

## AISLADOS NATIVOS CON POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO PARA MEJORAR LA AGRICULTURA

## STRAIN NATIVE WITH POTENTIAL IN THE ACETIC ACID PRODUCTION INDOL TO IMPROVE THE AGRICULTURE

## ISOLADOS NATIVOS COM POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO PARA MELHORAR A AGRICULTURA

CECILIA LARA<sup>1\*</sup>, LUIS OVIEDO<sup>2</sup>, ARNULFO ALEMÁN<sup>3</sup>

### PALABRAS CLAVE:

Azotobacter sp, Azospirillum sp, auxina: AIA, Reactivo de Salkowski.

### KEY WORDS:

Azotobacter sp, Azospirillum sp, auxin: AIA, Reagent of Salkowski.

### PALAVRAS CHAVE:

Azotobacter sp, Azospirillum sp, auxina: AIA, Reactivo de Salkowski

### RESUMEN

*En la presente investigación se aislaron 90 microorganismos de los géneros Azotobacter sp y Azospirillum sp, a partir de suelos de la rizosfera de cultivos de plátano, maíz, pastos, yuca, algodón y rastrojos (áreas sin cultivar) de la Zona del Sinú Medio en el Departamento de Córdoba (Colombia). Las poblaciones fueron evaluadas en la producción del Ácido IndolAcético (AIA) en presencia de triptófano obteniéndose un rango de concentración de 3.0 a 45.0 ppm; la determinación se realizó por técnica colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowski. La técnica fue modificada, adaptada y estandarizada. Se encontró que un aislado del género Azotobacter hallado en zonas de rastrojos produjo la mayor concentración de la auxina: 44,726 ppm.*

### ABSTRACT

*In the present investigation 90 microorganisms of the Azotobacter sp and Azospirillum sp strains were isolated, from grounds of the rizósfera of cultures of banana, maize, grass, yucca, cotton and field of stubble (zones without cultivating) of the Zone of the Sinu in the Department of Cordoba. (Colombia). The populations were evaluated in presence of Tryptophan and the production of IndolAcético Acid (AIA) was obtained a ranging from 3.0 to 45.0 ppm; the determination was realised by colorimétric technique using the reagent of Salkowski. The technique was modified, adapted and standardized. Once was that isolated of the Azotobacter starin found in zones*

Recibido para evaluación: 26 de Marzo de 2010. Aprobado para publicación: 30 de Enero de 2011

1\* Ph.D. Química. Laboratorio de Biotecnología. GRUBIODEQ. Universidad de Córdoba: lara\_mantilla\_cecilia@hotmail.com.

2 M.Sc. Laboratorio de Biotecnología. GRUBIODEQ. Universidad de Córdoba.

3 M.Sc. Laboratorio de Biotecnología. GRUBIODEQ. Universidad de Córdoba.

*of left-overs concentrated the greater mass artillery fire of the auxin: 44,726 ppm. The strain of the Azotobacter from of zones without cultivating exhibiting highest IAA production: 44,726 ppm*

## RESUMO

*Na presente investigação isolaram-se 90 microorganismos dos géneros Azotobacter sp e Azospirillum sp, a partir de solos da rizosfera de cultivos de plátano, maiz, pastos, yuca, algodón e rastrojos (áreas sem cultivar) da Zona do Sinú Médio no Departamento de Córdoba (Colômbia). As populações foram avaliadas na produção do Ácido IndolAcético (AIA) em presença de triptófano obtendo-se um rango de concentração de 3.0 a 45.0 ppm; a determinação realizou-se por técnica colorimétrica utilizando o reactivo de Salkowski. A técnica foi modificada, adaptada e estandarizada. Encontrou-se que um isolado do género Azotobacter achado em zonas de rastrojos produziu a maior concentração da auxina: 44,726 ppm.*

## INTRODUCCIÓN

El Departamento de Córdoba es considerado la capital ganadera de Colombia y la alimentación para los animales se basa principalmente en las especies forrajeras existentes en la región como la gramínea *Dichanthium aristatum* (Angleton). Las áreas de cultivo de estas pasturas, se ven sometidas a un uso irracional de agroquímicos y de alta mecanización, lo cual influye en la desestabilización ecológica del suelo afectando negativamente la fertilidad y limitando los nutrientes disponibles para las plantas.

El abuso de productos fertilizantes para aumentar la productividad de las pasturas, ha ocasionado un desequilibrio de la microbiota nativa que cumple con funciones importantes provocando bajos rendimientos y aumento en los costos para el agricultor y el ganadero. Una alternativa para promover el crecimiento rápido de raíces y tallos es el uso de inoculantes microbianos (biofertilizantes) que contribuyen a la recuperación de las poblaciones existentes en el suelo y con ello a mejorar la fertilidad de los mismos.

