

Topic: Ecology and environmental concerns

Screening of plant growth promoting bacteria associated with *Guadua angustifolia* Kunth

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas con *Guadua angustifolia* Kunth

García A. L., Saray K., Torres Y. y Díaz-Ariza L. A.

Grupo de Agricultura Biológica, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
luciaana@javeriana.edu.co

Abstract

Plant growth promoting bacteria were isolated from soil, roots and leaves of six natural guaduales (*Guadua angustifolia* Kunth) located in the department of Cundinamarca, Colombia. 650 bacterial isolates from different functional groups produced indolic derivatives. *Enterobacter* sp. isolated from soil and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from leaves, showed the largest concentration with 855 mg/mL and 328mg/mL, respectively. The 20 isolates with the highest production of indole derivatives were grown in liquid media to quantify 3-indole-acetic acid (IAA) and zeatin in the supernatant. *Enterobacter* sp. produced the highest concentration of IAA, 117 mg/mL. Among the isolates evaluated were also cytokinin zeatin producers with values up to 0.609 pM.

Keywords: 3-indoleacetic acid, *Guadua angustifolia*, plant growth promoting bacteria, zeatin, growth regulators.

Resumen

Se aislaron bacterias productoras de reguladores de crecimiento vegetal a partir de suelo, raíces y hojas de seis guaduales (*Guadua angustifolia* Kunth) naturales ubicados en el departamento de Cundinamarca, Colombia. 650 aislamientos bacterianos de diferentes grupos funcionales produjeron derivados indólicos. *Enterobacter* sp. aislado a partir de suelo y *Stenotrophomonas maltophilia* aislada de hojas, fueron los mayores productores con 855 mg/mL y 328mg/mL, respectivamente. Los 20 aislamientos con mayor producción de derivados indólicos se cultivaron en medios líquidos para cuantificar ácido 3-indol-acético (AIA) y zeatina en el sobrenadante. *Enterobacter* sp. produjo la mayor concentración de ácido indolacético, 117 mg/mL. Dentro de los aislamientos evaluados se encontraron también productores de la citoquinina zeatina con valores hasta de 0.609 pM.

Palabras claves: ácido indolacético, *Guadua angustifolia*, bacterias promotoras de crecimiento vegetal, zeatina, reguladores de crecimiento.

Introducción

Dentro de la microbiota edáfica es ampliamente conocida la actividad de promoción del crecimiento vegetal que ejercen algunos grupos de la región rizósfera. Uno de estos mecanismos consiste en la producción de reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxínicos y citoquininas, principalmente ácido indol-3 acético y zeatina, que están implicados en la elongación y diferenciación celular; adicionalmente estos compuestos actúan como moléculas señal en las plantas, mensajeros químicos,

responden a cambios ambientales y regulan la expresión genética (Van de Broek et al, 2005; Aguilar-Piedras et al, 2008). Cerca del 80% de los microorganismos rizósfericos tienen la capacidad de producir este tipo de metabolitos que influyen en la patogénesis y la fitoestimulación, dos de las más importantes interacciones entre plantas hospederas y microorganismos (Cassán *et al.* 2008).

Aquellos microorganismos productores de reguladores de crecimiento vegetal se conocen como fitoestimuladores y actualmente reciben particular atención para el desarrollo de productos biotecnológicos para la agricultura. Así mismo, es conocido el amplio potencial biotecnológico que poseen con otras actividades de importancia en la promoción del crecimiento vegetal, como la fijación de nitrógeno o la solubilización de fósforo. Estas características biológicas de los microorganismos han permitido a través del fortalecimiento en su investigación, la transferencia de tecnología al sector agrícola en América Latina (Glick et al 2001; Biró et al, 2006; Manoharachary & Mukerji, 2006).

Se han descrito varias rutas biosintéticas para la producción microbiana del AIA, tres de ellas dependientes del aminoácido precursor triptófano y una independiente; sin embargo, el patrón de biosíntesis se encuentra relacionado con tipo de microorganismo productor. El papel de estos compuestos en la elucidación del establecimiento de las relaciones planta-microrganismos puede estar en el estudio de las respectivas rutas metabólicas y sus elementos de regulación (Zakharova et al. 1999).

