

TOLERANCIA DE RIZOBIOS AL ESTRÉS ABIÓTICO, EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Nery L. Santillana Villanueva

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Agrarias

Programa de Investigación en Pastos y Ganadería

E-mail: nery.santillana@unsch.edu.pe

RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad de tolerancia de cepas de rizobios sometidos a factores de estrés, en condiciones de laboratorio. Cinco cepas de rizobio aisladas de pastizales altoandinos fueron sometidas a los siguientes factores de estrés (altas concentraciones de NaCl, varios niveles de temperatura, resistencia a antibióticos, tolerancia a diferentes pH, tolerancia a niveles altos de iones metálicos Cu^{2+} y Mn^{2+} y crecimiento en diferentes fuentes de carbohidrato). Los resultados fueron evaluados mediante el análisis de cluster o conglomerados utilizando el programa estadístico MINITAB versión 16. Se determinó que las cepas evaluadas no son tolerantes al estrés salino (100-600 mM de NaCl), tampoco a temperaturas extremas (6 y 38°C). Se observó tolerancia a la presencia de iones metálicos de Cu y Mn, a pH ácidos (5) y alcalinos. La cepa H1 fue resistente al cloranfenicol y a la penicilina, la cepa E4, a lincomicina y kanamicina, la cepa Q26, a ampicilina, lincomicina y estreptomycin. Las cepas E4, M16 y Q10 son capaces de utilizar 30 y 31 fuentes de carbohidratos, mientras que las cepas H1 y Q26, dos y 11 carbohidratos respectivamente. En base a las características evaluadas las cepas se conglomeraron en dos grupos. El grupo I formado por las cepas H1 y Q26 con 76% de similitud y el grupo II formado por las cepas E4, M16 y Q10 con 95% de similitud. En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que las cepas evaluadas pueden ser importantes en el desarrollo de leguminosas, ya que pueden ayudar a las plantas a enfrentar diferentes tipos de estrés abiótico.

Palabras clave: Rizobios, tolerancia, estrés abiótico.

TOLERANCE OF RIZOBIOS TO ABIOTIC STRESS, IN LABORATORY CONDITIONS

ABSTRACT

The research was carried out with the objective of evaluating the tolerance capacity of strains of rhizobia subjected to stress factors, under laboratory conditions. Five strains of rhizobium isolated from natural high-andean pastures were subjected to various stress factors (high concentrations of NaCl, various temperature levels, resistance to antibiotics, tolerance to different pH, tolerance to high levels of metal ions Cu^{2+} and Mn^{2+} and growth in different carbohydrate sources). The results were evaluated by cluster analysis or clusters using the statistical program MINITAB version 16. The evaluated strains are not tolerant to salt stress (100-600 mM NaCl), they are not tolerant to extreme temperatures (6 and 38 °C). They are tolerant to the presence of metal ions Cu and Mn, are tolerant to acidic (5) and alkaline pH. The H1 strain is resistant to chloramphenicol and penicillin. Strain E4 is resistant to lincomycin and kanamycin. Strain Q26 is resistant to ampicillin, lincomycin and streptomycin. The strains E4, M16 and Q10 are able to use 30 and 31 carbohydrate sources, while the strains H1 and Q26, two and 11 carbohydrates respectively. Based on the evaluated characteristics, the strains conglomerated into two groups. Group I formed by strains H1 and Q26 with 76% similarity and group II formed by strains E4, M16 and Q10 with 95% similarity.

Keywords: Rhizobia, tolerance, abiotic stress.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos están expuestos a diferentes tipos de estrés, los cuales pueden ser originados por la actividad del hombre o causas naturales como la contaminación del aire, sequía, alta y baja temperatura, intensidad luminosa y limitaciones nutricionales, (Acuayte-Valdés et al. S/F). En los ecosistemas naturales las bacterias se enfrentan a cambios continuos en las condiciones ambientales que inducen el desarrollo de diferentes estrategias de supervivencia que aseguren su éxito. En el caso de las bacterias autóctonas, el desarrollo de mecanismos de adaptación condiciona su capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles (Orruño et al. 2016). En el caso de los rizobios, los factores abióticos más estresantes incluyen variaciones de la temperatura, limitación en la disponibilidad de nutrientes o exposición a agroquímicos, salinidad, etc.

La búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a disminuir

los costos de la producción agrícola, cuidar el ambiente y lograr un desarrollo sostenible obliga a estudiar la posibilidad de utilizar el potencial que tienen las bacterias que nodulan en las raíces de las leguminosas. El seleccionar cepas autóctonas con alta capacidad de competencia puede ser ventajoso a la hora de pensar en utilizar los rizobios aislados y propios como biofertilizantes. Esto constituiría una posible alternativa para el enriquecimiento de los suelos con potencial agrícola (Cuadrado et al. 2009).

La presente investigación se desarrolló con el objetivo general de evaluar la capacidad de tolerancia de cepas de rizobios sometidos a factores de estrés, en condiciones de laboratorio. Los objetivos específicos fueron los siguientes: -Determinar la capacidad de tolerancia al estrés salino, a la presencia de metales pesados, a temperaturas y pH extremos en condiciones de laboratorio, - Evaluar la capacidad de adaptación en medios con diferentes fuentes de carbohidrato y nitrógeno en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Área de ubicación del estudio
La investigación se realizó en el laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga ubicado en la Pampa del Arco a 2750 msnm.
- Material Biológico
Cepas de Rizobios
- Tratamientos
05 cepas de rizobio
07 factores de estrés
- Diseño Experimental
El ensayo se condujo en el diseño completamente al azar con dos repeticiones por tratamiento
- Metodología
- ✓ Tolerancia a altas concentraciones de NaCl
La tolerancia a altas concentraciones de NaCl, se realizó sembrando las cepas en medio Levadura Manitol Agar (LMA) con diferentes concentraciones finales de NaCl (Santillana 2007). Fueron incubadas a 25°C y evaluadas cada 24 horas hasta los 4 días.
- ✓ Tolerancia a varios niveles de temperatura
Las cepas fueron estriadas en el medio LMA e incubadas a diferentes temperaturas: 6, 12, 38 y 28 °C (control), se evaluaron cada 24 horas por 4 días.
- ✓ Resistencia a antibióticos
La resistencia a antibióticos se verificó sembrando alícuotas de 100 mL de inóculo a placas con medio LMA. Sobre esta siembra se colocaron discos de antibióticos, a razón de 4 discos por placa y se incubaron a 25 °C por 4 días. La evaluación se efectuó considerando el diámetro de los halos de inhibición alrededor de los discos, los que fueron comparados con una tabla de diámetros límites para ser considerados resistentes o susceptibles.
Los antibióticos y las concentraciones respectivas se indican a continuación: Ampicilina (10mcg), Doxiciclina (30mcg), Cloranfenicol (30mcg), Eritromicina (15mcg), Lincomicina (2mcg), Estreptomina (10mcg), Kanamicina (30mcg), Penicilina (10 UOF),
- ✓ Tolerancia a diferentes pH
Las cepas fueron estriadas por duplicado en el medio LMA con pH ajustados a 4, 5, 8, 9 y 6.8 (control). La incubación se realizó a 25 °C y la evaluación cada 24 horas por 4 días.
- ✓ Tolerancia a niveles altos de iones metálicos Cu²⁺ y Mn²⁺.
Para evaluar la tolerancia a niveles altos de iones metálicos, las cepas fueron sembradas en medio de cultivo con diferentes concentraciones de dichos iones y pH inicial de 5. Para Cu se utilizó 10 mgmL⁻¹, 20mgmL⁻¹ y 40mgmL⁻¹ de CuSO₄. 5 H₂O; para Mn, se utilizó 0.31 mgmL⁻¹, 0.625 mgmL⁻¹, 1.25 mgmL⁻¹, de MnSO₄. H₂O. La incubación se realizó a 28°C y fueron evaluadas cada 24 horas por 7 días
- ✓ Crecimiento en diferentes fuentes de Carbohidrato.

La evaluación del crecimiento de las bacterias en diferentes fuentes de carbohidrato se realizó utilizando el KIT KBOO9 HiCARBOHIDRATE que consiste en un sistema de ensayo completo que se puede utilizar para estudiar el perfil bioquímico de una amplia variedad de organismos. Cada kit es un sistema de identificación colorimétrica estandarizado evaluando treinticinco pruebas de utilización de carbohidratos. Las pruebas se basan en el principio de cambio de pH y la utilización de sustratos.

El estudio se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante que consiste en hacer crecer las bacterias a evaluar en caldo nutritivo, luego inocular cada pocillo con 50 uL del crecimiento bacteriano, mediante el método de inoculación de superficie. Incubar a 30°C por 24 horas. La interpretación de los resultados se realizó utilizando la carta de interpretación del fabricante.

- Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados mediante el análisis de cluster o conglomerados utilizando el programa estadístico MINITAB versión 16.

Este tipo de análisis puede ofrecer una visión detallada de la variación de las bacterias dentro de una especie o entre diferentes especies y reconocer rasgos característicos de cada especie (Cardoso et al.2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presenta los resultados de la tolerancia de las cepas de rizobios a altas concentraciones de NaCl. Castellane y Lemos, (2007) indican que la evaluación de la tolerancia a la salinidad es un paso clave en el proceso de selección de rizobios debido a que la salinidad es un factor que puede inhibir su crecimiento.

En la presente investigación se determinó que todas las bacterias evaluadas no son tolerantes a altas concentraciones de cloruro de sodio. Asimismo, Santillana (2007) indica que cepas de rizobio aisladas de *Vicia faba* no fueron tolerantes a concentraciones elevadas de NaCl.

Al respecto, Sánchez y Arguello (2006) indican que las bacterias difieren en la capacidad de utilizar el cloruro de sodio, tal es así que *Vibrio alginolyticus*, y *Vibrio metschnikovii* capturaron sodio en todas las concentraciones (0.05, 0.3 y 0.65 M de NaCl), mientras que *Flavimonas oryzihabitans* y *Agrobacterium tumefaciens* fueron variables, y la bacteria que no capturó ningún ión sodio en las sales fue *Serratia marcescens*.

Las cepas evaluadas también fueron diferentes en términos de tolerancia a diversas temperaturas (Tabla 1), en general las cepas evaluadas no crecieron a 6°C. Las cepas H1 y Q10 tuvieron entre regular a poco crecimiento respectivamente, a 12°C. La cepa Q26 tuvo poco crecimiento a 38°C. La temperatura óptima de estas bacterias es 28°C. Los resultados obtenidos indican que los rizobios evaluados no son tolerantes a altas temperaturas. Estos resultados concuerdan con Quiñones et al. (2011) quienes indican que los rizobios generalmente no muestran crecimiento a temperaturas altas porque por encima de 28°C se produce una reducción significativa en la fijación de nitrógeno, se conoce muy poco sobre los mecanismos implicados en ese descenso en la actividad nitrogenasa dependiente de la temperatura, Gomes et al. (2012) indican que la tolerancia a

condiciones extremas de temperatura puede estar asociada con un control genético específico que confiere tal habilidad a las bacterias.

Tabla 1. Resultados de la tolerancia de cepas de rizobio al estrés abiótico.

Evaluaciones	Cepas de rizobio				
	H1	E4	M16	Q10	Q26
Concentraciones de NaCl (mM)					
Control	+++	+++	+++	+++	+++
100	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-
300	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-
600	-	-	-	-	-
Temperatura (°C)					
6	-	-	-	-	-
12	++	-	-	+	-
28	+++	+++	+++	+++	+++
38	-	-	-	-	+
Resistencia a antibióticos					
Ampicilina	S	S	ND	R	ND
Doxiciclina	S	S	ND	S	ND
Cloranfenicol	R	S	ND	S	ND
Eritromicina	S	S	ND	S	ND
Lincomicina	S	R	ND	R	ND
Kanamicina	S	R	ND	S	ND
Penicilina	R	S	ND	S	ND
Estreptomicina	S	S	ND	R	ND
pH					
4	-	-	-	-	-
5	+++	++	++	++	++
6.8	+++	++	++	++	++
8	+++	++	++	++	++
9	+++	++	++	++	++
Iones metálicos Cu ²⁺ (ugmL ⁻¹)					
10	+++	++	++	++	++
20	+++	++	++	++	++
40	+++	+	++	++	++
Iones metálicos Mn ²⁺ . (ugmL ⁻¹)					
0.31	+++	++	+++	+++	+++
0.625	+++	++	+++	+++	+++
1.25	+++	++	+++	+++	+++

+++ : Crecimiento normal; ++ : Crecimiento regular; +: Poco crecimiento;
 - : Sin crecimiento
 R: resistente; S: susceptible; ND: no determinado

Benidire et al. (2018), determinaron correlación directa entre el contenido de trealosa en las cepas de rizobio y la capacidad de osmotolerancia, asimismo indican que la capacidad de tolerancia de las cepas de rizobio a altas concentraciones de NaCl y altas temperaturas (más de 30°C) se debe a la presencia de los genes *otsA* y *kup* que posiblemente no fueron expresados en los rizobios evaluados.