Entre los microorganismos, las bacterias tienen especial importancia en la relación suelo-planta y son responsables del incremento o disminución en el suministro de nutrientes como también en la producción de factores de crecimiento (fitohormonas); las bacterias pertenecientes a los géneros: *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp, *Pseudomonas* sp, *Xantomonas* sp, *Enterobacter* sp, *Arthrobacter* sp, *Bacillus subtilis*, se destacan por su potencial como biofertilizantes debido a que son capaces de producir sustancias promotoras de crecimiento

vegetal, que inciden grandemente en el rendimiento y en la calidad de los cultivos [1,2,3,4,5].

Los estudios realizados con microorganismos de los géneros *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp han demostrado que estas poblaciones además de fijar nitrógeno en forma asimbiótica, también segregan sustancias promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), las cuales benefician a la planta de una forma multidimensional [3, 6, 7]. Las hormonas promotoras del crecimiento vegetal, como lo es la auxina: ácido Indol Acético (AIA) induce la deformación y el aumento de pelos radiculares, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos [8, 9,10]. Se ha establecido que las rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal (plant-growth promoting rhizobacteria, PGPR), juegan un papel primordial en los cultivos permitiendo disminuir la utilización de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento, acortar ciclos y por consiguiente, reducir la contaminación ambiental.

Las bacterias representan una alternativa para mejorar el aporte nutricional de las plantas; dentro de los efectos benéficos se destacan la secreción de reguladores de crecimiento de plantas como auxinas mejorando los procesos de germinación de semillas, nutrición, desarrollo de raíces etc. En este sentido el objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción AIA a partir de aislados de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp nativos de la zona San Carlos y San Pelayo ubicados en el Valle del Sinú medio del departamento de Córdoba para hallar cepas eficientes en la producción de la fitohormona, que posteriormente podrán ser utilizados como biofertilizantes para mejorar la productividad de los pastos.

## MÉTODO

### Sitios de muestreo

El muestreo se realizó en los municipios San Carlos, y San Pelayo (Zona agrícola. Valle del Sinú Medio. Departamento de Córdoba. Colombia) Esta región posee las siguientes características: altura promedio 20 msnm, temperatura 28°C, precipitación 1200-1300 mm, humedad relativa 80-90%, ecológicamente la zona corresponde a la denominación bosque seco tropical. Se escogieron al azar lotes sembrados con cultivos de plátano, maíz, algodón y pastos; además, zonas sin cultivar (rastros).

### Toma de la muestra

En cada lote de cultivo y rastrojo se efectuó un recorrido en zig-zag abarcando la máxima extensión; en cada uno de los sitios de muestreo se tomó una cantidad de suelo de los primeros 15 cms de la superficie de la rizósfera. Al finalizar el recorrido se hizo una mezcla de todas las muestras tomadas por lote y se realizó un cuarteo para obtener 1000 g de suelo representativo de cada cultivo y de rastrojo. Las muestras estuvieron constituidas por raíces y suelo adheridas a ellas.

### Aislamiento e identificación de los microorganismos nativos

Una vez colectadas las muestras de suelos, se determinó el pH en relación 2:1; luego se pesó un gramo de la muestra y se diluyó en 99 ml de agua. Se realizaron diluciones seriadas de 1:10 y las dos últimas fueron sembradas en caja petri con medios apropiados y fueron incubadas a una temperatura de 28 ° C durante 3 días; después de este tiempo se revisaron las cajas petri y se observaron las colonias típicas [7, 11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. También se realizaron siembras de muestras directas [19]. Los ensayos se efectuaron por triplicados.

### Se utilizaron medios líquidos, sólidos y semisólidos:

- Género *Azotobacter* spp: Medios utilizados: Burk's y Jensen's
- Género *Azospirillum* spp: Medios utilizados: Burk's, NFB -azul de bromo timol y NFB -rojo congo.

La identificación de los microorganismos a nivel de género se llevo a cabo mediante observaciones macroscópicas, microscópicas con coloración y pruebas bioquímicas examinados de acuerdo a los métodos descritos en el manual de Bergey's [13, 20]. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### Cuantificación química de la auxina: ácido indol acético (AIA)

Se utilizó el medio de cultivo líquido, Burk's libre de nitrógeno, preparado a base de glucosa como fuente de carbono, sales minerales y agua destilada, tal como lo describe Park (2005) [15]. El pH fue ajustado a un valor de 6,8, y luego se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. La determinación de la producción del ácido Indol Acético se llevo a cabo por método colorimétrico utilizando el reactivo de Salkowski preparado a partir de cloruro férrico en ácido sulfúrico [18, 21]. Se utilizó un equipo Espectrofotómetro Lambda 11. La técnica fue modificada adaptada y estandarizada; luego de múltiples ensayos se escogió como mejor longitud de onda de trabajo 527,9 nm y un rango de 1.9 hasta 45,00 ppm teniendo en cuenta la producción de la auxina por los aislados. Ensayos por triplicado.