En este trabajo se caracterizaron alfa proteobacterias asociadas naturalmente a guaduales de la región de Cundinamarca que fueran capaces de producir derivados indólicos y zeatina, en cultivos líquidos discontinuos.

Materiales y Métodos

Toma de muestras y aislamiento de bacterias

Los muestreos se realizaron en seis guaduales de la provincia de Rionegro ubicados en los municipios de Pacho (Y: 0979523 X: 1067073; Y: 976711 X: 1066118), Yacopí (Y: 1094434 X: 0971187), La Palma (Y: 0962644 X: 1086390), Topaipí (Y: 09747859 X: 1080600) y El Peñón (Y: 0975209 X: 1074462) en el departamento de Cundinamarca, Colombia (Figura 1). Se procedió a la toma de muestras de suelo asociado a raíces, hojas y raíces de individuos de *G. angustifolia* Kunth.

Se aislaron bacterias endófitas de raíz y hojas de guadua y de suelo asociado a raíces, mediante diluciones seriadas en solución salina al 0.85%, en los medios selectivos NFB, King B, SMRS y en Agar Nutritivo (Figura 2). La desinfección de las raíces para el aislamiento de endófitos consistió en sumergir las raíces en etanol al 70% durante 5 minutos, luego en hipoclorito de sodio al 1,8% por 5 minutos y finalmente se hicieron 3 lavados con agua destilada desionizada estéril. Para el aislamiento de endófitos de hojas, éstas fueron cortadas en fragmentos de 1 cm² aproximadamente, los cuales se desinfectaron en Tween20 ® al 10% durante 4 minutos, se pasaron por etanol al 70% por dos minutos, luego por hipoclorito de sodio al 1.8% durante tres minutos y por último se hicieron cinco lavados con agua destilada desionizada estéril. Se sembraron 8 fragmentos de hoja en cada medio de cultivo por duplicado; en el caso del medio semisólido NFB se sembró un fragmento por vial. Los aislamientos obtenidos fueron caracterizados macroscópica y microscópicamente. Se conservaron en agar papa modificado (Weber et al., 1999; Govindarajan et al., 2006)

Determinación semicuantitativa de concentración de derivados indólicos mediante pruebas colorimétricas

La determinación semicuantitativa de la producción de derivados indólicos de los aislamientos obtenidos se realizó por la técnica colorimétrica de Van Urk Salkowsky (Gordon & Weber, 1951).

Los aislamientos fueron sembrados en caldo nutritivo suplementado con triptófano al 0.2% e incubados en condiciones de oscuridad durante 48 h a 30°C y 125 rpm. Después de la incubación se tomó una alícuota de 1.5 ml, se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionaron 2 ml de reactivo de Van Urk Salkowsky; transcurridos 30 minutos se determinó la densidad óptica a 530 nm en un espectrofotómetro Beckman® 560 utilizando como blanco caldo nutritivo estéril y como control bacteriano un cultivo de *Azospirillum brasiliense* ATCC29145. Se utilizaron dos curvas patrón para la determinación de derivados indólicos con el fin de interpolar las DO obtenidas, la curva de concentraciones bajas se estableció con el rango de 1.5 ppm hasta 50 ppm de AIA y la de altas concentraciones desde 60 ppm hasta 250 ppm de AIA Merck®. La ecuación de la recta obtenida para la primera curva fue $y=0.0178x+0.0225$ $R^2=0.9902$, para la segunda curva fue $y=0.0021x+0.8056$ $R^2=0.99012$. Una vez determinada la concentración de derivados indólicos, se seleccionaron los dos aislamientos con mayores valores y se cultivaron durante 48 horas con el fin de determinar el momento de máxima concentración celular y la acidez del medio de cultivo.

Cuantificación de la producción de ácido 3 indolacético por HPLC

Se seleccionaron 20 aislamientos bacterianos de aquellos que en la prueba anterior presentaron los mayores valores de derivados indólicos. Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente. Una vez finalizado el período de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 8000 rpm a 4°C y el sobrenadante filtrado con filtros de teflon Xpertek® de 45 μm , para obtener el extracto utilizado en la cromatografía.

