

TOLERANCIA A ACIDEZ EN Rhizobium trifolii

CARMEN BUENO CASTILLO

Servicio de Investigación Agraria
Apdo 22. 06080 Badajoz

RESUMEN

La tolerancia a acidez de 29 cepas de Rhizobium trifolii de diverso origen, fue estudiada en el medio líquido acidificado de Keyser y Munns. Doce de las cepas mostraron crecimiento a pH 4.1, medido como densidad óptica a 600 nm, después de un periodo de latencia. De las cepas rhizobianas de origen español, solo crecieron las aisladas en suelos ácido de regiones húmedas o de regadío. Dos cepas, la tolerante a acidez USDA 2160 y la sensible a acidez 162-X-103 tenían una producción de polisacáridos extracelulares (EPS) similar. La diferencia en su tolerancia a acidez no es debida a una gran diferencia en producción de EPS.

PALABRAS CLAVE: Suelo ácido, rhizobio, trébol subterráneo.

INTRODUCCION

En el suroeste de la península Ibérica los pastos estan situados en su mayor parte sobre suelos ácidos con pH entre 5 y 6. Estos niveles de pH del suelo no son limitantes para el trébol subterráneo, pero pueden limitar la supervivencia y la actividad simbiótica del rhizobio. En Australia se ha observado que suelos bajo pastos con trébol subterráneo se han acidificado con el tiempo (Williams, 1980, Bromfield et al., 1983) y la pérdida de productividad de estos pastos puede ser debida a la falta de supervivencia de los rhizobios debida a la acidez (Coventry et al., 1985).

El trébol subterráneo es capaz de crecer en soluciones nutritivas a pH 4, cuando se le proveía de una adecuada fuente de nitrógeno (Munns, 1968); pero la nodulación es menos tolerante a pH ácidos (Loneragan y Dowling, 1958; Kim et al., 1985). Thorton and Davey (1983 b) demostraron que la sensibilidad de las cepas rhizobianas a la acidez del suelo podía predecirse en el laboratorio y que cepas resistentes a acidez, formaban simbiosis efectivas en suelos ácidos. En

algunos casos estas asociaciones produjeron el 90-99% de la biomasa producida por los controles con fertilización nitrogenada. Debe tenerse en cuenta que el aislamiento y replicación de las cepas de Rhizobium suele hacerse en medios con pH neutro y tal vez se están favoreciendo aquellos rhizobios con mayor capacidad de crecimiento y perdiendo potencial genético de resistencia a otros factores.

El objetivo del estudio fue determinar el crecimiento de cepas de R. trifolii en un medio líquido con distintos niveles de pH para seleccionar cepas tolerantes a acidez.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron 29 cepas de R. trifolii de colecciones de España y .OP U.S.A., que habían sido recogidas inicialmente en distintas regiones con clima mediterráneo (Tabla 1). El medio de cultivo fue el descrito por Keyser y Munns (1979), con las modificaciones de Thornton y Davey (1983a). La solución basal se compone como sigue: manitol, 10 g; Na-glutamato, 1.1; extracto de levadura, 0.5 g; y las siguientes sales en μmol : MgSO_4 , 300; CaCl_2 , 300; EDTA-Ferrico, 10; KCl_2 , 10; MnCl_2 , 0.1; ZnSO_4 , 0.4; CuCl_2 , 0.1; NaMoO_4 , 0.002; CoNO_3 , 0.002; KH_2PO_4 , 1; K_2HPO_4 , 1 y agua destilada hasta 1 l. Este medio se acidificó con HCl 1N, antes de introducirlo en el autoclave, para obtener unos pH finales de 6.8, 5.0, 4.5, y 4.1. De cada cepa se preparó un cultivo inicial en medio YEM (extracto de levadura-manitol Vincent, 1970) a pH 6.8, hasta obtener una turbidez correspondiente a 3×10^8 células/ml. Alicuotas de 0.5 ml de cada suspensión de cepas fueron inoculadas en tubos (72 mm x 100 mm), conteniendo 4 ml del medio acidificado o neutro. La densidad inicial en los tubos fue alrededor de 6×10^8 células/ml y no se observaba turbidez. Los tubos fueron incubados a 25 C en un agitador a 120 rpm. La tolerancia a la acidez se estableció por el crecimiento bacteriano diario, medido como densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro Varian DMS 100. El experimento