Se determinó que las cepas evaluadas fueron susceptibles a la doxiciclina y a la eritromicina (Tabla 1). La cepa H1 fue susceptible a la ampicilina, lincomicina, Kanamicina y estreptomicina y resistentes al cloranfenicol, y penicilina. La cepa E4, fue también susceptible a la ampicilina, cloranfenicol, penicilina y estreptomicina, resistente a la lincomicina y kanamicina. La cepa Q26 fue susceptible cloranfenicol, kanamicina y penicilina, resistente a

ampicilina, lincomicina y estreptomina. La diversidad de respuesta de las cepas frente a los antibióticos, es una característica que es utilizada para la identificación, y clasificación taxonómica de los rizobios, así como para estudios de serología o como marcadores de cepas empleados en estudios ecológicos (Madigan et al. 1998). Los mecanismos de acción de los antibióticos frente a las bacterias son diversos: Inhiben la síntesis de la pared celular (Penicilina, Vancomicina, Cefalosporina), interfieren la síntesis de proteínas (Tetraciclina, Espectinomina, Gentamicina, Cloranfenicol, Estreptomina, Kanamicina, Eritromicina, Lincomicina), inhiben la replicación del ácido nucleico (Norfloxacin, Acido nalidixico) (Madigan et al. 1998).

Referente a los resultados del crecimiento de cepas de rizobios sometidos a diferentes pH se ha observado que todos los rizobios evaluados no crecieron a pH 4 indicando que no son tolerantes al mencionado pH, sin embargo, se ha observado que a pH 5 todas las bacterias mostraron crecimiento normal. En el resto de pH, 6.8, 8 y 9 el crecimiento de las bacterias fue regular, excepto en la bacteria H1 que tuvo buen crecimiento, estos resultados indican que las bacterias evaluadas son tolerantes a pH alcalinos (Tabla 1). Benidire et al. (2018) mencionan correlación positiva entre la tolerancia y adaptación de rizobios a condiciones alcalinas y altas temperaturas, resultados que no fueron observados en el presente experimento, ya que los rizobios evaluados no toleraron altas temperaturas, seguramente porque las condiciones

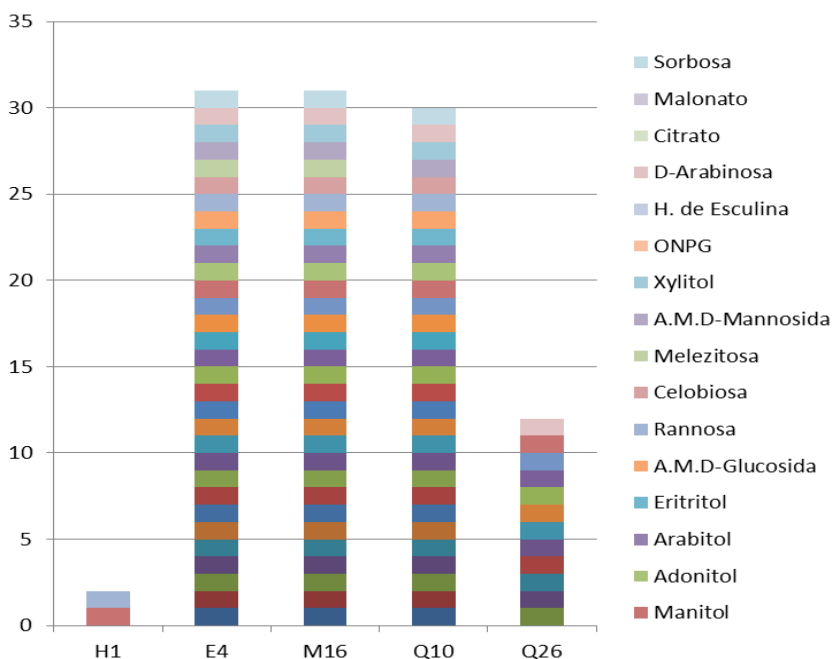
climáticas de los lugares de donde fueron aisladas las cepas de rizobios son diferentes.

Se observó que los rizobios evaluados tienen la capacidad de tolerar los niveles evaluados de Cu²⁺ y Mn²⁺ (Tabla 1). La tolerancia a diferentes metales pesados es una característica de algunas cepas de rizobio por lo que Broos et al. (2005) y Carrasco et al. (2005) sugieren el empleo de cepas de Rhizobium como una herramienta para la biorremediación de suelos contaminados.

