



“Latinoamérica unida protegiendo sus suelos”

XIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE LA CIENCIA DEL SUELO
XXIII CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

Mar del Plata, Argentina – 16 al 20 de abril de 2012
contribuciones@congresodesuelos.org.ar

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DE SUELO QUE SOLUBILIZAN FÓSFORO INORGÁNICO.

López, S. M. Y.¹; Pastorino, G. N.^{1,2}; Malbran, I.³; Medina, R.³; Balatti*, P. A.^{1,2,3}.

¹ Instituto de Fisiología Vegetal – UNLP; ² Cátedra de Microbiología Agrícola - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP; ³ Centro de Investigaciones de Fitopatología – Universidad Nacional de La Plata.

* Autor de contacto: pbalatti@gmail.com; calle 113 y 61- CP1900- La Plata, Bs As, Argentina; 54-221-4236618 int 38

RESUMEN

El fósforo (P) es junto con el Nitrógeno (N) el nutriente que más frecuentemente limita el crecimiento de los cultivos pero, a diferencia del N, la atmósfera no es una fuente del mismo para los microorganismos. Sin embargo, en muchos casos el P si bien se encuentra en el suelo no está disponible para las plantas, es decir no se encuentra formando parte de la solución del suelo. En este sentido, los microorganismos del suelo cumplen un rol clave en la dinámica del P y la transformación del mismo en formas solubles disponibles para las plantas. Los microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR) lo hacen a través de diversos mecanismos como por ejemplo la producción de ácido Indolacético (AIA) y sideróforos. El AIA es una hormona vegetal que se cree inhibe la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de los hongos patógenos. Los sideróforos bacterianos secuestran el hierro de la rizosfera, volviéndolo limitante del crecimiento especialmente en suelos neutros y alcalinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la solubilización del P inorgánico, la producción de AIA y sideróforos y el efecto de estos procesos en la actividad antifúngica. Los microorganismos aislados de los suelos se identificaron como *Enterobacter sakasaki* (GP 6 y 8), *E. agglomerans* (GP7), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *P. cichori* (GP2), *P. corrugata* (GP3) y *Kluyvera cryocrescens* (GP9). Estos microorganismos solubilizaron P del suelo pero además sintetizaron AIA y sideróforos, cada aislamiento en distinta cantidad. Además se observó que algunos de estos aislamientos inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos. Si bien la capacidad de producción de AIA y de sideróforos contribuye a la capacidad bioncontroladora de estas bacterias, otros mecanismos serían los que determinan la capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como Fusarium.

PALABRAS CLAVE

Solubilización - fósforo; Actividad antifúngica; Biofertilizantes.

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es uno de los nutrientes que más frecuentemente limita el rendimiento de los cultivos. El P, es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, constituyendo un 0,2% del peso seco de las plantas (Aadarsh, 2011). Si bien se puede encontrar en altas concentraciones en el suelo, puede no estar disponible para las plantas, situación que suele ocurrir en suelos fertilizados con 5-40 kg P/ha, donde el P es complejado como un mineral insoluble.

Se han propuesto dos mecanismos a través de los cuales el P insoluble del suelo se convierte en formas solubles disponibles para la planta. Uno es la excreción de ácidos por las raíces de las plantas y el otro es la solubilización que resulta de la actividad de microorganismos como las bacterias, actinomicetes y hongos.

Se han descrito varios géneros bacterianos con capacidad de solubilizar P, entre ellos *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium* y *Erwinia* (Illmer, 1992; Halder, 1993; Villegas, 2002). Estas bacterias suelen encontrarse en alto número en el rizoplasma de las raíces de las plantas, lo que probablemente esté relacionado con la alta demanda de P en el suelo que rodea a la raíz. Si bien la mayoría los organismos solubilizadores de P excretan ácidos orgánicos al medio, Sperber, 1958; Kucey, 1983 no encontraron correlación entre la producción de ácido (pH del medio) y la solubilización de PO_4 .

