

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y AMBIENTALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Métodos de identificación de especies de *Rhizobium*

**Monografía previa a la obtención del título de
Licenciada en Microbiología**

ALLISON LISBETH OQUENDO ACOSTA

Quito, 2025

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Monografía de la carrera de Licenciatura en Microbiología, de la Srta. Allison Lisbeth Oquendo Acosta ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna

Tutora de la monografía

Quito, 09 de julio del 2025

1 DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre, la persona que me ha acompañado en cada paso de este trayecto, en los momentos donde mi determinación comenzó a flaquear y me animo a seguir adelante dándome fortaleza. Mi padre que estuvo presente durante todo mi camino, comprendiendo mi esfuerzo, trayectoria y las dificultades que enfrenté. Su apoyo silencioso y constante ha sido el pilar que me permitió seguir adelante. A mis amados abuelos Rosa y Carlos que me dieron los valores de la persona que soy hoy en día. Ellos que sentaron las bases de mi deseo de explorar el conocimiento y comprender el mundo. Por el amor que me brindaron sin dudarlo y su infinita confianza a las decisiones que tome desde que era una niña. A ellos que me amaron cada día y me llenaron de momentos de felicidad. A mi mejor amiga Ana, que me escucho, compartió mis alegrías y tristezas. Al siempre apoyarme, guiarme y darme el mejor consejo de esforzarme en todo lo que me proponga. A Dios por darme esta maravillosa vida y familia que han estado presente en todo momento sin dudarlo, capaces de darlo todo sin pedir nada a cambio. Dedico este trabajo a mi alma gemela Juan que estuvo a mi lado incondicionalmente, a él que nunca dudo de mí y me hizo sentir capaz de conquistar todo reto que se me ponga en el camino. Este trabajo es dedicado a mí, por seguir a pesar de las dudas, desvelos, lágrimas. A mí, que superé cada adversidad y no cerré mis ojos ante la duda o el miedo, esta fortaleza que tengo se me es otorgada por Dios y la vida.

2 AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi tutora Jeniffer Yáñez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de laboratorio. En especial, por ser una guía tanto a nivel personal y académico que no dudo en ningún momento de brindar un consejo. Agradezco a mis tutores por guiarme en el mundo de la microbiología, impulsarme a preguntarme que más hay sobre los estudios microbiológicos. A mis amigos que estuvieron conmigo, compartiendo momentos de felicidad y dificultades, pero siempre brindando una mano de consuelo o de ayuda cuando era necesario. A mi abuela Rosa por creer en mi desde niña y reflejar en sus ojos la confianza sin ningún rasgo de duda.

TABLA DE CONTENIDOS

1	DEDICATORIA	III
2	AGRADECIMIENTOS.....	IV
3	RESUMEN	1
4	ABSTRACT	2
5	INTRODUCCIÓN	4
6	OBJETIVOS.....	8
6.1	OBJETIVO GENERAL	8
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
7	MARCO TEÓRICO.....	9
7.1	FERTILIZANTES NITROGENADOS	9
7.1.1	FUENTE DE NITRÓGENO NATURAL	9
7.1.2	FUENTE DE NITRÓGENO SINTÉTICOS.....	10
7.1.3	FUENTE DE MATERIA ORGÁNICA	11
7.2	RHIZOBIUM.....	12
7.3	MÉTODOS TRADICIONALES ESPECIFICOS PARA IDENTIFICAR A <i>Rhizobium</i>	13
7.3.1	BIOPROSPECCIÓN DE NÓDULOS	13
7.3.2	TINCIÓN GRAM DE <i>Rhizobium</i>	14
7.3.3	TOLERANCIA A NaCl	15
7.4	MEDIOS DE CULTIVO	15
7.4.1	AISLAMIENTO DE <i>Rhizobium</i> EN AGAR YMA + ROJO CONGO.....	15

7.4.2	AISLAMIENTO DE <i>Rhizobium</i> EN AGAR MACCONKEY	17
7.4.3	AISLAMIENTO DE <i>Rhizobium</i> EN AGAR LLA.....	18
7.4.4	AISLAMIENTO DE <i>Rhizobium</i> EN AGAR PGA	19
7.5	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	20
7.5.1	PRUEBA DE OXIDASA.....	20
7.5.2	PRUEBA DE CATALASA	20
7.5.3	PRUEBA DE CITRATO DE SIMMONS	21
7.6	PRUEBAS INMUNOLÓGICAS PARA IDENTIFICAR <i>Rhizobium</i>	21
7.6.1	TÉCNICA SÉROLOGICA DE AGLUTINACIÓN	21
7.6.2	TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN PARA IDENTIFICAR A <i>Rhizobium</i>	22
7.6.3	TÉCNICA ELISA PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE <i>Rhizobium</i>	23
7.7	MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAR A <i>Rhizobium</i>	24
7.7.1	FUNDAMENTOS.....	24
7.8	APLICACIÓN DE PCR DEL GEN 16S EN <i>Rhizobium</i>	26
7.9	PCR-RFLP PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOVARES DE CEPAS DE <i>Rhizobium</i>	27
7.10	SOUTHERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOVARES DE CEPAS DE <i>Rhizobium</i> 29	
7.11	ARDRA.....	29
7.12	BOX-PCR Y REP-PCR	29
7.13	SECUENCIACIÓN	30
7.14	ENFOQUE METATRANSCRIPTÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Rhizobium</i>	31

7.15	MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE <i>Rhizobium</i> ..	32
7.16	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Rhizobium</i> MEDIANTE PLÁSMIDOS.....	33
8	CONCLUSIONES	34
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
10	FIGURAS	¡Error! Marcador no definido.

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Tinción de Gram de <i>Rhizobium</i> observada al microscopio óptico.....	14
Figura 2. Procedimiento para el aislamiento de <i>Rhizobium</i> a partir de los nódulos.....	16
Figura 3. Aislamiento de colonias en YMA + Rojo Congo	17
Figura 4. Aislamiento de colonias en MacMonckey	18
Figura 5. Aislamiento de colonias en Agar LLA + reactivo de Benedict	19

3 RESUMEN

Las especies del género *Rhizobium* son bacterias aerobias, Gram-negativas que tienen la capacidad de formar relaciones simbióticas con plantas leguminosas específicas. Lo realizan mediante la formación de nódulos en las raíces de las plantas. Estas estructuras les permiten fijar nitrógeno atmosférico y reducirlo a iones de amonio para que sea más asimilable para la planta. Estas especies pueden suplir la necesidad de usar fertilizantes nitrogenados sintéticos, naturales y de materia orgánica. La identificación se inicia con métodos tradicionales, lo principal es la bioprospección de los nódulos, el implementar medio de cultivos selectivos; PGA, LLA, MacConkey, YMA + Rojo Congo. Se usa pruebas fisiológicas y pruebas bioquímicas para su identificación. Las técnicas inmunológicas determinan relaciones serológicas entre cepas y su composición antigénica, es el caso de la prueba serológica de aglutinación, inmunodifusión y ELISA que ayuda a estudiar la interacción entre antígenos de la superficie bacteriana y anticuerpos específicos de la planta. Los métodos moleculares juegan un papel importante para discernir entre especies debido a que tienen una mayor especificidad. Ese es el caso de la amplificación del gen 16S mediante PCR, la combinación de métodos moleculares como PCR-RFLP para la identificación de biovares de cepas de *Rhizobium*. La BOX-PCR Y REP-PCR reveló la capacidad de determinar perfiles genómicos y patrones polimórficos que reflejan la diversidad genómica, junto con secuenciación del gen 16S rRNA. Los enfoques moleculares como la metatranscriptómica para identificar factores de transcripción durante el proceso de simbiosis que regulan la modulación en la expresión de genes en la formación de nódulos y su respuesta simbiótica. Adicional, el Multilocus Sequence Analysis (MLSA) permite identificar y clasificar microorganismos comparando múltiples fragmentos housekeeping, como *recA*, *glnII* y *gyrB*, presentes en las especies de *Rhizobium*. Los plásmidos pueden diferir entre las especies de este género por su composición y pesos moleculares. Sin embargo, la revisión de literatura sobre los métodos implementados para reconocer a *Rhizobium* ha revelado de existen incongruencias en los resultados de varios estudios que se esclarecen con este trabajo. Existe literatura citada que han identificado especies de *Rhizobium* que en la actualidad han sido clasificados en nuevos géneros bacterianos.

PALABRAS CLAVE: *Rhizobium*, identificación molecular, identificación morfológica, identificación bioquímica, especies taxonómicas.

4 ABSTRACT

Species of the genus *Rhizobium* are aerobic, Gram-negative bacteria that have the ability to form symbiotic relationships with specific leguminous plants. They do this by forming nodules on the plant roots. These structures allow them to fix atmospheric nitrogen and reduce it to ammonium ions, making it more assimilable for the plant. These species can overcome the need for synthetic, natural, and organic matter nitrogen fertilizers. Identification begins with the implementation of traditional methods. The main method is bioprospecting of nodules, implementing selective culture media such as PGA, LLA, MacConkey, YMA, and Congo Red. Physiological tests are used to identify specific species, along with biochemical tests to determine characteristics of the genus *Rhizobium*. Immunological techniques determine serological relationships between strains and their antigenic composition. This is the case with serological agglutination tests, immunodiffusion tests, and ELISA, which help study the interaction between bacterial surface antigens and plant-specific antibodies. Molecular methods play an important role in distinguishing between species due to their greater specificity. This is the case with 16S gene amplification by PCR and the combination of molecular methods such as PCR-RFLP for the identification of biovars of *Rhizobium* strains. BOX-PCR and REP-PCR revealed the ability to determine genomic profiles and polymorphic patterns that reflect genomic diversity, along with 16S rRNA gene sequencing. Molecular approaches such as metatranscriptomics are used to identify transcription factors during the symbiosis process that regulate the modulation of gene expression in nodule formation and their symbiotic response. Additionally, Multilocus Sequence Analysis (MLSA) allows the identification and classification of microorganisms by comparing multiple housekeeping fragments, such as *recA*, *glnII*, and *gyrB*, present in *Rhizobium* species. Plasmids can differ among species of this genus in terms of their composition and molecular weight. However, a review of the literature on methods implemented to recognize *Rhizobium* has revealed inconsistencies in the results of several

studies, which are clarified in this work. Additionally, there is cited literature that has identified *Rhizobium* species that have now been classified into new bacterial genera.

KEY WORDS: *Rhizobium*, molecular identification, morphological identification, biochemical identification, taxonomic specie.

5 INTRODUCCIÓN

La población humana sigue en constante crecimiento, para el año 2030 se pronostica que la producción agrícola llegaría a 8600 millones de personas. Si existe un aumento significativo en la población debe existir un incremento sustancial en la producción de alimentos que pueda ser capaz de cubrir la demanda alimentaria (Naciones Unidas, 2017)

Las medidas que han tomado grandes y pequeñas empresas agrícolas para cumplir con la demanda, es usar fertilizantes químicos con el fin de aumentar el rendimiento en la producción de alimentos provenientes de plantas. Sin embargo, esta práctica en la agricultura mundial genera graves impactos ambientales. Uno de los principales conflictos que enfrenta el planeta es la contaminación que se encuentra estrechamente relacionada a la contaminación del suelo y a los gases de efecto invernadero. Entre los principales causantes se encuentra el uso desmesurado de fertilizantes químicos nitrogenados. Se estima que su uso aumentó durante los últimos años a nivel mundial, y varias investigaciones aseguran que las emisiones se incrementarán en un 50% para el año 2030 (González y Camacho, 2017).

