

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE GANDÍA  
GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

---



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



ESCUELA POLITÉCNICA  
SUPERIOR DE GANDÍA

**“Puesta a punto de un método de aislamiento de los  
*Rhizobium* simbiotes radiculares en una leguminosa  
de la Flora Valenciana”**

***TRABAJO FINAL DE GRADO***

Autora:  
Sherezade Ortiz-Villajos Cano

Tutora: Claudia Gabriela Pallotti Sagripanti  
Primer cotutor: Ana Isabel Jiménez Belenguer  
Segundo cotutor: Enrique Sanchis Duato

**GANDÍA, 2017**

## **Agradecimientos**

A mis tutores, Claudia Pallotti, Ana Jiménez y Enrique Sanchis, que me han guiado en este trabajo, y con los que he aprendido mucho durante todo el proceso; y a todos los profesores que me formaron para ser ambientóloga.

A mi familia, mis padres, mi abuela, mi hermano y mi cuñada, sin los cuales toda esta aventura universitaria no habría sido posible. Gracias por esas palabras de ánimo cuando hacían falta, y por esos esfuerzos para que yo cumpliera un sueño.

Y, por supuesto, a Nereida Gamón y Vicent Alborch, que fueron mis eternos compañeros en el grado, y cuyos consejos aclararon mis ideas en más de una ocasión.

A todos ellos, gracias.

## Resumen

En el presente trabajo, se realizó la caracterización de las raíces y se analizó la nodulación de dos leguminosas características de la Comunidad Valenciana: *Medicago sativa* L. y *Onobrychis viciifolia* Scop. Posteriormente, se llevó a cabo la puesta a punto de un método de aislamiento e identificación de los rizobios que albergan los nódulos formados en las raíces de dichas especies vegetales. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las diferencias en la nodulación radicular de ambas especies. Los nódulos obtenidos se sometieron a distintos métodos de desinfección para determinar cuál era más conveniente para obtener colonias aisladas de los rizobios, así como se probaron formas de conservación de las raíces, con el fin de valorar su viabilidad con el paso del tiempo. Finalmente, se realizaron pruebas bioquímicas para determinar la especie de rizobio de los microorganismos aislados.

Palabras clave: Leguminosas, *Rhizobium*, nódulos, aislamiento, caracterización.

## Abstract

Throughout the present piece of work, the characterization of the roots was performed, followed by the analysis of the nodulation of two main legumes of the Valencian Community: *Medicago sativa* L. y *Onobrychis viciifolia* Scop. Subsequently, the development of a method of isolation and identification of the rhizobia harboring the nodules formed in the roots of these plant species was carried out. The results showed the differences in root nodulation of both species. The obtained nodules were subjected to different disinfection methods to determine which one was more convenient to obtain isolated colonies of the rhizobia, as well as the ways in which the preservation of the roots were tested, in order to assess their viability over the time. Finally, biochemical tests were performed to determine the *Rhizobium* species of the isolated microorganisms.

Keywords: Legumes, *Rhizobium*, nodules, isolation, characterization.

## Resum

En el present treball, es va realitzar la caracterització de les arrels i es va analitzar la nodulació de dues leguminoses característiques de la Comunitat Valenciana: *Medicago sativa* L. i *Onobrychis viciifolia* scop. Posteriorment, es va dur a terme la posada a punt d'un mètode d'aïllament i identificació dels rizobios que alberguen els nòduls formats en les arrels d'aquestes espècies vegetals. Els resultats obtinguts posen de manifest les diferències en la nodulació radicular d'ambdues espècies. Els nòduls obtinguts es van sotmetre a diferents mètodes de desinfecció per a determinar com era més convenient per a obtenir colònies aïllades dels rizobios, així com es van provar formes de conservació de les arrels, amb la finalitat de valorar la seua viabilitat amb el pas del temps. Finalment, es van realitzar proves bioquímiques per a determinar l'espècie de rizobio dels microorganismes aïllats.

Paraules clau: Leguminoses, *Rhizobium*, nòduls, aïllament, caracterització.

## Índice

1. Introducción	1
1.1. La familia Leguminosae	1
1.2. El género <i>Rhizobium</i>	3
1.3. La simbiosis bacteria-planta y su importancia	4
2. Justificación y objetivos	7
3. Material y métodos	8
3.1 Cultivo de las especies vegetales	8
a) Caracterización macro y microscópica de los nódulos	10
3.2. Aislamiento de <i>Rhizobium</i>	11
3.2.1. Pruebas previas	11
a) Visualización de los nódulos en fresco	11
b) Desinfección de los nódulos con hipoclorito de sodio (NaClO)	11
b.1) Tinción	11
c) Desinfección de los nódulos con etanol 95%	11
d) Deshidratación de los nódulos	12
3.2.2. Aislamiento de <i>Rhizobium</i>	13
3.2.3. Pruebas bioquímicas para la identificación del género <i>Rhizobium</i>	15
4. Resultados y discusión	18
4.1. Caracterización de las leguminosas	18
4.2. Caracterización macro y microscópica de los nódulos	19
4.3. Aislamiento del <i>Rhizobium</i>	22
4.4. Caracterización de los rhizobios	24
4.5. Viabilidad de los nódulos rehidratados	29
5. Conclusiones	31
6. Líneas futuras	32
a) Viabilidad de los nódulos	32
b) Estudio molecular de los genes de <i>Rhizobium</i>	32
c) Realización de pruebas fisiológicas y bioquímicas	32
7. Referencias bibliográficas	33

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la morfología de <i>O. viciifolia</i> .....	2
Figura 2. Esquema de la morfología de <i>M. sativa</i> .....	2
Figura 3. Ciclo del nitrógeno (N <sub>2</sub> ). Fuente: ArgenBIO. ....	5
Figura 4. Germinación en placa de las semillas de <i>O. viciifolia</i> y <i>M. sativa</i> .....	8
Figura 5. Preparación del sustrato.....	9
Figura 6. Plántulas de <i>O. viciifolia</i> .....	9
Figura 7. Macetas con plántulas. ....	9
Figura 8. Macetas con plantas con crecimiento en el exterior. ....	10
Figura 9. Desinfección de los nódulos con etanol 95%.....	12
Figura 10. Preparación de los frascos para la desecación de los nódulos. ....	12
Figura 11. Nódulos en solución PBS (inicio).....	13
Figura 12. Nódulos en solución PBS (final).....	13
Figura 13. Esquema de la preparación de las placas de cultivo.....	14
Figura 14. Placas de cultivo con colonias.....	14
Figura 15. Técnica de la triple estría. ....	15
Figura 16. Preparación de placas de cultivo con la técnica de la triple estría... 15	
Figura 17. Colonias aisladas.....	15
Figura 18. Colores correspondientes al resultado de la prueba de oxidasa (según indicaciones del proveedor).....	16
Figura 19. Pruebas positivas de oxidasa y catalasa.....	16
Figura 20. Diferencia entre medios de cultivo con crecimiento (izquierda) y sin crecimiento (derecha). ....	17
Figura 21. Resultado positivo de las pruebas de Voges Proskauer (isquierda) y Rojo de Metilo (derecha). ....	17
Figura 22. Raíces de <i>O. viciifolia</i> (izquierda) y <i>M. sativa</i> (derecha).....	18
Figura 23. Nódulos radiculares de <i>O. viciifolia</i> .....	19
Figura 24. Nódulos radiculares de <i>M. sativa</i> .....	20
Figura 25. Nódulos en el cuello de la raíz de <i>M. sativa</i> .....	20
Figura 26. Coloración marrón-rojiza debido a la presencia de leghemoglobina. ....	21
Figura 27. Simbiosomas en nódulos de <i>O. viciifolia</i> . ....	21
Figura 28. Simbiosomas en nódulos de <i>M. sativa</i> .....	21
Figura 29. Ejemplo de placas de cultivo con colonias.....	22
Figura 30. Bacilos pertenecientes a nódulos de <i>M. sativa</i> .....	23
Figura 31. Bacilos pertenecientes a nódulos de <i>O. viciifolia</i> . ....	24
Figura 32. <i>Rhizobium</i> de nódulos deshidratados de <i>O. viciifolia</i> . ....	30
Figura 33. <i>Rhizobium</i> de nódulos deshidratados de <i>M. sativa</i> . ....	30

### Índice de tablas

Tabla 1. Crecimiento del número de especies en el género <i>Rhizobium</i> . (Fuente: Willems, A., 2008).....	3
Tabla 2. Especies incluidas en el género <i>Sinorhizobium</i> . (Fuente: Willems, A. et al., 2008) .....	4
Tabla 3. Caracterización de <i>O. viciifolia</i> .....	18
Tabla 4. Caracterización de <i>M. sativa</i> .....	19
Tabla 5. Resultados pruebas bioquímicas de los rhizobios pertenecientes a nódulos de <i>O. viciifolia</i> .....	25
Tabla 6. Resultados pruebas bioquímicas de los rhizobios pertenecientes a nódulos de <i>M. sativa</i> .....	27
Tabla 7. Pruebas bioquímicas de los rhizobios de nódulos rehidratados. ....	29

## 1. Introducción

Existen organismos que pueden asociarse y beneficiarse entre sí de distintas formas. En el presente trabajo se mostrará la simbiosis entre planta-bacteria, que tiene gran importancia para la planta, la bacteria, y cuya finalidad es proporcionar gran beneficio para el hombre. Así pues, el mutualismo existente entre las leguminosas y las bacterias fijadoras del nitrógeno, aportando al suelo características óptimas para el desarrollo de esta vegetación, y beneficiando al medio ambiente.

### 1.1. La familia Leguminosae

Las leguminosas son plantas que guardan sus semillas en vainas, además de ser la tercera familia más extensa de las plantas con flores, incluyendo plantas tan importantes como las judías, los guisantes o la alfalfa, las cuales tienen una gran importancia en la industria agroalimentaria. Así mismo, tienen la capacidad de crecer sin fertilizantes nitrogenados, lo que se supone un ahorro económico y, por otro lado, reduce los efectos ambientales de los fertilizantes nombrados (Madigan, M. *et al.* 2015).

La clasificación de las leguminosas, en base al Angiosperm Phylogeny Group III de 2009 (APG III), comprende 730 géneros y 19400 especies, siendo una de las familias con más especies y mayor distribución a escala mundial. Se divide en dos subfamilias: Mimosoideae y Caesalpinioideae.

