

## Nota Técnica

**EVALUACION DE MEDIOS PARA LA SELECCION DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TOLERANTES A BAJA CONCENTRACION DE FOSFATO EN MEDIO DE CULTIVO<sup>1/</sup>\***

Lidieth Uribe \*\*

## ABSTRACT

Evaluation of media for the selection of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* tolerant to a low concentration of phosphate in culture medium. With the goal of selecting the medium which grows the largest quantity of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, the growth of 19 strains were determined in the media defined by Cassman *et al.* (1981a), Date and Halliday (1979), Munns and Keyser (1981) and the same media modified with the addition of vitamins (4 mg/L Thiamine, 4 mg/L pantothenic acid and 1 µg/L Biotin) (CIAT, 1988) and a high concentration of phosphate (2870 µM). Variation of the capacity to grow in the different media was observed among strains. Bacterial growth was largest in the Munns and Keyser medium with vitamin, therefore it was chosen as the medium for selecting strains tolerant to low levels of phosphate (5 µM). Among ten strains of *R. leguminosarum* bv *phaseoli* tested, 5 were determined tolerant and 5 not tolerant. The initial pH of the media rose with bacterial growth and these alkalization coincided with the appearance of turbidity. The results indicated that for purposes of screening strains tolerant of low levels of phosphate in culture media, the Munns and Keyser (1981) medium modified with the addition of vitamins is the most adequated and turbidity can be used as a criterion for selection.

## INTRODUCCION

Se ha observado entre las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* un amplio ámbito de eficiencia en el uso de concentraciones bajas de fosfato inorgánico (Pi) en medio de cultivo. Algunos autores sugieren que las cepas tolerantes a estas condiciones pueden tener un mayor éxito en el establecimiento de la simbiosis (Cassman *e t*

*al.*, 1981a; 1981b; Beck y Munns, 1984; Morales, 1987).

En el caso de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* no se dispone de un medio de cultivo adecuado para la selección de cepas. Morales (1987) evaluó la capacidad de crecimiento de 32 cepas en bajas concentraciones de fosfato en el medio propuesto por Cassman *et al.* (1981a). En condiciones de alta concentración de Pi, únicamente crecieron 9 cepas. Este resultado indica que se puede haber eliminado cepas con potencial como inoculante debido a que no se adaptaron al medio de cultivo utilizado.

Existen además algunos problemas con el uso de medios definidos para seleccionar cepas tolerantes. En un estudio en el que se utilizó la aparición de turbiedad como criterio de selección, se encontró relación entre ésta y una población de aproximadamente  $10^7$  bacterias/ml (Keyser y

1/ Recibido para publicación el 10 de diciembre de 1992.  
\* Parte de la tesis de M.Sc. presentada por Lidieth Uribe Lorío ante la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. El trabajo fue financiado por el Programa de Microbiología del Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.  
\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Munns, 1979). Sin embargo, se ha observado que en condiciones de baja concentración de fosfato ocurre un aumento en la turbiedad del cultivo debido a una mayor producción de polisacáridos (Cassman *et al.*, 1981a).

Otro factor a considerar es la alcalinización del medio de cultivo por efecto del metabolismo bacteriano. Si bien Date y Halliday (1979) recomendaron en sus estudios de tolerancia a acidez sustituir el manitol por arabinosa y galactosa, para evitar cambios en el pH, varios autores han observado alcalinización del medio relacionada con el crecimiento celular (Keyser y Munns, 1979; Beck y Munns, 1984; Howieson, 1985; Wood y Cooper, 1988). En vista de que el aumento en el pH coincidió con una población de aproximadamente  $10^7$  células/ml, Keyser y Munns (1979) sugieren el uso de inóculos pequeños,  $10^3$ - $10^4$  bacterias/ml.

Algunos estudios indican, sin embargo, que la concentración inicial de bacterias puede ser importante en la determinación de tolerancia de las cepas cuando se usa el criterio de turbiedad. En una investigación de tolerancia a la acidez se observó que la aparición de turbiedad de la cepa evaluada dependió del tamaño inicial del inóculo. Así, con una concentración inicial de  $10^2$  bacterias/ml no se observó turbiedad, mientras que con inóculos mayores la cepa se mostró como tolerante (Wood y Cooper, 1988).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de un medio de cultivo no restrictivo al crecimiento de las cepas de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* en la selección de cepas tolerantes a bajos niveles de Pi.

