

Efecto de los Protozoarios sobre la Nodulación en Frijol (*Phaseolus vulgaris*)¹

O. Acuña*, C. Ramírez*

ABSTRACT

A study was conducted to determine the effect of a soil flagellate on survival and multiplication of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* and on nodulation of common beans (*Phaseolus vulgaris*) var. Mexico 80 grown in growth pouches under greenhouse conditions. The plant growth solution in the pouches was inoculated with *Rhizobium* strain CR-409 (CIAT 166) at two densities 1×10^4 and 1×10^6 bacteria ml^{-1} with and without protozoa (1×10^4 and ml^{-1}). Each growth pouch had two plants and each treatment consisted of four growth pouches (replicates). Bacterial counts were made on yeast extract mannitol amended with 5 ppm of brilliant green and the protozoa through the most probable number technique at days 0, 2, 4, 6 and 8 after the treatments were applied. Protozoa reduced the population of bacteria in comparison with the controls with no protozoa at both rates of bacterial inoculation; there was an increase in the protozoan population only at the high rate of inoculation. The decrease in the number of bacteria was also concomitant with a decrease in nodulation, measured as nodule dry weight per plant, from 35.5 mg to 19.6 mg at the low rate of inoculation and from 12.8 mg to 1.4 mg at the high rate of inoculation. Reasons for the difference between the two rates are discussed. The data presented support the view that protozoa may negatively affect nodulation.

COMPENDIO

Se evaluó el efecto de un flagelado (protozario), aislado del suelo, sobre la supervivencia y multiplicación de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*, y la nodulación en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) var. México 80, cultivado en bolsas de crecimiento para plantas, en condiciones de invernadero. Se inoculó la solución nutritiva con la cepa de *Rhizobium* CR-409 (CIAT 166) en dos niveles finales de la población, 1×10^4 y 1×10^6 bacterias por mililitro de medio, con y sin protozoarios inoculados (1×10^4) por mililitro. En cada bolsa de crecimiento se sembraron dos plántulas del frijol; en total se dispuso de cuatro bolsas (repeticiones) por tratamiento. Se realizaron recuentos de bacterias en agar, levadura manitol más verde brillante (5 ppm) y de protozoarios mediante la técnica del número más probable, a los 0, 2, 4, 6 y 8 días después de aplicados los tratamientos. La presencia de protozoarios redujo la población de las bacterias en relación con los tratamientos sin protozoarios en ambos niveles de inóculo, solo en el caso del alto inóculo bacteriano hubo aumento de la población de protozoarios. La disminución de la población bacteriana fue acompañada de una disminución en la nodulación en ambos casos, de 35.5 mg en peso seco de nódulos por planta a 19.6 mg en el bajo inóculo y de 12.8 mg a 1.4 mg en el alto inóculo bacteriano.

INTRODUCCION

La multiplicación de bacterias del género *Rhizobium* en la rizósfera antecede a la infección y formación de los nódulos radicales en las leguminosas capaces de formar simbiosis (8, 10). En estas estructuras se dan las condiciones fisiológicas adecuadas para que los bacteroides realicen la fijación biológica del N, proceso de relevancia ecológica y agronómica.

La colonización de la rizósfera del frijol y, tal vez, de otras leguminosas por *Rhizobium*, previa a la infección y formación de los nódulos, podría determinar en gran medida el éxito de la inoculación; pero ha sido poco estudiada. Factores físicoquímicos y biológicos afectan la supervivencia y multiplicación de las bacterias en el suelo, a saber: pH, T, humedad, presencia de sustratos, parasitismo, competencia y depredación (1). Las interacciones entre estos factores no se conoce bien, lo que impide mejorar las prácticas de manejo y obtener un mayor beneficio de la fijación biológica de nitrógeno, sobre todo mejorando la nodulación con cepas escogidas, aun en competencia con las nativas, generalmente más competitivas (6).