La subfamilia Mimosoideae se caracteriza por albergar árboles y arbustos, de hojas alternas, pinnadas o bipinnadas, con más de un foliolo, y estípulas siempre presentes; las inflorescencias paniculares, racemosas, simples, en cabezuelas o espigadas; flores simétricas, a veces solo estaminadas o con ovarios reducidos. Su fruto, se caracteriza por ser en legumbre y generalmente seca. Algunos ejemplos botánicos pertenecientes a esta subfamilia son: la Acacia anastema o la Mimosa (Rico arce, M.L., 2001).

Por su parte, la subfamilia Caesalpinioideae alberga árboles, arbustos o plantas herbáceas, provistas de espinas en ocasiones, con hojas comúnmente pinnadas o bipinnadas, a veces bifoliadas o simples. Las inflorescencias suelen distribuirse en forma de racimos o panículas; y las flores son grandes y vistosas, ligeramente zigomorfas, con cáliz de sépalos libres o más o menos unidos, corola de sépalos separados, y 10 o menos estambres (Rzedowski, J. *et al.*, 1997; Britton, N. L., 1975).

Para el presente trabajo, se escogieron dos especies de leguminosas:

*Onobrychis viciifolia*, o Pipirigallo, es una planta perteneciente a la familia Leguminosae. Es utilizada como forraje, sirviendo de alimento a animales, así como también puede aparecer de forma espontánea en los montes de la Comunidad Valenciana.

Crece en climas mediterráneo frío, sub-húmedos o semiáridos. Soporta bien las temperaturas bajas, las sequías cortas, y tolera los suelos salinos.

Por otra parte, se trata de una hierba perenne que puede llegar a alcanzar los 80 cm de alto, con un tallo de más de 2,5 mm de diámetro. Las hojas son imparipinnadas están divididas en numerosos foliolos con forma elíptica, siendo algo pelosos en el envés.

En lo que a las flores se refiere, la planta presenta numerosas flores, agrupadas en forma de racimo, situadas al final de un largo pedúnculo. Con una corola en tonos rosados, siguen la forma característica de las flores de las plantas leguminosas, explicada anteriormente.

Tras la floración, que se produce entre los meses de marzo a julio, la planta presenta frutos en nuez indehiscente (vaina), pelosa y con el borde dentado.



Figura 1. Esquema de la morfología de *O. viciifolia*

La otra especie elegida fue *Medicago sativa* L., conocida comúnmente como alfalfa, es una planta perteneciente a la familia de las leguminosas. Se cultiva en campos de regadío, y es utilizada como pasto. Se caracteriza por el color azulado de las flores, así como por tener un fruto en forma de espiral.

Es una planta herbácea, que puede llegar a medir 80 cm de altura, con hojas trifoliadas de folíolos ovalados, aserrados en sus extremos.

La corola tiene un color violáceo, y se agrupan en racimos densos terminales, con un pedúnculo más largo que la hoja adyacente.

Así mismo, esta especie tolera un amplio rango climático, llegando a tener un buen desarrollo con temperaturas elevadas y sequías.



Figura 2. Esquema de la morfología de *M. sativa*.



## 1.2. El género *Rhizobium*

Los rizobios son microorganismos capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico en las raíces de las plantas de la familia Leguminosae (Neyra, M. 1995). Los simbioses, o socios de la simbiosis, y la mayoría de las bacterias simbioses fijadoras de nitrógeno, son conocidas colectivamente como rizobios, término que deriva del nombre del género principal: *Rhizobium* (Madigan, M. *et al.* 2015). El *Rhizobium* pertenece al reino de las Proteobacteria, orden Rhizobiales, subdivisión  $\alpha$ -Proteobacteria, las cuales se caracterizan por ser fijadoras del nitrógeno atmosférico, y por asociarse simbióticamente a las plantas leguminosas (Cubillos-Hinojosa, 2016). La familia Rhizobiales se divide, según la versión de 1984 del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, en *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Phyllobacterium*. En la actualidad, el género *Rhizobium* contiene 34 especies, incluyendo los antiguos géneros *Agrobacterium* y *Allorhizobium* (Díaz Alcántara, C.A, 2010).

Al principio de los años 60, los bacteriólogos empezaron a usar una amplia gama de caracteres (morfología, nutrición, metabolismo, serología, y características simples del ADN) en estudios numéricos de taxonomía. Esto demostró la relación entre *Rhizobium* y *Agrobacterium*, así como llevó a una clara distinción entre rizobios de crecimiento lento y rizobios de crecimiento rápido (Willems, A. 2006; Graham, 1964). Desde los años 80, hasta la actualidad, con la introducción de técnicas de genética molecular, se descubrió una mayor diversidad de rizobios y su relación con otros grupos de bacterias. Esto proporcionó un incremento en el número de especies válidas, llegando en la actualidad a 48 especies reconocidas (Willems, A. 2006).

Tabla 1. Crecimiento del número de especies en el género *Rhizobium*. (Fuente: Willems, A., 2008)

Género	Publicación original	Número de especies					
		Años					
		Antes de 1980	81-85	86-90	91-95	96-00	01-06
<i>Agrobacterium</i>	Cohn (1942)	4	4	5	5	5	5
<i>Rhizobium</i>	Frank (1889)	4	5	5	10	10	16
<i>Bradyrhizobium</i>	Jordán (1982)		1	1	3	3	7
<i>Sinorhizobium</i>	Chen <i>et al.</i> (1988)			2	5	8	11
<i>Azorhizobium</i>	Dreyfus <i>et al.</i> (1988)			1	1	1	2
<i>Mesorhizobium</i>	Jarvis <i>et al.</i> (1997)					7	11
<i>Allorhizobium</i>	De Lajudie <i>et al.</i> (1998)					1	1
Total		8	9	13	23	34	53

Más tarde, los datos filogenéticos se presentaron para apoyar un tercer género de rizobios que no se limitaba al crecimiento rápido de los rizobios de la soja (Willems, A. 2006; de Lajudie *et al.*, 1994). Este nuevo género se denominó *Sinorhizobium*, y en él se incluyó a *Rhizobium meliloti*, ahora llamado *Sinorhizobium meliloti*, el cual interactúa con algunas de las leguminosas. En la actualidad, el género *Sinorhizobium* está admitido y cuenta con 11 especies válidas (Willems, Anne. 2006).

Tabla 2. Especies incluidas en el género *Sinorhizobium*. (Fuente: Willems, A. *et al.*, 2008)

Nombre	Año	Planta huésped	Referencia
<i>S. meliloti</i>	1926	<i>Melilotus, Medicago, Trigonella</i>	Dangeard (1926)
<i>S. fredii</i>	1984	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>	Scholla and Elkan (1984)
<i>S. xinjiangense</i>	1988	<i>Glycine</i>	Chen <i>et al.</i> (1988)
<i>S. saheli</i>	1988	<i>Sesbania, Acacia</i> (Senegal)	De Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. terangaee</i>	1994	<i>Sesbania</i> (Senegal)	De Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. medicae</i>	1994	<i>Medicago</i> (Siria, Francia)	Rome <i>et al.</i> (1996)
<i>S. arboris</i>	1999	<i>Acacia, Prosopis</i> (Sudán, Kenia)	Nick <i>et al.</i> (1999)
<i>S. kostiense</i>	1999	<i>Acacia, Prosopis</i> (Suán)	Nick <i>et al.</i> (1999)
<i>S. kummerowiae</i>	2002	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei <i>et al.</i> (2002)
<i>S. morelense</i>	2002	<i>Leucaena leucocephala</i> (México)	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>S. adhaerens</i>	2003	<i>Medicago sativa</i> (España), <i>Leucaena leucocephala</i> (Brasil), <i>Pithecellobium dulce</i> (Brasil)	Willems <i>et al.</i> (2003)
<i>S. americanum</i>	2003	<i>Acacia spp.</i> (México)	Toledo <i>et al.</i> (2003)

A pesar de la continua revisión taxonómica de los rhizobios, la clasificación actual, basada en criterios moleculares, agrupa a los rhizobios en 14 géneros de  $\alpha$ -proteobacterias: *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, y *Sinorhizobium*; y 3 géneros de  $\beta$ -proteobacterias: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, y *Herbaspirillum* (Salas, M.E., 2015. Weir, 2012).

### 1.3. La simbiosis bacteria-planta y su importancia

Como se ha indicado anteriormente, la simbiosis formada entre el *Rhizobium* y la planta leguminosa, da lugar a la formación de unas estructuras morfológicas conocidas como nódulos. La formación de los nódulos se produce en un serie de etapas: 1) Reconocimiento previo entre la bacteria y la planta, y posterior adhesión a los pelos de la raíz; 2) secreción de moléculas de oligosacáridos de señalización por parte de la bacteria; 3) invasión por la bacteria del pelo radicular; 4) traslado de la bacteria al cuerpo de la raíz a través de los filamentos de infección; 5) formación de células bacterianas – bacteroides– en el interior de las células vegetales y desarrollo del estado fijador de  $N_2$ ; 6) finalmente, se produce una división celular continuada de la planta y las bacterias, lo que genera la aparición de un nódulo maduro en la raíz (Madigan, M. *et al.* 2015).

Por otra parte, el nitrógeno es un compuesto no metálico que se encuentra en grandes cantidades, en todos sus estados, en la naturaleza. Sin embargo, es en el aire donde se encuentra la mayor concentración de este elemento, llegando a ser 4/5 partes del mismo.

A pesar de ello, el nitrógeno es un elemento que muy pocos organismos pueden utilizar, siendo imprescindible, para la mayoría de los organismos, una metabolización de éste para poder aprovecharlo. Uno de los compuestos resultante de este proceso es el amonio ( $NH_4^+$ ), esencial para el desarrollo de diversos organismos, como las plantas. Además, cabe destacar que este elemento forma parte numerosas moléculas biológicas, como las bases nitrogenadas que componen el ADN, por lo que aquí radica uno de los motivos por los que el nitrógeno es importante para la vida.

Por otra parte, el crecimiento de las plantas está determinado por el nitrógeno, puesto que una falta de este elemento conlleva ciertos problemas a la vegetación, como la clorosis, debilidad o falta de crecimiento. Tanta es la importancia del nitrógeno que, en la agricultura, se utilizan fertilizantes nitrogenados para facilitar el desarrollo de los cultivos.

Es esta necesidad de nitrógeno, por parte de la planta, la que hace que la simbiosis entre el *Rhizobium* y la planta sea tan importante, puesto que las bacterias fijadoras de nitrógeno cubren las necesidades de la planta, a la vez que ésta les proporciona nutrientes a las bacterias.

