

Aislamiento y caracterización de bacterias de la rizósfera de guayaba con capacidad promotora de crecimiento de las plantas

Blanca Gómez, Juan Ramírez, Rafael Veloz, José Gasca y Israel Herrera

B. Gómez, J. Ramírez, R. Veloz, J. Gasca, I. Herrera.
Universidad de Guanajuato Campus Celaya-Salvatierra, Departamento de Ingeniería Agroindustrial,
Prolongación Río Lerma s/n Col Suiza, C.P. 38060, Celaya, Gto.
bgomezl2000@yahoo.com.mx

M.Ramos.,V.Aguilera.,(eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago,
Guanajuato, 2014.

Abstract

Guava is a crop widely used around the world and a natural source of vitamins and minerals, this crop was of economic importance to the town of Salvatierra, Gto., which in recent years been declining due to pests present in orchards and as a deficiency in the development and plant growth. The principal objective in this paper was the isolation of plant growth promotion rhizobacterias from guava was conducted, were obtained insulated deaminase activity acc, later testing germination with guava and cucumber seeds and root development with the model plant *Arabidopsis thaliana*, and also determined that isolated fixed nitrogen and solubilized phosphates also testing with 50 guava plants in the greenhouse to see improvements on the ground directly. In each of the tests conducted the results were compared to positive control in each test is handling.

5 Introducción

La Guayaba (*Psidium guajava* L.) es un cultivo originario de América Tropical y actualmente se encuentran muy difundido en todo el mundo, es una fuente natural de vitaminas y minerales. Tiene muchas variedades, entre las que hay dulces, semiácidas y ácidas. Generalmente son de forma redondeada, no muy grande, amarilla cuando está madura, de sabor agridulce y con gran cantidad de semillas pequeñas y duras. Tiene olor penetrante y su sabor varía, según la especie. Anteriormente Salvatierra, Gto., se caracterizaba por ser un gran productor de dicho fruto utilizándolo para autoconsumo, venta como fruto fresco y seco, así como la elaboración de dulces típicos de la región; esta práctica se ha ido abandonando debido a que la producción de guayaba en huertos es muy bajo, a causa de que el árbol presenta deficiencias de desarrollo y crecimiento (Casaca, 2005). Los productores de esta región que continúan con este cultivo son de bajos recursos, ya que el ingreso es muy bajo y no les aporta recursos para compra de fertilizantes inorgánicos, además de que los suelos son pobres en nutrientes y tienen una baja calidad de riego, por este motivo se busca aislar e implementar microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés).

Como su nombre lo indica promueven y mejoran el crecimiento de las plantas ya que desempeñan funciones clave para la planta, mediante 2 formas diferentes, la primera teniendo un efecto indirecto sobre la planta conocido también como de control biológico protegiendo a la planta de ataques de microorganismos patógenos mediante diferentes mecanismos entre ellos la producción de sideróforos, la resistencia sistémica inducida, producción de antibióticos, estos por mencionar solo algunos, así como también aquellas que tiene un efecto directo sobre la planta, esto es porque los mecanismos de acción afectan directamente el metabolismo de la planta. Siendo estos los principales microorganismos en los que se centra el trabajo, explicando a continuación algunos de los mecanismos con los cuales trabajan dichos microorganismos (Bach y Diaz, 2008; Franco, 2008).

Fijación de nitrógeno: Se considera uno de los principales mecanismos por el cual las plantas encuentran beneficio en la asociación que forman con los microorganismos benéficos, aunque en la mayoría de los casos, la fijación de nitrógeno es solo un componente minoritario en la contribución al beneficio a la planta (Bach y Diaz, 2008).

Producción de reguladores del crecimiento vegetal: Son pequeñas moléculas conocidas como hormonas vegetales, que afectan el desarrollo y crecimiento vegetal, que generan cambios en el proceso fisiológico que repercuten en la floración, fructificación y rebrote de hojas entre otros. Estas hormonas pertenecen a 5 grupos conocidos de compuestos en el cual se incluyen auxinas, etileno, giberelinas, citoquininas y ácido abscísico (Bach y Diaz, 2008).

Solubilización de fosfatos: A través de la secreción de ácidos orgánicos, solubilizan el fósforo mineral y mediante la acción hidrolítica de las enzimas fosfatasas, mineralizan el fósforo orgánico, convirtiéndolo en un nutriente disponible para la planta (Bach y Diaz, 2008).