¹ Recibido para publicación el 15 de junio de 1990.
El presente trabajo fue realizado con fondos del Proyecto VI-733-86-107

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, C R

Investigaciones anteriores han impuesto un papel importante a los protozoarios del suelo en la depredación de bacterias en general (13) y *Rhizobium* en particular (2, 3, 5). Además, Ramírez y Alexander (9)

sugieren que la activa multiplicación bacteriana (incluyendo *Rhizobium*) resultante de la mayor disponibilidad de sustratos de fácil utilización, que proviene del efecto espermoférico y rizoférico en plántulas de frijol común, causa un aumento drástico en la actividad de los protozoarios del suelo, seguida de una reducción en el número de los rhizobia cercanos a 1×10^6 gl (5). Es decir, el influjo de carbono utilizable causa otra dinámica entre presa (bacterias) y depredador (protozoarios), lo que haría pensar en un decrecimiento importante de las poblaciones de *Rhizobium*, a un punto que afectaría la nodulación.

En esta investigación se mejoró la nodulación por cepas inoculadas, al disminuir la actividad depredadora de los protozoarios en los suelos mediante inhibidores, lo cual implica la actividad de los protozoarios; sin embargo, la evidencia no fue directa.

En el presente trabajo se estudió el efecto de los protozoarios aislados del suelo sobre la supervivencia de rhizobia y la nodulación en plántulas de frijol (*P. vulgaris* L.), bajo condiciones controladas. También se muestran datos experimentales del efecto directo de los mismos sobre el patrón de nodulación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó la cepa de *R. leguminosarum* biovar. *phaseoli* C.R.-409 (CIAT 166) de la bacteriotea del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, y la variedad de frijol (*P. vulgaris* L.) "México 80". Las bacterias crecieron en frascos Erlenmeyer de 250 ml con medio extracto de levadura manitol (14) y se incubaron a temperatura ambiente (21°C - 26°C) bajo agitación constante a 120 rpm, durante tres días, hasta alcanzar aproximadamente 1×10^9 ml⁻¹ bacterias por mililitro. Las bacterias fueron lavadas dos veces por centrifugación con solución nutritiva para plantas (12) antes de ajustar la turbiedad de la suspensión bacteriana con el nefelómetro de MacFarland (7) y las inoculaciones a los valores iniciales que se indican el Cuadro 1.

Para aislar el protozoario se humedeció a capacidad de campo un suelo por tres días; luego se tomó una muestra de 1 g y se inoculó en 20 ml de caldo proteosa peptona-sacarosa (1 y 0.5% respectivamente), con el propósito de promover primero la multiplicación bacteriana y, luego, la de los protozoarios. A los cuatro días de incubación, se tomó una muestra para hacer el re-

cuento del número más probable (NMP) de acuerdo con la metodología de Singh (11), pero usando placas de microtítulo. Se utilizó la misma cepa de *R. leguminosarum* como fuente de alimento (presa) para permitir la multiplicación de los protozoarios en los reservorios. Se aislaron los protozoarios de la mayor dilución positiva y se repitió el recuento del NMP para asegurar su homogeneidad al reaislar de la mayor dilución el protozoario (un flagelado).

Cuadro 1. Supervivencia de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* y protozoarios del suelo en la solución nutritiva de bolsas de crecimiento con plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su efecto sobre la nodulación.

Días de incubación	Número de rhizobia y protozoa ($\times 10^4$ ml ⁻¹)			
	Inóculo bacteria inicial			
	Bajo		Alto	
	Protozoarios		Protozoarios	
	-	+	-	+
0	1	1	100 000	100 000
		(-1)		(1)
2	270	420	290 000	2 000
		(0.49)		(10)
4	8 700	900	180 000	2 000
		(0.49)		(9)
6	3 500	2 000	50 000	310
		(0.98)		(17)
8	270	100	3 000	270
Peso seco nódulos (mg/planta)	35.1	19.6	12.8	1.4

* Número de protozoarios entre paréntesis

Las semillas de frijol se trataron con solución de cloruro de mercurio acidulado al 0.01% (14) por cinco minutos y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. La germinación se realizó en placas de Petri con agar agua. Las plántulas con una radícula de 2.5 cm se trasplantaron a las bolsas de crecimiento estériles, que contenían 100 ml de solución nutritiva para plantas (12). Una vez que las raíces alcanzaron la solución en el fondo de la bolsa de policarbonato, las soluciones se inocularon con las bacterias para obtener dos concentraciones, 1×10^9 y 1×10^4 bacterias por mililitro. A la mitad de las bolsas se le añadió una suspensión de protozoarios purificados (*vide ante*) a una concentración de 1×10^4 . Las bolsas de crecimiento fueron inoculadas en un número relativamente alto de protozoarios (10^4 ml⁻¹) con el fin de contar, desde un inicio, con una presión alta de depredación en la solución. Durante el experimento, diariamente, se reajustó el contenido de agua en 100 mililitros. Cada vez se tomaban las muestras. Se usaron dos plantas por bolsa y

