

CARACTERIZACIÓN MICROBIANA Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS DE SUELO DEL ÁREA NATURAL PROTEGIDA CERRO DEL CULIACÁN, GUANAJUATO

Torres Páramo Diana Karina (1), Gómez Luna Blanca Estela (2), Ramírez Granados Juan Carlos (2)

1 [Ingeniería en biotecnología, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [torresparamo.diana@gmail.com]

2 [Departamento Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [bgomezl200@yahoo.com.mx] [be.gomez@ugto.mx] [juan_carlos_rmz_gnd@yahoo.com]

Resumen

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal poseen mecanismos de acción directos e indirectos. Los primeros se relacionan con la producción de fitohormonas y la biodisponibilidad de nutrientes del suelo. Por otro lado, los indirectos consisten en brindar una resistencia o inhibir el crecimiento de organismos fitopatógenos. En el presente estudio se aislaron bacterias del suelo de la Zona natural protegida del Cerro del Culiacán, las cuales fueron caracterizadas por tinción de Gram, actividad antagonista contra hongos fitopatógenos, producción de sideróforos y de enzimas líticas, con el fin de seleccionar las cepas con un mayor potencial biotecnológico. Se encontraron 3 cepas (113, 225 y 258) que presentan resultados positivos en todas las pruebas realizadas y, por lo tanto, podrían ser utilizadas como biofertilizantes en cultivos de interés agrícola y en actividades de reforestación.

Abstract

Plant growth promoting bacteria have direct and indirect action mechanisms. Direct mechanisms are involved in the production of phytohormones and the bioavailability of nutrients from the soil. In the other hand, indirect mechanisms consist in giving resistance to the plant or inhibiting the growth of phytopathogen organisms. In this study, bacteria from the soil from Protected Natural Area hills of Culiacán have been isolated and characterized through Gram staining technique, antagonistic activity against phytopathogen fungi, siderophore production and lytic enzymes production, with the final purpose of selecting strains with the biggest biotechnological potential. Three strains were found (113, 225 and 258) which present positive results in all the tests, thus, they could be used as biofertilizers in crops of agricultural interest and in reforestation activities.

Palabras Clave

Rizobacterias; PGPR; Sideróforos; Control biológico

INTRODUCCIÓN

Una parte sustancial de la diversidad de seres vivos en el planeta corresponde a los microorganismos, debido a su tamaño y a su capacidad de adaptación a distintos ambientes. Éstos juegan un rol esencial en el equilibrio de los ecosistemas, siendo parte de los ciclos biogeoquímicos. Además, son ampliamente utilizados en las industrias alimenticia, farmacéutica y de combustibles.

En los últimos años se ha tomado interés en las bacterias que habitan el suelo y su posible uso como promotores de crecimiento vegetal, un estudio que se encamina hacia el desarrollo de productos con aplicación agrícola. El desarrollo de estos productos, como biofertilizantes, y su efecto sobre distintos tipos de cultivos de interés agrícola, pretende disminuir el uso de fertilizantes químicos, una de las principales fuentes de contaminación del suelo y del agua, lo que contribuiría con la disminución del impacto ambiental, mejoramiento de la calidad nutricional de los productos y enriquecimiento del suelo con las diferentes interacciones entre microorganismos benéficos, la rizósfera y la planta [1].

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Mecanismos de acción

Los mecanismos por los que ayudan en el crecimiento vegetal pueden ser directos o indirectos. El método directo se relaciona con la producción de fitohormonas por parte de la planta, además del efecto que pueden tener sobre la biodisponibilidad de los nutrientes del suelo, por ejemplo, con la fijación de nitrógeno atmosférico. Por otro lado, el método indirecto se relaciona con la inducción de la resistencia a fitopatógenos (bacterias, hongos y nemátodos), el control biológico de enfermedades y la producción de antibióticos [2].

Loredo et al. (2004) cita a diversos autores para señalar los mecanismos por los que las bacterias promueven el crecimiento vegetal, como la aportación de nitrógeno utilizable para las plantas por la capacidad de las bacterias de fijar N_2 , la producción de fitohormonas, la solubilización de minerales y nutrimentos, incremento en el volumen de la raíz, producción de compuestos sideróforos que incrementan la disponibilidad del Fe en la rizósfera, y la inducción de resistencia a patógenos [3].

Biofertilizantes

El aprovechamiento de estos microorganismos como biofertilizantes es un campo de gran importancia en las investigaciones actuales. Un biofertilizante es un producto que contiene microorganismos que tienen un efecto positivo sobre las plantas, con lo que se busca un aumento de rendimiento en los cultivos. Por esta razón, el encontrar cepas de bacterias que puedan ejercer mayores beneficios en plantas específicas es de gran relevancia para el desarrollo de biofertilizantes y su adaptación al suelo en el que se aplican.

