



# Comunicación corta

## TOLERANCIA A LA ACIDEZ DE RIZOBIOS PROVENIENTES DE NÓDULOS DE *Canavalia ensiformis*

### Short comunicaty

### Acidity tolerance of rhizobia from *Canavalia ensiformis* nodules

**Ionel Hernández Forte<sup>1✉</sup>, María C. Nápoles García<sup>1</sup>,  
Pedro R. Rosales Genqui<sup>1</sup>, Juan F. Ramírez Pedroso<sup>2</sup>  
y Sheyla Ponte Betancourt<sup>3</sup>**

**ABSTRACT.** The biofertilization of legumes with tolerant acidity rhizobia would allow a better establishment of these plants in acid soils. The objective of this study was to determine the acidity tolerance of rhizobia isolated from *Canavalia ensiformis* nodules. Five rhizobia isolates were used and their growth capacity at different acidity levels was performed. A second assay was performed where the pH influence on the viable cells number was determined. The statistical software Statgraphics version 5.0 was used to process the second test data. A simple classification variance analysis was performed and the means were compared for the Tukey test. All microorganisms grew at pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 and 5,5. The isolates Can4 and Can6 had a higher viable cells number at pH 4,5 than pH 6,8. Both isolates are promising to improve the *Canavalia ensiformis* establishment on cuban acid soils.

*Key words:* forage legumes, simbiosis, acid soil

## INTRODUCCIÓN

*Canavalia ensiformis* (canavalia) es una leguminosa forrajera que presenta rendimientos altos en granos y en forraje, en condiciones edafoclimáticas favorables. En Cuba constituye una de las especies más utilizadas como abono verde (1,2). Esta leguminosa se cultiva mayormente en suelos dedicados a la ganadería, los cuales se caracterizan por su acidez,

**RESUMEN.** La biofertilización de leguminosas con rizobios tolerantes a la acidez permitiría un mejor establecimiento de estas plantas en suelos ácidos. El objetivo del presente trabajo fue determinar la tolerancia a la acidez de aislados de rizobios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*. Se emplearon cinco aislados de rizobios y se determinó la capacidad de crecimiento de los microorganismos en diferentes niveles de acidez. Se realizó un segundo ensayo donde se evaluó la influencia del pH en el número de células viables. El programa estadístico Statgraphics versión 5.0 se empleó para procesar los datos del segundo ensayo. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y las medias se compararon a través del test de Tukey. Todos los microorganismos crecieron a pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5. Los aislados Can4 y Can6 presentaron un mayor número de células viables a pH 4,5 que a pH 6,8. Ambos aislados resultan promisorios para mejorar el establecimiento de *Canavalia ensiformis* en suelos cubanos afectados por la acidez.

*Palabras clave:* leguminosas forrajeras, simbiosis, suelo ácido

condición limitante que afecta más del 30 % de los suelos cubanos (3).

La capacidad de canavalia de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con los rizobios favorece el crecimiento de otros cultivos acompañantes, incrementando el valor nutritivo de los mismos (4-6). La biofertilización de canavalia con rizobios obtenidos de nódulos de esta planta y adaptados a condiciones de acidez en el suelo, mejoraría su establecimiento en el campo. Basado en lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar la tolerancia a la acidez de aislados de rizobios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta postal No.1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32700

<sup>2</sup> Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Cascajal

<sup>3</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana

✉ ionel@inca.edu.cu

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cinco aislados de rizobios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*, efectivos en la Fijación Biológica de Nitrógeno. Estas plantas estuvieron cultivadas en suelos ácidos de Cascajal, Villa Clara. La caracterización cultural, morfológica y fisiológica de los aislados permitió clasificarlos como posibles miembros de la familia *Rhizobiaceae* (7).

