

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE GUAYABA (*Psidium guajava*)

Blanca Estela Gómez-Luna; Alejandro Hernández-Morales; Carlos Hernán Herrera-
Méndez; Gabriela Arroyo-Figueroa; Lorena Vargas-Rodríguez; Víctor Olalde-Portugal

Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3

Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 97-102.



e-revist@s

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE GUAYABA (*Psidium guajava*)

ISOLATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA OF GUAVA PLANTS (*Psidium guajava*)

Blanca Estela **Gómez-Luna**¹; Alejandro **Hernández-Morales**¹; Carlos Hernán **Herrera-Méndez**¹; Gabriela **Arroyo-Figueroa**¹; Lorena **Vargas-Rodríguez**¹; Víctor **Olalde-Portugal**².

¹Profesor Investigador, Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Departamento De Ingeniería Agroindustrial, Privada de Arteaga S/N, Zona Centro CP 38900, Salvatierra Guanajuato. bgomezl2000@yahoo.com.mx. ²Investigador, Cinvestav-IPN Unidad Irapuato, Libramiento Norte Km. 9.6 Carretera Irapuato-León, Irapuato Guanajuato.

RESUMEN

La producción de guayaba para el 2008 en el estado de Guanajuato fue de 177 Ha de superficie sembrada e igual número de superficie cosechada, producción en 1,130.80 Ton. En las prácticas agrícolas tradicionales se ha hecho un uso excesivo de fertilizantes minerales, los que, si bien es cierto, garantizan una buena producción son costosos y llegan a causar desequilibrios en los agroecosistemas por la contaminación del suelo, agua, y de los alimentos. En este trabajo se evaluó el efecto de cepas de *Bacillus subtilis* como promotora de crecimiento de plantas en plantas de guayaba en condiciones de invernadero. Se utilizaron tres cepas, se inocularon en maceta con la planta de guayaba. Se midió la altura, número de ramas y hojas. De 2 huertos de guayaba se tomaron muestras de suelo para el aislamiento y caracterización de rizobacterias. Se utilizó un medio selectivo con 1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano y se seleccionaron las bacterias con la actividad de ACC desaminasa. A los aislados se les determinó resistencia a antibióticos, confrontación con hongos fitopatógenos, pruebas de crecimiento de plantas in vitro y perfiles metabólicos BIOLOG. Se encontraron 30 de aislados con actividades ACC, 7 tienen efecto de control biológico y 5 presentaron efecto en el desarrollo de la raíz in vitro. El uso de rizobacterias promotoras de crecimiento son una excelente alternativa de mejora de la producción de guayabas, cultivo del que se conoce muy poco de la microflora asociada a su rizósfera y del papel ecológico que tienen en suelo.

Palabras clave: Frutales, Rizósfera, *Psidium guajava*

SUMMARY

Guava production for 2008 in the state of Guanajuato was 177 ha in area planted and the same number of area harvested, production in 1,130.80 Ton. In traditional farming practices have made excessive use of mineral fertilizers, which, if it is true, ensure a good production are expensive and come to cause imbalances in agroecosystems by contamination of soil, water, and food. In this work we evaluated the effect of *Bacillus subtilis* strains as plant growth promoter rhizobacteria in guava plants under greenhouse conditions. We used three strains were inoculated potted plant with guava. We measured the height, number of branches and leaves. Guava orchards of 2 then display of soil were taken for the isolation and characterization of rhizobacteria. Selective medium was used with 1 - carboxylic acid, -1 - aminocyclopropane and selecting bacteria with ACC desaminase activity. For the isolates were determined antibiotic resistance, confrontation with fungal pathogens, plant growth tests in vitro and BIOLOG metabolic profiles. We found 30 isolates with ACC activities, 7 have the effect of biological control and 5 had effect on root development in vitro. The use of growth promoting rhizobacteria are an excellent alternative for improving the production of guavas, growing very little is known of the microflora associated with the rhizosphere and the ecological role they have in the ground.