La presente investigación tiene por motivo el aislamiento de bacterias con potencial biotecnológico a partir de muestras de suelo de áreas naturales protegidas del estado de Guanajuato, así como su caracterización (tinción Gram, inducción de resistencia a hongos patógenos, producción de sideróforos, enzimas quitinolíticas y celulolíticas), con el fin de comenzar un cepario que presente las mejores características para su posterior uso como biofertilizantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de Guanajuato, campus Celaya-Salvatierra, sede Mutualismo.

Muestreo de suelo

Se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 15 cm en puntos cercanos a árboles de encino en la Zona Natural Protegida del Cerro del Culiacán en el mes de junio de 2018. Las muestras se dejaron secar y se tamizaron con una malla número 40.

Aislamiento de bacterias

Se tomaron 10 g de suelo y se diluyeron con 90 mL de agua estéril. Posteriormente se realizaron dos diluciones en serie para bajar la carga microbiana. Para el aislamiento de las rizobacterias, se inocularon 50 μ L de la dilución más baja en el medio selectivo para actividad de ACC (1-ácido carboxílico, -1-aminociclopropano) desaminasa, utilizando un sembrador en placa semiautomático Automatic Spiral® Sample Plater. El medio de cultivo utilizado fue preparado según Penrose & Glick [4]. Las placas se incubaron a 28°C por 48 horas.

Caracterización microbiana

Se seleccionaron 25 cepas que mostraron actividad ACC desaminasa. Se les realizó tinción de Gram para una identificación preliminar. Posteriormente, se les realizaron las siguientes pruebas para determinar su potencial biotecnológico.

Producción de sideróforos

Para la detección de los sideróforos producidos por los aislados bacterianos se utilizó el medio agar CAS (Cromo azulol S) según Alexander y Zuberer [5]. Las cepas se sembraron por picadura en el medio CAS y se incubaron a 28° C por 48 horas. La prueba es positiva si se observa un halo de color naranja alrededor de la colonia, lo que indica la liberación de hierro a partir del complejo colorido Fe-CAS por los aislados.

Producción de enzimas líticas

Con el uso de esta prueba se pudieron identificar las cepas con producción de enzimas líticas (quitinasas y celulasas). Se preparó el Medio Minino Agar Czapek con 2 gramos de la fuente de carbono (quitina o celulosa microcristalina) para un litro de agua destilada, se ajustó el pH a 7.0, se calentó a disolución completa, se esterilizó durante 15 minutos a 121° C y 15lb de presión, y se vació en placas tamaño estándar. Se inocularon las cepas por el método por picadura y se incubaron a temperatura ambiente por 5 días.

Pruebas de antibiosis

Con las 25 cepas seleccionadas se realizaron confrontaciones con 8 hongos fitopatógenos (*Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium* spp., *Phytophthora* spp. y *Rhizoctonia* spp.) para evaluar la capacidad de control biológico de los aislados.

Las confrontaciones se llevaron a cabo en placas Petri de tamaño estándar con medio PDA. Al centro se sembró una rodaja con el inóculo del hongo, se incubaron a temperatura ambiente hasta que se obtuvo un diámetro de 3 cm. Una vez alcanzado el tamaño deseado, se inocularon por estriado 4 cepas por placa y se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas, monitoreando el avance del hongo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la caracterización inicial por tinción de Gram se obtuvieron resultados variados, dada la diversidad de microorganismos aislados. De las 25 cepas seleccionadas, 14 son Gram positivos (Imagen 1) y varían de forma entre bacilos, cocos y bacilococos.

La producción de sideróforos es positiva cuando se observa un halo de color naranja alrededor de la colonia. Esto indica que la bacteria liberó compuestos sideróforos al medio, los cuales son ligandos fuertes y como tal, secuestran al hierro, formando un complejo Fe^{3+} -sideróforo. Esto conduce a la liberación del cromóforo libre, lo que genera un cambio de color [5]. Al secuestrar el hierro presente en la rizósfera y bajar su concentración, se inhibe el crecimiento de organismos fitopatógenos. Se obtuvieron 19 cepas con resultados positivos en la producción de sideróforos, como se observa en la imagen 2.

En el caso de la producción de enzimas líticas, la prueba es positiva cuando se observa un halo de degradación alrededor de la colonia. La síntesis de este tipo de enzimas y su liberación al medio es una forma de defensa contra organismos fitopatógenos, al ser capaces de degradar compuestos presentes en la pared celular de algunos hongos patógenos de plantas, y con ello promover el crecimiento a través de la disminución de enfermedades. Se obtuvieron 20 cepas con actividad celulolítica (imagen 3) y 18 cepas con actividad quitinolítica, de las cuales 17 cepas producen ambas enzimas.