Inhibición de síntesis del etileno: Se ha encontrado que algunas enzimas de los microorganismo promotores del crecimiento de las plantas producen una enzima llamada ACC desaminasa la cual facilita el crecimiento y desarrollo de la planta mediante la disminución de los niveles de etileno, lo cual se observa en el mejoramiento del desarrollo radicular (Ochoa y col., 2010).

Todos estos mecanismos entre otros son los que logran el mejoramiento de las plantas, logrando así tener una mejora en la producción de los cultivos sin tener un efecto nocivo para el ecosistema. El objetivo de este trabajo fue aislar bacterias de la rizósfera de árboles de guayaba para seleccionar una cepa con las mejores capacidades para mejorar la producción en guayaba.

5.1 Materiales y métodos

Muestreo de suelo

Se tomaron muestras de suelo de la rizósfera de árboles de guayaba de 5 huertos del municipio de Salvatierra, Gto., 5 árboles en cada huerto y 3 puntos de cada árbol.

Aislados bacterianos

Una dilución 1:100 de suelo se inoculó en medio selectivo con 1-ácido carbixílico-1-aminociclopropano (ACC), las bacterias que crecieron en este medio se caracterizó su capacidad promotora de crecimiento. El cual contiene las sales minerales del medio Dworkin y Foster cuya composición por litro es la siguiente (4g KH_2PO_4 , 6 g NaHPO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 1 mg FeSO_4 , 10 μg H_3BO_3 , 10 μg MnSO_4 , 50 μg CuSO_4 , 10 μg MoO_3 , 70 μg ZnSO_4 , glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, ácido cítrico 0.2% y agar bacteriológico al 2% y ACC 3 mM (Sigma).

Prueba de germinación

Se utilizaron semillas de pepino y semillas de guayaba, las cuales se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20 % manteniendo en agitación durante 45 s, posteriormente se le añadió una solución de etanol al 70% durante 45 s en agitación, se vació la solución y por último se utilizó agua destilada estéril y se agitó durante 45 seg, este último paso se repite tres veces.

Después de esto se prepararon tubos con 10 ml de caldo de papa estéril, en los cuales se inocularon los aislados seleccionados para realizar esta prueba, y uno sin inocular como control, se dejaron incubando durante 24 hrs a una temperatura de 28°C en agitación constante. Se tomaron 15 semillas de pepino y 30 semillas de guayaba por cada tubo, se pusieron en agitación durante 20 min, pasado este tiempo las semillas fueron colocadas en cajas Petri con papel estéril humedecido, se dejaron en incubación a 28°C.

Prueba de desarrollo de raíz in vitro

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana*, las semillas fueron esterilizadas superficialmente, agitando en etanol al 70% por 3 minutos, seguido de la agitación en hipoclorito de sodio comercial al 20% por 3 minutos y posteriormente fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas fueron colocadas en cajas de Petri que contenían el medio Murashige-Skoog (MS; GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) al 20% suplementado con sacarosa al 1% y agar al 1% (Bioxon BD, Becton-Dickson, México) y el pH ajustado a 5.7. Para promover y uniformizar la germinación, las cajas se incubaron a 4°C durante 48 hrs en oscuridad. Posteriormente se sembró un aislado por caja, en el lado opuesto de donde se colocaron las semillas por último se colocaron en forma vertical en cámara de crecimiento a 24°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad por 10 días.

Aislamiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno

Para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, se empleó el medio libre de nitrógeno (NFB), cuya composición por litro fue la siguiente: 5g de ácido málico, 0.5g de K_2HPO_4 , 0.2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g de NaCl, 0.02g de $CaCl_2$, 2ml de elementos traza, 2ml de azul de bromotimol, 4ml de solución FeEDTA al 1.64%, 1ml de solución vitaminada, 4g de KOH y 1.75g de agar bacteriológico en este caso para preparación de medio semisólido, cada uno de los reactivos agregados en el orden mencionado hasta disolución completa; para la preparación de elementos traza se utilizó: 0.2g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.235g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.28g de H_3BO_3 , 0.008g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 0.024g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. La solución vitaminada se preparó con 0.01g de Biotina y 0.02g de piridoxina en 1000ml de agua destilada; la preparación de solución FeEDTA, 0.69g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.93g de NaEDTA en 80ml de agua hirviendo y enseguida se aforó a 1000ml con agua destilada fría; y por último el azul de bromotimol 95% de etanol y 5% de azul de bromotimol. La solución NFB, se esterilizó a 15lb de presión durante 15 minutos, sin la solución vitaminada ya que es termolábil, esta se agregó hasta que la temperatura del medio fuera aproximada a los 40°C. Se colocaron fragmentos de raíz de 2 cm de largo y se incubaron a 28°C por 48 h.