El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados es una de las principales causas del calentamiento global debido a que contribuye al incremento de las concentraciones de los gases del efecto de invernadero y la toxicidad provoca el aumento en la eutrofización del agua (Lambo y Mancipe, 2021). Un estudio realizado demostró que la agricultura es la responsable de generar entre el 60 y 70% de emisiones de óxido nitroso fuertemente relacionada con el uso de fertilizantes nitrogenados (Sánchez, 2019). En estos sistemas de cultivos de alta productividad, los monocultivos o rotación de cultivos se han implementado tarde como medidas alternativas en la agricultura moderna. Lo que ha incrementado el deterioro del suelo y consigo una disbiosis en la microflora natural de la misma. Además, la acumulación de nitrógeno favorece la presencia de ácidos fenólicos, compuestos que tienen la capacidad de modificar la interacción entre plantas y microorganismos, estos son los responsables de la disminución de pH que empeora las enfermedades del suelo y la aparición de patógenos (Yijie et al., 2022).

Se puede usar a la bacteria *Rhizobium* como biofertilizante debido a que tiene la capacidad de fijar nitrógeno presente en la atmósfera, que es una bacteria Gram-negativa que se encuentra en el suelo. Esta bacteria tiene la capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico a formas más asimilables para las plantas con las cuales pueden formar relaciones simbióticas. Esta interacción biológica tiene la capacidad de disminuir el 50 a 70% de nitrógeno biológicamente fijado en el mundo y el 65% empleado en agricultura (López et al., 2020).

Adicional, no todas las especies de *Rhizobium* son compatibles con todas las plantas, tienen una particularidad, y es que tiene especificidad por su hospedador. Existen cepas que son capaces de formar nódulos con plantas leguminosas en específico (Ballesteros et al., 2018). Las plantas leguminosas pertenecen a la familia Fabaceae o conocida comúnmente como familia de guisantes o frijoles. Estas plantas con frecuencia tienen nódulos radiculares producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno. Los tallos son erectos, trepadores o volubles con hojas compuestas (Xu y Deng, 2017).

La interacción entre bacterias de la especie *Rhizobium*, inicia cuando existe insuficiencia de nitrógeno en la planta leguminosa hospedadora. El nitrógeno es un elemento esencial para la planta dado que es un componente que permite formar proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, clorofila, hormonas, vitaminas. La deficiencia de nitrógeno influye en el crecimiento de la planta, lo que provoca que el rendimiento y la calidad se reduzca. Por otra parte, una vez que el nitrógeno es absorbido y aprovechado por las plantas es usado en funciones reguladoras en las fitohormonas (Wang et al., 2024).

La cooperación se da por señales químicas de la planta para atraer a las especies de *Rhizobium* y de esa manera formar una nodulación efectiva desencadenando la producción de los factores necesarios para la nodulación. Sin embargo, existe la posibilidad de que exista una compatibilidad parcial, es decir, la cepa no posee los factores necesarios para establecer una relación simbiótica efectiva. Las formas de visualizar una asociación efectiva son con la presencia de nódulos y el color de estos (Simon et al., 2014).

En el ámbito de la microbiología agrícola no se dispone documentos que recopilen todos los métodos que puedan ser utilizados para la identificación precisa y eficaz de especies de *Rhizobium*. A pesar de que los avances científicos siguen en constante cambio y evolución, se puede evidenciar un vacío investigativo en la literatura disponible, este estudio puede ser implementado como una guía para futuras investigaciones o por profesionales en la industria agrícola dado que es una alternativa ecológica al daño ambiental ocasionado por los fertilizantes nitrogenados. Una forma para identificar cepas de *Rhizobium* es evaluar su tolerancia a NaCl al 2%, estas bacterias tienen la característica de que su crecimiento bacteriano disminuye progresivamente a medida que se aumenta la concentración de sal en el medio de cultivo (Alencastro y Ayala, 2023).

La caracterización bioquímica con pruebas a la tolerancia de pH, cloruro de sodio, resistencia a metales pesados y antibióticos (López et al., 2017) son otras formas de identificar estas bacterias. La identificación de *Rhizobium phaseoli* se realizó mediante pruebas de Biuret para evaluar la ausencia de actividad hidrolítica sobre gelatina y caseína. La cepa fue sometida a una concentración de NaCl al 2% y cultivada en agar sulfito bismuto, considerando su característica de no producir H₂S (Saldaña, 2007).

Actualmente, el uso de métodos moleculares como ADN ribosómico amplificado (ARDRA), amplificados por PCR, metagenómica y secuenciación de genes son más utilizadas. La identificación de especies de *Rhizobium* puede realizarse mediante el uso de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Estas técnicas permiten analizar variaciones genéticas y establecer diferencias entre cepas dentro del género *Rhizobium*, facilitando su clasificación taxonómica (Koskey et al., 2018). Mediante PCR se amplificó fragmentos del gen ribosomal 16s, junto con secuenciación se identificó relaciones filogenéticas de las cepas secuenciadas construyendo filogramas. Se encontró que las cepas clasificadas dentro de este grupo tenían una alta identidad de secuenciación de *Rhizobium multihospitium* y *Rhizobium tropicipero* con una identidad del 99,24% y a *Rhizobium miluonense* con una identidad del 99.24% (Valenzuela et al., 2021).

Mediante revisión de literatura se pretende recopilar el estado del arte de los métodos de identificación de especies de *Rhizobium* que es crucial para el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. Las cuales ayuden a implementar una guía de cómo se deben implementar la información recopilada y categorizar el mejor método de caracterización dependiendo de la especie. Esto debido a que existen especies de *Rhizobium* que no han sido identificadas hasta la actualidad. La identificación de las especies es de suma importancia para determinar que especie de *Rhizobium* puede formar la interacción simbiótica con la leguminosa en concreto. Se pretende describir métodos tradicionales como el uso de pruebas bioquímicas, y métodos modernos con el empleo de técnicas moleculares como BOX-PCR y secuenciación del gen ribosomal 16S.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Revisar literatura existente sobre los métodos de identificación de las especies del género *Rhizobium*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir fuentes de nitrógeno que son utilizadas por las plantas y su interacción con los rizobios
2. Describir los métodos de identificación de especies de *Rhizobium* a partir de la literatura recopilada.

7 MARCO TEÓRICO

7.1 FERTILIZANTES NITROGENADOS

El nitrógeno se encuentra en la naturaleza en forma de gas, se encuentra libre en el aire, atmósfera y el suelo. Adicional, el nitrógeno está presente en los tejidos vegetales y una porción se compone de la materia orgánica que se da por la renovación periódica de las raíces y la actividad de los microorganismos en el suelo, junto con las excreciones animales, el uso de abonos verdes, la descomposición de restos agrícolas y la incorporación de residuos provenientes de la agroindustria y las zonas urbanas. Estos contribuyen a la regeneración natural y el equilibrio del ecosistema edáfico (Rodríguez, 2005).

El nitrógeno (N) forma parte de los principales componentes de los compuestos orgánicos como los aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Contribuye al desarrollo de las etapas vegetativa y reproductiva de las plantas, mediante la fertilización nitrogenada se puede llegar a obtener un aumento alto de biomasa y crecimiento de cultivos (Fathi, 2022).

El nitrógeno está formado por dos átomos de N unidos por un fuerte enlace triple debido a eso para romper el enlace y acelerar la reacción del nitrógeno se debe utilizar una gran cantidad de energía. Su fabricación se da por el proceso Haber-Bosch que consiste en una reacción de nitrógeno e hidrógeno gaseoso para producir amoníaco (NH_3). Este amoníaco es usado para elaborar una gran diversidad de fertilizantes nitrogenados, que tienen distintas formulaciones o nutrientes adicionales (Quemada y Gabriel, 2023).

7.1.1 FUENTE DE NITRÓGENO NATURAL

El nitrógeno atmosférico compone el 78.1% de la atmósfera terrestre y es la forma de nitrógeno más abundante en la tierra. La dinámica del nitrógeno comienza con su fijación, donde se convierte en formas más asimilables para que la planta lo utilice. La nitrificación es el proceso por el cual

se transforma amoníaco en nitratos. En la asimilación las plantas absorben el nitrógeno y junto con la desnitrificación se lo devuelve a la atmósfera (Enrich-Prast et al., 2018).

Estos procesos se llevan a cabo principalmente por microorganismos presentes en el suelo. La forma en la que el nitrógeno entra en la biosfera es mediante fijación química y biológica del nitrógeno molecular y es removida por desnitrificación. La fijación natural del nitrógeno se puede dar por bacterias como *Rhizobium*. Adicional, otras formas de obtener nitrógeno son por la descomposición de materia orgánica, la deposición atmosférica a través de tormentas eléctricas y la liberación de nitrógeno desde el suelo (Cerón y Aristizábal, 2012).

Además, los incendios forestales son otra fuente de nitrógeno cuando producen su salida a la atmósfera. El 30% de este elemento se encuentra contenido en biomasa que se volatiza en dinitrógeno (N_2) a través de la desnitrificación. Para cubrir el requerimiento de nitrógeno se necesita un reciclaje interno eficiente con procesos como la descomposición de la materia orgánica y la mineralización del nitrógeno (Enrich-Prast et al., 2018).

7.1.2 FUENTE DE NITRÓGENO SINTÉTICOS

La producción de fertilizantes sintéticos nitrogenados se origina convencionalmente de amoníaco. Lo que lo vuelve un tipo de fuente más económica, con mayor concentración y se encuentra disponible para las que las plantas lo utilicen. Sin embargo, su producción consume aproximadamente el 1,2% de energía a nivel mundial y con el mismo porcentaje contribuye a las emisiones de efecto invernadero total (Sabry, 2015).

El fertilizante de sulfato de amonio es una fuente de amonio que es más fácil de asimilar para las plantas, el azufre está presente en los aminoácidos y proteínas de las plantas. Estas son esenciales para la formación de clorofila. Es un fertilizante soluble que se aplica en suelo y agua. Sin embargo, en este fertilizante tiene un efecto inhibitorio fuerte en la germinación de semillas, inclusive si se lo aplica en concentraciones bajas (Haojiang et al., 2025).

Otra forma, es el nitrato de amonio tiene la capacidad de afectar a la planta a nivel del crecimiento de raíces de plántulas, esto provoca que la acumulación de biomasa y la raíz se reduzca. En

términos generales, los fertilizantes nitrogenados afectan a la distribución de sus recursos en las diferentes partes de su estructura como las raíces, tallos, hojas y frutos. Además, altera el contenido de nitratos y N de amonio del suelo junto con su pH (Haojiang et al., 2025).

En el caso de la urea tiene un alto contenido de nitrógeno, su porcentaje oscila entre el 46%, es usado con mayor frecuencia por los agricultores. Por lo tanto, estimula el crecimiento de las plantas, influye en la absorción de los nutrientes del suelo con mayor facilidad, esto mejora el rendimiento de los cultivos. Es un fertilizante de reacción ácida que puede ser incorporados en suelos agrícolas neutro o que sean moderadamente alcalinos (Sandoval y Peña, 2024).

7.1.3 FUENTE DE MATERIA ORGÁNICA

La materia orgánica tiene un contenido del 5% total de nitrógeno. Adicional, posee otros elementos esenciales para las plantas como el fósforo, magnesio, calcio, azufre y micronutrientes. El nitrógeno proviene de fuentes como estiércoles, compost, abonos verdes y residuos de cosecha. La materia orgánica en el suelo comprende dos fases; la humificación y mineralización, donde los microorganismos del suelo actúan sobre la materia orgánica desde el momento en que se la entierra (Julca et al., 2006).

La industria agrícola produce grandes volúmenes de residuos de cosecha a lo largo del año, de los cuales solo una parte se reutiliza en diversas aplicaciones, como alimento para el ganado, generación de compost, biosólidos y producción de biogás. Estos manifiestan nitrógeno en formas orgánicas que a medida que pasa el tiempo se mineralizan para pasar a ser disponibles para las plantas. La fuente de materia orgánica es usada como sustratos para obtener abono orgánico que es el resultado de la descomposición natural de la materia orgánica por acción de microorganismos presentes en el medio que tienen altos contenidos de nitrógeno mineral (Ramos y Elein, 2014).