La fijación del nitrógeno es un proceso que se define como la oxidación o reducción del nitrógeno para dar amonio u óxidos. Además, se distinguen dos tipos de fijación de nitrógeno: la abiótica y la biológica. El presente trabajo se centra en la fijación biológica, puesto que viene determinada por las bacterias del suelo que se asocian a las plantas leguminosas.

Las plantas, en este caso leguminosas, que establecen una relación simbiótica con las bacterias fijadoras, desarrollan unos nódulos en las raíces, lugar en el que se hospedan estos microorganismos.

Así pues, las bacterias que se encuentren en una planta hospedante, fijan el nitrógeno del aire, es decir, lo transforman en compuestos asimilables por la planta, como podría ser amonio que pasará a formar parte de la cadena alimenticia de la planta a través de los aminoácidos y proteínas. Sin embargo, romper el enlace de nitrógeno conlleva la utilización de una gran cantidad de energía de la planta (Calvo García, S. 2011).

Las leguminosas tienen una gran importancia económica, puesto que la familia alberga numerosas especies comestibles, como las habas y los guisantes, así como otras especies productoras de aceite, como la soja. Además, incluye plantas forrajeras, como las incluidas en el presente trabajo (Díaz González, T.M., *et al.* 2004).

Por otra parte, hay que tener en cuenta el papel que tienen las bacterias en lo que al medio ambiente se refiere. Esto se debe a la capacidad de las bacterias de fijar el nitrógeno atmosférico, que es uno de los gases más abundantes del planeta. Estas bacterias, tienen un importante papel en el ciclo del nitrógeno.

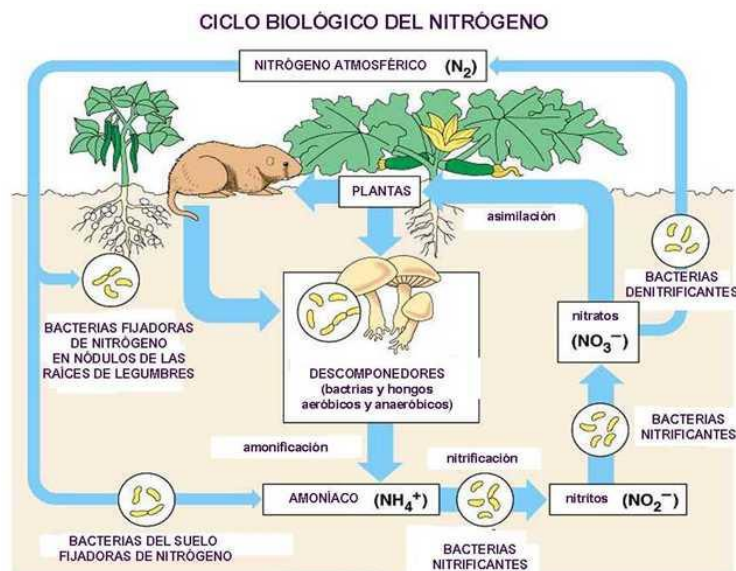


Figura 3. Ciclo del nitrógeno ( $N_2$ ). Fuente: ArgenBIO.

El nitrógeno se adiciona a los suelos de cultivo mediante abonos nitrogenados, perjudiciales para el medio ambiente, puesto que son la principal fuente de contaminación de aguas por nitratos y, en consecuencia, provocan la aparición de eutrofización, que se encadena a una serie de problemas que pueden llevar a un verdadero problema ambiental. Según la FAO, 2002, Los fertilizantes son la mayor fuente de contaminación de aguas subterráneas, y se produce cuando la utilización de estos fertilizantes es superior a la capacidad que tienen los cultivos para absorber los nutrientes. Además, señala que la utilización de estos fertilizantes es, también, causante

de la contaminación del aire, pudiendo llegar a provocar fenómenos como la lluvia ácida, la destrucción de la capa de ozono, o un incremento del calentamiento global, al combinarse con otros gases.

Así pues, el mutualismo de estas bacterias con las leguminosas supone que el suelo recibe los nutrientes necesarios, por lo que no serían necesarios aquellos fertilizantes nitrogenados.

## **2. Justificación y objetivos**

El género *Rhizobium* y otros relacionados en la fijación simbiótica del N<sub>2</sub> en leguminosas, tienen gran importancia ambiental por su efecto fertilizante del suelo. Es por ello que resulta de interés caracterizar e identificar los rizobios presentes en distintas leguminosas forrajeras con un elevado impacto en la recuperación y biodiversidad de los suelos.

El presente trabajo tiene como objetivo principal la puesta a punto de un método de aislamiento de especies de *Rhizobium* de nódulos radiculares presentes en dos especies de leguminosas de la Flora Valenciana: *Onobrychis viciifolia* y *Medicago sativa*.

Como objetivos específicos se plantearon en primer lugar la caracterización del desarrollo vegetativo y radicular de las dos leguminosas y la determinación de la capacidad de nodulación de *M. sativa*, y *O. viciifolia*.

En segundo lugar, se planteó la puesta a punto de un método de aislamiento adecuado de los rizobios simbioses presentes en nódulos radiculares de dichas especies, así como la identificación de dichos rizobios mediante una batería de pruebas bioquímicas para establecer su pertenencia al género *Rhizobium* o a otros géneros relacionados.

### 3. Material y métodos

El presente trabajo consta de diferentes fases, durante las cuales los materiales utilizados han sido diversos, en función de las acciones llevadas a cabo para conseguir los objetivos propuestos.

#### 3.1 Cultivo de las especies vegetales

Se han utilizado dos especies vegetales pertenecientes a la familia de las Leguminosas o fabáceas: *Onobrychis viciifolia* y *Medicago sativa*.

Para el cultivo de ambas especies se utilizaron:

- Semillas sin la capa externa de *O. viciifolia*.
- Semillas *M. sativa*.
- Placas Petri
- Papel de filtro
- Pinzas
- Macetas
- Sustrato COMPO SANA® Universal
- Suelo del municipio de Barx, escogido por albergar vegetación con características similares a las especies utilizadas en el presente trabajo.
- Tamizador con 2 mm de luz
- Maza
- Palas
- Bandeja alta.

Para la germinación de ambas especies vegetales se siguió el mismo método.

En primer lugar, se prepararon las placas Petri, colocando 5 discos de papel de filtro en cada una de ellas. Después, tras haber empapado los discos con agua destilada hasta la saturación, se dispusieron las semillas sobre ellos. En el caso de *O. viciifolia*, se extrajo la semilla de la testa, con el fin de acelerar el proceso de germinación.

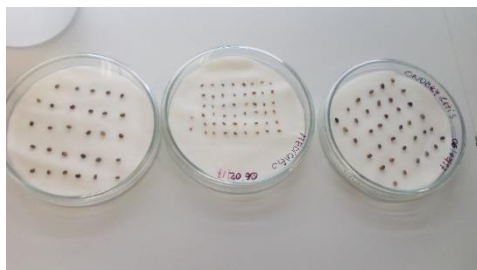


Figura 4. Germinación en placa de las semillas de *O. viciifolia* y *M. sativa*.

El sustrato utilizado fue una mezcla de COMPO SANA® Universal y suelo extraído del municipio de Barx (Valencia), escogido porque se apreció la presencia de vegetación con características similares a las utilizadas en el presente trabajo.

El suelo fue desprovisto de los elementos gruesos y tamizado hasta lograr un material fino. Posteriormente, se realizó la mezcla con la proporción de 75%-25%, siendo mayoritaria la presencia de turba para lograr un suelo franco. Esta mezcla consiguió que el suelo tuviera una textura más esponjosa, lo que facilitó el crecimiento de las plantas.



Figura 5. Preparación del sustrato.

Transcurridas 72 horas las plántulas se plantaron en macetas con el sustrato descrito anteriormente. Para cada especie vegetal se sembraron 5 macetas con los brotes más desarrollados en la superficie del sustrato, a 0,5-1 cm de profundidad.

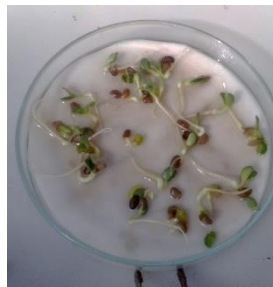


Figura 6. Plántulas de *O. viciifolia*

En esta parte, se descartaron aquellas semillas cuyos brotes eran pequeños o inexistentes, por lo que en cada maceta habría entre 5 y 7 plántulas. Por otra parte, se plantó una maceta control por especie, con turba como sustrato. Esto se hizo para comprobar que los nódulos se formaban por la interacción de las bacterias del suelo con la raíz.



Figura 7. Macetas con plántulas.

Una vez terminada esta fase, las macetas se dejaron en el exterior, con el fin de que las condiciones ambientales fueran lo más parecidas posible a las encontradas en la vida silvestre.



Figura 8. Macetas con plantas con crecimiento en el exterior.

Así pues, se plantaron *O. viciifolia* y *M. sativa* y se mantuvieron durante 96 días, durante los cuales se regaron las macetas por capilaridad, según necesidades de la planta. Durante ese periodo, se realizaron dos muestreos, aproximadamente a los 50 días el primero, y sobre los 96 días el segundo para observar la nodulación y, en caso de haber nódulos, desecarlos para su posterior estudio.

Ambas especies se llevaron al laboratorio, donde se realizó la medición de diferentes parámetros de crecimiento: longitud de la parte aérea y de la raíz; grosor de la raíz. Además, se comprobó la presencia de nódulos.

Una vez llevada a cabo la caracterización de las plantas, se empezó una nueva etapa en el laboratorio, para la cual fueron necesarios los siguientes materiales:

- Pinzas
- Bisturí
- Lanceta
- Regla
- Metro
- Pie de rey
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tinción de Gram
- Microscopio Nikon SE
- Agua destilada
- Placas Petri
- Etanol

#### **a) Caracterización macro y microscópica de los nódulos**

Con la ayuda de un bisturí, pinzas y lanceta, se extrajeron nódulos de las raíces y se observaron al microscopio.

En la fase macroscópica, se caracterizaron los nódulos de ambas especies, utilizando parámetros como: tamaño, forma y color.

Para la observación microscópica se realizó la técnica de squash, que consiste en el aplastamiento del nódulo sobre el portaobjetos, previa adición de una gota de agua destilada, con el fin de obtener una capa fina del mismo y facilitar el trabajo de microscopía.



