislado 1468

T14= aislado 1478

Numero de replicas 5

Unidades experimentales 60

Variable a evaluar: Infectividad (numero de nódulos)

#### ANALISIS DE VARIANZA

##### ANDEVA DISEÑO DIA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR CALCULADO	VALOR TABULADO
TRATAMIENTOS	11	2187305.93	198845.99	20.38 *	2.00 *
ERROR	48	468130.25	9752.71		
TOTAL	59	2655436.18			

\* Si existen diferencias estadísticamente significativa.

##### PRUEBA DE TUKEY

Comparador, este calculo se realizó con el 95% de confiabilidad y el 99% de significancia.

C= A x B

A= valor tabla de Tukey 5.96

B=

44.16

**C= 263**

## CUADRO DE DOBLE ENTRADA

	T7 459	T5 686	T4 730	T9 774	T6 795	T14 798	T11 812	T13 817	T8 993	T12 1045	T3 1104	T101175
T10 1175	716*	489*	445*	401*	380*	377*	363*	358*	177	130	71	0
T3 1104	645*	418*	374*	330*	309*	306*	292*	287*	111	59	0	
T12 1045	586*	359*	315*	271*	250	247	233	228	181	0		
T8 993	534*	307*	263	219	198	195	181	176	0			
T13 817	358*	131	87	43	22	19	5	0				
T11 812	353*	126	82	38	17	14	0					
T14 798	339*	112	68	68	3	0						
T6 795	336*	109	65	21	0							
T9 774	315*	88	44	0								
T4 730	217	44	0									
T5 686	227	0										
T7 459	0											

El valor indicado debajo de cada tratamiento es el promedio

### Determinación de la efectividad por peso seco

#### ANALISIS DE VARIANZA

$$H_0 = \mu_{T1} = \mu_{T2} = \mu_{T3} = \mu_{T4} = \mu_{T5} = \mu_{T6} = \mu_{T7} = \mu_{T8} = \mu_{T9} = \mu_{T10} = \mu_{T11} = \mu_{T12} = \mu_{T14}$$

$$H_1 = \mu_{T1} \neq \mu_{T2} \neq \mu_{T3} \neq \mu_{T4} \neq \mu_{T5} \neq \mu_{T6} \neq \mu_{T7} \neq \mu_{T8} \neq \mu_{T9} \neq \mu_{T10} \neq \mu_{T11} \neq \mu_{T12} \neq \mu_{T13} \neq \mu_{T14}$$

## CUADRO ORDENADO DE DATOS

### TRATAMIENTOS

T1 = Testigo control      T2 = Testigo absoluto      T3 = Aislado 301  
 T4 = Aislado 302      T5 = Aislado 303      T6 = Aislado 304  
 T7 = Aislado 305      T8 = Aislado 306      T9 = Aislado 307  
 T10 = Aislado 308      T11 = Aislado 309      T12 = Aislado 310  
 T13 = Aislado 1468      T14 = Aislado 1478

Numero de replicas 5  
 Unidades experimentales 70  
 Variable efectividad (peso seco)

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
6.21	0.98	6.05	3.98	1.11	5.62	3.50	3.98	4.01	6.23	2.37	6.05	3.84	3.27
6.83	1.19	5.93	4.65	2.23	4.21	2.31	4.26	4.80	6.12	3.41	6.10	4.24	3.43
6.68	1.10	6.10	4.31	1.43	5.53	3.29	3.21	3.73	6.01	2.75	6.95	3.65	3.41
6.72	1.02	6.21	3.69	2.97	4.41	3.64	3.96	4.62	6.15	3.39	6.03	4.02	3.56
6.10	1.23	6.09	3.22	2.25	4.71	3.77	4.11	4.45	6.07	2.63	6.90	4.56	3.93
6.50*	1.10*	6.08*	3.97*	1.99*	4.98*	3.30*	3.90*	4.32*	6.11*	2.91*	6.09*	4.06*	3.52*

\* Valores de la desviación estándar

### ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR CALCULADO	VALOR TABULADO
TRATAMIENTOS	13	169.2	13.01	32.52*	1.92*
ERROR	57	22.95	0.40		
TOTAL	70	192.15			

\*Existen diferencias estadísticamente significativas.

### PRUEBA DE TUKEY

Comparador, este calculo se realizo con el 95% de confiabilidad y el 99% de significancia.

C= A x B

A= valor tabla de Tukey 4.94

B= 0.28

**C= 1.3**

### CUADRO DE DOBLE ENTRADA

	T2 1.10	T5 1.99	T11 2.91	T7 3.30	T14 3.52	T8 3.90	T4 3.97	T13 4.06	T9 4.32	T6 4.89	T3 6.08	T12 6.09	T10 6.11	T1 6.50
T1 6.50	5.4*	4.51	3.59	3.2	1.98	2.6	2.53	2.44	2.18	1.61	0.42	0.41	0.39	0
T10 6.11	5.01	4.12	3.2	2.81	2.59	2.21	2.14	2.05	1.79	1.22	0.03	0.02	0	
T12 6.09	4.99	4.1	3.18	2.79	2.57	2.19	2.12	2.03	1.77	1.2	0.01	0		
T3 6.08	4.98	4.09	3.17	2.78	2.56	2.18	2.11	2.02	1.76	1.19	0			
T6 4.89	3.79	2.9	1.98	1.59	1.37	0.99	0.92	0.83	0.57	0				
T9 4.32	3.22	2.33	1.41	1.02	0.8	0.42	0.35	0.26	0					
T13 4.06	2.96	2.07	1.15	0.76	0.54	0.16	0.09	0						
T4 3.97	2.87	1.98	1.06	0.67	0.45	0.07	0							
T8 3.90	2.8	1.91	0.99	0.6	0.38	0								
T14 3.52	2.42	1.53	0.61	0.22	0									
T7 3.30	2.2	1.31	0.69	0										
T11 2.91	1.81	0.92	0											
T5 1.99	0.89	0												
T2 1.10	0													