La separación cromatográfica se realizó isocráticamente en una columna de fase reversa Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 de medidas 4.6*150mm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol: ácido acético 1% 55:45, con velocidad de flujo 1.2 mL/min y un tiempo de retención de 2.56 min (Castillo *et al.*, 2005; Mantilla, A. 2010). El análisis se llevó a cabo en el Instituto SINCHI.

Determinación de la producción de Zeatina

Para la determinación de la citoquinina Zeatina se siguió el protocolo propuesto por García de Salamoné *et al* (2001), mediante la prueba de ELISA. El metabolito generalmente es producido en cultivos entre 96 a 168 horas de incubación y puede tener varios momentos de aumento de producción. A 16 de los mejores aislamientos productores de derivados indólicos se les realizó una curva de crecimiento con el fin de determinar dos momentos de muestreo para realizar las respectivas determinaciones de zeatina. El primer momento de muestreo corresponde al inicio de la fase exponencial y el segundo momento en la mitad de la fase estacionaria. Los aislamientos fueron incubados en medio mínimo de sales, a los cuales se les determinó la densidad óptica a 635 nm a la hora 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 y 168. Se incluyó un cultivo de *A. brasiliense* ATCC 29145.

Para todos los aislamientos la fase estacionaria de crecimiento inició entre las horas 12 y 24 y se extendió hasta el final del ensayo. Para la determinación de la concentración de la citoquinina se tomaron los momentos de muestreo de inicio de fase estacionaria y fase estacionaria media (tabla 1). En cada momento se tomaron 3 mL del cultivo microbiano que se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 r.p.m. El sobrenadante se filtró de la forma descrita y se utilizó para la realización del ELISA competitivo, siguiendo el protocolo del kit de detección PhytoDetek t-ZR ® que tiene un rango de detección de 0.2 - 100 picomol t-ZR /mL. Se utilizó *trans*-Zearina Riboside Sigma Cat. No. Z0375 como control. Se evaluaron 10 aislamientos bacterianos.

Resultados y Discusión

De los seis guaduales muestreados se obtuvieron en total 650 aislamientos en los diferentes medios de cultivo y de las diferentes fuentes (Figura 3). Solo seis de estos aislamientos no produjeron derivados indólicos; la producción de derivados indólicos de los 644 positivos estuvo en un rango entre 0.05 ppm (aislamiento obtenido de suelo en un guadual de Pacho GaPaS0008) y 855 ppm (aislamiento de la misma fuente y el mismo guadual municipio *Enterobacter* sp.). Estos aislamientos se obtuvieron de hojas y raíces de guadua (endófitos) y también de suelo asociado a esta planta. No encontramos diferencias en el número de aislamientos ni en la magnitud de la actividad biológica entre guaduales ($p>0.05$). Sin embargo, los 20 aislamientos con los mayores valores de derivados indólicos provienen principalmente de raíz (11), seguido por suelo (8) y un aislamiento de hoja. El guadual en el que se encontró el mayor número de aislamientos productores de derivados indólicos fue el ubicado en el municipio de Pacho (ANAVA $p<0.001$) y aunque no hubo diferencias estadísticas entre ellos, el medio de cultivo que permitió el aislamiento de los mejores aislamientos fue el SMRS (195) seguido por el King B (179) y el NFB (153) ($p=0.109$). Una vez aislados, se verificó la actividad biológica de cada aislamiento para la producción de sideróforos, la fijación de nitrógeno y la solubilización de fósforo (figura 2).

Los microorganismos diazótrofos y los fosfatos solubilizadores asociados a la rizósfera de diferentes especies vegetales son dos de los grupos con mayor producción de fitohormonas.

Los anteriores resultados confirman el amplio potencial de promoción de crecimiento vegetal que una cepa puede tener al poseer diferentes actividades biológicas, de ahí la importancia de aislar microorganismos promotores de crecimiento vegetal en varios medios selectivos. En el caso de los microorganismos aislados en el medio NFB selectivo para diazótrofos, se ha encontrado que adicional a su actividad promotora de crecimiento relacionada con la fijación biológica de nitrógeno, la producción de ácido indoláctico estimula el desarrollo del sistema radical al promover la proliferación de pelos radicales y raíces laterales, como tal es el caso de algunas especies como *Azospirillum brasiliense* y *Klebsiella* sp. (Lambrecht et al. 2000; Cassan et al. 2008; Schdev et al. 2009).