## **3.2. Aislamiento de *Rhizobium***

### **3.2.1. Pruebas previas**

#### **a) Visualización de los nódulos en fresco**

Con las plantas recogidas en el primer muestreo (50 días), se realizaron preparaciones en fresco de los nódulos para observar la morfología interna del nódulo. Para ello se utilizó el siguiente material:

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio Nikon SE
- Agua destilada
- Varilla de vidrio

Se seleccionó un nódulo que se rompió sobre el portaobjetos mediante la técnica de squash, procurando que quedara lo más fino posible. Posteriormente, se observaron las preparaciones al microscopio.

#### **b) Desinfección de los nódulos con hipoclorito de sodio (NaClO)**

Los nódulos recolectados de las plantas correspondientes al primer muestreo fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (Consum®), con el fin de eliminar o reducir otros microorganismos que pudieran interferir en el aislamiento del *Rhizobium*.

Para esta fase se utilizó el siguiente material:

- Hipoclorito de sodio Consum® diluido al 50%.
- Agua destilada
- Placas Petri estériles
- Varilla de vidrio
- Pipeta Pasteur
- Portaobjetos
- Aceite de inmersión (aceite de cedro)
- Tinción de Gram (anexo I)

Así pues, el nódulo se sumergió en una solución de lejía al 50% durante tres minutos y, finalmente, se lavó dos o tres veces con agua destilada, dependiendo del tamaño.

##### **b.1) Tinción**

Una vez desinfectado el nódulo, se llevó a cabo una suspensión del mismo con agua destilada y, con ayuda de una pipeta Pasteur, se colocó en un portaobjetos para hacer un frotis con ayuda de otro portaobjetos. Como resultado se obtuvieron dos portaobjetos con material nodular que se tiñeron con Gram y se observaron al microscopio para comprobar la presencia, o no, de *Rhizobium*.

#### **c) Desinfección de los nódulos con etanol 95%**

Otra prueba llevada a cabo, en esta ocasión con los nódulos recolectados de las plantas correspondientes al segundo muestreo (96 días), fue la desinfección con etanol 95%, para lo que se utilizó:

- Etanol 95%
- Agua destilada estéril
- Placas Petri
- Varilla de vidrio
- Pinzas
- Pipeta Pasteur
- Mechero Bunsen

Los nódulos se sumergieron durante 3 minutos en etanol 95%, con el fin de eliminar otros microorganismos de la superficie nodular. Trascorrido el tiempo, se lavaron con agua destilada estéril, manteniendo la asepsia durante el proceso con el mechero Bunsen.

Posteriormente, se realizó una suspensión de los nódulos con agua destilada estéril, que se sembró en placas en medio de cultivo YEMA (anexo III).

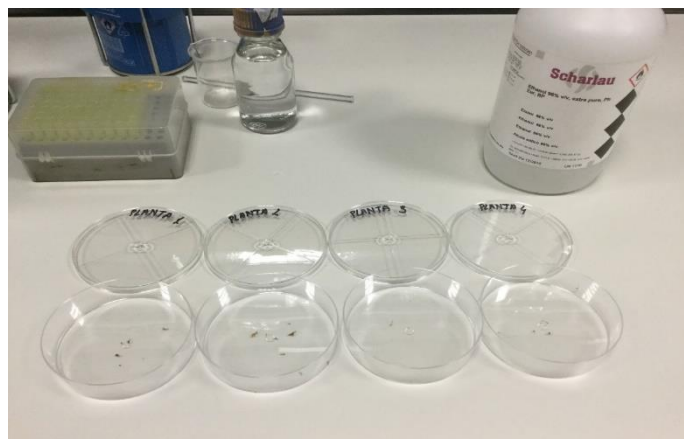


Figura 9. Desinfección de los nódulos con etanol 95%.

#### d) Deshidratación de los nódulos

Como se explica anteriormente, se tomaron nódulos de las primeras plantas recogidas en el primer muestreo y se deshidrataron. Con esta práctica, se pretendía estudiar la viabilidad de los nódulos una vez rehidratados.

Así pues, se utilizó:

- Desecador
- Gel de sílice
- Papel de filtro
- Botes para muestras
- Solución tampón Phosphate Saline Buffer (PBS) (anexo II)

Para la desecación de los nódulos, se prepararon frascos como se indica en el esquema:

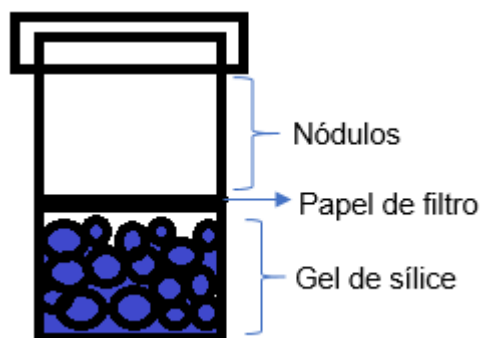


Figura 10. Preparación de los frascos para la desecación de los nódulos.

De esta manera, se seleccionaron fragmentos de raíces que contuvieran nódulos y se introdujeron en el frasco de muestras, con cuidado de que no entraran en contacto con el gel de sílice.

Los nódulos se mantuvieron en el desecador durante 50 días hasta su posterior rehidratación para estudiar su viabilidad.

La rehidratación de los nódulos (proveniente de cada una de las especies vegetales) se llevó a cabo en una placa Petri, con una solución tampón PBS. Los nódulos se mantuvieron sumergidos en dicha solución durante 4 horas, llegando a recuperar el aspecto previo a la deshidratación.

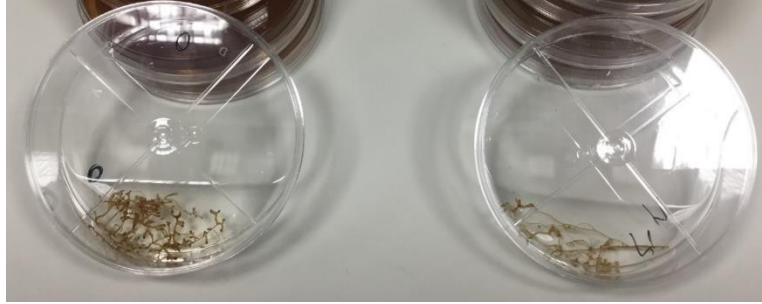


Figura 11. Nódulos en solución PBS (inicio).



Figura 12. Nódulos en solución PBS (final).

Tras la rehidratación, se siguió el proceso de desinfección descrito en el apartado anterior (etanol 95%) y, posteriormente, se pasó a la fase de aislamiento de *Rhizobium*.

### 3.2.2. Aislamiento de *Rhizobium*

Esta fase se llevó a cabo con todos los nódulos resultantes de los tratamientos previos, por lo que se realizó el aislamiento de *Rhizobium* tras las tres diferentes condiciones previas.

Así pues, por una parte, se necesitaron:

- Placas Petri
- Asas de Drigalsky desechables
- Asas de platino
- Mechero Bunsen
- Agua destilada estéril
- Etanol
- Pinzas
- Varilla de vidrio
- Pipeta automática (micropipeta) 200  $\mu$ l (P200)
- Puntas para micropipeta P200 (amarillas)
- Pipeta Pasteur
- Medio de cultivo sólido YEMA con Rojo Congo (anexo III)
- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Estufa de cultivo

El medio de cultivo que se empleó fue el YEMA, al cual se le adicionó Rojo Congo debido a que permite diferenciar las colonias de *Rhizobium* de las de *Agrobacterium*, si bien ambos microorganismos crecen en el medio YEMA, el *Rhizobium* no absorbe el colorante y *Agrobacterium* sí, diferenciándose por el color de las respectivas colonias.

Así mismo, tras cada prueba descrita en el apartado 3.2.1, se procedió al aislamiento de los rhizobios.

Con ambas especies de plantas se siguió la misma metodología, siguiendo siempre un protocolo de asepsia para evitar la contaminación de las placas de cultivo. Así pues, se hicieron suspensiones de 2 nódulos/planta con 100  $\mu$ l de agua destilada estéril, que consistía en la rotura de los nódulos con la ayuda de una varilla de vidrio, hasta conseguir una suspensión lo más fina posible. Posteriormente, con ayuda de la pipeta automática, se introduciría la mitad (aproximadamente 50  $\mu$ l) de la suspensión en una placa de cultivo, y la otra mitad en la otra placa cultivo. Finalmente, con un asa de Drigalsky se extendió la suspensión sobre la superficie del medio de cultivo. Esto se repitió con dos nuevos nódulos de la misma planta, para llevar a cabo una réplica del cultivo, por lo que se obtuvieron cuatro cultivos por planta.

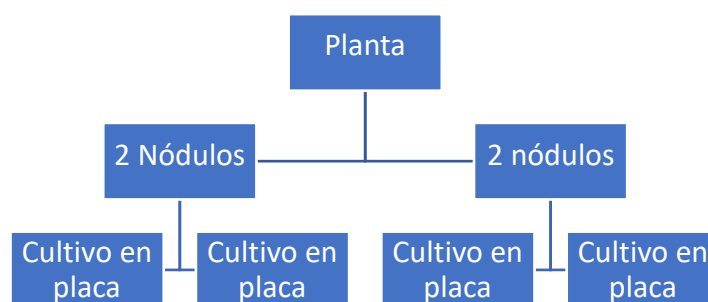


Figura 13. Esquema de la preparación de las placas de cultivo.

Esto se repitió en total con los nódulos de 4 plantas de cada una de las especies estudiadas.

Una vez preparadas las placas con la suspensión de los nódulos, se introdujeron las placas sembradas en una estufa de cultivo a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C. En el caso de los cultivos de nódulos provenientes de la especie *O. viciifolia* se mantuvieron en la estufa 48 horas, mientras que los pertenecientes a los nódulos de *M. sativa* estuvieron 72 horas hasta la observación de las colonias.

Tras el crecimiento de las bacterias, se procedió al aislamiento de las colonias.

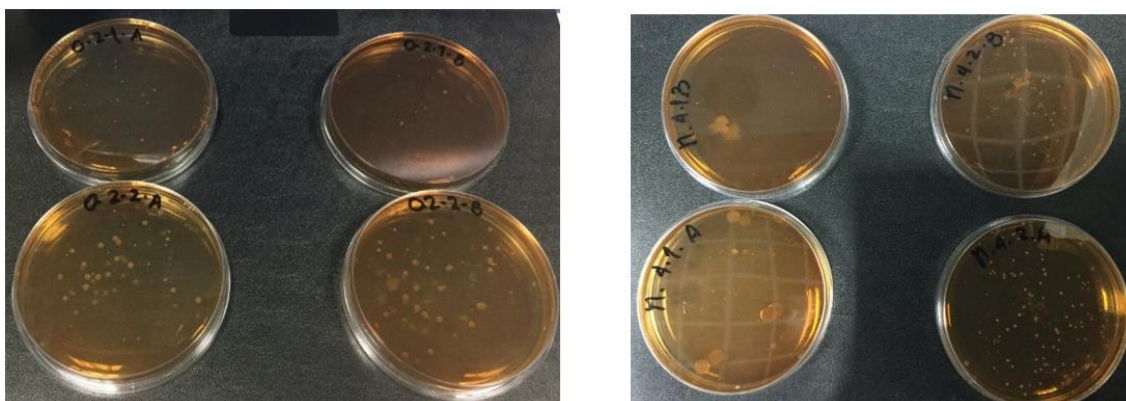


Figura 14. Placas de cultivo con colonias.