Key words: Fruit, Rhizosphere, *Psidium guajava*

INTRODUCCIÓN

La guayaba (*Psidium guajava*) es un árbol frutal cultivado en las regiones tropicales de América, Asia y Oceanía, cuyos frutos son consumidos por su agradable sabor y valor alimenticio, aportando nutrimentos tales como flavonoides, carotenoides, vitaminas A, B y C, terpenoides, compuestos volátiles y fibra, los cuales son importantes para la dieta humana gracias a sus propiedades como antioxidantes, antiartríticos, antimicrobianos, entre otras (Vargas-Alvarez, 2006). En México, la guayaba se cultiva en huertos en una superficie mayor a 22,000 hectáreas, distribuidas en los estados productores: Michoacán, Aguascalientes, Zacatecas, Estado de México, Querétaro, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Tabasco, Durango, Guanajuato, Colima, Puebla, Veracruz, Chiapas, Querétaro, Hidalgo, Sinaloa, Morelos y Baja California Sur, los cuales en conjunto generan 48,800 empleos directos, una producción de 225,000 toneladas anuales con un costo aproximado de 830

millones de pesos, constituyendo una de las actividades económicas importantes del país (SAGARPA, 2011). La demanda del fruto fresco es en mayor proporción en las centrales de abastos, supermercados y establecimientos de las principales ciudades del país: México, Guadalajara, Monterrey, Tijuana, Mexicali y la zona de La Laguna, en el Estado de Coahuila (INIFAP, 2008). Además la industria alimentaria, demanda frutos de calidad para la elaboración de jugos, néctar, ates, mermeladas, entre otros productos para el consumo nacional (SAGARPA, 2011).

En el estado de Guanajuato la producción anual de guayaba es de 1,131 toneladas, cantidad representativa a nivel nacional que lo ubica entre los 10 estados con mayor producción (SAGARPA, 2008). Dentro del estado, el municipio de Salvatierra cuenta con las condiciones climáticas y de suelos adecuados para el desarrollo de diferentes variedades de guayaba, los cuales durante mucho tiempo han sido utilizados en la elaboración de dulces y conservas para sustento económico de los pobladores. Sin embargo en los últimos años la producción de guayaba ha disminuido drásticamente por diversos factores tales como las sequías, mala calidad del agua de riego, los altos costos de servicio de agua, las enfermedades y plagas que merman la calidad del fruto (Reyes-Barrera *et al.*, 2011). Dada esta problemática es necesario establecer estrategias biotecnológicas que permitan mejorar la calidad y apariencia del fruto para hacerlo más atractivo al consumidor e incrementar la demanda del producto.

En el suelo existe gran diversidad de microorganismos benéficos para el desarrollo y producción de las plantas, entre los que se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas PGPR por su acrónimo en inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (Kloepper *et al.*, 1978; Glick, 1995; Glick, 1999); las cuales constituyen excelentes alternativas biotecnológicas para mejorar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica. Las PGPR ejercen efectos benéficos en las plantas a través mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. La promoción directa ocurre cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilita a las plantas, la toma de ciertos nutrimentos a partir del ambiente (Glick, 1995; Glick, 1999; Jiménez-Delgado, 2004); mientras que el mecanismo indirecto se lleva a cabo cuando las PGPR disminuyen o previenen el efecto deletéreo de fitopatógenos mediante control biológico (Glick, 1995; Glick, 1999). Las PGPR han sido ampliamente utilizadas en algunos cultivos de importancia agrícola donde se ha demostrado que incrementan el rendimiento y la calidad de frutos (Pulido *et al.*, 2003); así como la vida de anaquel como en el caso del tomate (Mena-Violante, 2007). Sin embargo, en el caso de árboles frutales las PGPR han sido poco estudiadas; en lo que respecta a árboles de guayaba se desconoce la diversidad de bacterias rizosféricas y sus efectos promotores del crecimiento (Ramírez *et al.*, 2003). Por lo que en este trabajo se propuso el aislamiento y caracterización de la diversidad microbiana asociada al cultivo de guayaba con el fin de seleccionar una cepa que sea factible para aplicación como un biofertilizante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento en invernadero con cepas de *Bacillus subtilis*.

