

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO, PRIMER ACERCAMIENTO

Domínguez Pérez Valeria Monserrat (1), Gómez Luna Blanca Estela (2)

1 [Escuela de Nivel Medio Superior de Celaya, Colegio de Nivel Medio Superior de la Universidad de Guanajuato] [vale.29.dominguez@gmail.com]

2 2 [Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato] [bgomezl2000@yahoo.com.mx][[be.gomez@ugto.mx]

Resumen

Como alternativa al uso de agroquímicos se ha propuesto el uso de bacterias rizosféricas (PGPR, por sus siglas en inglés) que tienen reconocida acción sobre el crecimiento y desarrollo vegetal. Estas bacterias son capaces de estimular el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas con las raíces de las plantas. Durante la investigación se realizó el aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento en suelo adherido a dos árboles mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) los cuales son árboles nativos de la región. Se obtuvieron 100 cepas con actividad de ACC (1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano) desaminasa que se confirmaron con capacidad promotora de crecimiento de plantas. Se seleccionaron 50 aislados para caracterización, germinación de semillas de rábano y lenteja, producción de sideróforos y confrontación de hongos fitopatógenos. Se encontraron cepas con efecto positivo en plantas mejorando el porcentaje de germinación y para contrarrestar hongos fitopatógenos.

Abstract

As an alternative to the use of agrochemicals, it has proposed the use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) that have recognized action on plant growth and development. These bacteria are able to stimulate the development of plants directly and indirectly and have a number of complex mechanisms interact to establish beneficial relationships with the roots of the target plants. During the investigation isolation of growth promoting bacteria in soil adhering two mesquite trees (*Prosopis laevigata*) and oak (*Quercus rugosa*) which are native trees of the region it was performed. 100 strains with ACC activity (1-carboxylic acid, 1- aminocyclopropane) deaminase which were confirmed by promoting plant growth capacity were obtained. 50 were selected for characterization isolated, germination of radish seeds and lentils, siderophore production and confrontation of phytopathogenic fungi. Strains with positive effect on plants were found to improve the germination percentage and to counter phytopathogenic fungi.

Palabras Clave

Rizobacteria; Suelo; Áreas Naturales Protegidas.

INTRODUCCIÓN

Las necesidades de la población mundial han llevado a la explotación de recursos naturales y a la utilización de materiales de alta eficiencia en la agricultura, para proveer variedades vegetales resistentes a plagas y enfermedades con ciclos de producción más cortos, agroquímicos que surten las necesidades nutricionales y provean protección frente factores bióticos adversos. Como alternativa al uso de agroquímicos se ha propuesto el uso de bacterias rizosféricas (PGPR, por sus siglas en inglés) que tienen reconocida acción sobre el crecimiento y desarrollo vegetal. Estas bacterias son capaces de estimular el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas, especialmente con las raíces de las plantas objetivo. [1]

Características

Uno de los requerimientos más importantes para que una bacteria sea considerada como PGPR es el tiempo de permanencia en la rizosfera después de la inoculación. Una población introducida que declina rápidamente en el tiempo, tendrá una baja habilidad de competencia con la flora nativa.

Otra característica, no menos importante, es la posibilidad de colonizar la superficie de las raíces para ejercer un efecto fisiológico directo sobre el crecimiento de las plantas. Por último, que esas PGPR utilizadas no provoquen daño ni al suelo, ni a las plantas, ni a los animales y al hombre. [2]

Mecanismos de acción

Se conoce que la estimulación se desarrolla a través de dos mecanismos fundamentales, uno directo y otro indirecto.

Estimulación directa: El metabolito producido por la bacteria es capaz de estimular el crecimiento del vegetal. A través de este mecanismo se desarrollan procesos tales como:

- Fijación de nitrógeno

- Producción de sustancias reguladoras del crecimiento.