### TOLERANCIA A LA ACIDEZ EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se realizaron dos ensayos. En el primero, los aislados se cultivaron por agotamiento en medio manitol-extracto de levadura (LM) sólido (8), a diferentes pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5). Se empleó pH 6,8 como control del experimento. Las placas se incubaron a  $28 \pm 1$  °C durante cinco días y se determinó la presencia de crecimiento bacteriano. Para el segundo ensayo, se prepararon inoculantes con los aislados de rizobios en medio LM líquido con pH 4,5 y pH 6,8 (control). Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) a las 20 h de cultivo. El conteo se realizó mediante el método de las diluciones seriadas, las cuales se cultivaron por diseminación en placas con medio LM sólido.

Los datos procedentes del primer ensayo no tuvieron procesamiento estadístico porque se trató de un análisis cualitativo. Los del segundo ensayo se procesaron a través del paquete estadístico Statgraphics versión 5.0, 2000 (9). Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple. Las medias se compararon a través del test de Tukey para un 5 % de significación (10), después de verificarse que cumplían con el ajuste de distribución normal (Bartlett) y de homogeneidad de varianzas (Kormogorov-Smirnov) (11). Se utilizó el programa SigmaPlot 2001 para graficar los datos (12).

## RESULTADOS

En la Tabla se muestra el comportamiento de los aislados de rizobios. Estos microorganismos presentaron un crecimiento similar en los diferentes valores de pH.

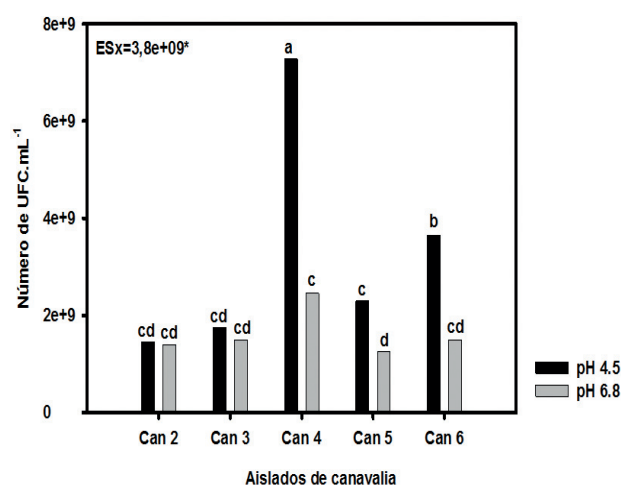
El efecto de las condiciones de acidez en el número de células viables de los aislados de rizobios se observa en la Figura.

Solo se observaron diferencias significativas entre el número de células viables de Can4 y Can5 en pH 6,8. Sin embargo, ambos aislados junto a Can6 presentaron un número de células viables significativamente superior en pH 4,5 que en pH 6,8. El aislado Can 4 tuvo el mayor número de células viables en pH 4,5.

**Tabla. Crecimiento de los aislados de rizobios en medio LMA con diferentes niveles de acidez**

Material microbiano	Nivel de acidez (pH)					
	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,8 (control)
Can2	+	+	+	+	+	+
Can3	+	+	+	+	+	+
Can4	+	+	+	+	+	+
Can5	+	+	+	+	+	+
Can6	+	+	+	+	+	+

Leyenda: (+), crecimiento



Letras comunes no difieren significativamente (Tukey,  $p < 0,05$ )

**Figura. Número de células viables de los aislados de rizobios en medio LMA con pH 4,5 y 6,8**

## DISCUSIÓN

Los cinco aislados de rizobios resultaron tolerantes a las condiciones de acidez que se evaluaron (3,5-5,5) ya que presentaron un crecimiento similar al control (Tabla). Estos microorganismos pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*, la cual agrupa a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Ensifer* (13,14). En la literatura se ha discutido sobre la tolerancia que presentan algunas especies del género *Rhizobium* a las condiciones de acidez en el medio (15,16).

La acidez del suelo puede limitar el crecimiento de las comunidades de rizobios en la rizosfera y también su capacidad de infectar la planta (17). De ahí la importancia de seleccionar cepas cuyo crecimiento no se afecte negativamente en suelos con esta limitante.

Al analizar el efecto de la acidez en el número de células viables, Can4 y Can6 presentaron una mayor capacidad para mantenerse viables a pH 4,5 que a pH 6,8 (Figura). Esto pudiera indicar la presencia de mecanismos que les permite a estos microorganismos sobrevivir en condiciones de acidez.

