

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE BUCHONES DE AGUA *Eichhornia crassipes* UBICADOS EN LA UNIVERSIDAD DE SANTANDER

Charris Silvia^{1*}, Parada Viviana^{2*}, Rivera Karen^{3*}, Acevedo Carlos^{4**}
Correspondencia: 1.silviacharris12331011@gmail.com 2. viviparada.08@gmail.com. 3. karen.riverarivera12331027@gmail.com

*Estudiantes de Microbiología Industrial, Universidad de Santander, Bucaramanga, Santander – Colombia.

** Profesor Ecología Microbiana

Resumen

Se realizó el aislamiento y la caracterización de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en las raíces de los Buchones de Agua, extraídas de un pequeño lago de la Universidad de Santander. Para el aislamiento de estas bacterias, se tomaron las raíces del Buchón y se les realizó siembra masiva utilizando una dilución madre la cuál contenía 10 gramos de raíces y 90mL de agua destilada, en los diferentes medios de cultivos utilizados para éste tipo de bacterias como, Agar Ashby, Agar Rojo Congo y Agar Levadura Manitol (LM). Las cepas obtenidas del aislamiento se caracterizaron de acuerdo a sus características morfológicas tanto macroscópicas, como microscópicas. Finalmente se determinó que las cepas aisladas, pertenecían presuntivamente a los géneros *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.* y *Rhizobium sp.*, las cuales pueden ser aprovechadas en la agricultura para obtener un mejor crecimiento en las plantas a las que se le deseen inocular.

INTRODUCCIÓN

Eichhornia crassipes se conoce con el nombre de Buchón, Jacinto o Lirio de Agua. De la Familia *Pontederiaceae* (Petrell y Bagnall, 1991). Puede vivir en aguas duras o blandas con temperaturas de 15 a 30°C, rangos de pH amplios, de 5.5 a 9.0, e iluminación alta¹.

Una de las plantas acuáticas más ampliamente distribuidas en el trópico americano es el “Buchón de Agua” o “Lirio de Agua” (*Eichhornia crassipes*). Sus raíces son filamentosas, fibrosas y en ocasiones alcanzan hasta un metro de longitud. Fue descrita por primera vez en Brasil, pero se cree que es originaria de Puerto Rico (Weldon et al., 1973)².

Bajo temperaturas optimas de crecimiento, la biomasa del Jacinto de agua puede duplicarse en un mes por medio de reproducción vegetativa. Esta alta capacidad reproductiva provoca la formación de colonias densas flotando en el agua. Por consiguiente se reduce el

flujo de agua en los embalses, cantidad de oxígeno, navegación y crecimiento de otras plantas acuáticas. El tráfico de botes, corrientes de viento, olas, y flujo de agua son algunos factores que facilitan la diseminación del Jacinto de agua en cuerpos de agua conectados. Cuando los cuerpos de agua no están conectados geográficamente, el Jacinto de agua puede colonizar por medio de transporte de botes e inundaciones³.

La planta obtiene del agua todos los nutrientes que requiere para su metabolismo, siendo el nitrógeno y el fósforo, junto a los iones de diferentes microelementos, los más importantes. Posee un sistema de raíces, que pueden tener microorganismos asociados a ellas que favorece la acción depuradora de la planta, siendo capaz de retener en sus tejidos una gran variedad de metales pesados.

La Fijación Biológica del Nitrógeno o diazotrófica es un proceso importante en ecosistemas acuáticos y terrestres que no

cuenten con fertilización química, siendo éste el principal aporte de nitrógeno para estos ambientes (Izquierdo et al. 2006).

Es el proceso de reducción del N_2 a NH_4^+ , siendo éste una molécula asimilable para los organismos (Deslippe y Egger 2006) una pequeña parte del N_2 puede ser fijada por procesos fisicoquímicos como en tormentas eléctricas pero la mayoría del nitrógeno se reduce de forma biológica (Postgate, 1982).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo del Buchón de Agua

La toma de muestra se realizó entre el 16 y el 23 de marzo de 2014; en un pequeño lago ubicado en la Universidad de Santander.

El criterio de selección de los Buchones fue su estado de floración y su ubicación dentro del lago. Se escogieron 3 Buchones, uno de ellos en estado de floración y los otros de apariencia un poco más joven.

Procesamiento de las raíces

Del Buchón en estado de Floración se tomaron 10 gramos de las raíces, posteriormente se les realizó desinfección con alcohol con agitación durante 1 minuto, agua destilada durante 30 segundos; éste proceso se realizó 2 veces de igual forma. Ya teniendo las raíces desinfectadas se diluyeron en 90mL de agua destilada y se agitó, durante 15 minutos para homogenizar la muestra.

Tratamiento de la Dilución Madre

La Dilución Madre que contenía 10 gramos de raíces y 90mL de agua destilada, se utilizó para realizar las siembras en los diferentes medios de cultivos selectivos para Bacterias Fijadoras de Nitrógeno.