Una de las formas de obtener disponibilidad de nitrógeno es mediante microorganismos actores responsables de la descomposición de la materia orgánica. Es un grupo que está conformado por bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y mohos. Durante este proceso, estos organismos liberan productos como energía, dióxido de carbono, azufre, nitrógeno y fósforo. El nitrógeno que se

adquiere tras la descomposición es esencial debido a que el suelo contiene este elemento en cantidades limitadas y, en su mayoría, se obtiene a partir de formas orgánicas (Yadav et al., 2021).

Para integrarse al ciclo del nitrógeno, este elemento es transformado mediante la amonificación, un proceso en el que los microorganismos degradadores convierten la materia orgánica en amoníaco (NH_3) o ion amonio (NH_4^+), facilitando su posterior aprovechamiento por otros organismos del ecosistema. Consecutivo, actúan los microorganismos nitrificantes que tiene la capacidad de oxidar el amonio en (NO_2^-) y posteriormente en nitratos (NO_3^-). La nitrificación es llevada a cabo por dos grupos principales de bacterias quimiolitótrofas obligadas. Una de ellas son las bacterias del género *Nitrosomas* y *Nitrosococcus* especializadas en la oxidación de amonio. El segundo grupo se encuentran las bacterias oxidantes de nitrito como *Nitrobacter*, *Nitrococcus* y *Nitrospira* (Rahimi, 2020).

Por otra parte, otra forma de obtener nitrógeno es por fijación simbiótica realizada por bacterias heterótrofas que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Se encuentra conformado por bacterias del género *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*. Sin embargo, el género *Rhizobium* destaca por su capacidad de establecer asociaciones altamente especializadas con leguminosas. Tiene la capacidad de formar nódulos radiculares en las raíces de sus hospedadores, donde llevan a cabo la conversión de nitrógeno atmosférico (N_2) en formas orgánicas asimilables para la planta. La bacteria se beneficia de esta relación al recibir de la planta carbohidratos que utiliza como fuente de energía. A su vez, la planta adquiere nitrógeno, lo que favorece su crecimiento y el desarrollo de cultivos, mejora la fertilidad del suelo y contribuye a la disponibilidad de este elemento en los ecosistemas terrestres (Abd-Alla et al., 2023).

7.2 RHIZOBIUM

Las bacterias del género *Rhizobium* presentan una morfología de bacilos Gram-negativos móviles, poseen de 1-6 flagelos que pueden llegar a ser peritricos o subpolares estos le confieren motilidad a la bacteria (López et al., 2017). Sus colonias se las puede reconocer por ser blancas o de color beige, circulares, convexas, semitraslúcidas y mucilaginosas. Además, estas pueden llegar a medir

entre 2 a 4 mm de diámetro dentro de un período de incubación entre los tres a cinco días de incubación en agar levadura manitol con rojo Congo (Contreras et al., 2007).

Son bacterias aerobias que crecen a temperaturas óptimas de entre 25 y 30 °C el pH óptimo para su crecimiento es de 6-7. El carbono y los electrones proviene de compuestos orgánicos debido a que el género *Rhizobium* son quimiorganoheterótrofos. Por ello, usan un amplio rango de carbohidratos simples y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono. Usan sales de amonio, nitrato y en general a los aminoácidos como fuente de nitrógeno. Por otra parte, no tienen la capacidad de metabolizar celulosa y almidón dado que carecen de las enzimas necesarias para degradar estos polímeros complejos. El tiempo de generación de una nueva célula de *oscila* entre 1.5 a 5 horas. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como biotina como el caso de *Rhizobium phaseoli* (Méndez y Lara, 2016).

Las bacterias del género *Rhizobium* tienen la capacidad de inducir en las raíces de las leguminosas la formación de estructuras especializadas conocidas como nódulos. Dentro de estas estructuras el nitrógeno atmosférico se reduce a iones de amonio, es decir, se convierten en una forma más fácil para asimilar para la planta. *Rhizobium* tienen la capacidad de formar relaciones simbióticas con plantas leguminosas, se considera que es un proceso de alta eficiencia en fijar biológicamente nitrógeno atmosférico. Esta relación simbiótica se estima que en 24 horas puede llegar a ser de 584 kg y puede proporcionar hasta un 90% de las necesidades de nitrógeno de la planta (López et al., 2017).

7.3 MÉTODOS TRADICIONALES ESPECIFICOS PARA IDENTIFICAR A *Rhizobium*

7.3.1 BIOPROSPECCIÓN DE NÓDULOS

En el aislamiento de *Rhizobium* empieza con la prospección de los nódulos, se escogen plantas jóvenes y saludables. En el caso de las leguminosas arbustivas como *Gliricidia sepium* y *Leucaena leucocephala* los nódulos fueron recolectados durante la temporada de lluvia, lo que optimiza la extracción del sistema radicular dado que ayuda a prevenir daños mecánicos. Es fundamental tomar una muestra representativa de los nódulos para su análisis, asegurando un conteo preciso y una evaluación detallada de su nodulación. Se debe observar su estructura, abundancia, tamaño y color interno,

así como la distribución de la nodulación en la raíz principal. Los nódulos seleccionados deben ser desinfectados en alcohol al 70% por un minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 2,5% durante cuatro minutos y enjuagados con agua destilada (Hernández et al., 2012).

7.3.2 TINCIÓN GRAM DE *Rhizobium*

El método Gram se fundamenta en diferenciar estructuras y composición de la pared celular de las bacterias. Las especies del género *Rhizobium* al ser bacilos Gram-negativas tienen una pared celular con una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana externa compuesta de contenido lipídico y proteico. Al finalizar la tinción pierden el colorante cristal violeta, por ello, al microscopio se observan bacilos teñidos de color rojo como se visualiza en **Figura 1. Tinción de Gram de *Rhizobium* observada al microscopio óptico.** El colorante primario es cristal violeta (CV) que en solución acuosa se disocia en iones CV⁺ y CV⁻. Estos penetran la pared celular y membrana de la bacteria por su afinidad con el peptidoglicano. Posterior, se agrega solución de yodo que es usado como fijador del colorante, este interactúa con los iones de CV⁺, lo que permite formar un complejo conocido como cristal violeta-yoduro. Este complejo tiene la capacidad de saturar los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. Luego, se agrega unas gotas de alcohol acetona que rompe la capa lipídica de las Gram-negativas para que pierda su membrana externa y se reduzca la cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca safranina o fucsina como colorante de contra tinción, tiñe a *Rhizobium* porque no tienen la capacidad de retener el complejo cristal-yoduro posterior a la decoloración (Casasola, 2022).

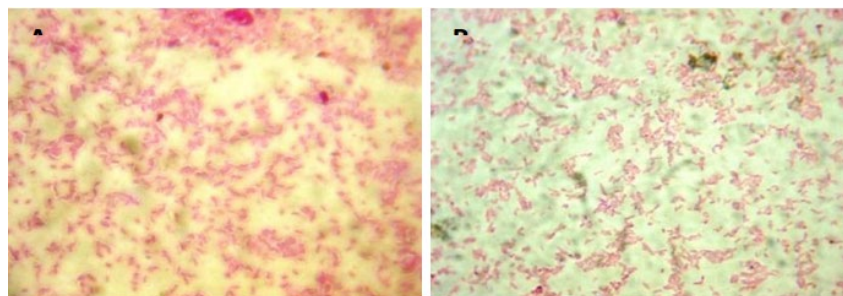


Figura 1. Tinción de Gram de *Rhizobium* observada al microscopio óptico

Este gráfico corresponde a la Tinción Gram de *Rhizobium*. [Fotografía], Hernández, Cubillos y Millan, 2018, https://www.researchgate.net/publication/298069900_Aislamiento_de_cepas_de_Rhizobium_spp_asociados_a_dos_leguminosas_forrajeras_en_el_Centro_Biotecnologico_del_Caribe_Isolation_of_Rhizobium_spp_associated_two_forage_leguminous_in_the_Caribbean_Biotech/download?tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnNOUGFnZSI6Il9kaXJlY3QiLCJwYWdlIjoiaX2RpcmVjdCJ9fQ

7.3.3 TOLERANCIA A NaCl

Las especies pertenecientes a este género son incapaces de tolerar la exposición a altas concentraciones de NaCl, lo que provoca que su crecimiento disminuya al estar en contacto con sal en el medio (Alencastro y Ayala, 2023). Al comparar la tolerancia a NaCl en concentraciones de 1% y 2%, se observó que el 24.32% de las cepas mostró un buen crecimiento al 1%. En contraste, al 2% de NaCl, el crecimiento se redujo significativamente a 13.51%. Por otra parte, las cepas que no crecieron a una concentración de NaCl al 1% fue de 13.51% y al ser sometidas al 2% el porcentaje aumento hasta el 35.14% (Contreras et al., 2007). Sin embargo, existe una especie del género *Rhizobium* que puede tolerar y crecer en óptimas condiciones bajo concentraciones de NaCl al 2% que es *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (Alencastro y Ayala, 2023).

7.4 MEDIOS DE CULTIVO

7.4.1 AISLAMIENTO DE *Rhizobium* EN AGAR YMA + ROJO CONGO

El agar manitol de levadura (YMA) es un medio de cultivo que tiene en su composición; 10 gramos de extracto de levadura, 500 mg de fosfato dipotásico, 500 mg de sulfato de magnesio, 200 mg de cloruro de sodio, 17 gramos de agar, agua destilada, más el tinte rojo Congo (RC) a una concentración del 0.25%. y el medio debe tener un pH de 6.8-7. Estas cantidades son usadas para la preparación de un litro del medio de cultivo. El medio de cultivo se esteriliza a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos (Thazin y Phyu, 2020).

Se realiza una suspensión bacteriana a partir de los nódulos, siguiendo el procedimiento de bioprospección previamente descrito. A continuación, los nódulos se colocan en un tubo de ensayo para ser triturado con una varilla de vidrio y pasar a ser mezclado por el Vortex. Luego, se realiza diluciones seriadas para su respectivo aislamiento. Al final, se siembra en el medio de cultivo YMA y

se incuba a temperatura de 27-30 °C (Thazin y Phyu, 2020). Esto se visualiza en **Figura 2. Procedimiento para el aislamiento de *Rhizobium* a partir de los nódulos.**

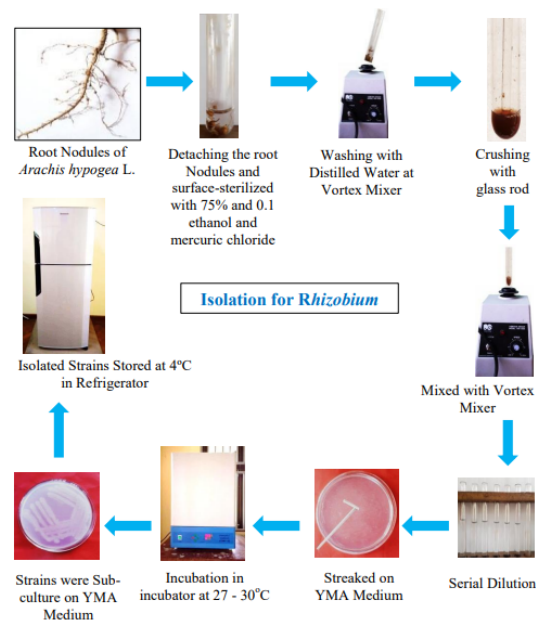


Figura 2. Procedimiento para el aislamiento de *Rhizobium* a partir de los nódulos.