cuatro repeticiones en un diseño de irrestricto al azar. A los 2, 4, 6 y 8 días después de la inoculación, se elaboraron recuentos de bacterias y protozoarios. Para las bacterias se usó la técnica de dilución en placa sobre medio ALM + 5 ppm de verde brillante y para el recuento de protozoarios la técnica de NMP. El peso seco de nódulos se determinó a los 20 días de aplicados los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El Cuadro 1 presenta los resultados obtenidos. En todas las plantas se esperaba nodulación, pues la solución-baño se inoculó con rhizobia compatible y efectiva con la variedad de frijol empleada. Las bacterias inoculadas con un número bajo fueron estimuladas por los exudados radicales del frijol, capaces de multiplicarse en la solución que bañaba las raíces y migrar hasta los sitios de infección desde los pelos radicales, ya fuera por arrastre de la solución-baño debido a la capilaridad del papel o por quimiotaxis positiva. Los protozoarios, cuya única fuente de alimento fueron las bacterias, estaban tanto en la solución nutritiva como en las raíces y, en estas condiciones experimentales, se permitió el estudio de su efecto directo sobre la nodulación.

Por el método de aislamiento empleado había certeza de que el flagelado en cuestión, era capaz de reproducirse aprovechando exclusivamente las bacterias como fuente de alimento. En este caso el protozoario se escogió para probar la hipótesis de que la depredación, bajo las condiciones experimentales empleadas, era capaz de alterar el patrón de nodulación. De estos resultados no se puede inferir que en el suelo, donde se aisló el mismo, sea el principal agente depredador de las bacterias si estas fueron inoculadas a las mismas dosis en suelo sin esterilizar. Tampoco se puede generalizar la importancia del flagelado en otros suelos, pues las poblaciones son bastante heterogéneas y, posiblemente, varias especies de protozoarios se estimulan al añadir una presa como *Rhizobium*.

La única fuente de sustratos para las bacterias fueron los radicales exudados por las plántulas de frijol, al ser capaces de multiplicarse en la solución que bañaba las raíces. Hecho que fue más notorio en el tratamiento sin protozoarios; a los cuatro días de incubación mostró un total de 8.7×10^5 ml⁻¹ rhizobia, cerca de un factor 10 más grande, comparado con el tratamiento con protozoario. A los seis y ocho días de incubación las proporciones no variaron. El número de protozoarios

fue constante, lo que indica que la multiplicación bacteriana en los exudados fue apenas suficiente para mantener la población inoculada al inicio. Por otro lado, la población máxima obtenida sin protozoarios representaría el potencial límite de colonización *Rhizobium* que resulta del aprovechamiento de los exudados radicales en las condiciones experimentales empleadas.

La caída brusca de la población rhizobia del día cuarto al octavo no se puede explicar con claridad, a menos que existiera lisis y/o aglutinación de las bacterias. De toda forma, los protozoarios fueron capaces de reducir drásticamente la nodulación pues la misma fue la mitad en relación con la inoculación en el nivel bajo con *Rhizobium* (19.6 versus 35.1 mg por planta, peso seco de nódulos). Estos resultados evidencian una correspondencia entre la cantidad de bacterias en la solución y la nodulación durante el experimento. Cabe recordar que en el momento de inocular la solución-baño con los diferentes tratamientos, las plántulas de frijol presentaban ya pelos radicales y, por lo tanto, eran susceptibles de ser noduladas.

