

Variabilidad metabólica de rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas de huertos de Guayaba

GOMEZ-LUNA, Blanca Estela*†, RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, VELOZ-GARCÍA, Rafael Alejandro y RUIZ-AGUILAR, Graciela Ma. de la Luz

Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Celaya, C.P. 38060, Campus Irapuato-Salamca, Irapuato, Gto.

Recibido 2 de Enero, 2015; Aceptado 26 de Marzo, 2015

Resumen

México produce alrededor del 25% del total de guayaba (*Psidium guajava* L.) a nivel mundial. La importancia radica desde el punto de vista artesanal hasta el industrial; sin embargo, esto no exenta a la guayaba de ser un fruto perjudicado por el uso intensivo de productos químicos durante su producción. Las bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) representan una alternativa biotecnológica sustentable para atenuar dicho problema. En el presente trabajo se caracterizaron fisiológicamente desde un enfoque cualitativo y con pruebas in vitro bacterias aisladas a partir de suelos de huertos de guayaba ubicados en Salvatierra, Gto. Se realizaron pruebas relacionadas con el perfil metabólico por medio del sistema BIOLOG, así como pruebas de resistencia a antibióticos, solubilización de fosfatos y germinación en semillas de guayaba. Los resultados mostraron que los aislados presentaron potenciales vías de acción de las PGPR y que son candidatas para realizar estudios cuantitativos sobre los mismos aspectos evaluados.

Perfil metabólico, Biolog, Rizobacterias

Abstract

Mexico produces around 25% of total guava in the world. The importance of the guava crops has a focus traditional and industrial; however, this point does not free the guava about the intensive use of chemical products during its production. The promoting growth plant rhizobacteria (PGPR) represent a sustainable biotechnology option to minimize that problem. In this paper is described the physiological characterization since a qualitative focus of bacteria isolated from soil of guava orchards located in Salvatierra, Gto. The tests were performed shown the metabolic profile through the BIOLOG system; also the antibiotics resistance test was developed, the evaluation of phosphates solubilization, nitrogen fixation, indol production and the germination in guava seeds. The results shown that the strains have routes of action potential of PGPR and, these are candidates to will do quantitative studies about the same aspects.

Metabolic profile, Biolog, Rhizobacteria

Citación: GOMEZ-LUNA, Blanca Estela, RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, VELOZ-GARCÍA, Rafael Alejandro y RUIZ-AGUILAR, Graciela Ma. de la Luz. Variabilidad metabólica de rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas de huertos de Guayaba. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias 2015, 2-2:115-119

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: bgomezl2000@yahoo.com.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La producción mundial de guayaba es de alrededor de 1.2 millones de toneladas, México produce el 25% (Yam-Tzec et al., 2010). El guayabo se cultiva en México, con una superficie de 24000 ha y un volumen de producción anual de 300 000 t. La guayaba se consume principalmente como fruta fresca (87 al 92%) y el resto en las industrias de bebidas, mermeladas y otros productos afines (Mondragón-Jacobo et al., 2009). Los mejores rendimientos se obtienen en regiones con lluvias en verano con una temperatura media anual de 23 a 28 °C (Castelán-Estrada y Becerril-Román, 2004). Sin embargo la guayaba ha sido poco estudiada su microfauna benéfica asociada a su rizósfera que puede ser un potencial biotecnológico.

La biotecnología ofrece herramientas para el desarrollo sostenible. Las bacterias promotoras de crecimiento, PGPR (promoting growth plant rhizobacteria) son microorganismos que ejercen un efecto benéfico para la planta, son definidas como bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. Estas no requieren de la invasión interna del tejido de las plantas, tiene una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, presentan la capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y no producen daño en otros organismos (Jiménez-Delgado, et al., 2001). Dentro de los efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas se distinguen los mecanismos directos e indirectos. Dentro de los mecanismos directos se pueden citar la fijación de nitrógeno, el incremento de la disponibilidad de nutrientes, la producción de hormonas y la producción de la ACC desaminasa (Glick et al., 1998; Milla-Martínez, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Las PGPR incluyen diferentes géneros de bacterias como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*, es posible que un mismo tipo de rizobacteria actúe mediante uno o varios mecanismos directos e indirectos (Glick et al., 1998).