Otro de los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal ejercido por las bacterias benéficas es la solubilización de fósforo, propiedad de alta importancia en los suelos de la región andina, caracterizados por presentar este elemento precipitado en complejos de aluminio y de hierro; adicionalmente a la actividad solubilizadora y al favorecimiento del desarrollo del sistema radical debido a la producción de derivados indólicos de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Kumari-Jha et al. 2009), se ha demostrado el establecimiento de interacciones con otros microorganismos del suelo involucrados en el transporte del fósforo orgánico, los hongos formadores de micorriza arbuscular. El sinergismo de esta asociación se evidencia cuando el hongo se ve estimulado por la producción de derivados indólicos de origen bacteriano, los cuales promueven el crecimiento apical de las hifas del hongo quien a su vez es más eficiente en el transporte del fósforo solubilizado por las bacterias y cuyo efecto final se observa en un mejor crecimiento de la planta (Pérez-Naranjo et al. 2004).

En la evaluación de crecimiento realizada bajo cultivo discontinuo, se observó a la hora 24 una concentración de 3.6×10^{10} UFC/mL, el pH del medio disminuyó de 6.08 hasta 5.07 y se presentó la producción de 327.7 mg/mL (ppm) de derivados indólicos para *S. maltophilia*, mientras que para *Enterobacter* sp. la máxima concentración celular se presentó a la hora 12 con 5.2×10^9 UFC/mL, se evidenció una disminución del pH del medio hasta 5.67 en la hora 12 y una producción de los metabolitos evaluados de 855 mg/mL (ppm). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Vande Broek y colaboradores en el 2005, donde enuncian que la expresión del gen *ipdC* codificante para la enzima índol-3-piruvato descarboxilasa, es dependiente del pH y aumenta en condiciones de acidez.

Por otra parte, dado que la determinación colorimétrica no discrimina el tipo de compuesto indólico presente, se realizó la cuantificación de ácido indoláctico por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC); este fue el caso del aislamiento obtenido también del suelo del guadual de Pacho, GaPaS1004, quien por la técnica colorimétrica produjo un total de 250 mg/mL y por HPLC solo 4 mg/mL de AIA. Sin embargo, *Enterobacter* sp., quien por colorimetría presentó la mayor producción de derivados indólicos (855 mg/mL), fue también quien obtuvo la mayor producción de AIA con 117 mg/mL.

El aislamiento con mayor producción de zearina fue obtenido de un guadual de Pacho, GaPaS1004, produjo 0,695 pmol/mL. En la tabla 1 se presentan las concentraciones de zearina de diez de los aislamientos evaluados. Se utilizó como control la cepa de *Azospirillum brasiliense* ATCC29145, que presentó un valor de 0.029 pmol/mL de Zearina. Solamente el aislamiento de Pacho GaPaR3317 presentó un menor valor que *A. brasiliense* (0.016 pmol/mL). Los aislamientos GaPaS1004, GaPaS3252, GaToR3323, GaPaR3240 y GaToR3215 presentaron la mayor producción de zearina en el momento 2, los demás aislamientos lo hicieron en el momento 1. Los valores obtenidos en nuestro ensayo superan los reportados por García de Salomé *et al* (2001), quienes publicaron valores hasta de 0.309 pmol/mL en el sobrenadante del medio mínimo utilizado también en este ensayo. Los mismos autores afirman que el porcentaje de la citoquinina aumenta a medida que aumenta el tiempo del cultivo, y sólo se presenta su producción en la fase estacionaria. Aunque en nuestro trabajo únicamente se evaluó esta fase, contrario a lo reportado por los autores mencionados la mayor concentración de zearina en general se produjo en la mitad de la fase estacionaria, momento que no excedió la hora 96.

Dado el alto costo de las fitohormonas sintéticas, particularmente de la zearina, el encontrar microorganismos que, bajo condiciones controladas de cultivo, produzcan valores significativos de estos metabolitos, los hacen biotecnológicamente interesantes y su uso puede ser una estrategia dentro de los sistemas de propagación clonal de diferentes especies de importancia económica que buscan además esquemas de producción con bajo uso de productos de síntesis química.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de la investigación, al Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi.

