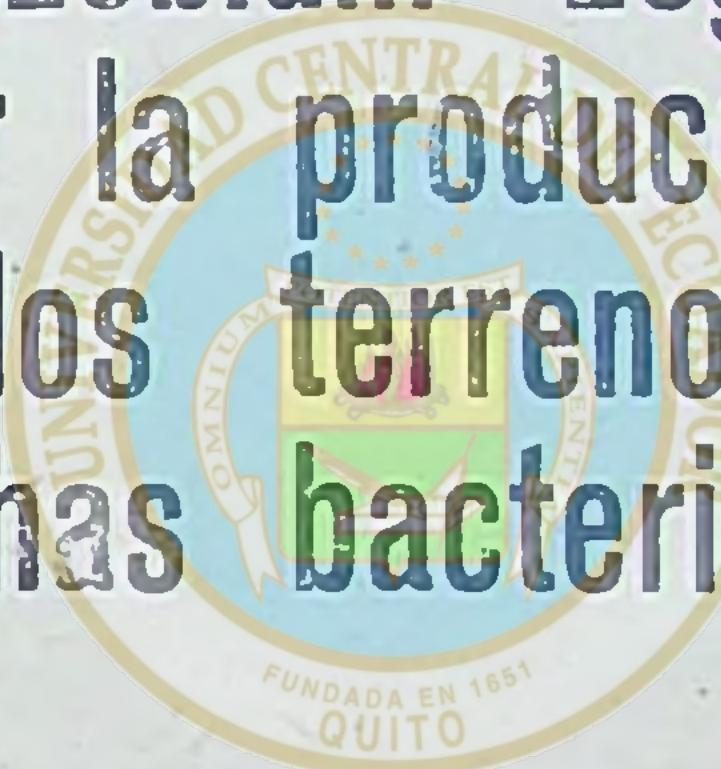


**FRANCISCO COUSIN (hijo)**  
Trabajo presentado para el grado de Doctor  
en Ciencias Agronómicas

**Aislamiento, Cultivo Artificial e Inoculación de Rhizobium Leguminosarum, para aumentar la producción de leguminosas en los terrenos pobres en dichas bacterias**



**ÁREA HISTÓRICA**  
DEL CENTRO DE INFORMACIÓN INTEGRAL

# AISLAMIENTO, CULTIVO ARTIFICIAL E INOCULACION DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM, PARA AUMENTAR LA PRODUCCION DE LEGUMINOSAS EN LOS TERRENOS POBRES EN DICHAS BACTERIAS

De acuerdo con el Art. 1º, inciso c, del Reglamento para optar el título de doctor en Ciencias Agronómicas, que dice: "Realizar un trabajo experimental agrícola, de carácter original, de innegable valor científico, que constituya un aporte al progreso agrícola del país, y presentar una obra publicada por el aspirante y de notorio valor científico", presento ante el señor Decano, el siguiente trabajo experimental:

Aislamiento, cultivo artificial e inoculación con Rhizobium Leguminosarum, para aumentar la producción de leguminosas en los terrenos pobres en dichas bacterias.

Por la experiencia que he adquirido en estos últimos 15 años en que he sido Profesor de Microbiología Agrícola de la Escuela Superior de Agronomía de la Universidad Central y en el laboratorio del Banco Nacional de Fomento, como Asesor Técnico Agrónomo y Jefe del laboratorio, me he inclinado a realizar este trabajo, que considero reúne todas las condiciones que prescribe dicho Reglamento.

Hace algunos años, los técnicos americanos de la Estación Agrícola Experimental del Ecuador importaron semillas de soya (*Glycine max*), y como se cultivaba por primera vez esta leguminosa en la zona de Tumbaco, el terreno estaba completamente desprovisto de la bacteria específica "Bacterium Radicicola Soya", por lo que los resultados del cultivo iban seguramente a fallar. Uno de los técnicos me solicitó que preparara los cultivos de dicha bacteria para proceder a la inoculación, lo que dió magníficos resultados. Otros agricultores también me han solicitado, en repetidas ocasiones, que les provea de esos cultivos artifi-

cales para inoculación de leguminosas, entre ellos el señor Reúl de Mesa, de quien presento el respectivo certificado.

Para este trabajo me ha parecido interesante escoger una planta muy importante, cuyo cultivo se halla muy extendido en ciertas localidades de la Sierra: la alfalfa (*Medicago Sativa*).