Se utilizaron tres cepas de *Bacillus subtilis* denominadas DN, MZ y BH del laboratorio de Bioquímica Ecológica a cargo del Dr. Víctor Olalde Portugal del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Se inocularon las plantas de guayaba (diez macetas por cepa) con cada una y un control solo con riego por 7 meses con dos inoculaciones durante ese período. Se evaluaron la altura, número de ramas y de hojas de cada planta de guayaba.

Muestreo de suelo de huertos de Guayaba.

Se seleccionaron dos huertos de guayaba ubicados en el municipio de Salvatierra Guanajuato, de los cuales se tomaron muestras de suelo de la rizósfera de cinco puntos en cada huerto. Las muestras de

suelo se almacenaron en bolsas de plástico y se guardaron a 4 °C hasta su análisis. El muestreo se realizó en el mes de mayo 2011, correspondiente a la temporada de sequía.

Aislamiento y caracterización de rizobacterias con actividad de ACC desaminasa.

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 mg MnSO_4 , 50 mg CuSO_4 , 10 mg MoO_3 , 10 mg ZnSO_4 , glucosa 0.2%, ac. glucónico 0.2%, ac. cítrico 0.2%, agar bacteriológico al 2% y 1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano (SIGMA) estéril de 3mM como única fuente de nitrógeno (Penrose y Glick, 2003). Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de las diferentes muestras de suelo en una dilución 1:100 utilizando el equipo *Automated Spiral Plater* 4000. A los aislados obtenidos se les realizó la tinción de Gram y se prosiguió con su caracterización.

Resistencia a antibióticos.

Los aislados de las rizobacterias se crecieron en agar nutritivo y se colocaron multidiscos combinados BIO-RAD. Las placas se incubaron a 28 °C por 24 h; transcurrido el período de incubación se determinó la sensibilidad a los antibióticos midiendo el diámetro del halo de inhibición.

Perfiles metabólicos.

Se utilizaron microplacas BIOLOG que contienen 95 fuentes de carbono distintas, las placas GN2 se utilizaron para la caracterización de los aislados Gram negativos, mientras que las GP2 para los aislados Gram positivos. Los aislados seleccionados se cultivaron en el medio BUG por 24 h a 28°C de la compañía BIOLOG. Se prepararon 20 ml de solución de NaCl al 0.85% estéril, se tomó muestra de la cepa inoculada en el medio BUG en NaCl hasta una transmitancia de 52% GN y 20-30% GP ± 3 %, se inocularon en las microplacas BIOLOG Gram positivas o Gram negativas según el aislado, de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las microplacas se incubaron a 28°C y se les tomó lectura de absorbancia a las 24 h con el lector de microplacas Biolog y el software ML3420, para determinar los perfiles metabólicos y la identificación de la cepa.

Efecto de antibiosis de las rizobacterias contra hongos fitopatógenos.

Se seleccionaron algunos aislados de rizobacterias y se confrontaron contra diversos hongos fitopatógenos: *Sclerotium sp*, CPH8 *Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Rhizoctonia sp* CPH1 del chile poblano, *Bipolaris sp* y *Colletotrichum sp* IR-MZ-LR del cepario del Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Cinvestav-IPN Unidad Irapuato. Las pruebas de antibiosis se realizaron en medio PDA a 28°C por 24 h.

Efecto de germinación y promoción de crecimiento de las rizobacterias en plantas.

Para la evaluación del efecto en la germinación; los aislados seleccionados se inocularon en 25 ml de extracto de papa, se agregaron 15 semillas de pepino al cultivo y se agitaron por 20 min, como control un grupo de semillas se agitaron en caldo estéril sin inóculo. Las semillas se colocaron en cajas Petri con papel húmedo estéril, se incubaron a 28°C por 20 h y se calculó el % de germinación. Para evaluar el efecto promotor de crecimiento, se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* en medio de Murashige-Skoog al 20% suplementado con sacarosa al 1% y agar al 1%, se colocaron semillas en placas con el medio e incubaron en cámara de crecimiento a 24°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad por 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas de *Bacillus subtilis* tuvieron un mayor crecimiento con respecto al control, pero las cepas DN y MZ tuvieron más del doble, como se indica Figura 1.