Los resultados conseguidos en el nivel alto de inoculación con *Rhizobium* (10^9 ml⁻¹) mostraron un aumento de la población bacteriana hasta 2.9×10^9 que perfectamente se debería al uso de sustratos y/o la utilización de las reservas endógenas de las bacterias al inocularse. De todas maneras, el aumento relativo de la población bacteriana, en ausencia de protozoarios, fue mucho menor en cuatro días; en el caso del nivel bajo de inóculo apenas se duplicó la población mientras que en el último aumentó casi por un factor de 10 000. Esto indicaría que la cantidad de exudados radicales no fue suficiente para soportar la multiplicación de una población bacteriana tan alta y/o a la existencia de otros factores limitantes del crecimiento. El hecho que sea la primera alternativa está determinado por los resultados obtenidos en el nivel bajo de inóculo, donde la colonización bacteriana no alcanzó niveles muy altos. En niveles altos de inóculo hubo una caída drástica de la población bacteriana, situación para la que no hay una explicación clara. Los protozoarios se reprodujeron en el nivel alto de inóculo bacteriano, por un factor de 10 al cabo de dos días, para llegar a un máximo de 1.7×10^5 en seis días. En el octavo día a pesar de que el número sobreviviente de bacterias fue similar al existente en el nivel bajo de inóculo sin protozoarios, la nodulación fue apenas perceptible. Aunque se hizo el recuento en la solución-baño, no se pudo descartar que parte del efecto de los protozoarios sobre la nodulación se debía a la depredación directa de los flagelados en las cerca-

nías o en los pelos radicales. Además, la excreción de amonio de los protozoarios (13) puede haber inhibido la nodulación (4).

La nodulación observada en ausencia de protozoarios fue menor que en el nivel bajo de inoculación. Posiblemente la lisis y/o la saturación de los sitios de infección la afectaron.

Los resultados presentados muestran una evidencia directa de que, en un sistema controlado, la presencia de protozoarios afecta decididamente la nodulación. Esta información es importante para entender los factores ecológicos que afectan el proceso en condiciones de campo y subraya el valor de realizar más estudios para determinar el papel de la depredación en la nodulación *in situ*. Desde el punto de vista práctico los resultados sugieren que una estrategia válida para aumentar la colonización y la nodulación es la inhibición temporal de los protozoarios del suelo durante el período que antecede a la infección (1, 9).

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. 1985. Enhancing nitrogen fixation by pesticides: A review. *Advances in Agronomy* 38:267-282.
2. CHAO, W.; ALEXANDER, M. 1981. Interactions between protozoa and *Rhizobium* in chemically amended soil. *Soil Science Society of America Journal* 45:48-50.
3. DANSO, S.; KEYA, S.; ALEXANDER, M. 1975. Protozoa and the decline of *Rhizobium* populations added to soil. *Canadian Journal of Microbiology* 21:884-895.
4. GIBSON, A.H.; JORDAN, D.C. 1983. Ecophysiology of nitrogen fixing systems. In *Physiological plant ecology. III. Responses to the chemical and biological environment*. Encyclopaedia of Plant Physiology. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (Eds.) New York, Springer Verlag. v. 12 c, p. 301-390.
5. HABTE, M.; ALEXANDER, M. 1977. Further evidence for the regulation of bacterial populations in soil by protozoa. *Archives for Microbiology* 113:181-183.
6. HALLIDAY, J. 1985. Biological nitrogen fixation in tropical agriculture. In *Nitrogen fixation research progress*. H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton (Eds.) Martinus Nijhoff, Dordrecht p. 675-681.
7. PAIK, G. 1970. Reagents, stains and test procedures. In *Manual of clinical microbiology*. J.E. Blair, E.H. Lennette, J.P. Truant (Eds.). Bethesda, American Society for Microbiology. p. 675-692.
8. PARKER, C.; TRINICK, M.J.; CHATEL, D.L. 1977. *Rhizobia* soil and rhizosphere inhabitants. In *A treatise on dinitrogen fixation. IV. Agronomy and ecology*. R.W.F. Hardy, A.H. Sibson (Eds.) New York, Wiley-Interscience. p. 311-352.
9. RAMIREZ, C.; ALEXANDER, M. 1980. Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and Environmental Microbiology* 40: 492-499.
10. ROLFE, B.G.; GRESSHOF, P.M. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:297-319.
11. SINGH, B.N. 1955. Culturing soil protozoa and estimating their numbers in soil. In *Soil zoology*. D.K. McKevan (Ed.). London, Butterworth's Scientific Pub. p. 403-411.
12. SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. Honolulu, University of Hawaii, College of Agriculture and Human Resources, NIFTAL Project. 367 p.
13. STOUT, J.D. 1980. The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow. *Advances in Microbial Ecology* 4:1-40.
14. VINCENT, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publ. 164 p.