## MATERIALES Y METODOS

### Ubicación

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica y en la Sección de Microbiología de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

### Cepas

Se utilizaron cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* pertenecientes a ambos laboratorios anteriormente citados. La información de las cepas se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Procedencia de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* utilizadas.

Cepas	Procedencia
CIAT 381 1	CIAT 57, resistente S*
CIAT 385 1	Popayán, Colombia
CIAT 390 1	Popayán, Colombia
CIAT 579 1	Popayán, Colombia
CIAT 580 1	Popayán, Colombia
CIAT 405 1	CIAT, Colombia
CIAT 406 1	CIAT, Colombia
CIAT 407 1	CIAT, Colombia
CIAT 608 1	Chinchiná, Colombia
CIAT 609 1	Chinchiná, Colombia
CIAT 611 1	Chinchiná, Colombia
CIAT 632 1	Guatemala
CIAT 460 1	Bayment, Bélgica
CIAT 515 1	Bayment, Bélgica
CIAT 70441	Quilichao, Colombia
CIAT 876 2	Marinilla, Colombia
CIAT 949 2	Sant. Q. Cauca, Colombia
CR 436 2	Puriscal, Costa Rica
KIM 5 2	Idaho, USA
KIM 5S 2	Kim 5, resistente S*
57ccm 2	Sydney, Australia
CIAT 652 3	Buitrera, Colombia
CIAT 166 3	Buga, Colombia
CR 477 3	Paraíso, Costa Rica
CIAT 899 3	Carmen Viboral, Colombia

- 1 = utilizadas en la evaluación de medios  
 2 = utilizadas en la tolerancia a baja concentración de fosfato en medio de cultivo.  
 3 = utilizadas en ambos experimentos  
 S\* = estreptomicina

### Medios de cultivo

Las cepas de *Rhizobium* se conservaron en tubos inclinados con Agar Levadura Manitol (ALM) (Vincent, 1970). En la evaluación de medios para la selección de cepas se utilizó el medio definido propuesto por Cassman *et al.* (1981a) (medio C), el medio Date y Halliday (1979) (medio D), el medio de Munns y Keyser (1981) (medio M) y los mismos medios modificados con la adición de vitaminas (4 mg/L de tiamina, 4 mg/L de ácido pantoténico y 1 ug/L de biotina) (CIAT, 1988), denominados aquí medios CV, DV y MV, respectivamente. Los medios con alta concentración de fosfato se aforaron a 1 L con el buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2870  $\mu\text{M}$ , pH 5,7. El medio con baja concentración de fosfato se aforó con un buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5  $\mu\text{M}$ , pH 5,7. La composición de los medios se especifica en el Cuadro 2. A todos los medios se les corrigió el pH a 5,7 con HCl 1N debido a que la condición de bajo P generalmente está relacionada a suelos ácidos.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados en la evaluación de medios con alta concentración de fosfato (2870  $\mu\text{M}$ ).

COMPONENTES	C (u/L)	D (u/L)	M (u/L)
Arabinosa	3,000 g		0,300 g
Galactosa	3,000 g	10,000 g	0,300 g
Glutamato	1,100 g	0,220 g	1,800 g
Tiamina		0,100 mg	
Biotina		0,250 mg	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,250 mM		
KCl			0,050 mM
CaCl <sub>2</sub> /2H <sub>2</sub> O	0,300 mM	0,268 mM	0,500 mM
MgSO <sub>4</sub> /7H <sub>2</sub> O	0,300 mM	0,300 mM	0,500 mM
FeNaEDTA	0,050 mM	0,100 mM	0,025 mM
MnSO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O	2,000 $\mu\text{M}$		1,000 $\mu\text{M}$
ZnSO <sub>4</sub> /7H <sub>2</sub> O	1,000 $\mu\text{M}$	1,000 $\mu\text{M}$	0,500 $\mu\text{M}$
CuSO <sub>4</sub> /5H <sub>2</sub> O	0,500 $\mu\text{M}$		0,100 $\mu\text{M}$
CoCl <sub>2</sub> /6H <sub>2</sub> O	0,002 $\mu\text{M}$	0,005 $\mu\text{M}$	0,005 $\mu\text{M}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> /2H <sub>2</sub> O	0,100 $\mu\text{M}$	0,050 $\mu\text{M}$	0,025 $\mu\text{M}$
MnCl <sub>2</sub> /4H <sub>2</sub> O		2,000 $\mu\text{M}$	
CuCl <sub>2</sub> /2H <sub>2</sub> O		0,250 $\mu\text{M}$	
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>			0,010 mM

C = medio de Cassman Munns y Beck (1981)

D = medio de Date y Halliday (1979)

M = medio de Munns y Keyser (1981)

\*\* A los medios CV, DV y MV se adicionó 4mg/L de Tiamina, 4 mg/L Acido Pantoténico y 1 $\mu\text{g}$ /L biotina.