Para ello, se seleccionaron dos colonias características de *Rhizobium* de cada placa, teniendo especial cuidado de que fueran colonias blanquecinas/transparentes, y que estuvieran perfectamente definidas. Para obtener cultivo puro se utilizó la técnica de la triple estría (figura 15).



Figura 15. Técnica de la triple estría.

Así pues, por cada placa crecida se obtuvieron dos cepas de *Rhizobium* con la técnica de la triple estría, siendo los cultivos clonales.

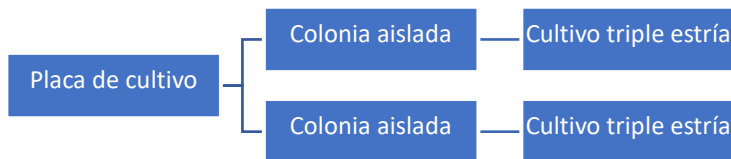


Figura 16. Preparación de placas de cultivo con la técnica de la triple estría.

Las placas se mantuvieron en una estufa de cultivo a  $28 \pm 1$  °C durante 48 horas en el caso de *O. viciifolia*, y 72 horas en el caso de *M. sativa*.



Figura 17. Colonias aisladas.

### 3.2.3. Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Rhizobium*

Una vez obtenidas las colonias aisladas, se pasó a realizar las pruebas bioquímicas, cuya finalidad fue confirmar la identificación del género *Rhizobium*.

Para esta etapa, se utilizó:

- Medio de cultivo líquido para prueba de INDOL (anexo IV)
- Reactivo de Kovacs para Indol
- Medio de cultivo líquido para Voges Proskauer (anexo V)
- $\alpha$ -naftol (anexo VI)
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Rojo de Metilo
- Tiras de oxidasa Bactident® Oxidase

- Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
- Asa de platino
- Mechero bunsen
- Agitador de tubos
- Tubos de ensayo

En primer lugar, se sembraron los medios de cultivo para las pruebas de Indol, Voges Proskauer y Rojo de Metilo. Para ello se cogió una colonia aislada con el asa de platino y se introdujo en el medio líquido, agitándose posteriormente el tubo para la dispersión completa de la colonia en el medio. Este procedimiento se llevó a cabo para la siembra de las pruebas de Indol y de Voges Proskauer.

De esta manera, se sembraron por cada placa un cultivo para prueba Indol y otro para Voges Proskauer, los cuales se introdujeron en la estufa de cultivo a una temperatura entre  $28 \pm 1$  °C entre 48 - 72 h hasta que se observó turbidez, indicativo de crecimiento bacteriano.

Una vez obtenido crecimiento en los medios de cultivo líquidos, se realizaron las pruebas de la oxidasa y la catalasa, para las cuales se cogieron dos colonias por placa: a una se le aplicó una gota de  $H_2O_2$  (catalasa), mientras que la otra se frotó, con la ayuda del asa de platino, sobre la tira reactiva impregnada con el reactivo de la de oxidasa (Bactident® Oxidase).

La prueba de oxidasa se consideró positiva si, tras un minuto, la tira de oxidasa viró a un color azul/morado (figura 19 y figura 20).

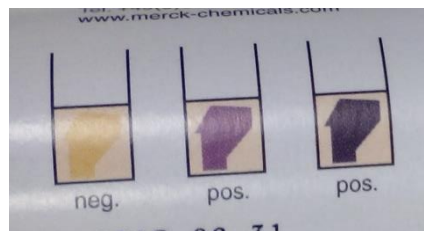


Figura 18. Colores correspondientes al resultado de la prueba de oxidasa (según indicaciones del proveedor).

Por su parte, la catalasa se consideró positiva si, después de aplicar  $H_2O_2$ , al cabo de un minuto se produjo burbujeo (figura 19).

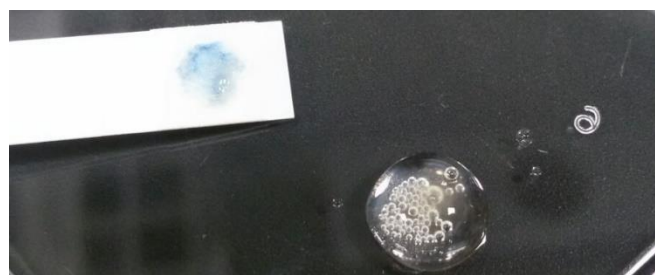


Figura 19. Pruebas positivas de oxidasa y catalasa.

El revelado de las pruebas bioquímicas Indol, Voges Proskauer y Rojo de Metilo se realizó una vez observado crecimiento en los medios de cultivo líquidos correspondientes, según la diferencia en velocidad de crecimiento de los distintos microorganismos.

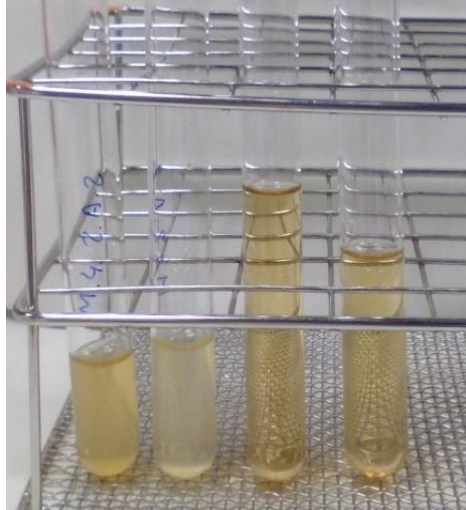


Figura 20. Diferencia entre medios de cultivo con crecimiento (izquierda) y sin crecimiento (derecha).

Así pues, los tubos que contenían el medio de cultivo para Voges Proskauer se dividieron en dos tubos, por lo que en uno de ellos se realizó la prueba del Rojo de Metilo y en el otro la de Voges Proskauer.

La prueba de Voges Proskauer se consideró positiva si, tras adicionar el KOH y el  $\alpha$ -naftol (en ese orden) el cultivo adquirió una tonalidad teja. El Rojo de Metilo se consideró positivo si, al adicionar entre 5 a 7 gotas del colorante (dependiendo del crecimiento bacteriano), el medio viró a rojo (figura21).

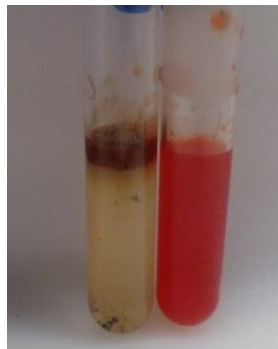


Figura 21. Resultado positivo de las pruebas de Voges Proskauer (izquierda) y Rojo de Metilo (derecha).

Por su parte, la prueba de Indol se consideró positiva si, al adicionar el reactivo de Kovacs, se formó una capa o halo rojiza/o en la superficie.

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas, se tomaron muestras de colonias aisladas, se realizó una tinción de Gram, y se comprobó al microscopio que todas ellas eran Gram negativas al mismo tiempo que se observó su morfología.

En esta fase final se utilizó el siguiente material:

- Portaobjetos
- Tinción de Gram (anexo I)
- Microscopio Olympus Bx41
- Cámara Olympus XC50
- Software CellSens 1.17.

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1. Caracterización de las leguminosas

Las especies utilizadas en el presente trabajo mostraron claras diferencias entre ellas. Por un lado, las raíces de *O. viciifolia* resultaron ser de un tono marrón anaranjado, abundantes y con gran cantidad de nódulos. Sin embargo, cuando la planta estaba terminando el ciclo de crecimiento, el color de sus raíces se tornaba casi negro.

Por el contrario, las raíces pertenecientes a las plantas de *M. sativa* fueron de un tono blanco amarillento, con una raíz central gruesa, y una nodulación escasa. Al igual que ocurrió con *O. viciifolia*, el color radicular resultó ser más oscuro cuando la planta había envejecido.



Figura 22. Raíces de *O. viciifolia* (izquierda) y *M. sativa* (derecha).

Se tomaron medidas de 5 plantas por especie:

Tabla 3. Caracterización de *O. viciifolia*.

Parámetro	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5
Longitud parte aérea (cm)	35	28	23	28	20
Longitud raíces (cm)	30	27	22	18	17
Grosor cuello de la raíz (cm)	0,8	1,3	0,6	0,5	1,0
Nodulación raíz principal	0	0	0	0	0
Nodulación raíces laterales	<100	<100	<100	>100	>100



Tabla 4. Caracterización de *M. sativa*.

Parámetro	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5
Longitud parte aérea (cm)	22	57	48	39	33
Longitud raíces (cm)	30	30	23	24	22
Grosor cuello de la raíz (cm)	0,4	1,2	1,0	0,5	0,7
Nodulación raíz principal	>25	>25	>25	>25	>25
Nodulación raíces laterales	>50	>50	>50	>50	>50

*O. viciifolia* se desarrolló de tal forma que la parte aérea y la parte radicular tuvieron longitudes similares. A su vez, el grosor del cuello de la raíz tampoco tuvo una gran variación entre las distintas plantas utilizadas en el estudio.

Por el contrario, en la tabla 4, se aprecia una considerable diferencia entre la longitud aérea y la radicular en la especie vegetal *M. sativa*.

#### 4.2. Caracterización macro y microscópica de los nódulos

En lo que a la nodulación se refiere, *O. viciifolia* presentó nódulos radiculares alargados, con el extremo más alejado de la raíz ligeramente más oscuro, y esféricos, que se distribuían por todas las raíces (figura 23).



Figura 23. Nódulos radiculares de *O. viciifolia*.

*M. sativa* presentó una nodulación escasa, pero más definida. Se observaron unos nódulos esféricos y blanquecinos, que se distribuían por la parte baja de la raíz (figura 24). Además, se pudieron apreciar unas formaciones blancas en el cuello de la raíz y la raíz principal que, posteriormente, se observaron al microscopio, confirmando la presencia de bacterias Gram negativas. Así pues, estas últimas formaciones pueden deberse a que, al crecer la raíz, el nódulo se integró en ella (figura 25).