Determinación de Solubilizadoras de fosfatos.

Para la determinación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, se empleó el medio NBRIP (Medio de fosfatos del National Botanical Research Institute), cuya composición por litro fue la siguiente: 10g de Glucosa, 5g de $Ca_3(PO_4)_2$, 5g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.025g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g de KCl, 0.1g de $(NH_4)SO_4$ y 0.05g de azul de bromotimol. Cada uno de los reactivos fue agregado y disuelto en el orden mencionado, y en seguida se agregaron 20g de agar bacteriológico y se esterilizó a 15lb de presión durante 15min.

Cada una de las cepas aisladas fue inoculada en medio NBRIP por picadura y se incubaron a 28°C durante 24hrs. La determinación de cepas solubilizadoras se realizó de acuerdo a la formación de un halo de degradación.

Experimento en Invernadero.

Para esta prueba se prepararon cuatro tratamientos con 50 plantas, obtenidas del vivero de Salvatierra, cada planta con sustrato artificial en macetas de 10 litros.

Se evaluaron tres cepas del género *Bacillus subtilis* del laboratorio de bioquímica ecológica a cargo del Dr. Víctor Olalde en Cinvestav-IPN U. Irapuato.

Se inocularon las plantas de guayaba con cada una de las cepas (DN, MZ y BH) cultivadas en caldo de papa y un control solo con riego. El ensayo se dejó por 7 meses y se dieron dos inoculaciones. Se evaluaron altura de la planta, número de ramas, número de hojas. Las condiciones en invernadero fueron: temperatura entre 25°C – 30°C y riego diario de 1 litro de agua por maceta. Los tratamientos fueron nombrados de la siguiente manera:

T1-Bacillus subtilis DN

T2-Bacillus subtilis MZ

T3-Bacillus subtilis BH

T4-Control

5.2 Resultados y discusión

Se tomaron muestras de suelo de la rizósfera de árboles de guayaba de 5 huertos del municipio de Salvatierra, Gto., 5 árboles en cada huerto y 3 puntos de cada árbol.

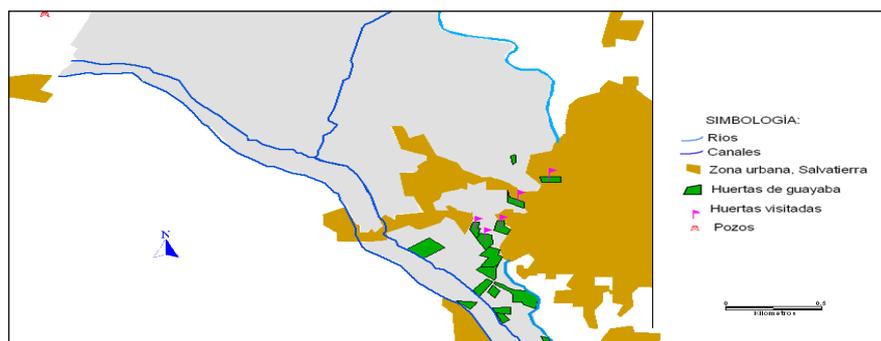
Con los datos de ubicación de los huertos seleccionados se generó un mapa de distribución el cual se muestra en la Figura 1, se puede apreciar que los huertos están distribuidos a lo largo del módulo de riego.

Se obtuvieron 50 aislados en medio selectivo para bacterias con actividad ACC desaminasa. Estos aislados se caracterizaron para capacidad de promoción de crecimiento de plantas.

Prueba de germinación

En ambos casos tanto en las semillas de pepino como en las semillas de guayaba, se observó diferencia el porcentaje de germinación utilizando el cultivo de bacteria en comparación con el control solo con agua, para pepino se mejoró en un 100% y para guayaba 56.6%, mostrándose los resultados en el Tabla 5 y Figura 5.1.