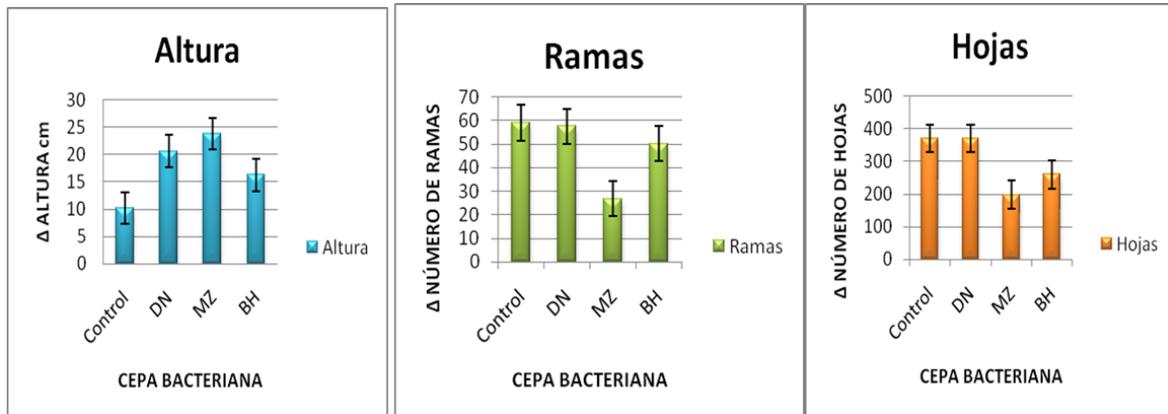


Figura 1. Efecto de cepas de *Bacillus subtilis* DN, MZ y BH sobre el desarrollo de plantas de guayaba en altura, número de ramas y hojas. Las barra indica el error experimental.

En el número de ramas, la cepas de *Bacillus subtilis* no mostraron diferencia significativa con el control a excepción de la cepa MZ tuvo el menor número de ramas como se indica figura 2. Con respecto al número de hojas, la cepa DN y el Control tuvieron los mismos resultados figura 3.

Del suelo de los huertos de guayaba muestreados se obtuvieron 30 aislados con actividad de ACC desaminasa, los cuales se caracterizaron por tinción de gram, se encontró que 20 aislados fueron gram positivos y 10 aislados fueron gram negativos. Los resultados de los antibiogramas dieron un grupo de 7 aislados sensibles a todos los antibióticos y el resto dieron patrones diferentes de sensibilidad y resistencia, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Determinación de la resistencia/sensibilidad de los aislados bacterianos a antibióticos.

Cepa	Gram	Antibiótico											
		AK	AM	CF	CRO	CL	DC	ENX	E	GE	NET	PE	SXT
A2b	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A2d	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A2c	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A3d	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A3.1d	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A3a	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A2.1a	-	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R
A3.1c	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A6a	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R

AK amikacina (30 μ g), AM ampicilina (10 μ g), CF cefalotina (30 μ g), CRO ceftriaxona (30 μ g), CL cloranfenicol (30 μ g), DC dicloxacilina (1 μ g), ENX enoxacina, E eritromicina (15 μ g), GE gentamicina (10 μ g), NET netilmicina (30 μ g), PE (10 U), SXT trimetoprin-sulfametoxazol (25 μ g). R resistente, S sensible.

La identificación de los aislados por perfiles metabólicos BIOLOG de los aislados gram negativos dieron porcentajes de similitud a los géneros: *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*; los aislados gram positivos dieron identificación de hasta 96% de similitud del género *Bacillus* y varias especies entre ellas *cereus*, *thuringensis*, *mycoides*, *megaterium*. Los perfiles metabólicos además indicaron que, de los aislados gram positivos el A2d es la presente

mayor capacidad metabólica al utilizar más fuentes de carbono con un 68 % y de los aislados gram negativos el aislado A2c fue de mayor capacidad metabólica con un 14 %. De las pruebas de antibiosis, 7 aislados detuvieron el crecimiento de hongos fitopatógenos: *Sclerotium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Bipolaris sp.*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* De la eficiencia en germinación de semillas de pepino, la cepa A2c dio un 100% de germinación en 20 h comparado con el control con un 46%. En la prueba de desarrollo de la raíz, la cepa A3a dio el mayor desarrollo en longitud de la raíz y formación de la roseta en *Arabidopsis thaliana* hasta tres veces más comparado con el control, cuadro 2.