se llevó a cabo con 3 tubos de cada una de las 29 cepas a cada nivel de pH en un diseño factorial completamente al azar. El periodo de incubación fue de 7 días y al finalizar todos los tubos fueron controlados por el método de "drop-plate" (Miles y Misra, 1938) para ver si hubo contaminación.

RESULTADOS

En previos cultivos, el medio de Keyser y Munns resultó ser adecuado para el crecimiento de las cepas de rhizobio que se usaron. Todas las cepas mostraron crecimiento en los pH altos, siendo altamente significativas las diferencias en los valores de D.O. para días de incubación, cepas y niveles de acidez. En el medio a pH 4.1, el día de incubación y cepas fueron significativamente diferentes en D.O. En la Tabla 2 se presentan las 12 cepas de rhizobio que mostraron un aumento de D.O. en el día 4 de incubación, el crecimiento fue precedido por un periodo de latencia. Curvas de crecimiento de una cepa que creció bien en medio ácido (USDA 2160) y otra que creció pobremente (162-X-103) se presentan en la Figura 1. Cuando finalizó el experimento la media del pH, en el medio más ácido donde las cepas crecieron, fue de 4.3 y el del medio donde las cepas no crecieron, fue de 4.2. Todas las cepas, incluso aquellas que no mostraron crecimiento a pH ácido, formaron colonias con el método "drop plate", indicando que los rhizobio sobrevivieron en el medio líquido.

DISCUSION

El periodo de latencia en el crecimiento del rhizobio no fue afectado por la acidez con la extensión indicada por Keyser y Munns (1979), posiblemente debido a la alta concentración inicial (6×10^8 células / ml). Keyser y Munns (1979) también encontraron que la acidez afectaba el crecimiento rhizobiano en medio líquido a pH 4.5 bien incrementando la fase de latencia y/o disminuyendo la tasa de crecimiento. En este estudio, la acidez impidió el crecimiento del 60% de

las cepas utilizadas. Evans et al. (1988) proponen que la capacidad de los rhizobios para proliferar rápidamente en suelo ácido puede ser un factor importante para su competencia en formar nódulos.

Howieson (1985) estableció que el medio de Keyser y Munns tiene baja capacidad buffer. Esto se demostró en el presente estudio por el incremento de pH debido al crecimiento bacteriano.

Es de interés que de las cepas de rhizobio de origen español que crecieron en el medio acidificado (pH 4.1) solo se incluían una cepa aislada de un lugar con suelo ácido y riego (IST-1) y dos aislados en suelos ácidos de la región húmeda del noreste (IST-71 y IST-73). Otras cepas recogidas de suelos ácidos y regiones secas no fueron tolerantes a la acidez del medio de cultivo usado en este estudio, posiblemente porque no estaban adaptadas a las condiciones del medio líquido. Sin embargo, tal vez hubieran sido capaces de crecer en un medio con agar y acidificado como el empleado por Ayanaba et al. (1983). Son necesarios más estudios para ver como el contenido de agua en el suelo influye en el efecto de la acidez en R. trifolii.

Cunningham y Munns (1984) observaron que existía una correlación entre polisacáridos extracelulares (EPS) y su tolerancia a acidez. Dos de las cepas de Rhizobium usadas en este estudio, la tolerante a acidez USDA 2160 y la no tolerante 162-X-103, parecían tener la misma producción de EPS, con colonias "mucosas o húmedas", cuando se incubaron en agar-YEM a pH 6.8. La diferencia en su tolerancia a la acidez no es debida a una diferencia grande en producción de EPS. Debido a que los EPS producen turbiedad, el método espectrofotométrico podría sobreestimar la tasa de crecimiento de las cepas productoras de EPS. Dada la diferencia de D.O. en dos cepas con similar producción de EPS, este método puede ser apropiado para diferenciar cepas tolerantes y sensibles a la acidez en medio líquido.