Procedimiento de aislamiento de *Rhizobium* a partir de nódulos radiculares . [Fotografía], Thazin y Phyu, 2020, https://www.researchgate.net/profile/Aung-Aung-Aye-2/publication/378175822_Study_on_some_Phytoplankton_of_Maung_Ma_Kan_Beach_Longlone_Township_Tanintharyi_Region_Southern_Myanmar/links/65cb8d581e1ec12eff8e3bac/Study-on-some-Phytoplankton-of-Maung-Ma-Kan-Beach-Longlone-Township-Tanintharyi-Region-Southern-Myanmar.pdf#page=192

Sus colonias en este medio de cultivo se las puede reconocer por ser blancas o de color beige, circulares, convexas, semitraslúcidas y mucilaginosas (Contreras et al., 2007). Esto ocurre como consecuencia de que *Rhizobium* no tiene la competencia o capacidad de absorber el colorante rojo Congo. Lo que permite diferenciar a este género entre otras especies fijadoras de nitrógeno como *Agrobacterium* sp. (Hernández et al., 2012). Tal como se muestra en la **Figura 3. Aislamiento de colonias en YMA + Rojo Congo.**



Figura 3. Aislamiento de colonias en YMA + Rojo Congo

Colonias individuales aisladas de rizobios en placa YMA. [Fotografía], Wadhwa et al., 2017, <https://www.ijcmas.com/6-11-2017/Zeenat%20Wadhwa,%20et%20al.pdf>

7.4.2 AISLAMIENTO DE *Rhizobium* EN AGAR MACCONKEY

El agar MacConkey es un medio de cultivo selectivo y diferencial para bacterias Gram-negativas capaces de fermentar lactosa. Esta fermentación produce ácidos orgánicos como el ácido láctico, el cual cambia el pH del agar. Los componentes de este medio de cultivo incluyen; colorante de cristal violeta y sales biliares que detienen el crecimiento de otras bacterias que no pertenezcan a este grupo. Adicional, tienen lactosa que es usada como principal fuente de carbono y rojo neutro que es el indicador de pH que tiene un viraje de color blanquecino a rojo/rosa brillante al descenso de pH de 6,8 (Jung y Hoilat, 2024).

Las colonias de *Rhizobium* que crecen en este medio de cultivo son pequeñas, translúcidas, incoloras o ligeramente amarillentas. A pesar de que es una bacteria Gram-negativa no puede fermentar lactosa y al ser las colonias amarillentas es un indicativo de que no acidifican el medio. Las condiciones de incubación son a temperatura de 28 °C durante 48 horas, se descartan las colonias que tengan un viraje de color rojo/rosa (Contreras et al., 2007).

Existen discrepancias en la literatura respecto a la capacidad de *Rhizobium* para fermentar lactosa. Contreras et al. (2007) sostienen que esta bacteria no posee dicha capacidad de fermentar el azúcar de que se compone el medio MacConkey, por lo que se refleja una coloración amarilla, que es un claro indicador de su incapacidad para llevar a cabo este proceso. Mientras que Chuquimarca (2025) plantea que al ocurrir un cambio de color del medio MacConkey de fucsia a amarillo es un indicativo de que las bacterias del género *Rhizobium* puede fermentar lactosa mediante las enzimas

lactosa permeasa y β -galactosidasa, generando un viraje de color del medio de cultivo a amarillo. Esto se visualiza en la **Figura 4. Aislamiento de colonias en MacConkey**



Figura 4. Aislamiento de colonias en MacMonckey

Cambio de color de un aislado de *Rhizobium* en medio de cultivo MacMonckey. [Fotografía], Chuquimarca, 2025, <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c1476b48-60d9-4bbb-99e9-d4382d601e4e/content>

Existe una contraposición con los resultados reportados por Chuquimarca (2025), debido a que las bacterias capaces de fermentar lactosa producen subproductos ácidos que reducen el pH, lo que provoca que el indicador de pH cambie a rosado. Al contrario, las especies bacterianas Lac negativas forman colonias blanquecidas, y el medio de cultivo se mantiene de color amarillo debido a que la bacteria puede metabolizar peptonas y alcalinizar el agar (Jung y Hoilat, 2024).

7.4.3 AISLAMIENTO DE *Rhizobium* EN AGAR LLA

El agar lactosa y levadura (LLA) es un medio de cultivo que tiene en su composición; extracto de levadura, lactosa, fosfato dipotásico de hidrógeno, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y agar. Además, las condiciones de incubación son a 25 °C con un pH de $6,8 \pm 0,2$. Según Soto et al. (2012), la mayoría de las especies del género *Rhizobium* no poseen la capacidad de fermentar lactosa debido a que prefieren otras fuentes de carbono para su metabolismo como manitol. Sin embargo, investigaciones han comprobado que existen ciertas especies de este género que si presentan la capacidad de fermentar lactosa con la producción de cetolactosa (Hernández et al., 2012).

Según Chuquimarca (2025), realizar la prueba en agar LLA + reactivo de Benedict contribuye para identificar cepas de *Rhizobium* que tengan la capacidad de usar lactosa como fuente de carbono, lo que se demostró con el cambio de color del medio de azul a amarillo por el cambio de pH. Los

aislados evidenciaron que la bacteria utiliza la enzima lactasa para fermentar el sustrato y producir ácido.

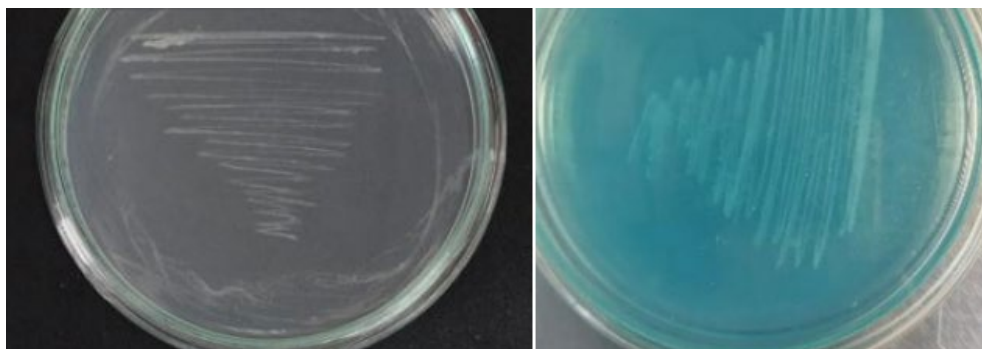


Figura 5. Aislamiento de colonias en Agar LLA + reactivo de Benedict

Cambio de color de un aislado de *Rhizobium* en el medio LLA + Benedict. [Fotografía], Chuquimarca, 2025, <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c1476b48-60d9-4bbb-99e9-d4382d601e4e/content>

7.4.4 AISLAMIENTO DE *Rhizobium* EN AGAR PGA

El agar peptona glucosa agar (PGA) tiene en su composición; peptona, glucosa, agar y púrpura de bromocresol, el pH del medio de cultivo es de 6,8. Las condiciones de incubación son de dos días por 30 °C \pm 2 grados centígrados (Chuquimarca, 2025).

Entre los indicadores de pH ácido-base se encuentra el púrpura de bromocresol. Este compuesto presenta un cambio distintivo de color en función de la variación del pH. En condiciones ácidas, cuando el pH alcanza un valor de aproximadamente 3, su tonalidad es amarilla. Sin embargo, conforme el pH aumenta y se acerca a 6, el indicador experimenta un viraje a un color azul o púrpura, esto permite descartar a especies del género *Rhizobium* por este medio de cultivo (Qianyun et al., 2021).

Según Hernández et al. (2012), los estudios demostraron que las cepas de *Rhizobium* fueron descartadas al ser sembradas en PGA + púrpura de bromocresol debido a que presentaron un incremento pronunciado en la densidad celular y una producción limitada de metabolitos ácidos. Esto tiene lugar por el hecho de que no es una característica típica de *Rhizobium* dado que no tiene el potencial metabólico para fermentar glucosa en un medio como el de PGA que es carente de minerales necesarios para esta bacteria.

7.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

7.5.1 PRUEBA DE OXIDASA

Esta prueba detecta la presencia de enzimas oxidasas presentes en la bacteria. Su reacción se efectúa cuando se detecta la presencia de un sistema citocromooxidasa. Este sistema activa la oxidación del citocromo, que es reducido por el oxígeno molecular. Esta reacción produce peróxido de hidrógeno. Adicional, el oxígeno tiene como finalidad actuar como aceptor final de electrones de la cadena transportadora de electrones (Fernández et al., 2010).

La actividad oxidasa de *Rhizobium* se determina por esta prueba, se tiene consideraciones al preparar el reactivo oxidasa. Uno de ellos es que el reactivo es disuelto al 1% tetrametil-p-fenilendiamina en agua que se encuentre a temperatura de 26°C. El reactivo se almacena en frascos ámbar u oscuro a temperatura de 25-30 °C. Existen diversas metodologías para llevar a cabo la prueba de oxidasa, cada una con características y aplicaciones específicas. Una de las técnicas comúnmente utilizadas consiste en el empleo de una tira de papel filtro sumergida en el reactivo, se transfiere una colonia de *Rhizobium* a la tira de papel usando un asa estéril. La prueba es positiva a la oxidasa al revelar un viraje de color lavanda o púrpura oscuro después de 5 minutos (Hossain et al., 2019).

Por otra parte, la prueba se realiza usando un portaobjetos limpio y seco. donde se coloca una gota del reactivo de tetrametil-p-fenilendiamina sobre el portaobjetos con micropipeta o gotero. A continuación, se transfiere colonias de bacterias con un asa bacteriológica de platino o con un palillo de madera estéril sobre la gota del reactivo. Sin extender la muestra, se mueve suavemente el asa para permitir la reacción y la respuesta ocurre en los primeros segundos. Una reacción positiva es el cambio de color a azul o púrpura oscuro, lo que indica que la presencia de citocromo oxidasa (Hossain et al., 2019).

7.5.2 PRUEBA DE CATALASA

Esta prueba detecta a la enzima catalasa presente en microorganismo que contienen citocromos. Las bacterias que sintetizan a esta enzima hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno

gaseoso (Fernández et al., 2010). La prueba en *Rhizobium* es positiva dado que se observa la formación de burbujas de gas que es un indicativo de esta actividad (Hossain et al., 2019).

7.5.3 PRUEBA DE CITRATO DE SIMMONS

La prueba de citrato de Simmons determina la capacidad de un microorganismo para utilizar al citrato de sodio como única fuente de carbono. De forma equivalente, es empleada para determinar si el fosfato de amonio es usado como fuente de nitrógeno en su metabolismo. Adicional a estos componentes, se usa azul de bromotimol como indicador de pH. Las bacterias que tengan la capacidad de usar estos componentes en su metabolismo liberan iones de amonio que provoca una alcalinización del medio. Esto se presenta como un cambio de color de verde a azul como un indicador del cambio de pH (Fernández et al., 2010).

Según Hossain et al. (2019), las pruebas realizadas con especies de *Rhizobium* se llegó a determinar que esta bacteria no puede crecer en el medio de cultivo de Citrato de Simmons en un periodo de incubación por 48 horas. Por otra parte, Delgado et al. (2014) concluyeron que, todas las cepas sembradas en este medio de cultivo en el transcurso de 72 hora no formaron colonias y este medio no es apto para su crecimiento.

7.6 PRUEBAS INMUNOLÓGICAS PARA IDENTIFICAR *Rhizobium*

7.6.1 TÉCNICA SÉROLOGICA DE AGLUTINACIÓN

Se han empleado las técnicas serológicas para identificar grupos de bacterias capaces de establecer relaciones simbióticas para fijar nitrógeno. En este grupo de rizobios se incluye a *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* y *Rhizobium*. Estas técnicas se implementan para determinar las relaciones serológicas de las cepas y su composición antigénica. Estudios han demostrado que, estas bacterias pertenecen a grupo serológico heterogéneo, por lo que se puede determinar que las cepas aisladas del mismo hospedador no están relaciones de forma serológica (Simon et al., 2014).