Estimulación indirecta: La estimulación es indirecta cuando la bacteria es capaz de liberar una o varias sustancias o metabolitos que intervienen en procesos que mejoran el crecimiento vegetal. Los mecanismos fundamentales de estimulación indirecta se pueden resumir en los siguientes:

- Producción de sustancias que movilizan nutrientes
- Producción de antibióticos.
- Producción de Sideróforos
- Producción de sustancias que inducen la resistencia sistémica en algunas plantas
- Síntesis de sustancias con actividad para el control de patógenos [2]

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías del Campus Celaya Salvatierra de la Universidad de Guanajuato

Muestreo de suelo

Se seleccionaron dos árboles mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) para la toma de muestra de suelo de la rizósfera, ubicados en la comunidad de Las Cruces con coordenadas geográficas, 20° 55' 5" latitud norte, 100 58' 38" longitud oeste, con una altura promedio sobre el nivel del mar de 2160 metros, en Salvatierra, Guanajuato. En cada uno de los árboles se tomaron 2 muestras de suelo, el muestreo se realizó el 20 de junio del 2015.

Aislamiento y purificación de bacterias promotoras de crecimiento de plantas.

Las muestras de suelo se utilizaron para aislar rizobacterias en medio selectivo para actividad de la enzima ACC (1- ácido carboxílico, -1-aminociclopropano) desaminasa. El medio de cultivo contiene por litro 4 g KH_2PO_4 , 6 g NaHPO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 1 mg FeSO_4 , 10 μg H, 10 μg MnSO_4 , 50 μg CuSO_4 , 10 μg MoO_3 , 70 μg ZnSO_4 , glucosa

0.2%, ac. glucónico 0.2%, 0.2%, agar bacteriológico al 2% y ACC 3mM (SIGMA), según las indicaciones de Penrose y Glick, 2003. A los aislados obtenidos se les realizó la tinción de Gram y se prosiguió con su caracterización. Se incubaron a 28° C por una semana. Las bacterias que presentaron actividad de ACC desaminasa se procedió a purificarlas en medio PDA (Papa Dextrosa Agar), por la técnica de estría cruzada y se caracterizaron por tinción de Gram. [3]

Prueba de germinación

Se seleccionaron 50 aislados y se inocularon en 10 ml de extracto de papa, se agregaron 25 semillas de lenteja (*Lens culinaris*) y rábano (*Rabhanus sativus*) y al cultivo y se agitaron por 30 min, como control agua. Las semillas se colocaron en cajas Petri con papel humedecido estéril, se incubaron a 28° C por 72 h. Se calculó el porcentaje de germinación y se comparó la elongación de la radícula de las semillas germinadas.



IMAGEN 1: Se aprecia el efecto positivo de las rizobacterias en la aparición de pelos radiculares

Prueba de control biológico.

Se utilizaron los seleccionados de la prueba de germinación para la prueba de antibiosis contra hongos fitopatógenos, los cuales fueron: *Fusarium oxisporum*, *Alternaria sp.* y *Bipolaris sp.* Las pruebas de antibiosis se realizaron en medio PDA a 28°C por 24 h y se tomaron datos cada 22 h durante 3 días.

Prueba de producción de Sideróforos

Se inocularon las 50 cepas seleccionadas en un medio CAS- aminoácidos agar, según las indicaciones de Alexander y Zuberer 1991. [4]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad de ACC desaminasa

Gracias a un medio selectivo, se aisló un total de 100 cepas con actividad de ACC desaminasa; de las cuales se seleccionaron 50 para las pruebas posteriores, teniendo como principal criterio el tiempo que tardaban en desarrollarse y la cantidad de bacteria en la colonia.

Prueba de germinación en semillas de Lenteja

En la prueba control se observó que germinó un 64% (16 de las 25 semillas); por otra parte, 32 de las 50 muestras inoculadas resultaron con un mayor porcentaje de germinación (entre 75 y 92%). Las cepas más destacadas en ésta prueba son: A1-103, A1-112 y C1-256.

También se observó que la mayoría de las cepas generaban una mayor longitud de radícula en menor tiempo.

IMAGEN 2: Contraste entre la longitud de radícula de semillas inoculadas y el control.



Otra característica de las muestras fue que en aquellas que fueron inoculadas, las semillas presentaban mayor número de pelos radiculares, como se observa en la imagen 1 y 2.

Prueba de germinación en semillas de rábano

La mayoría de las muestras inoculadas resultaron satisfactorias, con un porcentaje de germinación de entre el 85 y 100% de germinación.

Otra característica de las muestras fue que en aquellas que fueron inoculadas, las semillas presentaban mayor número de pelos radiculares, como se observa en la imagen 1.