### Evaluación de medios con alta concentración (2870 $\mu\text{M}$ ) de fosfato

Con el fin de seleccionar un medio en el que creciera la mayor cantidad de cepas de *R. leguminosarum* bv *phaseoli*, se determinó el crecimiento de 19 cepas en los medios C, D, M, CV, DV y MV. Se utilizó una concentración (2870  $\mu\text{M}$ ) de Pi similar a la del medio Levadura Manitol (LM) de uso convencional.

El medio C se utilizó previamente en la selección de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* tolerantes a condiciones de bajo fosfato en medio de cultivo y los medios D y M en la selección de cepas tolerantes a acidez (Date y Halliday, 1979; Cassman *et al.*, 1981a; Munns y Keyser, 1981). Las bacterias se cultivaron durante 72 h en platos con ALM. Para estandarizar el inóculo a aproximadamente 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> bacterias/ml, se hizo una suspensión a partir de 2 colonias de cada una de las cepas en 100 ml de agua destilada estéril y se inoculó por duplicado 25  $\mu\text{l}$  en tubos de 18 x 150 mm con 6 ml de cada medio. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante. Se midió la absorbancia a 420 nm ya que en experimentos

previos en que se comparó con 540 nm y 610 nm, resultó más sensible a los cambios en turbiedad.

Se determinó la tasa de crecimiento específico  $\mu = (Af - Ai)/(tf - ti)$  donde Af es la absorbancia final, Ai la absorbancia inicial, tf el tiempo final, y ti el tiempo inicial para cada una de las cepas evaluadas en los diferentes medios de cultivo. Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar con un arreglo factorial de 19 X 6 con 2 repeticiones donde el factor A está constituido por las 19 cepas y el factor B por los medios de cultivo. Se eligió el medio en el que se observó mayor crecimiento de las cepas.

### Evaluación del medio con niveles bajos (5 $\mu\text{M}$ ) de fosfato

Se evaluó la tolerancia de 10 cepas de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* a niveles bajos de fosfato en el medio de cultivo propuesto por Munns y Keyser (1981) y modificado con la adición de vitaminas (medio MV). Las bacterias se cultivaron en platos de ALM a 28°C durante 4 días, se hizo una suspensión a partir de 2 colonias de cada una de las cepas en 100 ml de agua destilada estéril y se inoculó, por duplicado, 100  $\mu\text{l}$  en tubos de 16 X 125 mm con 3 ml de medio alto en fosfato (2870  $\mu\text{M}$ ) y en tubos con medio bajo en fosfato (5  $\mu\text{M}$ ). Se determinó la concentración de bacterias presente en el inóculo con el uso de la técnica de recuento en gota (Somasegaran y Hoben, 1985). Los cultivos se incubaron a 28°C bajo agitación constante. A los 5 días se determinó visualmente la presencia de turbiedad.

A fin de determinar si la capacidad de crecer en bajos niveles de Pi podía evaluarse con base en la turbiedad en medio de cultivo, se realizaron curvas de crecimiento a las cepas que resultaron tolerantes en el medio con baja concentración (5  $\mu\text{M}$ ) de Pi y a la cepa no tolerante Kim 5.