Materiales y métodos

Resistencia a antibióticos

Se inoculó cada aislado en 15 ml caldo de papa en tubos Falcon de 50 mL con agitación (150 rpm) durante 20 min a 28°C. En seguida con el equipo de siembra Spiral Biotech se inocularon con 50 µL de cultivo las placas con medio PDA. Se colocó el multidisco combinado de la marca BIO-RAD. Cada multidisco contiene 12 antibióticos: amikacina (AK, 30 µg), ampicilina (AM, 10 µg), cefotina (CF, 30 µg), cetriaxiona (CRO, 30 µg), cloranfenicol (CL, 30 µg), dicloxacilina (DC, 1 µg), enoxacina (ENX, 10 µg), eritromicina (E, 15 µg), gentamicina (GE, 10 µg), netilmicina (NET, 10 µg), penicilina (PE, 10 U) y trimetropim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg). Para la activación de los antibióticos, las placas se colocaron por una hora a 4 °C para después incubarse por 24 hrs a 28 °C.

Perfiles metabólicos

Se realizó una siembra de 10 cepas gram negativas en el medio BUG de la compañía BIOLOG incubándolas a 28 °C por 24 hrs. Por cepa se prepararon 20 ml de una solución estéril de NaCl al 85%, en la cual fue depositada la muestra del medio BUG hasta que se obtuvo una transmitancia del 52% ±3 %, las cepas se inocularon en microplacas de la misma compañía, de las cuales se tomo lectura a las 24 h de incubación (28 °C) con el lector de microplacas Biolog y el software ML3420, se determinaron los perfiles metabólicos y se la identificación de la cepa.

Bacterias solubilizadoras de fosfatos

Para esta prueba se utilizó el Medio de Fosfatos del National Botanical Research Institute (NBRIP). Para un litro de medio se disponen en el siguiente orden los reactivos: 10 g. de glucosa, 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de KCl, 0.1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 17 g de agar bacteriológico, 0.0005 g de azul de bromitimidol y 1000 ml de agua destilada. Se inocularon las bacterias por picadura en el medio sólido y se incubaron a 28 °C y se observaron cada 24 hrs la formación de un halo de degradación (Morales-Torres et al., 2012).

Resultados y discusión

La sensibilidad (S) y resistencia (R) de las cepas aisladas de huertos de guayaba se muestran en la Tabla 1, se trabajaron 18 cepas gram negativas y 20 cepas gram positivas. Se obtuvieron los siguientes resultados de las bacterias aisladas frente a doce antibióticos diferentes. De las 38 cepas únicamente 12 muestras no presentaron resistencia a ninguno de los antibióticos, como se muestra en la Tabla 1 y Figura 1.

Perfiles metabólicos

Una vez incubadas por 24 horas las placas con el inóculo, con el software ML3420 se leyó el perfil metabólico de once cepas gram negativas, se obtuvo la similitud a nivel con respecto a la base de datos del sistema BIOLOG Tabla 2 y Figura 2; así como las fuentes de carbono utilizadas las cepas Tabla 3.

Bacterias solubilizadoras de fosfatos

Se evaluaron 51 cepas para esta prueba utilizando el Medio NBRIP. Las colonias presentan morfología amarillo intenso en la periferia y un centro amarillo tenue, de consistencia cremosa.

Lo que podría ser característico del medio de cultivo. El crecimiento de las bacterias comenzó a partir de las 48 horas, y a las 96 hrs, comenzó a distinguirse claramente el halo alrededor de algunas bacterias. Para las bacterias gram negativas se trabajaron 19 cepas de las cuales, doce mostraron halo de degradación. Por otro lado para las gram positivas evaluaron 32 aislados donde 21 de los mismos presentaron el halo alrededor de la colonia.