Figura5. Ubicación de las huertas de guayaba en la cabecera municipal de Salvatierra, Guanajuato



Fuente: Elaboración propia con base en los resultados de la investigación. Cartografía de referencia: CONAGUA; Organismo de cuenca Lerma-Santiago Pacífico, Dirección Local Guanajuato, Distrito de Riego 011 "Alto Río Lerma". Cartografía proporcionada por Productores Agrícolas Modulo Salvatierra, DR 011, Alto Río Lerma Guanajuato, A.C.

Tabla5 Porcentaje de germinación en semillas de pepino y guayaba

Clave	pepino	Clave	guayaba
A2.1a	66.60%	6A2b - 2	56.66%
A3d	92.80%	B1R1/1	56.66%
A2d	86.60%	A2R2/10	56.66%
A6a	80%	A2R2/4	46.66%
A3.1c	73.33%	13A3d	43.33%
A3a	80%	E1R1/3.2	43.33%
A2c	100%	8A3a - 1	43.33%
A2b	86.60%	47A3C	40%
A3.1d	93%	8A2.1 - 2	40%
Control	46.60%	Control	33.33%

Figura5.1 Pruebas de germinación de semillas



A) Semillas de guayaba con agua, B) Semillas de guayaba embebidas en caldo de papa con la cepa B1R1, C) Semillas de pepino con agua y D) Semillas de pepino con caldo de papa con la cepa A6a2.

Prueba de desarrollo de raíz in vitro

Los resultados obtenidos fueron mucho mejores en las plantas de *Arabidopsis thaliana* donde se inocularon con bacterias en comparación con el control.

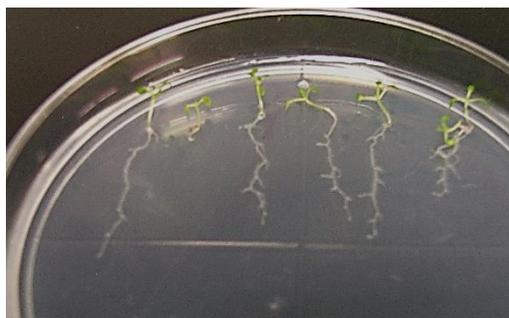
El efecto en la raíz fue especialmente en lo largo mejorando hasta en veces comparado con el control en el cual fue la planta Arabidopsisthaliana en medio de cultivo MS con agua, Tabla 2.

Esto nos indica que los aislados bacterianos producen un metabolito que difunde en el medio de cultivo y tiene su efecto en el desarrollo de la raíz de la planta, este efecto también se observa en la Figura 3.

Tabla5.1 Efecto de las cepas aisladas en la promoción del crecimiento de la raíz

Cepa	Longitud raíz cm	Cepa	Longitud raíz cm
4a3.1c	2.7	10A2c	2.6
A3d3	1	9A2.1a	1
2A3.1d	2.8	2A6a	1
5A2b	2.7	11A2d	2.7
A3a7	3	Control	1

Figura5.2 Efecto en el desarrollo de la raíz



Se muestra el efecto de los aislados en el desarrollo de la raíz de Arabidopsisthaliana comparado con el control sin la aplicación de ningún aislado.

Aislamiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno

Se obtuvieron 34 aislados de raíces de plantas de guayaba en medio selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno (NFB). Estos aislados tienen el potencial de proporcionar a las plantas nitrógeno y mejorar su desarrollo.

Determinación de Solubilizadoras de fosfatos

De los aislados obtenidos 20 son gram negativos y 30 son gram positivos, del total de aislados que fueron 50, se obtuvieron 27 cepas con capacidad de solubilizar fosfatos, estas cepas tienen potencial de favorecer a la planta con la toma de fósforo no disponible, Tabla 3.

Experimento en invernadero

Se observó en altura, que la cepa MZ fue la que mostró un mayor efecto en la planta, superando al control en un 134%, seguida de la cepa DN que fue mayor al control en un 102% y la cepa BH también superior al control en un 60%.