En la Figura 1 se muestra la habilidad de las bacterias de utilizar diferentes fuentes de carbohidrato. La cepa H1 utilizó solamente dos fuentes de carbohidrato de las 35 evaluadas, la cepa Q26, 11 carbohidratos, mientras que las cepas E4, M16 y Q23 utilizaron entre 30 y 31 fuentes de carbohidrato.

Zhu Yun Yao et al. (2002) entre otros indican que las cepas de Rhizobium de crecimiento rápido son hábiles para usar diversos componentes como fuente de carbono y nitrógeno, que les permite ser caracterizadas y diferenciadas dentro de un género.

La utilización de azúcares o alcohol azúcares a menudo resulta en la acidificación del medio con producción de ácidos orgánicos como productos parciales de oxidación, mientras que el uso de ácidos orgánicos o aminoácidos conduce a la alcalinización, debido al intercambio de ácidos orgánicos/OH o de liberación de amonio (Castro et al. 2000).



A.M.D-Glucosida =Alfa metil D-Glucosida
 A.M.D-Mannosida= Alfa metil D-Mannosida
 ONPG= actividad Beta galactosidasa

Figura 1: Uso de fuentes de carbohidratos por cepas de rizobio

Al realizar el análisis de componentes principales considerando las 65 variables evaluadas, se determinó que el primer componente principal tiene una varianza de 3.30 y explica el 66% de la variación total en los datos. El segundo componente principal (varianza 1.11) explica el 22 % de la

variación total de los datos. Los dos primeros componentes principales con varianzas iguales a los valores propios mayores que 1 representan el 88% de la variabilidad total, lo que sugiere que los dos componentes principales explican adecuadamente la variación en los datos.

Las cepas H1 y Q26 presentan variabilidad semejante ya que tienen cargas positivas en el primer y segundo componente, mientras que las cepas Q10, E4 y M16 tienen cargas positivas en el primer componente y cargas negativas en el segundo componente, por lo que presentan variabilidad semejante. (Figura 2).

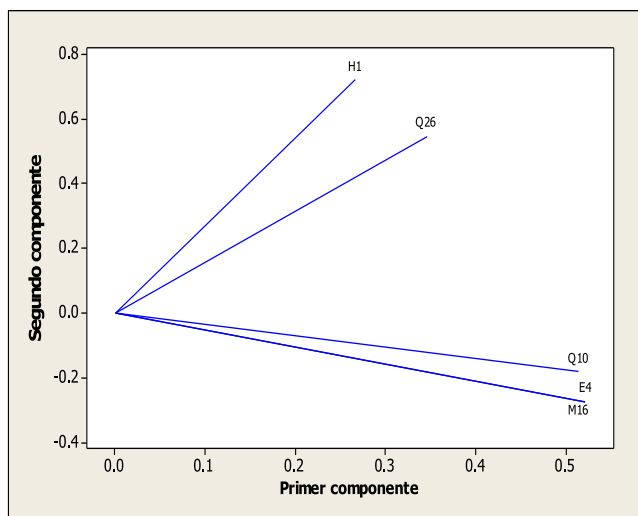


Figura 2: Análisis de componentes principales de 65 variables evaluadas

En la Figura 3 se presenta el análisis de conglomerados (Dendrograma), en la que se observa dos agrupaciones a 62% de similitud. La primera agrupación, formada por las cepas H1 y Q26 con 76% de semejanza entre ellas, estas cepas se caracterizan porque no son tolerantes a altas concentraciones de NaCl, tampoco a temperaturas extremas, son tolerantes a pH por encima de 5 hasta 9 y a iones metálicos, utilizan entre dos y 11 fuentes de carbohidrato. La segunda agrupación formada por las cepas E4, M16 y Q10 con 95% de semejanza, como en el caso anterior, no son tolerantes a altas concentraciones de NaCl, tampoco a temperaturas extremas, son tolerantes a pH por encima de 5 hasta 9 y a iones metálicos, utilizan entre 30 y 31 carbohidratos.