Aislado	AK	AM	CF	CRO	CL	DC
B2R3-3	S	R	R	R	S	R
C3R2-2.2	S	R	R	R	R	R
6A2d-3	S	S	S	S	S	S
8A2.1c-3	S	S	S	S	S	R
1A2.1a-1	S	R	R	S	R	R
C3R2-2.3	S	S	S	R	S	R
8A2.1d-1	R	S	S	S	R	R
A2R2-9	R	R	R	R	S	R
A2R2-3	S	R	R	R	R	R
4-7A3c	S	S	R	S	R	S
12A2.1b-2	S	S	S	S	S	S
A2R2-7	R	R	R	R	R	R
B2R3-9	R	R	R	R	R	R
A2R2-2.2	R	R	R	R	R	R
8A3a-1	S	S	R	R	S	R
8a3a-2	S	S	S	R	S	R
8a2.1-2	S	S	S	R	S	R
C3R2-2.1	S	S	S	R	S	R
C3R2-1	R	S	S	S	R	R
A2R2-6	R	R	R	R	R	R
B2R3-4	R	R	R	R	R	R
A2R2-8	S	R	R	R	R	R
B3R3-6	R	R	R	R	R	R
13A3d-2	S	S	S	S	S	R
13A3d-2.2	S	S	S	S	S	R
C3R3-9	S	S	S	S	R	R
A2R2-5	S	R	R	R	R	R
B2R3-4.1	R	R	R	R	R	R
13a3d-2.2	S	R	S	S	S	R
E1R1-3.1	R	R	R	R	R	R
8a2.1c-1	S	R	R	S	R	R
E1R1-7.2	R	R	R	R	R	R

Aislado	ENX	E	GE	NET	PE	SXT
B2R3-3	S	S	R	S	R	S
C3R2-2.2	R	R	R	S	R	R
6A2d-3	S	R	S	S	R	R
BA2.1c-3	S	S	S	S	R	S
1A2.1a-1	R	R	S	S	R	S
C3R2-2.3	S	S	S	S	S	R
BA2.1d-1	S	S	R	S	S	S
A2R2-9	R	R	S	S	R	R
A2R2-3	S	S	S	S	R	R
4-7A3c	S	R	S	S	R	S
12A2.1b-2	S	S	S	S	S	R
A2R2-7	R	R	S	S	R	R
B2R3-9	R	R	R	R	R	R
A2R2-2.2	S	R	R	S	R	R
8A3a-1	R	R	S	S	R	S
8a3a-2	R	S	S	S	R	S
8a2.1-2	R	S	S	S	R	S
C3R2-2.1	R	S	S	S	R	R
C3R2-1	R	S	R	R	R	R
A2R2-6	R	R	S	S	R	R
B2R3-4	R	R	R	R	R	S
A2R2-8	S	S	S	S	R	S
B3R3-6	R	R	R	R	R	R
13A3d-2	S	S	S	S	S	S
13A3d-2.2	S	S	S	S	S	S
C3R3-9	S	R	S	S	S	S
A2R2-5	R	R	S	S	R	R
B2R3-4.1	R	R	R	R	R	R
13a3d-2.2	S	S	S	S	S	S
E1R1-3.1	R	R	R	R	R	S
8a2.1c-1	R	R	R	S	R	S
E1R1-7.2	R	R	R	R	S	R

Tabla 1 Resultados de antibiogramas



Figura 2 Microplaca Biolog para identificación de aislados de bacterias.

Conclusiones

La variabilidad metabólica de los aislados es muy diversa en resistencia/sensibilidad a antibióticos indicando diversos grupos de bacterias. Las diversas capacidades de las rizobacterias aisladas como ACC desaminasa y solubilización de fósforo nos indican la capacidad de las rizobacterias de metabolizar los componentes del suelo que en consecuencia tiene un efecto positivo en la planta.