BIBLIOGRAFIA

- AYANABA A., ASANUMA S., MUNNS D.N., 1983. An agar plate method for the rapid screening of Rhizobium for tolerance to acid-aluminium stress. Soil Sci. Soc. Am. J. 47: 256-258.
- BROMFIELD S.H., CUMMING R.W., DAVID D.J., WILLIAMS C.H., 1983. Change in soil pH, manganese and aluminium under subterranean clover pasture. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 23: 31-37.
- COVENTRY D.R., HIRTH J.R., REEVES T.G., JONES H.R., 1985. Development of populations of Rhizobium trifolii and nodulation of subterranean clover following the cropping phase in crop-pasture rotations in southeastern Australia. Soil Biol. Biochem. 17: 17-22.
- CUNNINGHAM S.D., MUNNS D.N., 1984. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in Rhizobium. Soil Sci. Soc. Am. J. 48: 1273-1276.
- EVANS J., HOCHMAN Z., O'CONNOR G.E., OSBORNE G.J., 1988. Soil acidity and Rhizobium: their effect on nodulation of subterranean clover on the slopes of Southern New South Wales. Aust. J. Agric. Res. 38: 605-618.
- KEYSER H.H., MUNNS D.N., 1979. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium and phosphate. Soil Sci. Soc. Am. J. 43: 519-523.
- KIM M.K., EDWARDS D.G., DATE R.A., ASHER C.J., 1985. Effects of pH on nodulation and growth of subterranean clover cultivars. In: H. Kirita et al. (ed.) Proc. XV Int. Grass. Cong. Kyoto, Japan, pp. 543-544.
- LONERAGAN J.F., DOWLING E.J., 1958. The interaction of calcium and hydrogen ions in the nodulation of subterranean clover. Aust. J. Agric. Res. 9: 464-472.
- MILES A.A., MISRA S.S., 1938. The estimation of the bactericidal power of blood. J. Hyg. Camb. 38: 732-749.
- MUNNS D. N., 1968. Nodulation of Medicago sativa L. and Trifolium subterraneum L. Aust. J. Agric. Res. 16: 733-741.
- THORNTON F.C., DAVEY C.B., 1983a. Acid tolerance of Rhizobium trifolii in culture media. Soil Sci. Soc. Am. J. 47:496-501.
- THORNTON F.C., DAVEY C.B., 1983b. Response of the clover-Rhizobium symbiosis to soil acidity and Rhizobium strain. Agron. J. 75: 557-560.
- VINCENT J.M., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Program Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- WILLIAMS C.H., 1980. Soil acidification under clover pasture. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 20: 561-567.

ACIDITY TOLERANCE OF Rhizobium trifolii

SUMMARY

Acidity tolerance of 29 R. trifolii strains of different origin, was studied in the acidified liquid medium of Keyser and Munns. Twelve strains showed growth at pH 4.1, measured as optical density at 600 nm, after a lag phase. Only the spanish rhizobial accessions isolated from acidic soils in humid and irrigated sites, grew in the liquid medium. Two strains, acid tolerant USDA 2160 and acid sensitive 162-X-103 had similar production of extracellular polysaccharides (EPS). The difference in their acidity tolerance was not due to a gross difference in EPS production.

Tabla 1. Cepas de R. trifolii : origen, planta y características del sitio de donde fueron aisladas.