Para ello se hizo una suspensión a partir de 2 colonias de cada una de las cepas y se inoculó por duplicado 100  $\mu\text{l}$  de cada suspensión en erlenmeyers con 100 ml del medio. Los cultivos se incubaron durante 6 días a 28°C bajo agitación constante. Para evitar la fase de adaptación que ocurre después de la transferencia de bacterias procedentes de ALM a un medio con arabinosa y galactosa (Cassman *et al.*, 1981a), el sexto día se hizo, a partir de cada cultivo, un subcultivo de 100  $\mu\text{l}$  a un medio bajo en fosfato. Se determinó la absorbancia a 420 nm y el pH cada 24 h. A las

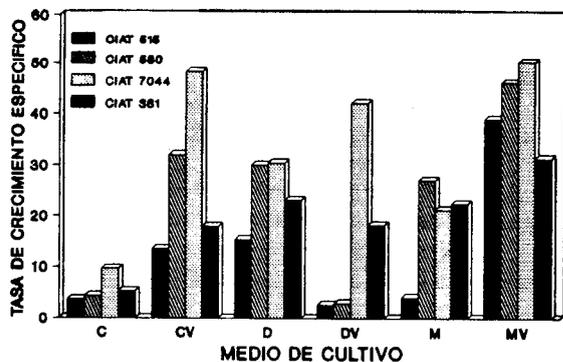


Fig. 1. Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de cuatro cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*.

cepas tolerantes se les hizo recuento en gota a los días 4 y 6, y a la cepa Kim 5 a los días 1, 3 y 6 después de inoculado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Evaluación de medios con alta concentración de fosfato

Se observó diferencia entre cepas en la capacidad de crecer en los medios de cultivo evaluados. Esto se evidencia por la interacción altamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre los factores cepa y medio de cultivo (Figura 1).

En términos generales las cepas crecieron mejor en el medio MV. En la Figura 1 se muestran 5 casos representativos de las 19 cepas. El menor crecimiento se registró en el medio C, lo que concuerda con lo observado por Morales (1987) quien señala que este medio fue restrictivo al crecimiento de *R. leguminosarum* bv *phaseoli*; este resultado pudo deberse a que el medio C fue diseñado para el estudio de cepas de *Bradyrhizobium* que poseen requerimientos nutricionales diferentes a las del género *Rhizobium*. Si bien la adición de vitaminas mejoró considerablemente el crecimiento de las cepas, el medio Munns (M) se ajustó más a las necesidades nutricionales de las mismas (Figura 1).

En este mismo estudio se observó que de las 19 cepas evaluadas, CIAT 652, CIAT 406 y CIAT 381 no presentaron turbiedad a 420 nm en el medio C; de igual manera, la cepa CIAT 381 no presentó crecimiento en forma detectable en los medios CV, D y DV, mientras que todas las cepas presentaron turbiedad en los medios M y MV.

Cuadro 3. Población inicial de bacterias utilizada en la evaluación de 6 medios de cultivo con alta concentración de fosfato (2870  $\mu\text{M}$ ).

CEPAS	NOCULO UFC/ml X 10 <sup>3</sup>
CIAT 632	3,7
CIAT 608	0,8
CIAT 385	5,8
CIAT 407	17,0
CIAT 652	4,0
CIAT 609	19,0
CIAT 7044	8,3
CIAT 580	4,6
CR 477	17,0
CIAT 579	87,0
CIAT 390	3,2
CIAT 406	7,1
CIAT 405	8,4
CIAT 899	39,0
CIAT 166	67,0
CIAT 611	3,4
CIAT 381	1,6
CIAT 460	3,3
CIAT 515	3,5

UFC = unidades formadoras de colonias

La variación en turbiedad se atribuye principalmente a diferencias en el crecimiento de las cepas y en menor medida al tamaño inicial del inóculo (Cuadro 3) y producción de polisacáridos.

### Evaluación del medio con bajos niveles de fosfato

Todas las cepas evaluadas crecieron en el medio alto en  $\text{P}_i$ , usado como control. Se observó diferencia en el nivel de tolerancia de las 10 cepas de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* estudiadas (Cuadro 4). Se obtuvo 5 cepas tolerantes y 5 no tolerantes. La cepa CIAT 166 que resultó tolerante en este experimento, también fue catalogada previamente como tolerante en los ensayos realizados por Morales (1987). En el Cuadro 5 se observa que las cepas CIAT 949 y CIAT 652 capaces de crecer en medio alto en  $\text{P}_i$  no presentaron turbiedad cuando se utilizó un inóculo menor. Para evitar el efecto de tamaño del inóculo se recomienda el uso de las poblaciones utilizadas en este experimento ( $10^3$ - $10^4$  bacterias/ml).

Al realizar las curvas de crecimiento se observó un comportamiento similar en los valores de absorbancia y pH de las cepas tolerantes CIAT

Cuadro 4. Crecimiento de 10 cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* en el medio propuesto por Munns y Keyser y modificado con la adición de vitaminas, en niveles bajos (5  $\mu\text{M}$ ) y altos (2870  $\mu\text{M}$ ) de fosfatos.