Según Cabrera y Guevara (2003), se debe cuantificar los anticuerpos presentes en una muestra. Por ello, el suero es diluido hasta determinar el punto en que los anticuerpos son capaces de

reaccionar con el antígeno, causando aglutinación. Las diluciones para el título son esenciales dado que ayuda a determinar la mayor dilución en la se observa una reacción positiva en el sistema de ensayo. Los anticuerpos tienen la capacidad de formar uniones cruzadas con antígenos específicos, generando complejos inmunológicos. Esto sucede debido a que reconocen y se enlazan de forma rápida con los antigénicos correspondientes, su agrupación provoca la aglutinación. Sin embargo, el proceso de aglutinación no es rápido debido a que la adherencia de las partículas solo se produce cuando el anticuerpo tiene contacto con el antígeno para formar puentes inmunológicos (Cabrera y Guevara, 2003).

Según Simon et al. (2014), la prueba de aglutinación permite distinguir de manera serológica cepas dentro de una misma especie de *Rhizobium*. Esta prueba tiene como fundamento identificar la interacción que ocurre entre antígenos de la superficie bacteriana y anticuerpos específicos. Los estudios realizados en cepas de *Rhizobium japonicum* mediante pruebas serológicas de aglutinación evidenciaron su agrupamiento en distintos serogrupos somáticos, definidos por la similitud antigénica de sus componentes de superficie celular.

7.6.2 TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN PARA IDENTIFICAR A *Rhizobium*

La técnica de inmunodifusión implica el verter una capa delgada de agar sobre un portaobjetos. Una vez solidificado el medio, se practican pequeños orificios en el gel, donde se colocan las soluciones de antígeno y anticuerpo para permitir su difusión y la formación de bandas de precipitación. Las moléculas de antígeno migran a diferentes velocidades mediante la corriente eléctrica debido a las diferentes cargas eléctricas. Al encontrarse el antígeno específico con el anticuerpo, se forma una banda blanca debido a la precipitación sobre un fondo negro. Esto es una señal de la presencia de un anticuerpo para el antígeno. Adicional, la presencia de varias bandas es un indicativo de heterogeneidad del anticuerpo. Por otra parte, si no hay bandas de precipitación significa que no hay un anticuerpo específico para el antígeno diana (Buyukkiriglu y Senel, 2018).

Aplicando esta técnica de inmunodifusión se busca determinar las relaciones serológicas entre diversas especies y cepas de *Rhizobium*. Según Simon et al. (2014), permite distinguir entre cepas con

identidad antigénica completa de aquellas que tienen una similitud. Por ello, con los resultados se evidenció que las cepas de crecimiento rápido y lento manifestaban un antígeno somático en común. Adicional, las cepas de crecimiento rápido compartir los antígenos internos.

En investigaciones previas se empleó la misma metodología para identificar a especies de *Rhizobium* utilizando antisueros homólogos mediante inmunodifusión. Un ejemplo de ello es el estudio de Dudman y Belbin (1988), donde usaron antisueros existentes contra cepas conocidas para diferenciar entre aislados desconocidos por su capacidad o incapacidad de reaccionar con antisueros específicos. Los antisueros se usaron con cepas de *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium japonicum* con los antígenos pertenecientes a sus grupos de inoculación cruzada. Los resultados que se obtuvieron fueron de que *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium meliloti* a pesar de pertenecer al mismo género, no tienen una relación de identidad antigénica.

7.6.3 TÉCNICA ELISA PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE *Rhizobium*

Los enzimoimmunoensayos aprovechan las propiedades catalíticas de las enzimas para poder detectar y cuantificar reacciones inmunológicas específicas. En el caso del ensayo inmunoabsorbente se encuentra ligado de forma estrecha a enzimas (ELISA). Este permite identificar antígenos bacterianos mediante su interacción con anticuerpos específicos en una fase sólida, con los pocillos de una microplaca de poliestireno. El componente antigénico de la reacción se adsorbe de manera inespecífica o con una unión covalente a la superficie que se encuentra en fase sólida. El procedimiento comienza con la adición de una alícuota de la muestra que contenga el antígeno específico a cuantificar, esto se coloca para que se una al anticuerpo primario en fase sólida lo reconozca. Posterior a esto se realiza un lavado para eliminar los anticuerpos que no se encuentren unidos. A continuación, se añade un anticuerpo secundario que este conjugado con una enzima, esta se une al anticuerpo primario. Finalmente, el sustrato cromogénico al ser degradado por la enzima, provoca un viraje de color. Por lo que se evalúa la intensidad de la señal colorimétrica. Es esencial tener en cuenta que el producto que se obtiene es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (Alhajj et al., 2023).

Según Simon et al. (2014), es una técnica que se utiliza para identificar bacterias presentes en el suelo, implementando anticuerpos y el cambio de color para identificar una sustancia en específico. La identificación de especies de *Rhizobium* mediante ELISA es importante dado que estas bacterias tienen antígenos superficiales específicos. En el caso de lipopolisacáridos o exopolisacáridos, estos varían dependiendo de las cepas y las especies. Por ello, se hace el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra estos epítomos. Lo que permite detectar la presencia de *Rhizobium* y diferenciar entre especies o grupos simbióticos con diferentes capacidades de nodulación y fijación de nitrógeno. Es una técnica que se utiliza para identificar bacterias presentes en el suelo, implementando anticuerpos y el cambio de color para identificar una sustancia en específico. El resultado de la implementación de esta técnica reveló que el 38% y el 50 % de los nódulos en el cultivar en el Bronco están ocupados por rizobios nativos. Esto ayuda a determinar la eficacia de estos rizobios nativos para fijar nitrógeno y mejorar la eficiencia en la producción de leguminosas.

7.7 MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAR A *Rhizobium*

7.7.1 FUNDAMENTOS

7.7.1.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN permite aislar el material genético separándolo de proteínas, membranas y otros componentes celulares. El proceso inicia con la lisis celular, en la que se rompen las membranas celulares y nuclear para liberar el ADN presente en el núcleo. El ADN liberado se separa de otros elementos celulares acompañantes mediante la adición de iones de sodio, que neutralizan su carga, y etanol o isopropanol, que facilitan su precipitación. Finalmente, en la etapa de purificación, el ADN se lava para eliminar impurezas y se resuspende en agua o en un buffer adecuado para su manipulación y almacenamiento (Sharma et al., 2021).

7.7.1.2 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que se utiliza para desnaturalizar y renaturalización de segmentos cortos de ADN por medio de la enzima ADN polimerasa I. El proceso consiste en amplificar pequeños fragmentos de ADN, usando ciclos controlados de temperatura y

enzimas para copiar de forma eficiente y rápida la secuencia objetivo. Esto genera millones de copias a partir de una cantidad mínima de material genético. La primera fase de la PCR es la desnaturalización, el ADN se calienta a 95 °C debido a que disocia los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarios del ADN bicatenario. Segunda fase, desnaturalización se genera el proceso *annealing* a temperaturas entre 55 y 72 °C. Estas temperaturas específicas se establecen por las propiedades físicas y químicas de los cebadores específicos utilizados en la solución. Tercera fase, es hibridación dado que hace posible que los cebadores se unan al ADN monocatenario en los respectivos sitios complementarios, dando inicio con el extremo 3' del molde de ADN. A continuación, la unión de los cebadores a los sitios complementarios de ADN monocatenario que les compete genera dos hebras bicatenarias a temperaturas de 75 a 80 °C. Es la temperatura ideal para que el ADN comience a replicarse, esto es inducido por las enzimas para preservar la actividad catalítica de la ADN polimerasa. Esta enzima es esencial para que el ADN bicatenario inicie su replicación de nuevas hebras de ADN en dirección 5' a 3', esto genera hebras idénticas a las hebras molde. Esto se repite varias veces mediante un termociclador durante 30 a 40 ciclos. De forma gradual va disminuyendo por la capacidad limitada del reactivo y a otros factores contribuyentes, como la acumulación de moléculas de pirofosfato, la autohibridación excesiva y la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra (Khera et al., 2012).

7.7.1.3 Fundamento de la técnica de separación por electroforesis

La electroforesis es una técnica que visualiza los productos de la amplificación de un gen en específico de PCR. Los productos pueden ser de distinto tamaño, conformación y contenido de guanina (G) y citosina (C). Se fundamenta en usar una corriente eléctrica para separar partículas por su carga. Se separa el ADN que se encuentra separado por fragmentos, que son colocados en pocillos en una placa de gel. El ADN, tienen una carga negativa, por ello, se desplaza a través del gel cuando se aplica una corriente eléctrica. A medida que la corriente fluye, las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo, ubicado en la parte inferior de la placa. Los fragmentos se movilizan por el gel a una velocidad proporcional a su tamaño. Es decir, los fragmentos grandes se mueven de forma más lenta que los pequeños. Estos son comparados con marcadores de ácido nucleico de tamaño conocido, que

se colocan en una o más líneas del gel. Se los identifica como escaleras moleculares dado que ayuda a determinar el tamaño de interés. El gel debe estar teñido para poder identificar las bandas de ADN. Existe un gradiente tanto en temperatura como químico, lo que provoca que el ADN bicatenario se vuelva monocatenario por la desnaturalización, sucede a medida que se mueve a través del gel con un gradiente (Foxman, 2012).

7.7.1.4 Fundamento de la técnica ARDRA

El análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA) involucra la amplificación de secuencias específicas del gen 16S rRNA por vía de PCR. Los fragmentos amplificados se digieren con el uso de endonucleasas de restricción de tetracorte, estas son enzimas de restricción se reconocen y cortan secuencias específicas de cuatro pares de bases de ADN. Al finalizar, se separa con el uso de electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida (Nazir et al., 2019).

7.8 APLICACIÓN DE PCR DEL GEN 16S EN *Rhizobium*

La identificación de las especies de *Rhizobium* se hizo mediante el aislamiento de genes de la región de 16S ARNr, el cual es una región altamente conservada en el genoma de esta bacteria. Previo a la amplificación, se debe extraer el ADN de las colonias aisladas. Se realiza mediante el método de lisis alcalina que su proceso constituye en la suspensión de 1 o 2 colonias en 20 µl de buffer de lisis. Posterior, se centrifuga la suspensión durante un tiempo de 5 minutos a una velocidad de 13 000 rpm. El sobrenadante de cada aislamiento se traspa a nuevos tubos Eppendorf, los cuales deben ser colocados a 95 °C durante 15 min. Adicional, se añade 180 µl de agua ultrapura y debe ser centrifugado nuevamente por durante 5 min a 13 000 rpm, se debe desechar a un nuevo tubo conservando el ADN extraído a -20 °C (Granda et al., 2009).

Para la amplificación de genes en la región 16S, se usan cebadores específicos, ya que el objetivo es amplificar segmentos particulares en lugar de la secuencia completa. Se usa los primers 5'CTGGCTCAGGAC/TGAACGCTG3' y 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3'. La amplificación de toda la región es de 1500 pares de bases que corresponden a los genes 16S ARNr. Subsiguiente, son purificados para eliminar impurezas y asegurar la calidad del ADN. La electroforesis es usada para amplificar estos

genes y se verifica la integridad de los fragmentos. Se emplea gel de agarosa al 1%, donde los productos de PCR se separan según su tamaño molecular y se visualizan con colorantes como bromuro de etidio o SYBR Green (Montalvo y Lugo, 2019).