Las cepas más destacadas fueron: A1-123, B2-205, C1-255, D1-317, D1-318 Y D1-322.

Prueba de control biológico

El 46% de las cepas seleccionadas pudieron contrarrestar al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

El 28% de las cepas seleccionadas pudieron contrarrestar al hongo fitopatógeno *Alternaria sp.*

El 24% de las cepas seleccionadas pudieron contrarrestar al hongo fitopatógeno *Bipolaris sp.*

Las cepas que pudieron contrarrestar a los tres hongos fueron: B2-203, C1-258, D1-302 y D1-303. El efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos

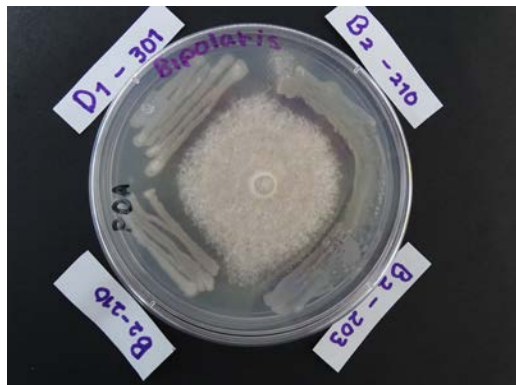


IMAGEN 3: Acción de las bacterias B2-203, B2-210, B2-216 Y D1-301 contra el hongo fitopatógeno *Bipolaris sp.*

fitopatógenos por las bacterias promotoras de crecimiento de plantas se observa en la imagen 3.

Prueba de producción de Sideróforos

El 68% de las cepas seleccionadas demostraron tener la capacidad de producción de Sideróforos.

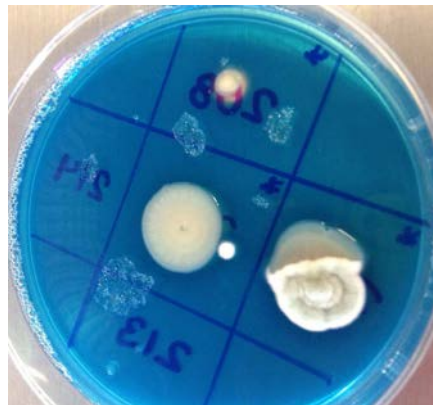


IMAGEN 4. Desarrollo de las colonias en medio CAS-aminocácidos para sideróforos, se aprecia formación de halo de color anaranjado como resultado positivo.

CONCLUSIONES

Las bacterias promotoras de crecimiento se encuentran en la rizosfera, son aquellas que poseen una relación simbiótica con una planta.

Recientemente se han realizado estudios para comprobar el efecto positivo de las PGPR en Guayaba y otras hortalizas. [5]

Para que la planta pueda beneficiarse de los nutrientes disponibles añadidos proporcionados por las rizobacterias, tiene que proporcionar un lugar y las condiciones adecuadas para que éstas vivan. A cambio, las PGPR aumentan la disponibilidad de nutrientes a través de la solubilización de las formas no disponibles de nutrientes y la producción de sideróforos que ayuda en la facilitación del transporte de nutrientes.

Es por esto que las rizobacterias son efectivas como biofertilizantes, biofungicidas y bioactivadores, y así colaborar en el desarrollo de plantas de importancia agrícola y ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por la oportunidad de hacer este verano, a mis compañeros de trabajo y a mi asesora por el apoyo en la realización de la investigación.

REFERENCIAS

- [1] Mauricio Camelo R., S. P. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 159-166. Recuperado en <http://www.bashanfoundation.org/homembers/bonillamechanis.pdf>
- [2] Díaz, T. B. (2008). Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. *Agricultura Orgánica*, 35-38. Recuperado en http://www.actaf.co.cu/revistas/revista_ao_95-2010/Rev%202008-3/21-Rizobacterias.pdf
- [3] Penrose, DM y Glick, BR., (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol plant*. 118(1):10-15.
- [4] Alexander DB., Zuberer DA., (1991). Use of Chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Earth and Environmental Science*. 12(1):39-45.
- [5] Villagómez, A. H. (2015). Análisis de compuestos involucrados en la promoción de crecimiento de plantas por rizobacterias en Guayaba. Celaya, Gto.