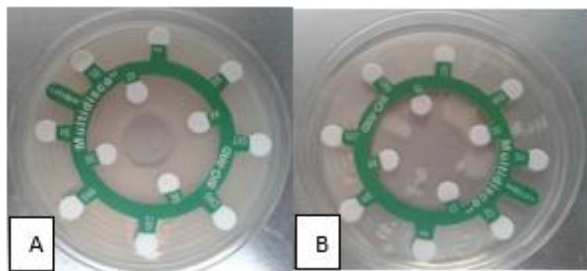


Figura 1 Antibiogramas, Multidiscos BIORAD en placa con medio de cultivo.

AISLADO	BACTERIA CON MAYOR SIMILITUD	PORCENTAJE DE SIMILITUD
5-A2c-2	<i>Bacillus mycoloides</i>	96 %
10-A2c-1	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	70 %
4-A3.1c-1	<i>Xanthomonas campestris pv translucens</i>	54 %
4-A3.1a-2	<i>Pantoea stewartii ss stewartii</i>	66 %

Tabla 2 Similitud de perfiles metabólicos con el sistema BIOLOG

Fuente de C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agua	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
b-Metil-D-Glucósido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido D-galactónico g lactona	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-Arginina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido Metil Éster Pirúvico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D-Xilosa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido D-Galacturónico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-Asparagina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tween 40	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
I-Eritritol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido 2-Hidroxibenzoico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-fenilalanina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tween 80	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D-Manitol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido 4-Hidroxibenzoico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-Serina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
a- Ciclodextrina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-acetil-D-Glucosamina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido g- Hidroxibutírico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
L-Treonina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glicógeno	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido D-Glucosaminico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido Itaconico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido Glicil-L- Glutamico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D-Celobiosa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glucosa-3-Fosfato	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido a-Cetobutírico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Feniletil-Amina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabla 3 Fuentes de carbono utilizadas por cepas Gram negativas

Los aislados mostraron un alto potencial como bacterias promotoras de crecimiento de plantas para mejorar la producción de guayaba así como minimizar el uso de agroquímicos agresivos que pongan en riesgo el equilibrio del ecosistema y en su lugar utilizar un biofertilizante. Además.

Los aislados bacterianos representan una alternativa económica a los productores y mejor calidad del producto.

Referencias

Castelán-Estrada, M., Becerril-Román, A. E. (2004), "Fisiología de la producción forzada en guayaba. II. Nutrientes y respuesta floral", *Interciencia*, Vol. 29, Núm. 012, pp. 680-685

Glick, B. R., Penrose, D. M., Li J. (1998), "A model for the lowering of the plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria", *Y. theor. Biol.*, pp. 63-68

Jiménez-Delgadillo, R., Virgen-Calleros, G., Tabares-Franco, S., Olalde-Portugal, V. (2001), "Bacterias promotoras de crecimiento de plantas: agro-biotecnología", *Avance y Perspectiva*, Vol. 20, pp. 395-400

Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009), "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria", *Annual Review of Microbiology*, Vol. 63, pp. 541-556

Milla-Martínez, C., (2007), "Selección y caracterización fisiológica de rizobacterias promotoras del crecimiento provenientes de dos biomas del Estado de Guanajuato", Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en la Especialidad de Biotecnología de Plantas, pp. 3-10

Mondragón-Jacobo, C., Toriz-Ahumada, L. M., Guzmán-Maldonado, S. H. (2009), "Caracterización de selecciones de guayaba para el bajío de Guanajuato, México", *Agricultura Técnica en México*, Vol. 35. Núm. 3, pp. 315-322

Morales-Torres, H. C., Campos-Guillén, J., Olalde-Portugal, V. (2012), "Aislamiento y caracterización de fosfobacterias", Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología, pp. 14-29

Yam-Tzec, J. A., Villaseñor-Perea, C. A., Romantchik-Kriuchkova, E., Soto-Escobar, M., Peña-Peralta, M. A. (2010), "Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha", *Revista de Ciencias técnicas Agropecuarias*, Vol. 19, Núm. 4, pp. 74-82