Número	Origen geográfico	Planta	Características del suelo
Donante: H. Keyser. USDA Agricultural Research Service. Beltsville, MD 20705.			
USDA 2092	-	<u>I. incarnatum</u>	
USDA 2130	-	<u>I. alexandrinum</u>	
USDA 2131	-	"	
USDA 2153	Marruecos	<u>I. subterraneum</u>	
USDA 2154	California	"	
USDA 2155	"	"	
USDA 2156	"	"	
USDA 2157	"	"	
USDA 2158	"	"	
USDA 2159	"	"	
USDA 2160	"	"	
USDA 2161	"	"	
USDA 2162	Tunez	"	
Donante: S. Smith. Nitragin Co. Inc. Milwaukee, WI 53209.			
162-G-15	California	<u>I. hirtum</u>	
162-K-13	Alabama	<u>I. incarnatum</u>	
162-X-68	California	<u>I. subterraneum</u>	
162-X-103	Tunez	"	
Donante : R. Drive. CIDA "La Rinconada" Sevilla.			
IST-1	España	<u>Trifolium</u> sp.	Acido, regadio
IST-11	"	"	"
IST-28	"	"	"
IST-51	"	<u>I. subterraneum</u>	Acido, secano
IST-54	"	"	" "
IST-61	"	<u>I. repens</u>	" "
IST-62	"	"	" "
IST-65	"	<u>I. subterraneum</u>	" "
IST-66	"	<u>I. fragiferum</u>	pH 7.4, aluvial regadio.
IST-69	"	"	"
IST-71	"	<u>I. repens</u>	Acido, húmedo.
IST-73	"	<u>I. subterraneum</u>	" "

Tabla 2. Turbidez de los cultivos de las cepas de rhizobio que crecieron a pH 4.1.

Cepa	Dias de crecimiento del cultivo.					
	1	2	4	5	6	7
	----- Densidad Optica a 600 nm x 10 ⁻³ -----					
USDA 2154	94	88	332	513	608	638
USDA 2155	84	99	223	339	466	600
USDA 2156	71	59	104	184	281	316
USDA 2157	105	74	134	176	203	218
USDA 2158	46	56	220	266	377	465
USDA 2159	81	57	167	231	336	429
USDA 2160	97	48	302	373	466	483
162-X-68	51	60	213	301	357	511
162-K-13	41	32	94	147	183	267
IST-1	40	36	83	123	90	128
IST-71	19	31	218	275	452	579
IST-73	23	53	359	368	609	757

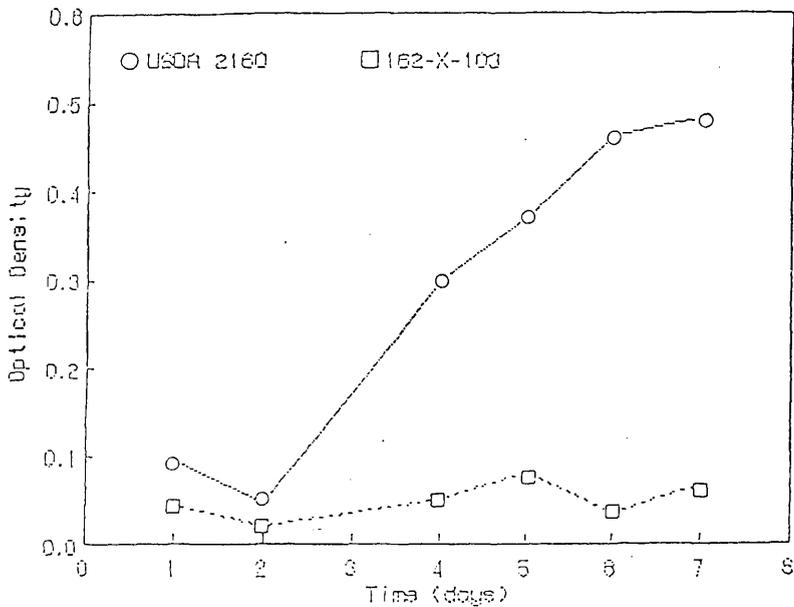


Figura 1. Densidad óptica a 600nm de dos cepas rhizobianas que crecieron durante 7 días en un medio líquido a pH 4.1. Cada punto representa la media de 3 tubos.