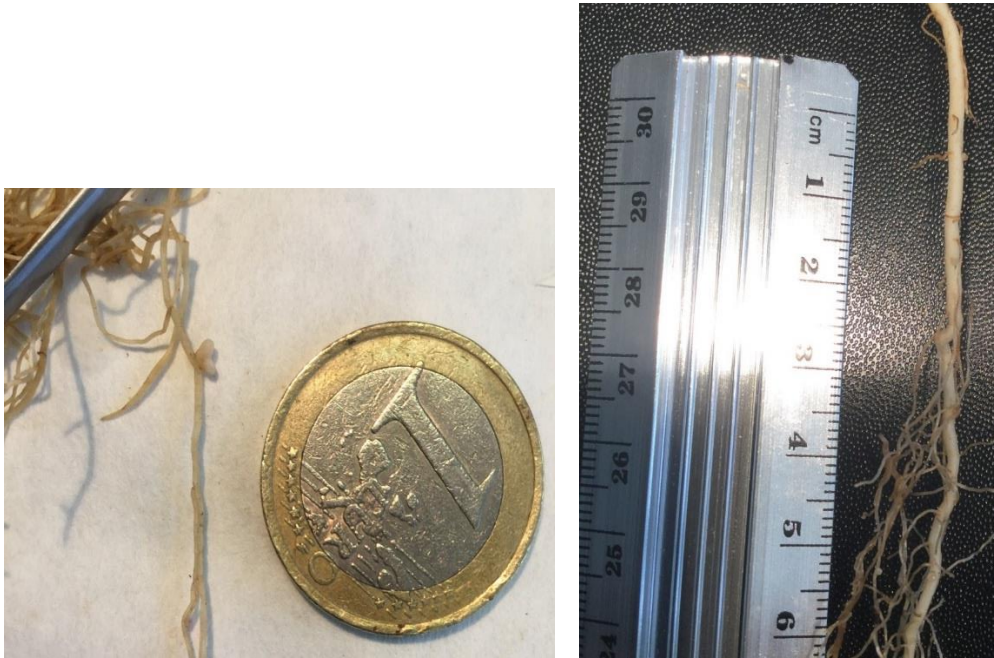


Figura 24. Nódulos radiculares de *M. sativa*.



Figura 25. Nódulos en el cuello de la raíz de *M. sativa*.

La observación al microscopio de los nódulos en fresco reveló la presencia de unas estructuras redondeadas, denominadas simbiosomas, que albergan a los *Rhizobium* en su interior, envueltos por una membrana vegetal denominada membrana peribacteroidea o simbiosomal que aísla a los microorganismos del citoplasma de la célula huésped (Herbario Universidad Pública de Navarra; Madigan, M. T. *et al.* 2015). Además, también se pudo apreciar en el interior del nódulo un color rojizo o amarronado que podría ser indicativo de la producción de leghemoglobina por parte de los bacteroides. La leghemoglobina es una proteína con hierro presente en los nódulos sanos que fijan nitrógeno que se induce por la interacción del hospedador vegetal y el simbiote bacteriano. Los rhizobios necesitan algo de  $O_2$  para generar energía para la fijación del  $N_2$ , pero sus nitrogenasas se inactivan con el  $O_2$ , por lo que en el nódulo se controla la cantidad de  $O_2$  mediante la proteína de unión al  $O_2$  leghemoglobina (Madigan, M.T. *et al.* 2009)

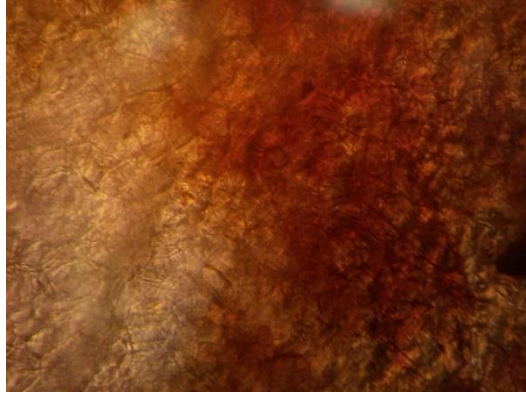


Figura 26. Coloración marrón-rojiza debido a la presencia de leghemoglobina.

Como se aprecia en la figura 26, la leghemoglobina tiene un tono marrón rojizo, característico de las sustancias ferrosas.

Por otra parte, cabe destacar la localización de los simbiosomas, que pudieron observarse adheridos a las paredes de las células del córtex de la raíz. Además, se apreció que la mayor cantidad de simbiosomas se encontraron en la proximidad de los vasos conductores.

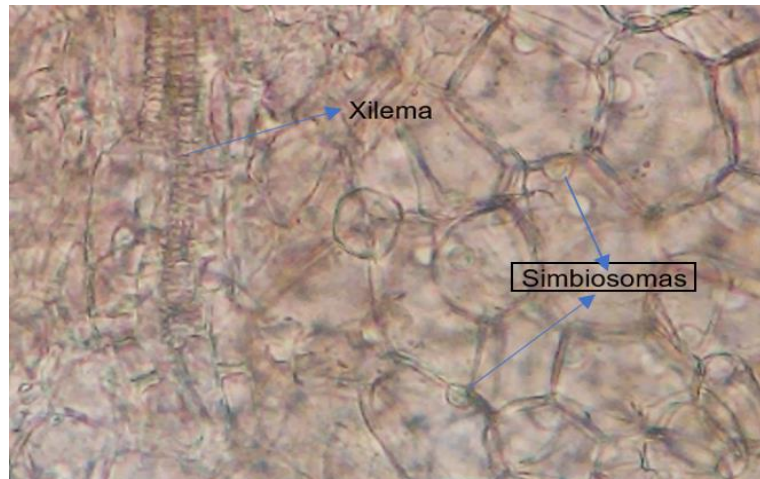


Figura 27. Simbiosomas en nódulos de *O. viciifolia*.

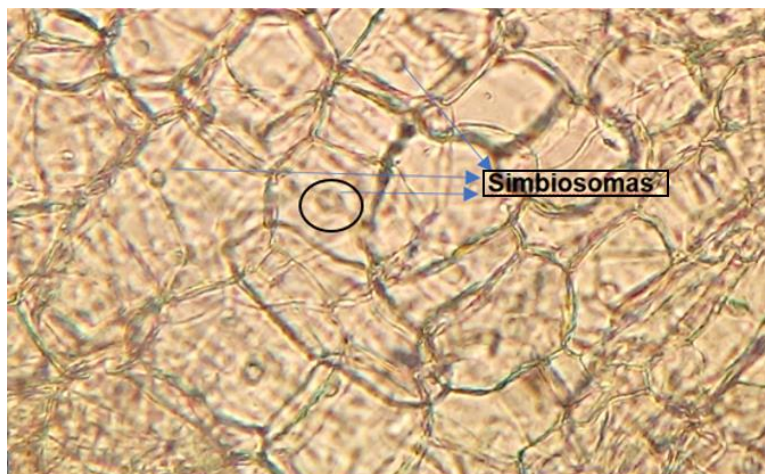


Figura 28. Simbiosomas en nódulos de *M. sativa*.

En el caso de los simbiosomas observados en los nódulos de *M. sativa* (figura 28) se pudo apreciar que existían simbiosomas adheridos a la pared celular al igual que en caso de los observados en la figura 27, pero además se observaron unos que

presentaban una prolongación que se unía a la pared celular (en la figura 28 señalado con un círculo).

Por otra parte, las macetas que contenían exclusivamente turba como sustrato, y que se utilizaron como control, mostraron unas raíces más largas pero desprovistas de nodulación, a excepción de una planta de *O. viciifolia* que si los desarrolló. Sin embargo, al visualizar al microscopio los nódulos se observaron simbiosomas únicamente en uno, por lo que se podría considerar que las raíces no hospedaban *Rhizobium*.

#### 4.3. Aislamiento del *Rhizobium*

Al tratarse de una puesta a punto de un método, se estudiaron diversas formas de llevar a cabo la desinfección de los nódulos para poder realizar un correcto aislamiento del *Rhizobium*.

Los resultados obtenidos con la desinfección de los nódulos con hipoclorito de sodio no nos permitieron llevar a cabo un aislamiento del *Rhizobium*, puesto que no hubo un crecimiento adecuado en la placa de cultivo. Esto pudo deberse a que la solución escogida para desinfectar los nódulos era muy agresiva, pudiendo haber entrado en el interior del nódulo, destruyendo los microorganismos.

Debido a esto, se descartó este método y se procedió a llevar a cabo la desinfección de los nódulos con etanol 95%.

Tras el descalce de las macetas de 96 días, se observó que la cantidad de nódulos presentes en las raíces era considerablemente menor, a pesar de tener un buen desarrollo aéreo. La causa de este fenómeno puede deberse a que las plantas eran más viejas y ya estaban entrando al final de su ciclo de vida. Además, se observó que los nódulos desarrollados eran más pequeños.

Sin embargo, tras la desinfección de los nódulos con etanol 95% y la posterior siembra en placas de cultivo, el desarrollo de las colonias fue idóneo para el aislamiento.

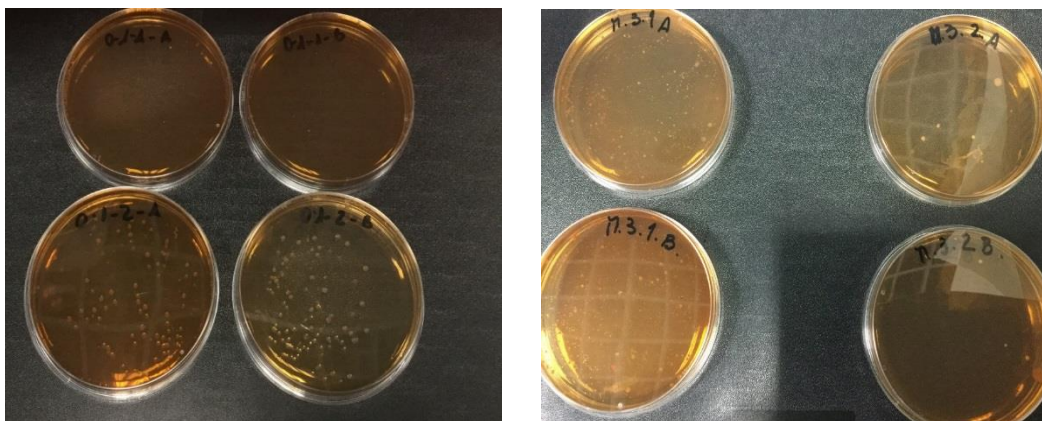


Figura 29. Ejemplo de placas de cultivo con colonias.