Los suelos de la región de Cascajal, Villa Clara se caracterizan por su acidez con valores cercanos a pH 4,7 (3).

Esta característica constituye un factor decisivo en la tolerancia a la acidez de los aislados estudiados. Se ha informado acerca de la selección que condiciones estresantes como la acidez en los suelos ejercen sobre las poblaciones de rizobios, lo cual favorece a aquellas mejor adaptadas y competitivas en la simbiosis (18).

## CONCLUSIÓN

La tolerancia a pH ácidos de los aislados Can4 y Can6 hace que constituyan microorganismos promisorios para mejorar el establecimiento de *Canavalia ensiformis* en suelos cubanos afectados por la acidez.

## BIBLIOGRAFÍA

- Martín GM, Rivera R. Efecto económico de la rotación canavalia-maíz y de la sustitución parcial de fertilizantes minerales. *Cultivos Tropicales*. 2015;36(3):34-9.
- Martín GM. Mineralización del nitrógeno de la *Canavalia ensiformis* en un suelo Ferralítico Rojo de La Habana. *Cultivos Tropicales*. 2013;25(3):83-8.
- Hernández A, Ascanio MO, Morales M, León A. La historia de la clasificación de los suelos de Cuba. La Habana, Cuba: Félix Varela; 2006. 98 p.
- Padovan MP, Carneiro LF, Felisberto G, Nascimento JS, et al. Maize grown in succession to green manure under agro-ecology based systems. *Agro@ambiente*. 2015;9(4):377-85.
- Jaiarree S, Chidthaisong A, Tangtham N, et al. Carbon budget and sequestration potential in a sandy soil treated with compost. *Land Degradation & Development*. 2014;25(2):120-9.
- Lenkala P, Rani KR, Sivaraj N, et al. Genetic variability and character association studies in Jack bean (*Canavalia ensiformis* (L) DC) for yield and yield contributing traits. *Electronic Journal of Plant Breeding*. 2015;6(2):625-9.
- Hernández I, Pérez G, Nápoles MC, et al. Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 2012;33(3):27-33.
- Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *International Programme Handbook*, Oxford England: Blackwele Scientific Publications; 1970.
- Statistical Graphics Corp. STATGRAPHICS® Plus [Internet]. 2000. (Profesional). Available from: <http://www.statgraphics.com/statgraphics/statgraphics.nsf/pd/pdpricing>
- Tukey JW. Bias and confidence in not quite large samples. *The Annals of Mathematical Statistics*. 1958;29(2):614-23.
- Sigarroa A. *Biometría y Diseño Experimental*. Ciudad de La Habana, Cuba: Pueblo y Educación; 1985. p. 319-28.
- Systat Software Inc. SigmaPlot® - Scientific Data Analysis and Graphing Software [Internet]. San Jose, CA, US; 2001. Available from: <http://sigmaplot.co.uk/products/sigmaplot/produpdates/prod-updates7.php>
- Berrada H, Fikri-Benbrahim K. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *British Microbiology Research Journal*. 2014;4(6):616-39.
- Ormeño-Orrillo E, Servín-Garcidueñas LE, Rogel MA, et al. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and applied microbiology*. 2015;38(4):287-91.
- Kolhey S, Patel R, Dash D, Chowdhury T. Detection and characterization of Albizia procera-Rhizobium for stress tolerance. *International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar)*. 2014;9(2):349-52.
- Wibberg D, Tejerizo GT, del Papa MF, et al. Genome sequence of the acid-tolerant strain *Rhizobium* sp. LPU83. *Journal of biotechnology*. 2014;176:40-1.
- Soares BL, Ferreira PAA, Oliveira-Longatti SM, et al. Cowpea symbiotic efficiency pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. *Scientia Agricola*. 2014;71(3):171-80.
- Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, et al. Low pH Changes the Profile of Nodulation Factors Produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chemistry & Biology*. 2005;12(9):1029-40.

Recibido: 14 de enero de 2016

Aceptado: 9 de febrero de 2017