El procedimiento fue el siguiente: los microorganismos fueron inoculados en 25 ml del medio líquido Burk's; seguidamente se agregó L- triptófano (100 ppm) para inducir a la producción del AIA y se colocó en un Shaker con agitación constante a 120 rpm y a una temperatura de 30°C durante 72 horas en la oscuridad. Al finalizar este proceso se centrifugo alícuotas de 10 ml a 4000 rpm durante 20 min. En un tubo de ensayo se tomaron 4 ml del sobrenadante y se les adiciónó 2. 0 ml de reactivo Salkowski (relación 2:1) a cada muestra; el periodo de revelado fue de 30 min. Luego se leyó la absorbancia en el Espectrofotómetro Lambda 11 a una longitud de onda de 527,9 nm. Ensayos por triplicado.

## RESULTADOS

En la determinación de la auxina, se utilizó un medio de cultivo al cual se le agregó triptófano para inducir a la producción de ésta; numerosos estudios han demostrado que el ácido Indol acético es sintetizado a partir del triptófano y el proceso es llevado a cabo por microorganismos a través de una conversión oxidativa. [22,

23]. El reactivo de Salkowski empleado en el método colorimétrico permite la oxidación de los compuestos indólicos por sales férricas [24]; cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso dependiendo de la concentración del ácido indol acético presente. En la literatura existen numerosas formas de preparar el reactivo de Salkowski para detectar compuestos indólicos entre ellos el AIA producidos por bacterias; unas preparaciones utilizan ácido sulfúrico otras ácido perclórico. Las relaciones de reactivo-muestra también han sido variadas (1:1; 1:4, 2:1; 1:5; 1:1 y otras) para evaluar la sensibilidad de la prueba [14, 25, 26, 27]; en la presente investigación se preparó el reactivo de Salkowski con ácido sulfúrico y se probó a diferentes relaciones estableciéndose la 2:1 como la de mejor sensibilidad para la determinación de las concentraciones.

La tabla 1 y tabla 2 muestran los resultados obtenidos en la producción de la auxina de 45 microorganismos

Tabla 1. Concentración de Acido Indol Acético producidos por los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp aislados de suelos del municipio de San Carlos.

Géneros	Código	Concentración de AIA (ppm)
<i>Azotobacter</i> spp	A14*	44,276
	A15	17,964
	A16	26,987
	A17	29,920
	A18	3,431
	A19	31,520
	A20	31,164
	A21	3,653
	A22	3,387
	A23	3,431
	A24	3,831
	A25	3,342
	A26	3,387
	A27	22,187
<i>Azospirillum</i> spp	A1	3,653
	A2	3,609
	A3	2,853
	A4	3,564
	A5	27,120
	A6	26,142
	A7	3,076
	A8	3,520
	A9	3,253
	A10	6,720
	A11	4,987
	A12	6,087

Tabla 2. Concentración de Acido Indol Acético producidos por los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp aislados de suelos del municipio de San Pelayo.

Géneros	Código	Concentración de AIA (ppm)
<i>Azotobacter</i> spp	S4,1BL	3,342
	S4,1Az	4,453
	S4,2 am	3,920
	S4,2 O	4,720
	S4,2	3,431
	S,2az	5,920
	S,1N	39,342
	S3,2	37,209
	S6,2AM	29,787
	S6,0	11,342
	S6,2	17,298
	S7,1P	3,564
	S7,1az	6,178
<i>Azospirillum</i> spp	S7,1P	8,587
	S1,1BL	11,698
	S2,1	23,209
	S4,1PAM2	3,431
	S4,1PAM1	29,653
	S4,1AM	3,787

de los 90 evaluados de las regiones de San Carlos y San Pelayo.