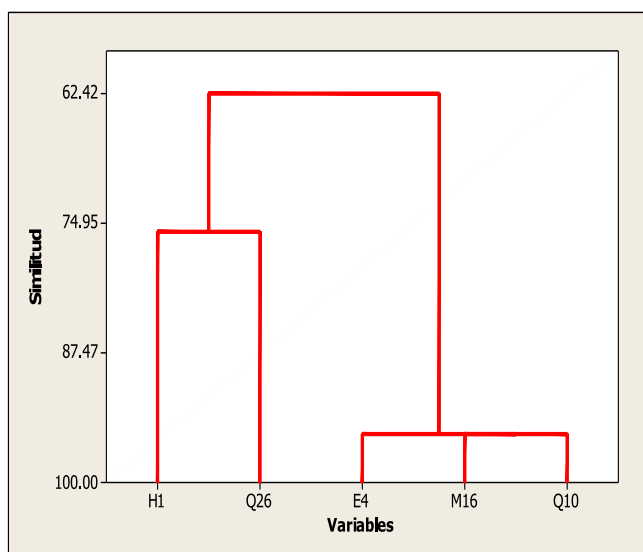


Figura 3: Dendrograma de cepas de rizobio evaluadas a través de 65 variables.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que las cepas evaluadas pueden ser importantes en el desarrollo de leguminosas, ya que cuentan con diferentes estrategias que ayudan a las plantas a enfrentar diferentes tipos de estrés abiótico, como tolerancia a pH alcalinos, toxicidad por metales pesados de Cu y Mn, resistencia a antibióticos, utilización de diferentes fuentes de carbohidratos. Estas estrategias posiblemente se deben a mecanismos como la regulación de fitohormonas, resistencia sistémica inducida (ISR), producción de antioxidantes, degradación del etileno, entre otros que les ayuda a mitigar el estrés (Palacio-Rodríguez et al. 2016).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuayte-Valdés M C, Tijerina-Chávez L, Hernández-López JC (SF) Respuesta del Maíz y Frijol al estrés hídrico y salino. *Hidrociencias*, Colegio de Postgraduados. Estado de México. México.

Benidire L, Lahrouni M, Daoui K, Fatemi Z, Gomez RC, Göttfert M, Oufdou K (2018) Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology* 41, 51–61

Broos K, Beyens H, Smolders E (2005) Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biology and Biochemistry*. 37, 573-579

Cardoso A, Andraus M, Oliveira T, Garcia C, de Brito E (2017) Characterization of rhizobia isolates obtained from nodules of wild genotypes of common bean. *Brasilian Journal of Microbiology* 48: 43–50

Carrasco J, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes A, Lopez R, Chamber M, Palomares A (2005) Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollas pyrite mine. *Soil Biology & Biochemistry* xx, 1-10

Castellane TCL, Lemos EGM (2007) Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. *Pesq Agrop Bras.* 42:1503–1506.28

Castro S, Glenn A, Dilworth M (2000) Substrate selection as a possible strategy for amelioration of acid pH by *Rhizobium leguminosarum* biovar. viciae. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1039-1041

Cuadrado B, Rubio G, Santos W (2009) Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 38 (1), 78-104

Gomes DF, Batista JSS, Schiavon AL, Andrade DS, Hungria M (2012) Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: identification of conserved and specific responses to heat stress. *BMC Microbiol.* 12:1–12.27

Madigan M, Martinko J, Parker J (1998) Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Prince Hall Iberia, Madrid. 1064 p.

Orruño M, Kaberdin VR, Arana I (2016) Respuesta bacteriana al estrés. *sem@foro*, num.61, junio 2016. Especial de Microbiología del medio acuático, España.

Palacio-Rodríguez R, Ramos P, Coria-Arellano J, Nava-Reyes B, Sáenz-Mata J (2016) Mecanismos de las PGPR para mitigar el Estrés Abiótico de plantas. *Árido-Ciencia 2016 Vol. 1 (1):4-11*

Quiñones M, Manrique E, Ochoa-Hueso R, Herrera-Cervera J (2011) Estrategias para mejorar la tolerancia a estreses abióticos de la simbiosis leguminosa – rizobio. En: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos, Capítulo 08. España.

Sánchez LC y Arguello AH (2006) Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in Vitro y su posible aplicación en bioremediación en suelos salinos-sódicos. Nova - Publicación Científica – I SSN: 1794-2470 Vol.4 No. 6: 110-114.

Santillana N (2007) Caracterización fenotípica, simbiótica y capacidad PGPR de cepas de rizobio aislados de *Pisum sativum* bv. macrocarpum y *Vicia faba*. (Tesis doctoral). UNALM, Lima.

Zhu Yun Yao, Feng Ling Kan, En Tao Wang, Ge Hong Wei, Wen Xxin Chen (2002) Characterization of rhizobio that nodulate legume specie of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2219 -2230