Cepas	Inóculo UFC/ml X $10^3$	5 $\mu\text{M}$ $\text{PO}_4$	2870 $\mu\text{M}$ $\text{PO}_4$
CIAT 899	32,0	+	+
CIAT 166	11,0	+	+
CR 477	55,0	+	+
CIAT 876	24,0	+	+
CR 436	16,0	+	+
57ccm	11,0	-	+
KIM 5	8,0	-	+
KIM55	7,0	-	+
CIAT 949	3,2	-	+
CIAT 652	0,8	-	+

+ = presencia de turbiedad

- = ausencia de turbiedad

UFC = unidades formadoras de colonias

Cuadro 5. Efecto del tamaño del inóculo sobre el crecimiento de 2 cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* en el medio de cultivo propuesto por Munns y Keyser (1981) y modificado con la adición de vitaminas, en niveles de alto (2870  $\mu\text{M}$ ) fosfato.

Cepas	Inóculo UFC/ml X $10^2$	2870 $\mu\text{M}$ $\text{PO}_4$
CIAT 949	32,0	+
CIAT 949	0,1	-
CIAT 652	8,0	+
CIAT 652	0,4	-

+ = presencia de turbiedad

- = ausencia de turbiedad

UFC = unidades formadoras de colonias

Cuadro 6. Efecto del crecimiento de 5 cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* sobre la turbiedad y el pH del medio de cultivo MV a una concentración baja (5  $\mu\text{M}$ ) de fosfato.

CEPA	Cuarto día*				Sexto día*		
	UFC/ml X $10^6$	A	pH	UFC/ml X $10^6$	A	pH	
CIAT 166	22,0	0,360	7,2	30,0	0,426	7,5	
CR 436	16,0	0,401	7,2	65,0	0,525	7,3	
CR 477	44,0	0,368	7,2	36,0	0,504	7,6	
CIAT 899	31,0	0,380	7,3	7,3	0,494	7,7	
CIAT 876	0,4	0,127	6,0	7,8	0,398	6,6	

\* después de inoculado

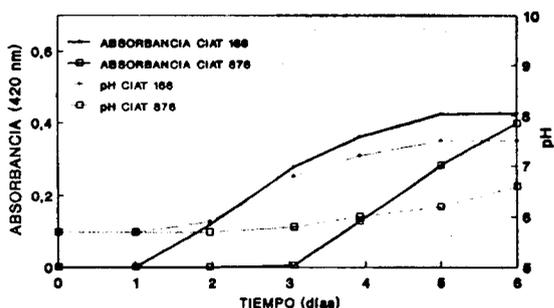
UFC = unidades formadoras de colonias

A = absorbancia a 420 nm

MV = medio propuesto por Munns y Keyser (1981), modificado con la adición de vitaminas.

Como se observa en el Cuadro 6, la densidad de población de las cepas CIAT 899, CR 436 y CR 477 fue de aproximadamente  $10^7$  bacterias/ml al cuarto día de inoculado el ensayo, mientras que la cepa CIAT 876 presentó una concentración de  $10^5$  bacterias/ml. A partir de este punto, se observó una disminución en el crecimiento de las cepas CIAT 166 y CR 436 y en la densidad de población de las cepas CR 477 y CIAT 899, debido probablemente al agotamiento de nutrientes, alcalinidad y acúmulo de sustancias tóxicas. En el caso de la cepa CIAT 876 la población aumentó a  $7,8 \times 10^6$  bacterias/ml (Cuadro 6). Los datos de densidad de población obtenidos en este experimento están de acuerdo con lo indicado por Keyser y Munns (1979) quienes señalaron que los niveles bajos de Pi en medio de cultivo limitan la población máxima a  $10^7$  bacterias/ml.

#### a. cultivo



#### b. subcultivo

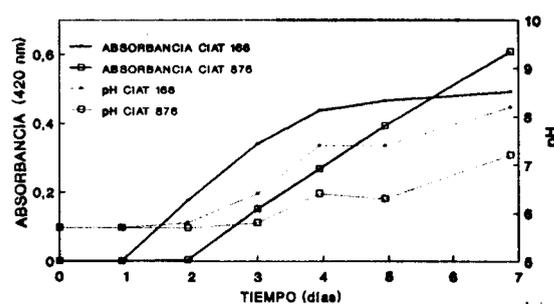


Fig. 2. Efecto del crecimiento de dos cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* sobre la turbiedad y el pH del medio con bajos niveles (5  $\mu\text{M}$ ) de fosfato.