Referencias

- Aguilar-Piedras J.J., Xiqui-Vásquez M.L., García-García S. y Baca B.E. 2008. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 50 (1): 29 – 37
- Biró B., Köves-Péchy K., Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. 2006. Role of Beneficial Microsymbionts on the Plant Performance and Plant Fitness. Soil Biology, Volume 7. Mukerji K.G., Manoharachary C., Singh J. (Eds.). Microbial Activity in the Rhizosphere. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Castillo G., Altuna B., Michelena G. Sánchez-Bravo J. y Acosta M. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. Anales de Biología 27: 137-142.
- Cassán, F., Sgroy, V., Perrig, D., Masciarelli, O. and Luna, V. 2008. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal In: *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. F. D. Cassan and I. García de Salamone (Eds.). Published by: Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Chapter 4. pp. 61-86

Garcia de Salomone, I.E., Hynes, R.K. & Nelson, L.M. 2001. Citokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J microbial.* 47:404-411.

Glick B., Penrose D. Y. y Ma W. 2001. Bacterial promotion of plant growth. *Biotechnology Advances* 19:135-138

Gordon S.A. y Weber R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology.* 26 (1): 192.

Govindarajan M., Balandreau J., Muthukumarasamy R., Revathi G. y lakshminarasimhan C. 2006. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and soil* 280:239–252.

Kumari-jha B., Gandhi-Pragash M., Cletus J., Raman G. y Sakthive N. 2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida* y *Pseudomonas mosselii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 25 (4): 573 -581

Lambrecht, M., Okon Y., Vande Broek A., y Vanderleyden J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiology* 8:298-300

Manoharachary C. y Mukerji K. 2006. Rhizosphere Biology – an Overview. *Soil Biology, Volume 7.* Mukerji K.G., Manoharachary C., Singh J. (Eds.). *Microbial Activity in the Rhizosphere.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.1-15

Mantilla, A. 2010. Informe Técnico Final. Instituto de Investigación SINCHI.

Pérez – Naranjo, J.C., Osorio, N.W y Álvarez, C.L. 2004. Crecimiento, absorción de fósforo y morfología de la raíz en espárragos inoculados con hongos micorrizales y pseudomonas fluorescentes. *Revista Facultad Nacional de Agronomía.* 57 (2)

Schdev, D.P., Chaudhari, H.G., Kasture, V.M., Dhauale, D.D. y Chopade, B.A. 2009. Isolation and characterization of índole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian Journal of Experimental Biology.* 47: 993-1000.

Vande Broek A., Gysegom P., Ona O., Hendrickx N., Prinsen E., Van Impe J. y Vanderleyden J. 2005. Transcriptional Analysis of the *Azospirillum brasiliense* Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene and Identification of a *cis*-Acting Sequence Involved in Auxin Responsive Expression. *MPMI* 18 (4): 311–323.

Weber O.B., Baldani V.L.D., Teixeira K.R.S., Kirchhof G., Baldani J.I Y Dobereiner J. 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210: 103–113

Zakharova, E.A., Shcherbakov, A.A., Brudnik, V.V., Skripko, N.G., Bulkhin, N.Sh. & Ignatov, V. 1999. Biosynthesis of índole-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*. Insights from quantum chemistry. *Eur J Biochem.* 259:572-576.

Figura 1. Zona de muestreo en guaduales del Departamento de Cundinamarca, Colombia.