Antes de indicar el proceso que seguí para el aislamiento y cultivo de *Bacterium Radicicola*, quiero hacer una ligera descripción de las bacterias que viven en las raíces las leguminosas: El mejoramiento del suelo por el cultivo de las leguminosas es bien conocido. Esta propiedad se debe a la presencia en sus raíces, de bacterias que agrupadas en una sola especie, *Bacterium Radicicola* (algunos autores la denominan *Rhizobium Radicicola* o *Leguminosarum*) pasa por diversas etapas sucesivas. Al principio están libres y son muy móviles, luego son atraídas por un jugo azucarado secretado por las raicillas de las leguminosas, penetran en su tejido, se fijan y se multiplican rápidamente. En las raicillas, estas células se multiplican rápidamente, forman una nudosidad, en cuyo interior las bacterias se modifican, se alargan y primero se ensanchan para luego volverse irregulares, son puestas en libertad por la descomposición de la raíz. Luego de la muerte de la planta regresan al suelo y dan lugar al nacimiento de nuevas bacterias móviles que penetran a otras raíces y el ciclo se renueva. La fijación del nitrógeno se opera únicamente al interior y bajo la protección de las nudosidades. Se puede decir que existe una verdadera simbiosis entre la planta y la bacteria. La bacteria fija el nitrógeno que es el alimento indispensable a la planta y esta protege a la bacteria contra sus enemigos y le suministra el alimento hidrocarbonado que ella necesita. (Tesis, página 50).

Para el cultivo artificial del *Rhizobium*, preparé el siguiente medio de cultivo, que siempre me ha dado resultados satisfactorios:

Agar .....	10,00	Grs.
Mannita .....	10,00	"
K2HPO4 .....	0,50	"
MgSO4.7H2O .....	0,20	"
NaCL .....	0,10	"
CaCO3 .....	3,00	"
Extracto de levadura .....	100	cc.
Agua destilada .....	900	"

En los 900 centímetros cúbicos de agua destilada disolví todos los ingredientes. Dejé media hora en reposo, para incorporar el agar y luego calenté la mezcla hasta la ebullición, prolongué el tiempo de ésta cinco minutos más. Dejé enfriar e introduje 10 gramos en cada tubo de ensayo. Una vez taponados los tubos con algodón cardado, esterilicé el medio por el método intermitente: exposición al vapor durante veinte minutos en cada uno de tres días consecutivos.

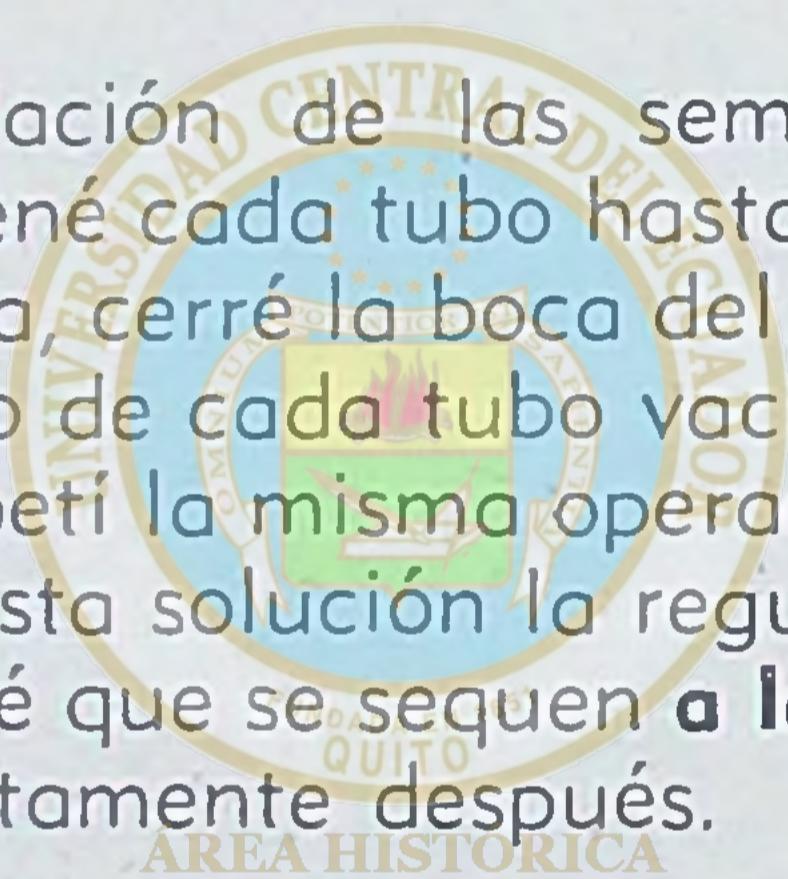
El extracto de levadura preparé de la siguiente manera: a un litro de agua destilada añadí 100 gramos de levadura de cerveza (se puede también emplear levadura seca en la proporción de 10 gramos por litro). Mezclé bien y calenté hasta la ebullición. Dejé enfriar y en reposo hasta que pude sifonar el líquido claro.