Las reacciones deben ser mezclados con 1 µl del producto del PCR purificada junto a 0,5 µl de Big Dye™ Termination Ready Reaction Mix que contiene 3,75 µl de agua ultra purificada y 3 µl (20 ng µl⁻¹) de uno de los ocho cebadores usados para la secuenciación total (cebador delantero, posición 339-358, 5'CTCCTACGGGAGGCAGCAGT3'; 519- 536, 5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3'; 908- 926, 5'AACTCAAAGGAATTGACGG3'; 1093- 1112, 5'AGTCCCGCAACGAGCGCAAC3'; cebador reverso, posición 358-339, 5'ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG3'; 536-519, 5'GTATTACGCGGCTGCTG3'; 1112-1093, 5'GTTGCGCTCGTTGCGGGACT3' and 1241- 1222, 5'GCTACACACGTGCTACAATG3'). La configuración térmica se basó en 30 ciclos; comenzando con 15 a 96 °C, un ciclo de 35 °C y 4 min por 60 °C. La secuencia es analizada con el secuenciador de ADN Applied Biosystem 3100 con montaje del programa BioNumerics ver. 4.5 (Granda et al., 2009). Las secuencias fueron alineadas por FASTA y la homología de las secuencias fueron comparadas con bases de datos de nucleótidos internacional European Molecular Biology Laboratory (Granda et al., 2009).

En contraste, Laguerre et al. (1996) señala que, la identificación de cepas de *Rhizobium* se realizó por PCR con cebadores para amplificar las secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas como el REP1R-I y el REP2-I. Estas secuencias son fragmentos del ADN conservadas que tienen una estructura simétrica y repetitiva. A pesar de que son secuencias conservadas su disposición varía, lo que es un indicativo de la variabilidad genética de esta bacteria. Se obtiene como resultado patrones de bandas distintivos incluso entre los biovares de cepas de las especies de *Rhizobium*.

7.9 PCR-RFLP PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOVARES DE CEPAS DE *Rhizobium*

El PCR-RFLP es utilizado para identificar regiones cromosómicas y simbiogénicas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Se analiza la región 16S ADNr con el uso del cebador FGPS1490 que amplifica el extremo 3' de este gen. Seguido, se utilizó el cebador FGPL132 que se ubica en el extremo 5' del gen 23S

rDNA. Por otra parte, se realizó distintas PCR independientes para nifD-nifK usando FGPD807 y FGPK492 como cebadores correspondientes a cada gen. Esto debido a que ambos forman parte en del complejo de fijación de nitrógeno que comúnmente se encuentran en el plásmido simbiogénico. Adicional, Se realizó un PCR de los biovares usando las regiones nodD, nodF, nodD2-nodD3 para detectar la regulación de la nodulación en *Rhizobium leguminosarum* biovares viciae y trifolii (Laguerre et al., 1996).

El PCR junto se realizó bajo condiciones específicas para garantizar una amplificación eficiente de las secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas presentes en el genoma de las cepas del género *Rhizobium*. La preparación comenzó tomando 15 μ L del ADN extraído puro como molde. Los reactivos que se implementaron fueron 10 mM de Tris-HCl a un pH 9 que se encontraba a una temperatura de 25°C. Se adicionó, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 20 μ M de cada dNTP. Al finalizar, se agregó 0.05 μ M de cada cebador junto a 1 μ L de una solución de 1 U/ μ L de Taq polimerasa. El ciclo térmico que se llevó a cabo fue en la desnaturalización inicial fue de 95°C por 3 min. Durante un periodo de 35 ciclos. La desnaturalización ocurrió a una temperatura de 94°C por 1 min. El alineamiento se produjo a una temperatura de a 55-63°C por un 1 min, seguido de dos extensiones de 2-3 minutos cada uno (Laguerre et al., 1996).

Los productos de la amplificación por PCR fueron sometidas a la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), para encontrar variaciones genéticas mediante la digestión enzimática del ADN amplificado. Se usaron siete enzimas de restricción para cada producto amplificado, las cuales fueron AluI, CfoI, DdeI, HaeIII, MspI, NdeI y TaqI agregados al ADN amplificado. La temperatura de incubación depende de la especificidad de la enzima, pero oscila en un rango de 37°C o 65°C. El análisis de los fragmentos se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa 3-4% y se dejó correr por un periodo de tiempo de 4 horas a un voltaje 80-100 V. Al finalizar, al comparar las bandas se obtuvo que hay 13 tipos de IGS del ADNr. Esto es un indicativo de las diferencias en la organización de los genes simbióticos entre cepas (Laguerre et al., 1996).

7.10 SOUTHERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOVARES DE CEPAS DE *Rhizobium*

La técnica Southern blot se implementó para detectar la variabilidad genética encontrada por PCR-RFLP. Se comparó los perfiles de restricción mediante hibridación con sondas específicas. Los fragmentos que se obtuvieron del PCR-RFLP se trasladaron a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Este procedimiento se realizó con el propósito de facilitar la hibridación, con el empleo de Plac12, usado como la sonda cromosómica marcada. Por otra parte, se usaron sondas específicas para los genes *nod* y *nif*. Esta técnica permitió determinar que las cepas con perfiles cromosómicos similares tenían diferentes plásmidos simbióticos, por ende, existe una variabilidad entre estas para realizar la simbiosis con la planta hospedadora (Laguerre et al., 1996).

7.11 ARDRA

El análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado de genes de ARNr 16S se realizó con tres cepas; *Rhizobium tropici*, *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum*. Los productos de la PCR junto con las cepas se les agrega enzimas de restricción como Hae III, Eco R I y Msp I. Lo que genera una mezcla de; 3.8 µl de agua para PCR, 1.0 µl de tampón de reacción, 0.2 µl de enzima de restricción y 5.0 µl de amplicones de PCR durante una hora a una temperatura de 37 °C. Los fragmentos se tiñen por el SYBR-Green y son separados por un gel de agarosa al 2%. La escalera molecular de ADN de 100 pb ayuda a estimar el tamaño de los fragmentos. Los cuales pasan a través del gel a una carga de 80 V en un tiempo de 50 min (Koskey et al., 2018)

7.12 BOX-PCR Y REP-PCR

En la extracción de ADN se trabaja con una suspensión bacteriana de *Rhizobium* con una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Lo que garantiza una cantidad suficiente de biomasa para obtener un rendimiento adecuado de material genético. Los perfiles genómicos fueron desarrollados por la técnica rep-PCR en donde se emplearon el primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). La mezcla de la reacción tuvo un volumen total de 50 µL, compuesta por: 2 µL del primer BOX A1R (50 pmoles), 3.125 µL de dNTPs (1.25 mM), 2.5 µL de tampón KCl-MgCl₂ (1×), 7.5 µL de MgCl₂ (7.5 mM), 0.4 µL de Taq polimerasa (2 U), 0.4 µL de DMSO (10%), 5 µL de ADN genómico diluido (10 ng/µL; total

50 ng), y 2.24 µL de agua ultrapura. La amplificación comenzó con dos desnaturalizaciones iniciales a 95 °C por periodos de tiempo de 3 min y 45 segundos. El alineamiento se realizó a 53.4 °C por un minuto y sus dos extensiones finales fue a una temperatura de 65°C por 8 minutos y la segunda con el doble de tiempo.

Las bandas fueron reveladas en gel de agarosa al 1% en buffer TBE a 80V durante 180 minutos. Para esto, se utilizó una escalera molecular de referencia de Gene Ruler 1kb DNA Ladder Plus.

El perfil genómico se infirió con el método de máxima verosimilitud para escoger el modelo de sustitución de cada alineamiento con el software MEGA 7.0

Los perfiles genéticos con BOX-PCR genera patrones polimórficos que reflejan la diversidad genómica, junto con secuenciación del gen 16S rRNA, se llegó a verificar la diferenciación genotípica. Se agruparon por su similitud debido a que se eligió una cepa representativa por cada distribución de bandas. Se obtuvieron como resultado 24 cepas de *Rhizobium*, las relaciones filogenéticas de las cepas aisladas tuvieron relación con especies de *Rhizobium multihospitium* y *Rhizobium tropicipero* con una similitud de (99.52%). En el caso de *Rhizobium miluonense* se obtuvo una similitud del (99.24%). Cinco cepas que se encontraban de forma independiente en la filogenia tuvieron una identidad con *Rhizobium endophyticum* con el (98.44%) (Soto et al., 2021).

7.13 SECUENCIACIÓN

Según Granda et al. (2009), la identificación genética de los aislados se realizó a partir del ADN extraído de colonias previamente purificadas, que se obtuvieron de nódulos de frijol. El ADN genómico se aisló mediante un protocolo de lisis alcalina, el cual permitió obtener material genético adecuado para la posterior amplificación por PCR de la región 16S rRNA, utilizando cebadores conservados que abarcaron aproximadamente 1500 pb de esta región altamente conservada del genoma bacteriano. Tras la purificación de los amplicones mediante un kit comercial, se llevó a cabo la reacción de secuenciación empleando cebadores específicos distribuidos a lo largo de la secuencia.

En el análisis de las secuencias se utilizó un secuenciador de ADN Applied Biosystem 3100, en conjunto con un montaje de las secuencias con el programa BioNumerics. Las secuencias fueron

alineadas para buscar cercanía con bases de datos internacionales como EMBL. Todo esto se realizó con el programa FASTA. Se identificó especies del género *Rhizobium*, entre ellas a *Rhizobium etli*, *Rhizobium radiobacter* y *Rhizobium pisi* (Granda et al., 2009).

7.14 ENFOQUE METATRANSCRIPTÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Rhizobium*

Las especies de *Rhizobium* presentan especificidad para formar relaciones simbióticas con determinadas leguminosas. La interacción principal comienza en las raíces de las plantas, actúan como un sitio de reconocimiento, colonización e instauración de la simbiosis fijadora de nitrógeno. El desarrollo de los nódulos es un proceso complejo, que se encuentra sujeto a estrictas regulaciones de la planta. Los factores de transcripción (FT) están involucrados en las etapas de la simbiosis debido a son los encargados de reprogramar la transcripción. Los TF son clasificados como activadores o represores, dependiendo de con que proteína interactúa (Chakraborty et al., 2022).

Según Pardo (2021), la regulación transcripcional permite que las plantas ajusten dinámicamente su expresión génica durante la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno. Por ello, se han identificado factores de transcripción como las familias MADS/AGL y SHI/STY/SRS mediante el uso de transcriptómica para analizar estos genes durante la simbiosis con *Rhizobium etli*. Estos modulan la expresión de genes involucrados en la formación de nódulos y en su respuesta simbiótica dado que actúan como interruptores que encienden o apagan redes de genes claves. El resultado de la transcriptómica reveló la expresión génica de *PvGEA* donde se identificó genes de la familia MADS/AGL y STY/SRS, los cuales son altamente expresados en raíces y nódulos. La expresión de estos genes fue validada con qRT-PCR, lo que confirmó los resultados de su participación en procesos simbióticos como la infección, organogénesis nodular y funcionamiento del nódulo. La identificación de especies bacterianas se puede lograr por la secuenciación del RNA total extraído de los nódulos, conocida como metatranscriptómica. Es esencial que se identifique de forma clara entre los transcritos vegetales y bacterianos dado que permite recuperar transcritos de genes conservados como *rRNA*, *recA*, *atpD*, *glnII*, *nodC*, *nifH*, *fixK*, y *rpoB*. Son secuencias conservadas con suficiente variabilidad para distinguir

entre especies. Los transcritos, se alinean con bases de datos genómicas de *Rhizobium* para determinar la especie simbiote dominante (Pardo, 2021).

7.15 MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE *Rhizobium*

El análisis de secuencias multilocus (MLSA) es un método molecular que permite identificar y clasificar microorganismos mediante el análisis filogenético comparativo de múltiples fragmentos internos de genes housekeeping. Estos se encuentran presentes en todos los organismos del grupo que se estudia, por ello, solo hay una copia de cada uno en el genoma. Esto garantiza que las comparaciones entre cepas o especies sea consistente y no sea afectada por variantes de los genes. La amplificación por PCR y secuenciación de estos fragmentos permite elaborar árboles filogenéticos que revelan las relaciones evolutivas entre nuevas variantes de especies bacterianas (Macheras et al., 2011).