166, CIAT 899, CR 436 y CR 477 (Cuadro 6), por lo que únicamente se graficaron los datos de la cepa CIAT 166 y la cepa CIAT 876 (Figura 2).

Cuadro 7. Crecimiento de la cepa tolerante CIAT 166 y de la cepa tolerante Kim 5 en medio de cultivo de MV a una concentración de bajo ( $5\mu\text{M}$ ) fosfato.

CEPA	Primer día* UFC/ml $\times 10^4$	Tercer día* UFC/ml $\times 10^4$	Sexto día* UFC/ml $\times 10^4$
CIAT 166	9,80	120,00	3000,00
KIM 5	0,08	0,76	170,00

\* después de inoculado

UFC = unidades formadoras de colonias

MV = medio propuesto por Munns y Keyser (1981), modificado con la adición de vitaminas

Al parecer el aumento en absorbancia estuvo relacionado al crecimiento celular hasta que las bacterias entraron en la fase estacionaria, con una población de aproximadamente  $10^7$  bacterias/ml, en ese momento la técnica de absorbancia perdió sensibilidad por no discernir entre bacterias vivas y muertas.

El pH de los medios se alcalinizó con el crecimiento bacteriano (Figura 2, Cuadro 6). Estos resultados concuerdan con lo observado en trabajos anteriores, donde el aumento en el pH del medio coincidió con la aparición de turbiedad. Los autores señalan que los cambios en pH en alta densidad celular se deben al aumento de la cantidad total de álcali producto del metabolismo celular, a la utilización del glutamato de sodio como fuente de N y posiblemente como fuente de C y energía, lo que reduce la capacidad buffer del medio (Keyser y Munns, 1979; Beck y Munns, 1985; Howieson, 1985; Wood y Cooper, 1988). En estudios previos se observó que el pH del medio estuvo relacionado con la cantidad de crecimiento de las cepas.

Las cepas CIAT 166, CIAT 899, CR 436 y CR 477 presentaron turbiedad un día después de inoculado el medio con baja concentración de Pi (Figura 2a), este tiempo de adaptación al medio de cultivo se mantuvo después de la transferencia a un medio de cultivo nuevo (Figura 2b).

Como se observa en la Figura 2a, la cepa CIAT 876 presentó crecimiento detectable por turbidimetría 2 días después que las otras cepas; este resultado concuerda con lo observado por Keyser y Munns (1979) quienes señalaron que los niveles bajos de Pi aumentaron la fase de adaptación de las bacterias al medio de cultivo. Al parecer, las cepas CIAT 166, CR 436, CR 477 y CIAT 899 sintetizan las enzimas necesarias para el creci-

miento en bajos niveles de Pi antes que la cepa CIAT 876.

Al reinocular, se observó una disminución en el tiempo de aparición de turbiedad de la cepa CIAT 876, debido probablemente a la presencia de las enzimas necesarias para crecer en dicho medio. Tanto en el cultivo inicial (Figura 2a, Cuadro 6) como después del subcultivo (Figura 2b), la fase de crecimiento logarítmico de esta cepa fue similar al de las otras bacterias. Así la duración de la fase de adaptación estuvo, como indican Cassman *et al.* (1981a), pobremente relacionada con la capacidad de crecer sin Pi externo. Sin embargo, las cepas que presenten una fase de adaptación menor a los niveles bajos de Pi probablemente tengan ventaja en la colonización de la rizosfera; por lo tanto deben realizarse estudios para determinar la significancia de esta característica.

Cuando se comparó el crecimiento de la cepa Kim 5 que resultó no tolerante a bajos niveles de Pi, con la cepa tolerante CIAT 166, se observó crecimiento visible 6 días después de inoculada. El crecimiento de esta cepa fue menor que el observado para la cepa CIAT 166 (Cuadro 7) debido probablemente a una fase de adaptación más larga. Esta cepa fue catalogada como no tolerante al utilizar el criterio de aparición de turbiedad a los 5 días de inoculado. Si bien presentó crecimiento como lo demuestran los datos de población, podría ser desplazada por la cepa CIAT 166 si se inocula en cultivo mixto. Es importante determinar si este comportamiento tiene alguna implicación ecológica.