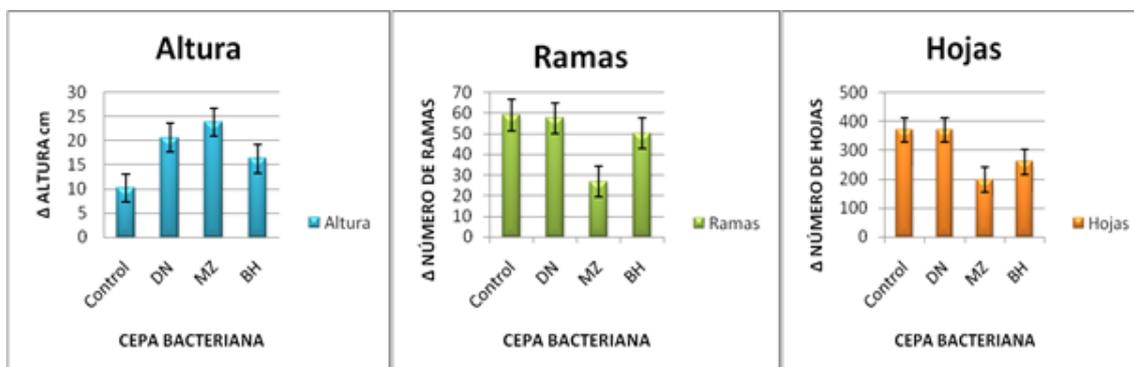
De igual manera, mostró el comportamiento para ramas y hojas, cuando si la supera al control o igual al control, tomando como un 100% la medida del control.

Los resultados se muestran en las gráficas.

Tabla 5.2 Caracterización de las cepas aisladas por tinción gram y formación de halo de solubilización de fosfatos

Cepa	Gram	Halo	Cepa	Gram	Halo
47-A3c	-		A2R2/7	+	X
A2R2/4	-	X	A2R2/2.1	-	X
1A2.1a-1	-	X	A2R2/10	-	X
8A3b-2	-		8A2.1d-2	-	
A2R2/1	-	X	C3R2/10	+	
6A2a-1	+	X	8A2.1d-2	-	
12A2.1-2	+	X	6A2d-1	+	X
B2R3/2	+		13A3d	-	X
8A3a-1	+		47A3c	+	
6A2d-3	+	X	C3R2/2.3	+	X
12A2.1d-2	+	X	12A2.1d-1	+	X
A2R2/7	-		6A2b/1	+	X
A2R2/9	-		12A2.1b-1	-	
B2R2/9	-		E1R1/3.2	+	
B2R3/3	-		12A2.1b/2	-	
12A2.1c	-		8A3b-1	-	
A2R2/3	-	X	6A2c-2	+	X
12A2.1-1	+		6A2a-2	+	X
6A2d-2	+	X	E1R1/3.1	+	
6A2a-3	+	X	6A2c-3	+	X
8A2.1c-3	-		B2R3/10	+	
8A2.1d-1	-		D1R1/1	+	
8A3a-2	+		C3R2/3.1	+	X
1A2.1a-2	+	X	6A2b-2	+	X
A2R2/2.2	+	X	6A2c-1	+	X
E1R1/4.1	+		B2R3/8	+	
C3R2/2.2	+	X			

Gráfico 5 Efecto de las cepas de *Bacillus subtilis*



Efecto de cepas de *Bacillus subtilis* DN, MZ y BH sobre el desarrollo de plantas de guayaba, altura, número de ramas y hojas.

5.3 Conclusiones

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal resultan ser una excelente herramienta biotecnológica, para favorecer el desarrollo de la agricultura en el país, ya que los beneficios son muchos tanto en la mayor y mejor producción vegetal así como a la protección del medio ambiente.

Las rizobacterias aisladas durante la elaboración de este trabajo muestran tener un efecto directo en el desarrollo de la planta, lo cual representa una alternativa positiva para obtener una mayor y mejor producción de guayabas sin el uso excesivo de productos químicos, evitando así más el desgaste ya ocasionado en los suelos de la ciudad de Salvatierra, Gto.

Los aislados presentaron actividad de promoción del crecimiento vegetal también en especies diferentes a la guayaba como fue en el caso de *Arabadobsisthaliana* y pepino indicando la posibilidad de aplicación en otras plantas.

5.4 Agradecimientos

El trabajo fue apoyado por SEP-PROMEP y Apoyo institucional UG.

5.5 Referencias

Bach, Alvarez T; Diaz M. (2008). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura, Agricultura orgánica. [online]

Franco, Correa M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.

Sarabia, Ochoa M, Madrigal, Pedraza R, Martínez, Trujillo M, Carreón, Abud Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones, Biologicas, [online]. Vol. 12, Art. # 1.

Casaca A. (2005). El cultivo de la Guayaba (*Psidiumguajava*). SAG. Volumen 5. [online]