Todos las poblaciones evaluadas produjeron AIA inducido por triptófano en el rango de 3,0 a 45 ppm; los resultados encontrados en este trabajo sobre la producción del AIA y comparados con los obtenidos en la zona de Espinal (Tolima, Colombia) [14], utilizando microorganismos nativos de igual género, muestran un mayor rango de producción de auxina: 3,5 a 32,2 ppm (mg/L) [16], frente a 3,00 a 45,0 ppm (mg/L) en nuestro trabajo; es decir los microorganismos nativos de la Zona del Valle del Sinú Medio se extienden en un mayor rango de producción de AIA. En los trabajos realizados sobre la microbiota nativa de la caña de azúcar [28] (Cuba), se evaluaron aislados provenientes del interior de este cultivo, en la producción del Ácido Indol Acético; se obtuvo como resultado que 6 de ellos, produjeron la auxina en un rango de valores entre 1,7 y 2,5 ( $\mu\text{g/mL}$ ). En esta investigación no se reporta evaluación de AIA con los géneros estudiados en el presente estudio.

En la tabla 3 se muestra la producción de AIA producidas por las bacterias de los géneros *Azotobacter* spp y *Azospirillum* spp aislados de las dos regiones;

realizando una comparación se establece que las cepas más eficientes fueron aisladas de rastrojo y por género correspondieron a: a) tres bacterias *Azotobacter* sp: cepa A14 de la zona de San Carlos con el mayor valor en la producción de AIA, 44,276 ppm; cepas, S,N1y S3,2 de la zona de San Pelayo, 39, 342 ppm y 37,209 ppm respectivamente; b) una bacteria *Azospirillum* spp: cepa S4,1PAM2 de la zona de San Pelayo (29,653 pm).

Los mejores resultados en la producción de la auxina se obtuvieron a partir de aislados provenientes de rastrojos; dentro de las posibles razones se debe tener en cuenta que la alta fertilización utilizada en la producción de las cosechas en la región de Córdoba, pueden estar afectando negativamente el mecanismo de secreción de la auxina que llevan a cabo los microorganismos aislados de la zona en estudio.

La tabla 3 denota que existe similitud en el número de *Azotobacter* sp encontrados en las regiones estudiadas al igual que en los valores más altos de producción de AIA; para el caso de *Azospirillum* sp se observa mayor número en la zona de San Carlos comparada con San Pelayo, pero el valor más alto en AIA se registró en San Pelayo. Se encontró además mayor producción de Ácido Indol Acético para el género *Azotobacter* sp en comparación con *Azospirillum* sp. El suelo de San Carlos se caracteriza por ser de condiciones livianas, contrario a San Pelayo cuya textura es de suelos arcillosos; esto sugiere que las características de suelo de San Pelayo son menos favorables para el desarrollo y crecimiento de la géneros *Azospirillum* sp.

Es importante anotar que aunque las investigaciones sobre evaluación microbiana en la producción de AIA arroje valores alto o bajos si se comparan entre si, está demostrado que bajas concentraciones de fitohormona son capaces de estimular el desarrollo vegetal y altas concentraciones inhiben y reducen la zona de alargamiento [28, 29]; teniendo en cuenta que los microorganismos nativos están adaptados a condiciones y ambientes propios, sólo realizando bioensayos "In vitro" se podrá encontrar la dosis adecuada y comprobar el efecto ejercido sobre los cultivos a aplicar.

El ácido Indol Acético (AIA) es la auxina más ampliamente distribuida en las plantas; los efectos demostrados en investigaciones llevadas a cabo, contemplan, entre otras, la elongación, aumento en la respiración celular, promoción del crecimiento en raíces o incre-

Tabla 3. Relación de géneros microbianos por región

Microorganismos	San Carlos Código	Concentración AIA (ppm)		San Pelayo Código
		San Carlos	San Pelayo	
<i>Azotobacter</i> sp	A14*	44,276	3,342	S4,1BL
	A15	17,964	4,453	S4,1Az
	A16	26,987	3,920	S4,2 am
	A17	29,920	4,720	S4,2 O
	A18	3,431	3,431	S4,2
	A19	31,520	5,920	S,2az
	A20	31,164	39,342	S,1N
	A21	3,653	37,209	S3,2
	A22	3,387	29,787	S6,2AM
	A23	3,431	11,342	S6,0
	A24	3,831	17,298	S6,2
	A25	3,342	3,564	S7,1
	A26	3,387	6,187	S7,1az
A27	22,187	8,587	S7,1P	
A28	3,164			
<i>Azospirillum</i> spp	A1	3,653	11,698	S1,1BL
	A2	3,609	23,209	S2,1
	A3	2,853	3,431	S4,1PAM2
	A4	3,564	29,653	S4,1PAM1
	A5	27,120	S4,1AM	3,787
	A6	26,142		
	A7	3,076		
	A8	3,520		
	A9	3,253		
	A10	6,720		
	A11	4,987		
	A12	6,087		

mento en la división celular, factores que favorecen el desarrollo vegetal.