En síntesis, los resultados obtenidos indican que para fines de tamizaje, el medio propuesto por Munns y Keyser (1981) y modificado con la adición de vitaminas, es el más adecuado porque permite el crecimiento de un número mayor de cepas de *R. leguminosarum* bv *phaseoli*. En este ensayo existió relación entre la aparición de turbiedad y la población de bacterias por lo que se puede utilizar el método de turbidimetría para la detección de crecimiento bacteriano.

Debido a que los cambios importantes en el pH del medio ocurrieron después de que el crecimiento fue detectable por turbiedad y que no hubo variación entre cepas en la producción de alcalinidad, se puede usar este medio en la selección de cepas tolerantes a condiciones de bajo Pi.

Faltaría determinar si la tolerancia obtenida *in vitro* corresponde con la capacidad de las cepas

de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* de crecer en ambientes con niveles bajos de Pi en el campo.

### RESUMEN

Con el fin de seleccionar un medio en el que creciera la mayor cantidad de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, se determinó el crecimiento de 19 cepas en el medio definido propuesto por Cassman *et al.* (1981a), el medio Date y Halliday (1979), el medio de Munns y Keyser (1981) y los mismos medios modificados con la adición de vitaminas (4 mg/L de Tiamina, 4 mg/L de ácido pantoténico y 1 µg/L de Biotina) (CIAT, 1988) a una concentración alta de fosfato (2870 µM).

Se observó variación entre cepas en la capacidad de crecer en los distintos medios. El crecimiento bacteriano fue mayor en el medio de Munns y Keyser con vitaminas por lo que éste se eligió como medio para la selección de cepas tolerantes a niveles bajos de fosfato (5 µM). Se determinó la tolerancia de 10 cepas de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* y se encontraron 5 cepas tolerantes y 5 no tolerantes. El pH inicial de los medios aumentó con el crecimiento bacteriano y esta alcalinización coincidió con la aparición de turbiedad. Los resultados obtenidos indican que para los fines de tamizaje de cepas tolerantes a bajos niveles de fosfato en medio de cultivo, el medio de Munns y Keyser (1981) modificado con la adición de vitaminas fue el más adecuado y que se puede emplear la turbiedad como criterio de selección.

### AGRADECIMIENTOS

La autora agradece a la Dra. Judy Kipe-Nolt, al Dr. Carlos Ramírez y a Vivian Sánchez la colaboración prestada en el desarrollo de esta investigación

### LITERATURA CITADA

- BECK, D.P.; MUNNS, D.N. 1984. Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp. Appl. Environ. Microbiol. 47:278-282.
- CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N.; BECK, D.P. 1981a. Phosphorus nutrition of *Rhizobium japonicum*: strain differences in phosphate storage and utilization. Soil Sci. Am. J. 45:517-520.
- CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N.; BECK, D.P. 1981b. Growth of *Rhizobium* strains at low concentrations of phosphate. Soil Sci. Am. J. 45:520-523.
- CIAT. 1988. Simbiosis *leguminosa-Rhizobium*. Manual de Métodos. Cali, Colombia. CIAT. 178p.
- DATE, R.A.; HALLIDAY, J. 1979. Selecting *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics. Nature 277:62-64.
- HOWIESON, J.G. 1985. Use of an organic buffer for the selection of acid tolerant *Rhizobium meliloti* strains. Plant and Soil 88: 367-376.
- KEYSER, H. H.; MUNNS, D.N. 1979. Tolerance of Rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. Soil Sci. Soc. Am J. 43:519-523.
- MORALES, M. 1987. Selección y evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* tolerantes al suministro restringido de fósforo. Tesis MSc. Catie. Turrialba, C.R. 97p.
- MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. 1981. Response of *Rhizobium* strain to acid and aluminium stress. Soil Biol. Biochem. 13:115-118.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J.H. 1985. Methods in *leguminosa-Rhizobium* technology. Niftal proyect and Mircen, Paia, Hawaii 367p.
- VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- WOOD, M.; COOPER, J.E. 1988. Acidity, aluminium and multiplication of *Rhizobium trifolii*: effects of initial inoculum density and growth phase. Soil Biol. Biochem. 20:83-87.