Los microorganismos promotores del crecimiento, suelen tener también otros mecanismos a través de los cuales promueven el crecimiento como p. ej. la producción de AIA y de sideróforos, moléculas que sean encontrado en los microorganismos solubilizadores de P (Vassilev, 2006). El AIA es una auxina reguladora de crecimiento, que estaría involucrada en la inhibición de la germinación de esporas y del crecimiento del micelio de hongos patógenos (Parra Gonzalez, 2009). Las bacterias productoras de sideróforos promueven indirectamente el crecimiento de la planta, porque secuestran el hierro de la rizósfera, especialmente en suelos neutros y alcalinos, lo que genera una limitación en la disponibilidad del hierro que limita el crecimiento del patógeno (Alexander, 1991; Subba Rao, 1999).

En nuestro laboratorio comenzamos estudios con bacterias solubilizadoras de P con el fin de entender las bases del proceso de solubilización y para producir fertilizantes biológicos. Aquí se describen los aislamientos de bacterias de diferentes géneros, entre ellas *Kluyvera spp.* Todos estos organismos comparten el mecanismo de solubilización de P, que es la producción de ácidos orgánicos. Además, se encontró que independientemente de la planta de origen, los exudados inducen el crecimiento bacteriano pero no regulan la actividad de solubilización, que es además afectada por el medio de cultivo.

Por ello el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad de los organismos solubilizadores de P para producir AIA y sideróforos y controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se cultivaron los aislamientos en medio Tris-YMRT, enriquecido con 0.3 mM de triptofano (Minamisawa, 1991). El AIA se determinó tal cual lo descrito por Ferreira and Hungria (2002).

La producción de sideróforos se determinó en medio conteniendo Cromo Azurol Agar (CAS) de acuerdo a lo descrito por Alexander and Zuberer (1991). Luego de incubar los cultivos a 26°C por 2 días se determinó la producción de sideróforos por la presencia de un halo naranja alrededor de las colonias.

Actividad antifúngica: Se realizaron dos experimentos *in vitro* en los que se evaluó el antagonismo, entre las bacterias aisladas del suelo, esto es las cepas GP2 (*P. cichori*), GP3 (*P. corrugata*), GP6 (*E. sakazakii*), GP7 (*E. agglomerans*), GP8 (*E. sakazakii*), GP9 (*K. cryocrescens*) y PF (*P. fluorescens*) y los hongos fitopatógenos *Fusarium graminearum* y *F.solani*. El primer experimento consistió en una evaluación de la actividad antifúngica, con este fin se sembraron estrías bacterianas en cruz y en los cuadrantes de las cajas definidos por esta cruz, se inocularon previo a las bacterias los hongos patógenos incluidos en el estudio. La actividad antifúngica y su relación con la producción de sideróforos se evaluó de acuerdo a lo propuesto por Filippi (1984), con algunas modificaciones. El medio de cultivo (Agar CAS) se dividió, en base a la siembra de bacterias en dos estrías en cruz, en cuatro cuadrantes. En el centro de cada uno se colocó un cilindro de 5 mm de diámetro de un cultivo de *F. graminearum* y *F.solani*. Las cajas se incubaron a 26°C y posteriormente, se midió el diámetro mayor de cada una de las colonias de *F. graminearum* y *F.solani* a los 2 y 7 días de incubación. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

El tratamiento control consistió en la siembra de cilindros con *F. graminearum* y *F. solani* sin bacterias en cruz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas que produjeron más AIA fueron *E. aglomerans* (GP7) y *K. cryocrescens* (GP9), que junto con *P. fluorescens* también produjeron mas sideróforos, lo que se visualizó por el tamaño del halo que rodeó a las colonias (Fig. 1 y 2). Cuando los aislamientos se sembraron junto con los hongos, se observó que algunas bacterias como *P. cichori* (GP2) y *P. corrugata* (GP3) produjeron bajos niveles de sideróforos mientras que *E. sakazakii* cepas GP 6 y 8 directamente no los produjeron.

El diámetro de las colonias de los hongos a las 48 hs de la incubación mostró que las cepas PF, GP2 y GP9 fueron las de mayor actividad antifúngica sobre *F. graminearum*. Mientras que todos los aislamientos bacterianos inhibieron el desarrollo de *F. solani*, excepto GP3 que no mostró actividad antifúngica. En parte esto fue debido a que el medio Agar CAS limitó el crecimiento de la cepa. La evaluación realizada a los 7 días de incubación mostró que todos los aislamientos excepto GP3, GP6 y GP7 inhibieron el crecimiento de *F. graminearum* (Fig. 3). En contraposición solo los GP9 y GP2 inhibieron significativamente el crecimiento de *F. solani*. El análisis del efecto de los aislamientos a las 48 hs y a los 7 días de incubación demuestra que o bien los aislamientos bacterianos pierden la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico o el hongo se adapta los inhibidores producidos por las bacterias.