Las colonias obtenidas fueron redondeadas, con bordes regulares, de un color blanco/transparente, o rosado/transparente. Además, el crecimiento bacteriano provocó que el cultivo desprendiera un olor fuerte (Shahzad *et al.* 2012; Holt, J. G., *et al.* 1994)

El tiempo de crecimiento fue distinto entre los rhizobios provenientes de *O. viciifolia* y de los obtenidos de los nódulos formados en *M. sativa*, siendo más lentos los provenientes a esta última especie vegetal.

Las colonias tenían un color blanquecino lechoso o transparente, siendo mucilaginosas en la mayoría de los casos. Sin embargo, se dieron placas en las que las colonias

desarrolladas tenían una textura más dura, elástica y difícil de coger con el asa de platino. Esta diferencia pudo deberse a que las colonias contenían distintas cepas de *Rhizobium* o, por el contrario, que se trataba de colonias de *Agrobacterium*, aunque no tenían el color rosáceo que adquieren estas bacterias en el medio de cultivo YEMA con Rojo Congo (Giménez Hernández, E., 2006)

Por otra parte, destacó la diferencia entre los tamaños de las colonias obtenidas a partir de *O. viciifolia* y *M. sativa*, siendo más grandes las de la primera especie. La diferencia en el crecimiento sería causada por el tiempo de crecimiento de cada cepa, puesto que se detectó que los *Rhizobium* de *M. sativa* se desarrollaban de forma más lenta. Se considera rápido el crecimiento cuando la colonia alcanza 1 a 5 mm tras un periodo de 3 a 5 días en la estufa de cultivo. Por el contrario, si transcurrido el mismo tiempo las colonias no alcanzan esas medidas se consideran de crecimiento lento (Paredes, M.C., 2013; Vincent, 1983).

Así pues, una vez se obtuvieron las colonias se prosiguió con un cultivo en triple estría con el fin de conseguir cultivos puros.

En el caso de las placas de cultivo correspondientes a *O. viciifolia*, se obtuvo un 97% de placas con colonias aisladas. Sin embargo, las placas de cultivo correspondientes a *M. sativa* obtuvieron un 84% de éxito en el aislamiento. Esta diferencia pudo ser debida al estado del medio de cultivo, a la efectividad de los nódulos utilizados, o a la cepa formadora de la colonia escogida para la última siembra.

De esta manera, tras la obtención de colonias aisladas, se procedió a llevar a cabo los estudios de microscopía, donde se observó la presencia de bacterias Gram negativas. Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son bacilos Gram negativo que pueden llegar a medir  $0,9 \times 3,0 \mu\text{m}$  (Cubillos-Hinojosa, 2016). Sin embargo, mientras la bacteria permanece en el interior del nódulo pierde la pared celular, por lo que se le puede observar también en forma de Y.

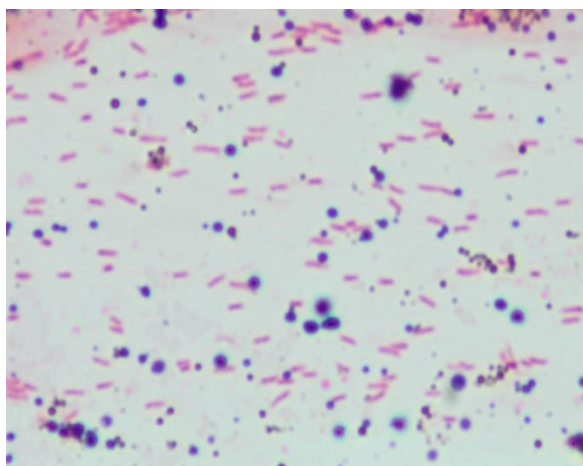


Figura 30. Bacilos pertenecientes a nódulos de *M. sativa*.

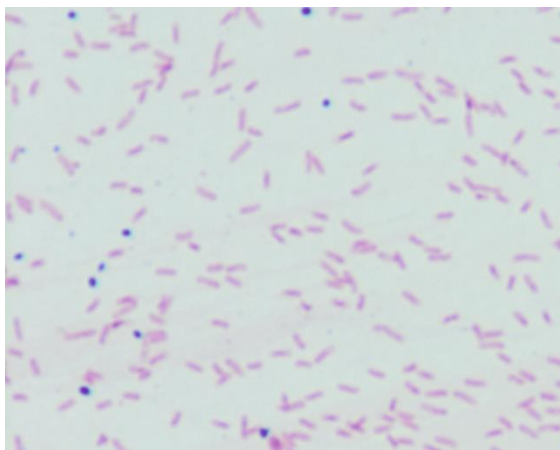


Figura 31. Bacilos pertenecientes a nódulos de *O. viciifolia*.

Se observó que las bacterias aisladas de los nódulos eran bacilos Gram negativo, lo que podría indicar la presencia de estos microorganismos.

Cabe destacar que, a pesar de haber obtenido colonias más cremosas y otras más gomosas, las bacterias observadas tenían la misma morfología.

#### 4.4. Caracterización de los rizobios

Las colonias obtenidas en las placas sembradas en triple estría fueron sometidas a pruebas bioquímicas seleccionadas para confirmar si pertenecían al género *Rhizobium* o al género *Sinorhizobium* (oxidasa, catalasa, Voges Proskauer, Indol, y Rojo de Metilo). La prueba de oxidasa se hizo para demostrar la presencia, o no, de enzimas oxidasas. La prueba de la catalasa indicó que la bacteria produce la enzima catalasa, puesto que hidrolizó el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, el cual se liberó en forma de burbujas.

La prueba de Voges Proskauer indicó que el microorganismo fermentaba la glucosa por la vía butanodiólica.

El cambio de color del cultivo en la prueba de Rojo de Metilo indicó que el pH del medio de cultivo había cambiado (acidificación del medio).

Finalmente, el revelado de la prueba de Indol permitió comprobar si el microorganismo produce Indol, provocado por la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa (Fernández Olmos, A., *et al.* 2010).

Así pues, las bacterias aisladas, según los resultados de las pruebas bioquímicas, y tomando como referencia el artículo de Agahm M.V. *et al.* (2016) y el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994), se consideró que los microorganismos aislados podrían ser *Rhizobium spp*, y/o *Sinorhizobium spp*.

Tabla 5. Resultados pruebas bioquímicas de los rhizobios pertenecientes a nódulos de *O. viciifolia*.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DE LEGUMINOSAS												
Muestra			Morfología			Colonia	Pruebas bioquímicas					Resultado
Planta	Nº	Placa	Textura	Gram	Forma	Nº	Catalasa	Oxidasa	V-P	Indol	R.M.	Posible organismo
O1	M1	A	Gomosa	-	Alargada	1	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	-	+	+	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
O2	M1	A	Gomosa	-	Alargada	1	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	-	+	+	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>

Tabla 5. Continuación.

O3	M1	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
O4	M1	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp.</i>

O: Especie vegetal *O. viciifolia*.

M: Réplica de la muestra.



Tabla 6. Resultados pruebas bioquímicas de los rhizobios pertenecientes a nódulos de *M. sativa*.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DE LEGUMINOSAS												
Muestra			Morfología			Colonia	Pruebas bioquímicas					Resultado
Planta	Nº	Placa	Textura	Gram	Forma	Nº	Catalasa	Oxidasa	V-P	Indol	R.M.	Posible organismo
O1	M1	A	Gomosa	-	Alargada	1	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	-	+	+	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
O2	M1	A	Gomosa	-	Alargada	1	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	-	+	+	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>

Tabla 6. Continuación.

M3	M1	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	-	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	-	+	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
M4	M1	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	-	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
	M2	A	Cremosa	-	Alargada	1	+	-	+	+	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
		B	Cremosa	-	Alargada	1	+	+	+	-	+	<i>Rhizobium spp./Sinorhizobium spp.</i>
			Cremosa	-	Alargada	2	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>

M: Especie vegetal *M. sativa*.

M: Réplica de la muestra.

Analizando los resultados de las pruebas bioquímicas recogidos en la tabla 5, se puede observar que en el caso de los rhizobios de *O. viciifolia*, el 65% de las pruebas de Indol fueron negativas. Por otra parte, el 23% de las pruebas de oxidasa realizadas resultaron negativas, coincidiendo en algunas ocasiones con el indol negativo; mientras que las pruebas realizadas para la catalasa, el Rojo de Metilo y el Voges Proskauer resultaron positivas en un 100%.

En el caso de los *Rhizobium* extraídos de *M. sativa* (tabla 6), el 27% de las pruebas de indol realizadas resultaron negativas. La diferencia en las proporciones de positivos y negativos de una especie a otra, puede deberse a que para realizar las pruebas de *M. sativa* se utilizó menor cantidad de líquido para la prueba o, por el contrario, a que son cepas distintas de *Rhizobium*. La prueba de oxidasa resultó negativa en un 27%, lo que se consideró como un resultado anómalo al no haber bibliografía con datos concluyentes con resultados de oxidasa negativa para estos microorganismos. Así mismo, la prueba de Voges Proskauer resultó positiva en todos los tubos a excepción de uno, cuyo resultado fue confuso, y se consideró negativo utilizando como referencia el resto de pruebas. Por otra parte, la prueba de Rojo de Metilo, tuvo un 8% de resultados negativos, considerado así porque el color de viraje era anaranjado y no rojo. Finalmente, la catalasa resultó positiva en un 100%.

Estas diferencias entre ambas especies pueden deberse, como se ha indicado, a la presencia de distintos rhizobios, o a la utilización de un volumen menor de líquido en los medios de cultivo. Es importante que haya cierto grado de turbidez en los tubos para que las pruebas sean más fiables.

Por otra parte, las pruebas de indol se llevaron a cabo tras cultivar en Agua de Peptona los rhizobios aislados y los resultados son confusos, posiblemente debido a que el *Rhizobium* no utiliza bien la Peptona (Holt, J. G., et al. 1994).

#### 4.5. Viabilidad de los nódulos rehidratados

En primer lugar, se llevó a cabo la siembra de los nódulos en las placas de cultivo según el método descrito en material y métodos y se dejaron hasta 72 horas en la estufa de cultivo a  $28 \pm 1$  °C, para ver si se producía un crecimiento más significativo. Finalmente, se obtuvo un número reducido de colonias por placa, las cuales se sembraron en otras placas en triple estría para conseguir cultivos puros.