Los resultados de las confrontaciones indican que 21 cepas tienen actividad antagónica contra al menos un hongo fitopatógeno, como se observa en el ejemplo de la imagen 4. La mayoría de las cepas pudo contrarrestar el crecimiento de las variedades *Helminthosporium* spp., *Alternaria* spp. y *Colletotrichum* spp. Siete de las cepas tuvieron actividad de inhibición completa en al menos 4 de los hongos probados. La cepa 258 tuvo actividad de inhibición total en 6 hongos e inhibición parcial en los dos restantes, por lo que dicha cepa presenta los mejores resultados de los aislados probados.

Considerando una inhibición completa en al menos 4 hongos, las cepas 113, 225 y 258 presentan las cuatro características mencionadas y, por lo tanto, deben ser seleccionadas para futuros estudios para testear su potencial como bacterias promotoras del crecimiento y su posible uso como biofertilizante.

CONCLUSIONES

Las bacterias con actividad ACC desaminasa aisladas de suelo de una Zona Natural Protegida tienen un gran potencial para ser utilizadas en la industria agrícola por sus mecanismos de acción contra organismos fitopatógenos, con lo que se disminuiría el uso de plaguicidas químicos. Además, se ha demostrado que tienen un efecto promotor del crecimiento, por lo que también se disminuiría el uso de fertilizantes químicos y con ello, se frenaría la contaminación que genera la industria agrícola. Por otro lado, pueden ser utilizadas para facilitar el proceso de reforestación de las áreas naturales protegidas, sin alterar el ecosistema del suelo por ser cepas aisladas de dichos lugares.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por permitirme participar en esta edición del programa Veranos UG y por la beca otorgada. Además, agradezco a la doctora Blanca Estela Gómez Luna por la oportunidad de formar parte de este proyecto y los conocimientos, apoyo y guía que me brindó.

REFERENCIAS

- [1] Cubillos, J., Castellanos, D., y Argüello, H. (2009). Selección de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (Ácido Indol Acético) a partir de Muestras de Suelo Rizosférico, como Primera Etapa en el Desarrollo de un Biofertilizante. *Revista Brasileira De Agroecología*, [en línea] 4(2).
- [2] Camelo R., M., Vera M., S. y Bonilla B., R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, [en línea] 12(2), pp.159-166.
- [3] Loredo-Osti, C., López-Reyes, L. y Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, [en línea] 22(2), pp. 225-239.
- [4] Glick BR.; Penrose DM. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum* 118 (1), pp. 10-15.
- [5] Alexander DB.; Zuberer DA. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Earth and environmental science*. 12(1), pp. 39-45.

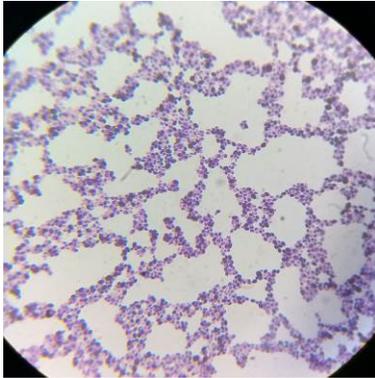


IMAGEN 1: Tinción de Gram. La cepa 304 corresponde a cocos Gram positivos.

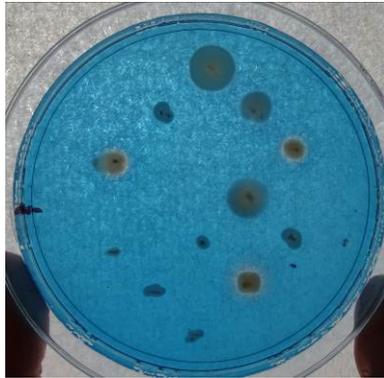


IMAGEN 2: Producción de sideróforos. El halo naranja indica un resultado positivo.



IMAGEN 3: Halo de degradación en el medio que contiene celulosa.

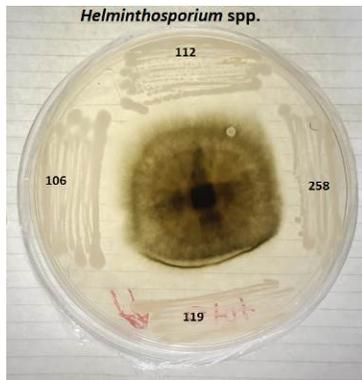


IMAGEN 4: Confrontación de 4 cepas de bacterias con el hongo *Helminthosporium spp.*