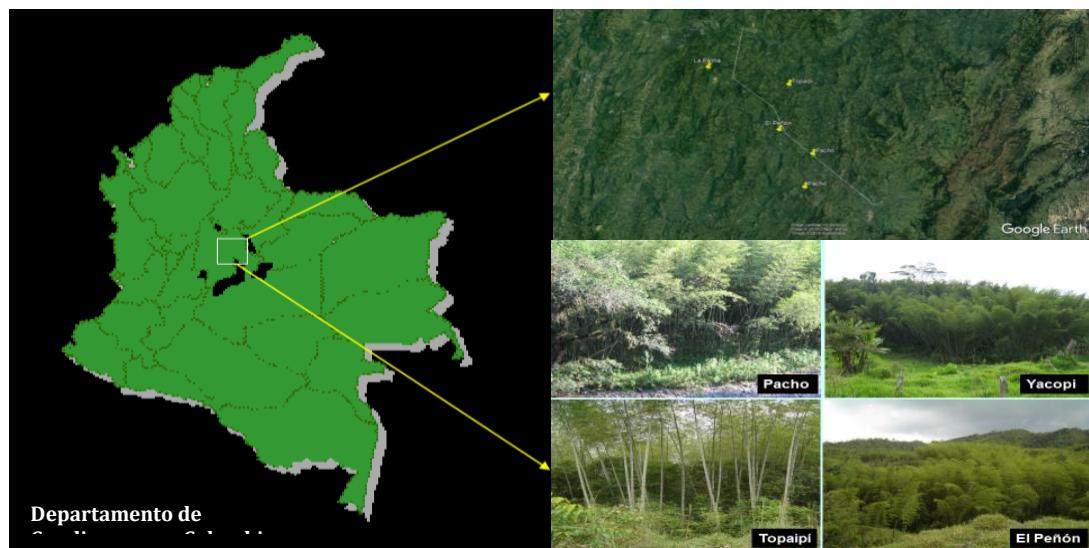
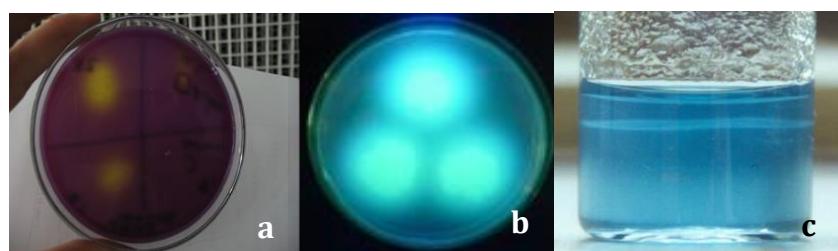


Figura 2. Medios de cultivo sólidos diferenciales para el aislamiento de bacterias productoras de ácidos y solubilizadoras de fósforo- Agar SMRS (a), bacterias productoras de pigmentos fluorescentes-Agar King-B (b), bacterias fijadoras de nitrógeno Agar NFb (c)*



*a. Color amarillo por acidificación del medio alrededor de las colonias bacterianas; b. presencia de pigmentos fluorescentes difusibles en el medio de cultivo; c. formación de biopelícula indicando crecimiento de bacterias en un medio libre de nitrógeno.

Figura 3. Número total de aislamientos bacterianos de suelo, raíces y hojas de *Guadua angustifolia* del Departamento de Cundinamarca, Colombia. Se presentan los grupos funcionales fijadores de nitrógeno, productores de sideróforos (pigmentos fluorescentes difusibles, solubilizadoras de fósforo y heterótrofos totales.

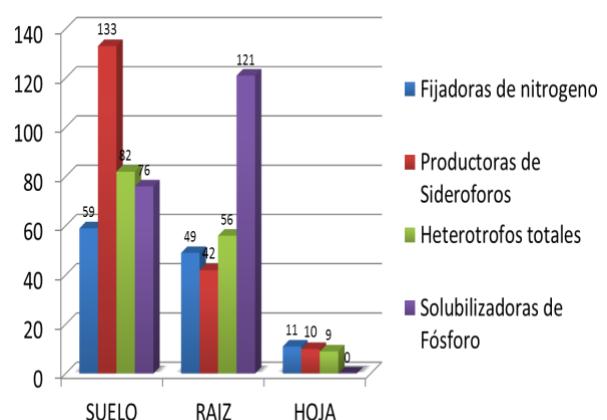


Figura 4. Concentración de derivados indólicos (incluyendo ácido indol acético) en el sobrenadante de cultivos bacterianos discontinuos. Número total de aislamientos bacterianos de suelo, raíces y hojas de *Guadua angustifolia* del Departamento de Cundinamarca, Colombia. Se presentan los grupos funcionales fijadores de nitrógeno, productores de sideróforos (pigmentos fluorescentes difusibles, solubilizadores de fósforo y heterótrofos totales.