Las aplicaciones de inoculantes microbianos (biofertilizantes) en los cultivos cada día van en aumento debido a que sustituya en parte o totalmente la utilización de fertilizantes para disminuir los problemas ambientales y aprovechar los productos que conserven los ecosistemas naturales. La utilización de microorganismos con potencial biofertilizante productores de AIA ha demostrado ser eficientes gracias a que pueden aumentar los rendimientos y la calidad de las cosechas; así lo han demostrados los trabajos en campo realizado en Colombia [30, 31] en los cuales se reporta rendimientos en pastos de un 80 % con respecto al testigo, utilizando biofertilizantes a partir de microorganismos nativos ya las condiciones propias de la zona.

Los resultados de esta investigación contribuyen al conocimiento de microorganismos autóctonos con potencial en la producción de la fitohormona, que a futuro pueden ser evaluados y utilizados como biofertilizante, para mejorar la productividad de los cultivos, especialmente pasturas, acorde con las necesidades del sector agropecuario de Córdoba, sustituyendo o minimizando la utilización de productos químicos. El uso de bacterias productoras de AIA a las pasturas de la región de Córdoba traería como beneficio un mejoramiento en la productividad a bajo costo y contribuiría a mejorar la fertilidad del suelo.

## CONCLUSIONES

La mayor producción de AIA se obtuvo de bacteria *Azotobacter A14\** aisladas de la Zona de San Carlos. Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron identificar microorganismos nativos de la zona agrícola del Valle del Sinú medio en el departamento de Córdoba, que presentan un gran potencial en la secreción de ácido Indol acético; la actividad y eficiencia de los microorganismos de vida libre de los géneros: *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*, que tienen la capacidad de producir sustancias promotoras de crecimiento (auxinas), es de gran interés debido a que representan un extraordinario potencial para la explotación agrícola y la actividad ganadera de la región.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad de Córdoba por financiar el presente proyecto de investigación.

## REFERENCIAS

- [1] GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria, *Can J. Microbiol.*, p. 41, 109-117. 1995.
- [2] BASHAN, Y. and HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiology advances (1990-1996), *Can.J. Microbiol.*, p. 43, 103-121. 1997.
- [3] MARTÍNEZ, M. *Microbiología de Suelos. Memorias I Seminario Cooperativa de Profesionales para el desarrollo de tecnología Ambiental LTDA. B/manga, Colombia, junio, 1999.*
- [4] AZCÓN-BIOETO, J. y TALÓN, M. *Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill. Madrid, 2000.*
- [5] VESSEY, J. K. Plant grown promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil.*, p. 255, 571-586. 2003.
- [6] ABASS, Z. and OKÓN, Y. Physiological properties of *Azotobacter paspali* in culture and rhizosphere, *Soil Biol and Biochemistry.*, 25 no., 8, p. 1061-1173. 1993.
- [7] AGUILAR, S; TOFINO, J. y SÁNCHEZ, M. Caracterización de dos cepas de *Azotobacter spp* y evaluación de su efectividad en semillas de tomates. *ASCOLFI INFORMA*, 22(2), p. 30-34. 1995.
- [8] OKON, Y. and VANDERLEYDEN, J. Root associated *Azospirillum* species can stimulate plants, *ASM New*, p. 63, 366-370. 1997.
- [9] PEREYRA, M; ZALAZAR, A. y BARASSI, C. Identificación de *Azospirillum brasilense* BR 11005 a través del perfil de distribución de sus ácidos grasos. Unidad Integrada FCA (UNMP)-EEA. Buenos Aires. e-mail: biomolbalc@balcarce.inta.gov.ar [citado Febrero 2002].
- [10] DOBBELAERE, S; VANDERLEYDEN, J. and OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere, *Critical Reviews Plant Sciences*, 22, no., 2, p. 107-149. 2003.
- [11] FETT, W., OSMAN, S. and DUNN, M. Auxin production by plant-pathogenic pathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 53, 1839-1845, 1987.
- [12] DOBEREINER, J., BALDANI, V, and Baldani, JI. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas, *Brasilia-DF: EMBRAPA-SPI.* 1995.
- [13] BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N, E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th de Baltimore: Williams and Wilkins Company, p. 135-136. 1994.
- [14] BERNAL, J., VALENCIA P. and GUINETH, S. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*, Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología.*, p. 42, 171-176. 2000.
- [15] PARK, M., CHUNGWOO, K., YANGA, J., HYOUNG-SEOK, L., WANSIK, S., SEUNGHWAN, K. and TONGMIN, S. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Micro-*