**T1 = T3 = T12 = T10** El valor que se muestra debajo de cada tratamiento es el promedio.

Determinación de la Efectividad de las cepas LFBN 301, LFBN 308 y LFBN 310 marcadas con resistencia a antibióticos

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
6.63	1.09	6.08	6.13	6.02	6.15	5.99
6.54	0.98	6.45	6.19	5.98	6.08	6.05
6.59	1.11	6.11	6.09	6.10	6.20	6.12
6.58*	1.06*	6.11*	6.13*	6.03*	6.14*	6.05*

\*Promedios del peso seco de las tres réplicas de cada tratamiento

Numero de replicas: 3

Unidades experimentales: 21

Variable: Efectividad (por peso seco de la parte aérea)

## ANALISIS DE VARIANZA

### ANDEVA DISEÑO DIA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR CALCULADO	VALOR TABULADO
TRATAMIENTOS	6	67.86	11.31	157.08*	2.85
ERROR	14	1.02	0.072		
TOTAL	20	68.88			

\* Existen diferencias estadísticamente significativas.

### PRUEBA DE TUKEY

Comparador, este calculo se realizo con el 95% de confiabilidad y el 99% de significancia.

C= A x B      A= valor tabla de Tukey 4.83      B=      0.155  
**C= 0.74**

**CUADRO DE DOBLE ENTRADA**

	T1 6.58	T6 6.14	T4 6.13	T3 6.11	T7 6.05	T5 6.03	T2 1.06
T2 1.06	5.52	5.08	5.07	5.05	4.99	4.97	0
T5 6.05	0.55	0.11	0.1	0.08	0.02	0	
T7 6.03	0.53	0.09	0.08	0.06	0		
T3 6.11	0.47	0.03	0.02	0			
T4 6.13	0.45	0.01	0				
T6 6.14	0.44	0					
T1 6.58	0						

**T1=T6=T4=T7=T5**

Los valores mostrados debajo de cada tratamiento, son los promedios.

### Apéndice E. Regresión lineal de los datos obtenidos en la prueba de ELISA

Los datos presentados a continuación son el promedio de dos replicas realizadas por concentración, para la aislado LFBN 301

X= Log <sub>10</sub> de la concentración bacteriana	Y= Absorbancia	Concentración bacteriana
5.764	1.912	5.8x10 <sup>4</sup>
5.145	1.725	1.3x10 <sup>4</sup>
4.407	1.502	2.5x10 <sup>3</sup>
4.119	1.415	1.3x10 <sup>3</sup>
4.867*	1.641*	7.3x10 <sup>3*</sup>

\*Son los valores obtenidos en el análisis del jugo nodular

**Ecuación:  $A = 0.302x C + 0.170$**

Por lo tanto, conociendo la absorbancia de una muestra que contenga antígenos rizobiales de la aislado LFBN 301, se puede calcular su concentración.

Los datos presentados a continuación son el promedio de dos replicas realizadas por concentración, para la aislado LFBN 308

X= Log <sub>10</sub> de la concentración bacteriana	Y= Absorbancia	Concentración bacteriana
6.101	1.822	1.2x10 <sup>5</sup>
5.45	1.665	2.8x10 <sup>4</sup>
4.82	1.515	6.6x10 <sup>3</sup>
4.115	1.354	1.3x10 <sup>3</sup>
4.45*	1.428*	2.8x10 <sup>3*</sup>

\*Son los valores obtenidos en el análisis del jugo nodular

**Ecuación:  $A = 0.236x C + 0.381$**

Por lo tanto, conociendo la absorbancia de una muestra que contenga antígenos rizobiales de la aislado LFBN 308, se puede calcular su concentración.

**Los datos presentados a continuación son el promedio de dos replicas realizadas por concentración, para la aislado LFBN 310**

X= Log <sub>10</sub> de la concentración bacterial	Y= Absorbancia	Concentración bacterial
5.146	1.727	1.4x10 <sup>4</sup>
4.954	1.666	9x10 <sup>3</sup>
4.415	1.509	2.6x10 <sup>3</sup>
4.079	1.411	1.2x10 <sup>3</sup>
3.85*	1.339*	7x10 <sup>2</sup> *

**\*Son los valores obtenidos en el análisis del jugo nodular**

**Ecuación:  $A = 0.294x C + 0.207$**

Por lo tanto, conociendo la absorbancia de una muestra que contenga antígenos rizobiales de la aislado LFBN 310, se puede calcular su concentración.