Teniendo el medio listo para la siembra procedí al aislamiento de la bacteria, para lo cual seleccioné las plantas mejor desarrolladas en un terreno de la hacienda "Las Cuadras" (Chillogallo), lavé las raíces con abundante agua y escogí los nódulos mejor formados. Uno de éstos fué partido por la mitad y luego hice un frotis en una lámina ordinaria. Una vez seco el frotis y fijado por dos pasos lentos por la llama de alcohol procedí a la coloración por el método de Gram: aplicación de solución de violeta de genciana 30 segundos, sacudida de la lámina para arrojar el exceso de colorante y sosteniéndola a ángulo agudo, vertí encima solución de yodo, para echar enseguida el depósito formado por la interacción del colorante y el yodo. Lavé con la solución de yodo dos veces. Decoloré con alcohol absoluto. Lavé bien con agua y apliqué el colorante de contraste: fuchsina de Ziehl Neelsen al 10%, durante treinta segundos. (Ver página 29 de la tesis).

Como al examen microscópico tenían los microbios las características del Rhizobium: bastoncitos alargados, móviles, Gram negativos y aún formas irregulares de coma y de Y, procedí a la siembra del medio en estado puro. Para esto lavé unos nódulos, a fin de remover los restos de tierras. Sumergí una porción de la raíz con los nódulos adheridos, en sublimado corrosivo al uno por mil, durante 10 minutos para destruir todos los microbios que podían encontrarse en la parte exterior de los nódulos, luego los lavé con alcohol. Dejé que se seque y para evaporar las trazas de alcohol los pasé rápidamente por la llama. Coloqué la raíz sobre una lámina flameada y enfriada, y sosteniendo con unas pinzas esté-

riles, corté uno de los nódulos mejor desarrollados con un bistirú estéril. Lo aplasté luego en una gota de agua esteril y de la emulsión obtenida de esa manera procedí a la siembra, empleando una gota de la suspensión microbiana y pásandola sobre la superficie del medio, con precauciones estériles. Como la temperatura óptima de este microbio es la de 15° centígrados, los cultivos fueron encubados a esa temperatura durante 21 días. Al cuarto día se notaban algunas colonias visibles, que eran al principio pequeñas y transparentes, con aspecto de gotitas de agua. Hice un examen microscópico de éllas, en fresco, y noté que las bacterias tenían movimiento. Luego hice una coloración por el método de Gram y demostraban ser Gram negativas. Al cabo de algunos días las colonias se volvían opacas. La bacteria había sido aislada en estado puro y demostraba tener todas las características de *Bacterium Radicicola*: bastoncito pequeño, móvil y Gram negativo.

Para la inoculación de las semillas procedí de la siguiente manera: llené cada tubo hasta cerca de la boca con agua limpia y fresca, cerré la boca del tubo y agité vigorosamente. El contenido de cada tubo vacié en un recipiente de mayor tamaño. Repetí la misma operación y mezclé bien las dos suspensiones. Esta solución la regué sobre diez libras de semillas. Luego dejé que se sequen **a la sombra** y la siembra fué hecha inmediatamente después.



DEL CENTRO DE INFORMACIÓN INTEGRAL

Todos estos trabajos los he podido realizar ya que poseo un laboratorio Bacteriológico que tiene todos los aparatos y reactivos necesarios.

Para finalizar, debo indicar que todas las bacterias nodulares ejercen la misma función, pero no son idénticas en la capacidad de producir nódulos en las diferentes especies de leguminosas. Algunas especies producen la formación de nódulos en las raíces de un grupo numeroso de leguminosas, mientras que otras tan sólo en una o unas pocas especies. El siguiente cuadro (Cortesía del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) indica "la inoculación cruzada" entre las bacterias de las leguminosas comunes. Las leguminosas que producen nódulos con la misma raza de bacterias están reunidas por grupos:

## GRUPO DE LA ALFALFA

- |                              |                                  |
|------------------------------|----------------------------------|
| <i>Medicago sativa.</i>      | <i>Medicago rigidula.</i>        |
| <i>Medicago orbicularis.</i> | <i>Medicago falcata.</i>         |
| <i>Medicago denticulata.</i> | <i>Melilotus alba.</i>           |
| <i>Medicago arabica.</i>     | <i>Melilotus alba annua.</i>     |
| <i>Medicago lupulina.</i>    | <i>Melilotus officinalis.</i>    |
| <i>Medicago scutellata.</i>  | <i>Melilotus indica.</i>         |
| <i>Medicago tuberculata.</i> | <i>Trigonella foenumgraecum.</i> |
| <i>Medicago mimima.</i>      |                                  |

## GRUPO DEL TREBOL

- |                                |                                |
|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Trifolium hybridum</i>      | <i>Trifolium nigrescens.</i>   |
| <i>Trifolium incarnatum.</i>   | <i>Trifolium willdenovii.</i>  |
| <i>Trifolium agrarium.</i>     | <i>Trifolium lappaceum.</i>    |
| <i>Trifolium dubium.</i>       | <i>Trifolium michelianum.</i>  |
| <i>Trifolium arvense.</i>      | <i>Trifolium fucatum.</i>      |
| <i>Trifolium pratense.</i>     | <i>Trifolium procumbens.</i>   |
| <i>Trifolium repens.</i>       | <i>Trifolium resupinatum.</i>  |
| <i>Trifolium subterraneum</i>  | <i>Trifolium carolinianum.</i> |
| <i>Trifolium fragiferum.</i>   | <i>Trifolium hirtum.</i>       |
| <i>Trifolium alexandrinum.</i> | <i>Trifolium reflexum.</i>     |
| <i>Trifolium glomeratum.</i>   | <i>Trifolium pannonicum</i>    |
| <i>Trifolium medium.</i>       |                                |

## GRUPO DE LAS ARVEJAS

- |                                      |                                    |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Pisum arvense.</i>                | <i>Vicia angustifolia.</i>         |
| <i>Pisum sativum.</i>                | <i>Vicia atropurpurea.</i>         |
| <i>Pisum sativum</i> (var. arvensis) | <i>Vicia articulata.</i>           |
| <i>Vicia sativa.</i>                 | <i>Lathyrus odoratus.</i>          |
| <i>Vicia villosa.</i>                | <i>Lathyrus sylvestris.</i>        |
| <i>Vicia faba.</i>                   | <i>Lathyrus hirsutus.</i>          |
|                                      | <i>Lathyrus tingitanus.</i>        |
|                                      | <i>Lens culinaris</i> (esculenta). |

## GRUPO DE LA SOYA

- Todas las variedades de Soya (Glycine Max).

## GRUPO DEL COWPEA

*Vigna sinensis.*  
*Vigna sesquipedalis.*  
*Lespedeza striata.*  
*Lespedeza stipulacea.*  
*Lespediza cuneata.*  
*Lespedeza virginica.*  
*Crotalaria mucronata.*  
*Crotalaria juncea.*  
*Crotalaria sagittalis.*  
*Phaseolus aconitifolius.*  
*Desmodium tortuosum.*  
*Desmodium illinoense.*  
*Desmodium canescens.*  
*Fueraria thunbergiana.*  
*Alysicarpus vaginalis.*

*Erythrina indica.*  
*Cajanus cajan.*  
*Cyamopsis tetragonoloba.*  
*Canavalia ensiformis.*  
*Arachis hypogaea.*  
*Stizolobium deerlingianum.*  
*Phaseolus lunatus.*  
*Phaseolus angularis.*  
*Phaseolus aureus.*  
*Phaseolus acutifolius.*  
*Chamaecrista fasciculata.*  
*Acacia linifolia.*  
*Acacia armata.*  
*Baptisia tinctoria.*  
*Indigofera hirsuta.*

## GRUPO DEL FREJOL

*Phaseolus vulgaris.*

*Phaseolus coccineus.*

## GRUPO DEL CHOCHO

*Lupinus angustifolius.*  
*Lupinus luteus.*  
*Lupinus albus.*  
*Lupinus polyphyllus.*

*Lupinus perennis.*  
*Lupinus diffusus*  
*Lupinus villosus.*  
*Ornithopus sativus.*

Además de esos, grupos, las siguientes leguminosas parece que requieren cepas específicas de bacterias nodulares para inoculación efectiva:

## GRUPO DE CEPAS ESPECIFICAS

*Lotus corniculatus.*  
*Lotus uliginosus.*  
*Dalea alopecuroides.*  
*Robinia pseudoacacia.*  
*Strophostyles helvola.*  
*Sesbania exaltata.*

*Onobrychis vulgaris.*  
*Coronilla varia.*  
*Caragana arborescens.*  
*Cicer arietinum.*  
*Amorpha canescens.*