El análisis mediante MLSA reveló una notable diversidad filogenética entre las cepas de *Rhizobium*, lo que sugiere la posible existencia de especies no descritas previamente. Esta técnica evalúa múltiples genes de mantenimiento, como *recA*, *glnII* y *gyrB*, caracterizados por una tasa de evolución más rápida que los genes ribosómicos. Su equilibrio entre conservación evolutiva y variabilidad discriminatoria los hace ideales para estudios filogenéticos, al tiempo que preservan información evolutiva clave. Los resultados mostraron que las cepas se agruparon en clados separados de otras especies del género, respaldando la hipótesis de una nueva especie. El hallazgo fue validado por un soporte bootstrap del 100%, lo que indica alta confiabilidad en el agrupamiento filogenético. Adicional, el gen 16S rRNA se emplea como marcador filogenético universal debido a su alta conservación, su limitada variabilidad impide diferenciar entre especies estrechamente relacionadas. En este estudio, el árbol construido con secuencias 16S agrupó cuatro de las cinco cepas, mientras que una se posicionó más cercana a *Rhizobium tropici*. Sin embargo, el análisis filogenético basado en la concatenación de genes housekeeping reunió a las cinco cepas en un único clado con soporte del 100%, ofreciendo una resolución taxonómica superior. Previo al análisis, las cepas fueron aisladas en medio YMA, amplificadas por BOX-PCR y se secuenciaron los genes 16S, *recA*, *glnII* y *gyrB*. Los perfiles genéticos obtenidos con el cebador BOX-A1R (versión 4.6) y analizados estadísticamente mostraron similitudes menores al 70%

con otras especies del género, umbral considerado como evidencia de separación a nivel de especie. Estos resultados no solo aportan a la delimitación taxonómica, sino que también son fundamentales para seleccionar cepas nativas con potencial como inoculantes agrícolas adaptados a las condiciones edáficas locales (Fuzinatto et al., 2012).

7.16 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Rhizobium* MEDIANTE PLÁSMIDOS

La identificación y extracción de plásmidos en *Rhizobium* se realiza de forma rutinaria bajo ciertas condiciones. Las condiciones sugieren que el crecimiento bacteriano se encuentre en fase estacionaria temprana con una densidad óptica de 540 nm. Los cultivos en esta fase son densos con una apariencia gomosa debido a que *Rhizobium* es productora de alta cantidad de lipopolisacáridos (LPS), fibrillas de celulosa, polisacáridos capsulares neutros y polisacáridos extracelulares aniónicos de alto peso molecular. Los cuales están presentes en la pared celular o son secretados en el medio, estos interfieren en la lisis celular y el aislamiento del ADN plasmídico. En la mayoría de distintas cepas de *Rhizobium* se han encontrado plásmidos megaplásmidos con pesos moleculares de 90 y 300 MDa. Se ha encontrado que existen diferentes plásmidos dentro de una cepa, van desde 1 y 6 que representan el 25% del AND total. Se han encontrado plásmidos en las cepas de *Rhizobium* que intervienen en la fijación de nitrógeno. Adicional, se ha encontrado plásmidos en cepas de *Rhizobium trifolii* con pesos moleculares de 350 y 160 MDa. Otra especie que se detectó su presencia fue en *Rhizobium japonicum* con un plásmido de 110 MDa (Cortés et al., 1994).

8 CONCLUSIONES

1. La identificación de especies del género *Rhizobium* ha progresado desde enfoques fenotípicos tradicionales hacia técnicas moleculares de alta resolución. En el caso de los métodos tradicionales como el análisis morfológico, pruebas bioquímicas y el uso de medios diferenciales siguen siendo usado para una caracterización preliminar. Sin embargo, su limitada especificidad ha impulsado el uso de herramientas moleculares más precisas.
2. Entre estas, la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA se ha establecido como un análisis estándar para la identificación a nivel de género. Sin embargo, debido a su baja resolución para discriminar entre especies cercanas, se ha complementado con técnicas como , PCR-RFLP, ARDRA, BOX-PCR, REP-PCR y metatranscriptómica. Adicional, se implemento el uso de técnicas inmunológicas que van a la identificación de anticuerpos y plásmidos para detectar a especies específicas de este género.
3. El nitrógeno cumple una función esencial en el crecimiento vegetal y es incorporado al ecosistema de distintas fuentes naturales y sintéticas. Las plantas obtienen el nitrógeno por procesos biológicos como la descomposición de materia orgánica, nitrificación y fijación atmosférica. La fijación de nitrógeno atmosférico por *Rhizobium* es una fuente de nitrógeno natural debido a que la bacteria establece relaciones simbióticas con plantas leguminosas. Le proporciona nutrientes esenciales para su crecimiento, lo que mejora la fertilidad del suelo y reduce el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados.
4. El uso de métodos tradicionales para su identificación como la tinción Gram, tolerancia a NaCl, los cultivos en medios selectivos, y las pruebas bioquímicas como catalasa y la oxidasa, son relevantes dado que la base para diferenciar su morfología y fisiología. Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen limitaciones en cuanto a su especificidad y sensibilidad al tratar de discriminar entre cepas genéticamente similares o biovares con capacidades simbióticas divergentes. A pesar de esto, existen especies que tienen características que las diferencian de las demás. Ese es el caso de la tolerancia a NaCl, la mayoría de las especies no tiene

crecimientos bajos estas condiciones, pero hay una especie que se diferencia de las otras y es *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* que si lo puede crecer bajo esta prueba.

5. Las técnicas inmunológicas han incorporado una nueva perspectiva para su identificación. En el caso de la aglutinación, inmunodifusión y ELISA, permitieron avanzar significativamente en la identificación serológica de cepas y en la evaluación de similitudes antigénicas. Estas metodologías aportan mayor especificidad que los métodos convencionales, aunque su eficacia depende en gran medida de la calidad de los antisueros utilizados y de la homogeneidad de los antígenos entre especies.
6. El uso de técnicas moleculares existe una mayor capacidad de discriminación taxonómica. Los métodos como PCR dirigida al gen 16S rRNA, PCR-RFLP, ARDRA, BOX-PCR, REP-PCR, secuenciación y MLSA permiten una identificación genética robusta y reproducible. Estas herramientas no solo revelan relaciones filogenéticas y diversidad genómica, sino que también abren posibilidades para descubrir nuevas especies y evaluar el potencial simbiótico de cepas nativas. Por ejemplo, la integración de BOX-PCR con secuenciación permitió alcanzar niveles de identidad superiores al 99% con especies como *Rhizobium miluonense* y *Rhizobium multihospitium*, lo que valida la eficacia de los enfoques combinados.
7. El uso de la técnica como metatranscriptómica soporta el estudio de la funcionalidad simbiótica a nivel de la expresión génica, lo que permite identificar especies simbiotes dominantes y los mecanismos moleculares que regulan la formación de nódulos que se relación con la eficiencia en la fijación de nitrógeno. Estas tecnologías, junto con el análisis multilocus (MLSA), permiten establecer perfiles genéticos completos que ayudan a seleccionar cepas adaptadas a condiciones agroecológicas específicas y con alto potencial como inoculantes agrícolas.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M., Al-Amri, S., El-Enany. (2023). Enhancing Rhizobium–Legume Symbiosis and Reducing Nitrogen Fertilizer Use Are Potential Options for Mitigating Climate Change. *MDPI*, 13 (11). <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/11/2092#:~:text=The%20symbiotic%20relationship%20between%20Rhizobium%20bacteria%20and%20leguminous%20plants%20plays,the%20need%20for%20chemical%20fertilizers>.
- Alencastro, C, y Ayala, J. (2023). Caracterización morfológica de la cepa nativa de *Rhizobium* sp. obtenida a partir de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.). *AXIOMA*, 1 (29), 13–18. <https://doi.org/10.26621/ra.v1i29.889>
- Alhajj, M., Zubair, M., Farhana, A. (2023). *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Ballesteros, M., Durán, D., Domínguez, D., Albareda, M., y Palacios, J. (2018). *Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de Rhizobium leguminosarum bv. viciae a diferentes hospedadores*. Universidad Politécnica de Madrid. https://oa.upm.es/50995/1/INVE_MEM_2017_276980.pdf
- Cabrera, L., y Guevara, C. (2003). *Caracterización de cepas de Rhizobium leguminosarum bv. Phaseoli mediante la técnica de Elisa y resistencia a antibióticos*. SIREDA. <https://sired.ude-nar.edu.co/14029/1/62574.pdf>
- Casasola, M. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Rev. Colegio de Microb. Quím. Clín. de Costa Rica*, 27 (2). <https://revista.microbiologos.cr/wp-content/uploads/2023/11/Volumen-27-No2-Articulo-3-89-98.pdf>
- Cerón, L., Aristizábal, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1). http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752012000100026&script=sci_arttext

- Chakraborty, S., Valdés, O., Stonoha, C., Ané, J. (2022). Transcription Factors Controlling the Rhizobium–Legume Symbiosis: Integrating Infection, Organogenesis and the Abiotic Environment. *Plant and Cell Physiology*, 63 (10), 1326–1343. <https://academic.oup.com/pcp/article/63/10/1326/6584650>
- Chuquimarca, D. (2025). Caracterización morfológica, bioquímica y funcional de cepas de *Rhizobium* asociadas a Trébol Blanco (*Trifolium repens L.*) de las provincias de Pichincha y Cotopaxi. [Tesis de licenciatura, Universidad Central del Ecuador]. <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c1476b48-60d9-4bbb-99e9-d4382d601e4e/content>
- Contreras, C., Iriarte, J., y Muñoz, A. (2007). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE GÉNEROS *Rhizobium sp.* Y *Bradyrhizobium sp.* ASOCIADOS A LA LEGUMINOSA *Cajanus Cajan* EN PARCELAS AGRÍCOLAS DEL MUNICIPIO DE SAMPUÉS, DEPARTAMENTO DE SUCRE [Proyecto presentado como requisito para optar al título de Biólogo con Énfasis en Biotecnología] Repositorio Universidad de Sucre. <https://repositorio.unisucre.edu.co/server/api/core/bitstreams/68c3e76e-c3d7-4b92-bf89-dd4487d55a5c/content>
- Cortés, M., Vargas, F., Pinilla, C., Pérez. G., Navarro. (1994). Extracción de ADN plasmidico de cepas de *Rhizobium leguminisarum* en diferentes fases de crecimiento. *Revista Colombiana de Química*, 23 (2). <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/16212/17095>
- Delgado, A., Contreras, L., Almaraz, C., Esnarriaga, N., Toledo, M., y Gabriela , D. B. (2014). BIOLOGÍA EN AGRONOMÍA. In *RIZOBIOS NATIVOS QUE NODULAN ALFALFA (Medicago sativa L.) Y GARBANZO (Cicer arietinum L.) EN CATAMARCA, ARGENTINA*. <https://editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/rebea/2014-marzo/4.Delgado.pdf>
- Enrich-Prast, A., Gaxiola, A., Lúcia, A., Durán, J., Rodríguez, A., y Marotta, H. (2018). Ciclos biogeoquímicos y cambios globales. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1368257/fulltext01>