Tabla 7. Pruebas bioquímicas de los rhizobios de nódulos rehidratados.

Muestra Nº	Morfología			Pruebas bioquímicas					Resultado Posible organismo
	Textura	Gram	Forma	Catalasa	Oxidasa	V-P	Indol	R.M	
M.R.1.1.A.1	Creмосa	-	Alargada	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
M.R.1.2.A.1	Gomosa	-	Alargada	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
M.R.1.1.B.1	Gomosa	-	Alargada	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
O.R.1.1.A.1	Creмосa	-	Alargada	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
O.R.1.1.A.3	Creмосa	-	Alargada	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>
O.R.1.1.A.5	Creмосa	-	Alargada	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium spp.</i>

De las colonias aisladas se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes. Cabe destacar que de 12 placas, sólo se pudieron aislar colonias en 6, 3 por especie vegetal.

En esta fase destaca la claridad con la que se pudieron observar los resultados de las pruebas bioquímicas, y la presencia de colonias gomosas de un aspecto más rosado que las otras.

Además, se pudo observar al microscopio la presencia de *Rhizobium* con una morfología similar a la de aquellas bacterias producidas en fresco.

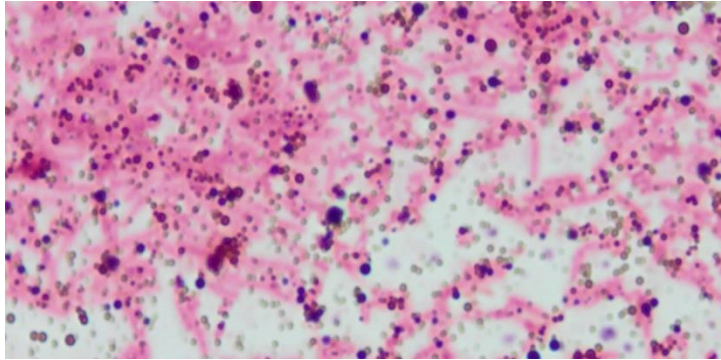


Figura 32. *Rhizobium* de nódulos deshidratados de *O. viciifolia*.

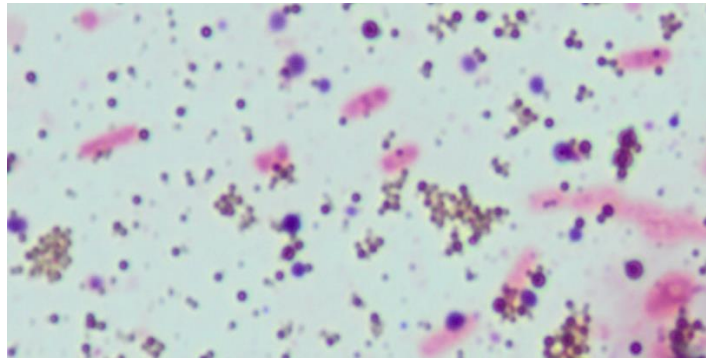


Figura 33. *Rhizobium* de nódulos deshidratados de *M. sativa*.

Se observó presencia de *Rhizobium* aunque en menor cantidad y no de una forma tan nítida como en el resto de plantas. Esto puede deberse a que la efectividad de los nódulos disminuye conforme transcurre el tiempo de desecación (Beck, D.P. *et al.* 1993).

## 5. Conclusiones

Tras los resultados obtenidos en los distintos procedimientos, se llegó a las siguientes conclusiones:

La presencia de nódulos en las especies vegetales seleccionadas, pone de manifiesto la presencia de bacteria fijadoras de N<sub>2</sub> simbiotes en el suelo empleado

Se ha observado diferencia de proporciones entre la parte aérea y la radicular de las especies vegetales, siendo en *O. viciifolia* más abundante, aunque más corta, y su capacidad de formar nódulos fue considerablemente más efectiva. Así mismo, el desarrollo nodular fue más abundante en esta especie.

Los nódulos formados presentaron diferencias morfológicas, tanto dentro de una misma especie a distintos niveles radiculares, como entre las especies. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la especificidad que puede existir entre los rizobios y las leguminosas.

Se observó que el número de nódulos radiculares disminuyó considerablemente conforme la planta fue envejeciendo, encontrándose una disminución de un 75% en *O. viciifolia*, y un 50% en *M. sativa*.

El método etanólico empleado resultó ser el más adecuado para el aislamiento de rizobios diferentes a partir de nódulos que presentaban un tamaño muy reducido, puesto que fue el que presentó mayor tasa de aislamiento.

Los rizobios estudiados, teniendo en cuenta la bibliografía consultada en el presente trabajo, se consideran de crecimiento rápido. Dentro de este tipo de crecimiento se observó que los rizobios provenientes de nódulos formados en *O. viciifolia* tenían una mayor velocidad de crecimiento que aquellos provenientes de *M. sativa*.

Los nódulos sometidos a proceso de deshidratación mantuvieron la capacidad de recuperación de los rizobios a lo largo del tiempo, considerando que este hecho se relaciona con la viabilidad de los nódulos.

La identificación de los rizobios aislados mediante las pruebas bioquímicas no resultó concluyente en cuanto a especie, permitiendo en todos los casos la identificación de género, confirmando que eran todos pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y/o *Sinorizhobium*.

## **6. Líneas futuras**

En el futuro se podrían contemplar otras vías de estudio para los nódulos y el *Rhizobium*:

### **a) Viabilidad de los nódulos**

Sería interesante realizar un estudio de la viabilidad nodular teniendo en cuenta el tiempo transcurrido desde la plantación, de tal forma que cada dos o tres semanas se extrajeran nuevas plantas y se llevaran a cabo las pruebas descritas en el presente trabajo.

Con ese nuevo procedimiento, se puede obtener una estadística que indique en que momento las raíces tienen mayor número de nódulos, así como la viabilidad de los mismos.

Esto podría ser de utilidad para conocer el momento del ciclo de vida de la planta en el cual los nódulos son más productivos, o la eficacia de los nódulos es mayor. Este control puede proporcionar nuevos conocimientos a tener en cuenta en los cultivos de alfalfa, así como puede favorecer a la mejora de los suelos, potenciando la fijación de nitrógeno.

### **b) Estudio molecular de los genes de *Rhizobium***

Estudio de genes (PCR) para identificar géneros y especies de rizobios de modo tal que se pueda estudiar/comprobar la especificidad de la relación simbiótica.

### **c) Realización de pruebas fisiológicas y bioquímicas**

Pruebas destinadas a una identificación más precisa de las distintas especies de rizobios, así como las cepas dentro de las mismas.

## 7. Referencias bibliográficas

Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2009). *Fundamentos de fisiología vegetal* (2ª ed.). Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, pp. 305-309.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition*. Baltimore, Maryland (USA): Williams & Wilkins, pp 95-97-112-113.

Díaz González, T., Fernández-Carvajal Álvarez, M. and Fernández Prieto, J. (2004). *Curso de botánica*. Gijón: Trea, pp.436-437.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2014). *Prescott's Microbiology, ninth edition*. New York (USA): Mc Graw Hill, pp

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2009). *Brock biology of microorganisms*. Harlow [etc.]: Pearson Education.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Harlow [etc.]: Pearson Education.

Beck, D., Materon, L., & Afandi, F. (1993). *Practical Rhizobium-legume technology manual*. Aleppo: ICARDA, pp. 1-15.

Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Procedimientos de Microbiología Clínica*. Madrid: Emilia Cercenado y Rafael Cantón, pp. 5-52.

Neyra, M. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1995). *Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: Leguminosa-Rhizobium*. Roma: FAO.

Agahm M.V., Orji, J.O., A.U., Chukwu, O.S., Udu-Ibiam, O.E., Nwachi, A.C. y Olaosebikan, O.O. (2016). *Isolation and Identification of Rhizobium species from Root Nodules of Arachis Hypogaea L. and Telfaria occidentalis in South-East, Nigeria*. International Journal of Science and Research (IJSR), 5(6), pp. 227-230.

Cubillos-Hinojosa, J., Milian, P., & Hernández, J. (2012). Aislamiento de cepas de Rhizobium spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana De Microbiología Tropical*, 2(2), 51-62.

Calvo García, S (2011). *Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno*. Dialnet, 3, pp. 173-186.

Britton, N. L. & J. N. Rose (1975). *Caesalpiniaceae*. North Amer. 23: 201-349. 1930. Isely, D. Leguminosae of the United States. II, Subfamily Caesalpinioideae. Mem. N. Y. Bot. Gard. 25(2): 1-228.

Rico Arce, M. L. (2001). *El género Acacia (Leguminosae, Mimosoideae) en el estado de Oaxaca, México*. Anales Jard. Bot. Madrid 58(2), pp 251-302.

Shahzad, F., Shafee, M., Abbas, F., Babar, S., Tariq, M., y Ahmad, Z. (2012). *Isolation and biochemical characterization of Rhizobium meliloti from root nodules of alfalfa (Medicago sativa)*. The Journal of Animal & Plant Science, 22(2), pp 522-524.

Willems, A. (2006). *The taxonomy of rhizobia: an overview*. Plant and Soil, 287(1-2), pp.3-14.

Salas, M. (2015). *La simbiosis fijadora de nitrógeno Sinorhizobium meliloti-alfalfa: Aproximaciones ómica aplicadas a la identificación y caracterización de determinantes genéticos del rhizobio asociados a la colonización temprana de la raíz de alfalfa (Medicago sativa)* (Licenciada). Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Díaz Alcántara, C. (2010). *Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (Phaseolus vulgaris L.), en la República Dominicana*. (Licenciado). Universidad de León.

Herbarivirtual.uib.es. (n.d.). Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental. [online] Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-ub/especie/6730.html> [Consulta 3 julio 2017].

Unavarra.es. (n.d.). *Onobrychis viciifolia* Scop. [online] Disponible en: [http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Onob\\_vici\\_p.htm](http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Onob_vici_p.htm) [Consulta 3 julio 2017].

Herbarivirtual.uib.es. (n.d.). Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental. [online] Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/5092.html> [Consulta 3 julio 2017].

Unavarra.es. (n.d.). *Medicago sativa* L. [online] Disponible en: [http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Medi\\_sati\\_p.htm](http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Medi_sati_p.htm) [Consulta 3 julio 2017].

Fao.org. (2002). *Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030*. [online] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s11.htm> [Consulta 6 agosto 2017].

*Bioteología*. (2007). Los microbios del suelo y la agricultura. [online] Disponible en: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&not e=24> [Consulta 5 julio 2017].