Figura 1: evaluación cuantitativa de la producción bacteriana de AIA.



Figura 2: Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica en Agar nutritivo y producción de sideróforos en Agar CAS.

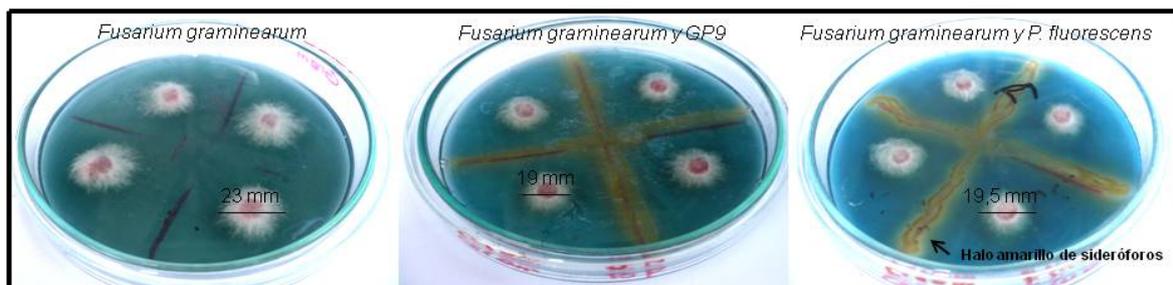


Figura 3: Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica en Agar CAS.

CONCLUSIONES

P. fluorescens (Pf), *K. cryocrescenes* (GP9) y *P. cichori* (GP2) inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos como *F. graminearum* y *F. solani*.

La actividad inhibitoria de estas bacterias estuvo asociada a la producción de AIA y sideróforos, si bien estos metabolitos no son los responsables directos de la actividad inhibitoria.

Las bacterias aisladas de los suelos son bacterias promotoras del crecimiento que no solo actúan solubilizando el P del suelo sino también a través de mecanismos como la producción de AIA y de sideróforos. Las características descritas de las bacterias promotoras del crecimiento confirmaron que las mismas pueden utilizarse para formular biofertilizantes para el crecimiento de las plantas. Entre los aislamientos mencionados las cepas Pf, GP9 y GP2 tienen actividad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo de subsidios de la Universidad Nacional de La Plata y la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

BIBLIOGRAFÍA

- Aadarsh,P; V Deepa; P Balakrishna Murthy; M. Deecaraman, R Sridhar and P Dhandapani. 2011. Insoluble phosphate solubilization by bacterial strains isolates from rice rhizosphere soils from southern India. *Int. J. soil Sci.* 6(2); 134-141.
- Alexander, DB and DA Zuberer, 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12; 39–45.
- Ferreira, MC and M Hungria. 2002. Recovery of soybean inoculants strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research* 79; 139-152.
- Filippi, C; G Bagnoli; G Treggi and G Picci. 1984. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *dianthii* (Prill and Del.) Snyd. and Hans. I. *In vitro* experiments and preliminary assays on Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Soil* 80; 119-125.
- Halder, AK; AK Mishra; P Bhattacharyya and PK Chakrabarty. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36; 81-92.
- Illmer, P and F Schinner . 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 24; 389-395.
- Kucey, RM. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63; 671-678.
- Minamisawa, K and K Fukai. 1991. Production of Indole-3-Acetic Acid by *Bradyrhizobium japonicum*: A correlation with genotype grouping and rhizobiotoxine production. *Plant Cell Physiol* 32(1); 1-9.
- Sperber, Joan I. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research* 9; 782-787.
- Subba Rao, N.S. 1999. *Soil Microbiology (Fourth Edition of Soil Microorganisms and Plant Growth)*. Science Publishers, Inc. USA.
- Vassilev, N; M Vassileva and I Nikolaeva. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 71;137-144.
- Villegas, J and JA Fortin. 2002. Phosphorous solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO₃⁻ as nitrogen source. *Can. J. Bot.* 80; 571–576.