- Fathi, A. (2022). *Role of nitrogen (N) in plant growth, photosynthesis pigments, and N use efficiency: A review*. Research Gate. https://www.researchgate.net/publication/364150308_Role_of_nitrogen_N_in_plant_growth_photosynthesis_pigments_and_N_use_efficiency_A_review
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., y Valdazete, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. EIMC. https://www.researchgate.net/publication/51229535_Bacterial_identification_methods_in_the_microbiology_laboratory/link/5cc081cfa6fdcc1d49acb6fa/download?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7InBhZ2UiOiJwdWJsaWNhdGlvbilsInByZXZpb3VzUGFnZSI6bnVsbH19
- Foxman, B. (2012). Chapter 5 - A Primer of Molecular Biology. *Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology*, 53 –78. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/electrophoresis>
- Fuzinnatto, R., Marcon, J., Ribeiro, R., Hungria, M. (2012). *Diversidade e filogenia de estirpes de Rhizobium pela metodologia de MLSA*. FERTBIO. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/934744/1/FERTBIO1212.pdf>
- González, A., y Camacho, M. (2017). Emisión de gases de efecto invernadero de la fertilización nitrogenada en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8 (8), 1733–1745. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.698>
- Granda, K., Colás, A., Cupull, R., Gutiérrez, Y., y Torre, R. (2009). Caracterización e identificación genética de aislados de Rhizobium en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 36 (4), 5–14. <https://biblat.unam.mx/hevila/Centroagricola/2009/vol36/no4/1.pdf>
- Haojiang, B., Yongqing, L., Weiyuan, L., Xueyong, Z., Yuqiang, L., y Juanli, C. (2025). Impact of nitrogen fertilizer types and concentrations on soil seed bank germination and seedling growth in semi-fixed dunes of the Horqin Sandy Land. *Journal of Environmental Management*, 383.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479725014409#:~:text=Nitrogen%20addition%20significantly%20inhibited%20seed,among%20fertilizer%20types%20and%20concentrations>

Hernández, J., Cubillos, J., y Millan, P. (2012). *Aislamiento de cepas de Rhizobium spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe* Isolation of *Rhizobium spp.*, associated two forage leguminous in the Caribbean Biotechnological Center. Research Gate.

https://www.researchgate.net/publication/298069900_Aislamiento_de_cepas_de_Rhizobium_spp_asociados_a_dos_leguminosas_forrajeras_en_el_Centro_Biotecnologico_del_Caribe_Isolation_of_Rhizobium_spp_associated_two_forage_leguminous_in_the_Caribbean_Biotech/download?tp=eyJjb250ZXh0Ijp7Im-ZpcnN0UGFnZSI6Il9kaXJlY3QiLCJwYWdlIjoieX2RpcmVjdCJ9fQ

Hossain, A., Gunri, S., Barman, M., Sabagh, S., y Teixeira, J. (2019). *Isolation, characterization and purification of Rhizobium strain to enrich the productivity of groundnut (Arachis hypogaea L.)*.

De Gruyter Brill. <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/opag-2019-0040/html?srsId=AfmBOoqXafadopXfWKhxTjOHxjHNsUP-FGLrb3uuualW5io2RbQFM4Jp>

Julca, A., Meneses, L., Blas, R., y Bello, S. (2006). LA MATERIA ORGÁNICA, IMPORTANCIA Y EXPERIENCIA DE SU USO EN LA AGRICULTURA. *Idesia*, 24 (1), 49-61

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292006000100009

Jung, B., y Hoilat, G. (2024). *MacConkey Medium*. National Library of Medicine.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>

Khera, N., Padda, I., Swift, C. (2023). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>

Koskey, G., Mburu, S., Kimiti, J., Ombori, O., Maingi, J., y Njeru, E. (2018). Genetic Characterization and Diversity of *Rhizobium* Isolated From Root Nodules of Mid-Altitude Climbing Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Varieties. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00968>

- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M., Charnay, M., Louvrier, P., Mazurier, S., Rigottier-Gois, L., y Amarger, N. (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (6), 2029–2036. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.62.6.2029-2036.1996?download=true>
- Lambo, L., y Mancipe, D. (2021). Análisis de los impactos ambientales ocasionados por el uso de los fertilizantes nitrogenados, en el cultivo de papa en el municipio de Zipaquirá [Universidad Distrital Francisco José de Caldas]. <https://repository.udistrital.edu.co/server/api/core/bitstreams/d342d79c-dfbf-4890-93e3-90da4b4d055f/content>
- López, J., Lépiz, R., González, D., Rodríguez, R., López, E., y Olalde, A. (2017). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Rhizobium* COLECTADAS EN FRIJOL COMÚN SILVESTRE Y DOMESTICADO. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40 (1), 73–81. <https://www.redalyc.org/journal/610/61051194009/html/>
- López, J., Lépiz, R., González, D., Rodríguez, R., y López, E. (2020). Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol cultivado y silvestre. *Terra Latinoamericana*, 38 (4). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792020000500841#B29
- Macheras, E., Roux, A., Bastian, S., Cardoso, S., Palaci, M., Sivadon, V., Gutierrez, C. (2011). Multilocus Sequence Analysis and *rpoB* Sequencing of *Mycobacterium abscessus* (Sensu Lato) Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. [https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.01274-10#:~:text=Multilocus%20sequence%20analysis%20\(MLSA\)%20is,to%20selective%20pressure%20\(27\)](https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.01274-10#:~:text=Multilocus%20sequence%20analysis%20(MLSA)%20is,to%20selective%20pressure%20(27))
- Méndez, R., y Lara, A. (2016). ELABORACIÓN DE BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Rhizobium* spp. EN CAMPO ZACATECANO. Research Gate.

<https://www.researchgate.net/publication/320161210> ELABORACION DE BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Rhizobium* spp EN CAMPO ZACATECANO

Montalvo, C. A., y Lugo, M. A. (2019). *Electroforésis: fundamentos, avances y aplicaciones*. *Epistemus. Ciencia, Tecnología y Salud*, 13(26), 85–102. <https://biblat.unam.mx/hevila/EpistemusCiencia-tecnologiaysalud/2019/vol13/no26/7.pdf>

Naciones Unidas. (2017). *World Population Prospects: The 2017 Revision*. United Nations. <https://www.un.org/es/desa/world-population-prospects-2017?form=MG0AV>

Nazir, R., Rehman, S., Nisa, M., y Baba, U. Ali. (2019). Exploring bacterial diversity. *Elsevier EBooks*, 263–306. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817495-1.00007-4>

Pardo, L. (2021). *Nuevos protagonistas de la regulación transcripcional del frijol para la simbiosis fijadora de nitrógeno con *Rhizobium etli** [TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTORA EN CIENCIAS] Repositorio UNAM. <https://tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx/ptd2021/septiembre/0814574/Index.html>

Qianyun, M., Xiaomin, L., Wenxiu, W., Martin, H., Yaqiong, L., Jianlou, M., Wang, J., Jianfeng, S, Rojas, O. (2021). Recent developments in colorimetric and optical indicators stimulated by volatile base nitrogen to monitor seafood freshness. *Food Packaging and Shelf Life*, 28. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289421000028/pdffft?md5=99e20d3031e1bd155fdb7d6a5497ca3c&pid=1-s2.0-S2214289421000028-main.pdf>

Quemada, M., y Gabriel, J. (2023). *Impacto de los fertilizantes y la energía en la producción de alimentos*. Fundación de Estudios Rurales ANUARIO 2023. <https://www.upa.es/Anuario2023/020-Anuario-2023-Quemada-Gabriel.pdf>

Rahimi, S., Modin, O., Mijakovic, I. (2020). Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater. *Biotechnology Advances*, 43. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975020300677>

- Ramos, D., y Elein, T. (2014). Generalidades de los abonos orgánicos: Importancia del Bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. *Cultivos Tropicales*, 35(4), 52–59.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362014000400007
- Rodríguez, M. (2005). *Impacto ambiental del uso de fertilizantes nitrogenados en agricultura* [Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas] Repositorio Universidad de Buenos Aires. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3905_Rodriguez.pdf
- Sabry, K. (2015). Synthetic Fertilizers; Role and Hazards. Research Gate. https://www.researchgate.net/profile/Kazafy-Sabry-2/publication/283500340_Synthetic_Fertilizers_Role_and_Hazards/links/563b597b08ae405111a752c9/Synthetic-Fertilizers-Role-and-Hazards.pdf
- Sánchez, A. (2019). *Fertilizantes de nitrógeno, tan imprescindibles como contaminantes*. The Conversation. <http://theconversation.com/fertilizantes-de-nitrogeno-tan-imprescindibles-como-contaminantes-122594>
- Sandoval, G., y Peña, I. (2024). Incidencia de la Importación de Urea en el Sector Agrícola del Ecuador. *Revista de Investigación SIGMA*, 11 (02). <https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/Sigma/article/view/3493>
- Sharma, D., Singh, V., Singh, R., Joshi, C., Sharma, V. (2021). Isolation and characterization of bioactive compounds from natural resources: Metabolomics and molecular approaches. *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules*. 77-101. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/dna-extraction>
- Simon, Z., Mtei, K., Gessesse, A., y Ndakidemi, P. (2014). Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Rhizobia from Cultivated and Uncultivated Soils of Northern Tanzania. *American Journal of Plant Science*, 5, 4050-4067. https://www.scirp.org/pdf/AJPS_2015010211513606.pdf
- Soto, J., Borbor, G., y Borbor, V. (2012). Identificación y caracterización de cepas nativas de Rhizobium en la Provincia de Santa Elena. [Avance de investigación]. Facultad Ciencias Agrarias.

<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/7270/1/UPSE-RCT-2013-Vol.1-No.1-007.pdf>

Soto, J., Ormeño, E., Zuñiga, D. (2021). Diversidad de rizobios y fijación biológica de nitrógeno en aislados de *Clitoria brachystegia*, en remanentes de bosque seco tropical de Ecuador y Perú. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92. <https://revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/view/3426/2185>

Thazin, M., y Phyu, P. (2020). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RHIZOBIUM FROM ROOT NODULES OF ARACHIS HYPOGAEA L. (GROUNDNUT). *J. Myanmar Acad. Arts Sci*, 18 (4). https://www.researchgate.net/profile/Aung-Aung-Aye-2/publication/378175822_Study_on_some_Phytoplankton_of_Maung_Ma_Kan_Beach_Longlone_Township_Tanintharyi_Region_Southern_Myanmar/links/65cb8d581e1ec12eff8e3bac/Study-on-some-Phytoplankton-of-Maung-Ma-Kan-Beach-Longlone-Township-Tanintharyi-Region-Southern-Myanmar.pdf#page=192

Valenzuela, J., Ormeño, E., y Zúñiga, D. (2021). Diversidad de rizobios y fijación biológica de nitrógeno en aislados de *Clitoria brachystegia*, en remanentes de bosque seco tropical de Ecuador y Perú. *Revista mexicana de biodiversidad*, 92. <https://revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/view/3426/2185>

Wadhwa, Z., Srivastava, V., Rani, R., vi, T., Makkar, K., y Jangra, S. (2017). Isolation and Characterization of Rhizobium from Chickpea (*Cicer arietinum*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 2880–2893. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.340>

Wang, Q., Li, S., Li, J., y Huang, D. (2024). The Utilization and Roles of Nitrogen in Plants. *Forests*, 15 (1191). <https://www.mdpi.com/1999-4907/15/7/1191>

Xu, Z., y Deng, M. (2017). Identification and Control of Common Weeds: Volume 2. *Springer Nature*, 547-615. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-024-1157-7_43

Yadav, A., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Dikilitas, M., Abdel, A., Ahluwalia, A., Kumar, A. (2021). Biodiversity, and biotechnological contribution of beneficial soil microbiomes for nutrient

cycling, plant growth improvement and nutrient uptake. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818121001055/pdf>

Yijie, Z., Chen, Y., Yingwei, S., Weicheng, P., Rong, L., Yixiang, L., Huichuan, H., Xiahong, H., Min, Y., y Shusheng., Z. (2022). Soil Acidification caused by excessive application of nitrogen fertilizer aggravates soil-borne diseases: Evidence from literature review and field trials. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 340 (108176). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167880922003255>