Cuadro2. Efecto de Germinación, Promoción de Crecimiento y antibiosis.

Cepa	% Germinación	Desarrollo de la Raíz (cm)	Antibiosis
A2.1a	67	1	S, R, A
A2d	93	1	B
A2c	87	2.7	R, B, C
A2b	80	1	R, F
A3d	73	2.7	F
A3.1c	80	3	S, R
A3a	100	2.6	C, F
A3.1d	87	2.7	NE
A6a	93	2.8	R
Control	47	1	NE

A) *Alternaria sp.*, B) *Bipolaris sp.*, C) *Colletotrichum sp.*, F) *Fusarium sp.*, R) *Rhizoctonia sp.*, S) *Sclerotium sp.*, NE no hay efecto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos indican la necesidad de explorar la microflora de suelo de frutales que pueden ser utilizados como herramientas benéficas en la producción de plantas de guayaba. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas aisladas de suelos de guayaba demostraron ser una excelente opción para formular un biofertilizante específico para la producción de guayaba y con esto contribuir al desarrollo del municipio en Salvatierra, Gto., mejorando la producción de materia prima para la producción de dulces tradicionales de guayaba.

LITERATURA CITADA

- Glick, B.R., 1995. **The enhancement plant growth free-living bacteria.** Can. J. Microbiol. 41:109-117.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, O., Penrose, D.M. 1999. **Biocontrol Mechanism. Chapter 7. In Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria.** Ontario Canada. Imperial Collage Press pp. 215-248.
- INIFAP, F. G. 2008. **Transferencia de tecnología para la optimización de la producción frutícola en pequeña escala en Guanajuato (SIFP: 11-2005-2461).** Guanajuato: INIFAP, FGP: 1-18.
- Jiménez-Delgadillo, M.R. 2004. **Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** Tesis de Doctorado en Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. México.
- Mena-Violante, H.G, Olalde-Portugal, V. 2007. **Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs.** Scientia Horticulturae, 113:103–106.
- Penrose D., Glick B. 2003. **Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria.** *Physiologia plantarum.* 118:10-15.

- Pulido, L.E., Medina, N., Cabrera, A. 2003. **La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y Cebolla (*Allium cepa* L.). I. Crecimiento vegetativo.** Cultivos Tropicales. 24(1):15-24.
- Ramírez, A., Cruz, N., Franchialfaro, O. 2003. **Uso de Bioestimuladores en la reproducción de guayaba (*Psidium guajava* L.). Mediante el enraizamiento de esquejes.** Cultivos Tropicales. 24(1):59-63.
- Reyes Barrera, D. M., Gómez Luna, B. E. 2011. **Estudio Socioeconómico de la Guayaba en el Municipio de Salvatierra, Gto.** Memorias del Verano de la Investigación Científica UG. 2103-2112.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura y Recursos Pecuarios. 2011. **Crece Producción de Guayaba Destinada a Exportación.** México: 1-3.
- Vargas-Alvarez, D., Soto-Hernández, M., González-Hernández, V.A., Engleman, M., Martínez-Garza, A. 2006. **Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.).** Agrociencia, 40:109-115.

Dra. Blanca Estela Gómez Luna

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato. Correo electrónico: bgomezl2000@yahoo.com.

Dr. Alejandro Hernández Morales

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Carlos Hernán Herrera Méndez

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dra. Gabriela Arroyo Figueroa

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dra. Lorena Vargas Rodríguez

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Víctor Olalde Portugal

Investigador Titular. Laboratorio de Bioquímica Ecológica. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.