Preparación de Medios de Cultivo

Todos los medios que se prepararon, no contenía fuente de nitrógeno, pues las bacterias que se pretendían aislar eran las encargadas de aportar éste compuesto.

Para el aislamiento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno, pertenecientes al género *Azotobacter*, se preparó, Agar Ashby.

Para los géneros *Azospirillum*, se preparó el Agar Rojo Congo. Y para géneros de *Rhizobium*, Agar Levadura Manitol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar los aislamientos en la rizósfera del Jacinto o Buchón de agua, utilizando medios de cultivos, selectivos para el crecimiento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno se puede sospechar de la presencia de los siguientes géneros *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.* y *Rhizobium sp.*. Para estar totalmente seguros de la presencia de dichas bacterias, una caracterización macroscópica y microscópica es más confiable, pues la caracterización macroscópica permite la diferenciación entre otras bacterias por su aspecto y la microscópica al utilizar una Tinción de Gram se podría diferenciar de otros géneros.

Como resultado de la primera siembra, y para obtener colonias puras, se realizó un segundo repique, de la colonia más característica y que cumpliera con los requisitos que anteriormente se habían averiguado para cada género de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno.

En Agar Ashby, se encontró presuntamente *Azotobacter sp.*

Caracterización macroscópica de las colonias en Agar Ashby (Figura 1):

Agar Ashby es un medio de cultivo selectivo que se utiliza para el cultivo de especies de *Azotobacter sp.*, que pueden utilizar el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno ya que este medio no

lo contiene. Las colonias que se pudieron observar presentaban las siguientes características, medianas, translúcidas, convexas y de bordes irregulares, con un aspecto viscoso.



Figura 1. Macroscopia de *Azotobacter* sp., en agar Ashby.

Caracterización microscópica, (Figura 2): A las colonias observadas en Agar Ashby se les realizó Tinción Gram y se lograron observar al microscopio, en el objetivo de 100X, Bacilos Cortos, Gram Negativos.

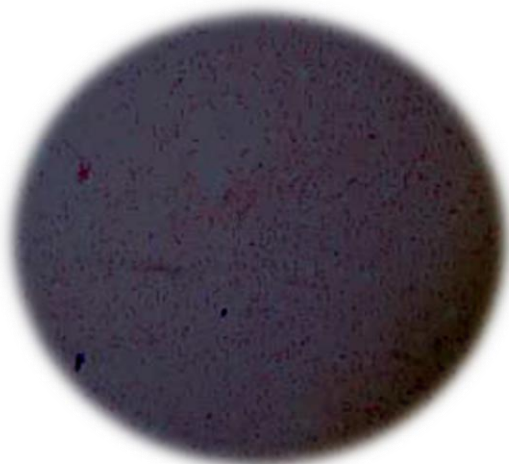


Figura 2. Microscopia de *Azotobacter* sp., en objetivo de 100X.

Éstas características que presentaron las colonias y la descripción macroscópica, confirmó aún más la posibilidad de que el

género aislado utilizando Agar Ashby, fue *Azotobacter* sp.

Este género es el más estudiado y se ha encontrado en numerosos ambientes como suelos, agua y hojas en todo el mundo e inclusive se conocen Inoculantes producidos comercialmente en Rusia y en Cuba, también son comunes en la agricultura como una forma de hacerle frente a la carencia de fertilizantes nitrogenados⁴.

Azotobacter es un género de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno de vida libre, llamadas también diazotróficas debido a que dos moles de amonio producen un mol de nitrógeno gaseoso (*Philippot & Germon 2005*). El potencial natural de *Azotobacter* en la nutrición de la planta y en la fertilidad del suelo es recomendable utilizarla en la agricultura (*Mrkovacki & Milic 2001*).

Dentro de estos biofertilizantes se encuentran las bacterias del género *Azotobacter*, las cuales están presentes en el suelo y al encontrarse en elevadas poblaciones en el agroecosistema se asocian al sistema radical de algunas especies vegetales y ocasionan una aceleración del desarrollo y un aumento del rendimiento en los cultivos, debido fundamentalmente a su capacidad de sintetizar sustancias biológicamente activas como auxinas, citoquininas, giberelinas, aminoácidos y vitaminas (*Vancura, 1961; Brown et al., 1968; Dibut, 1988 y Martínez et al., 1997*).

Utilizando el medio Rojo Congo, se sospechó de la presencia de bacterias pertenecientes al género *Azospirillum*, comparando las características encontradas en otros trabajos que pretendían aislar Bacterias Fijadoras de Nitrógeno.

Una de las características fenotípicas más ampliamente utilizadas como criterio de reconocimiento tentativo del género

Azospirillum es el color rojo escarlata que toman las colonias que toman las colonias al crecer en un medio adicionando el Colorante Rojo Congo⁵.

Teniendo en cuenta lo anterior, en Agar Rojo Congo, se observaron colonias de tamaño mediano a pequeño, presentan color rojo escarlata un poco opaco, con elevación convexa, superficie lisa y bordes regulares (Figura 3, encerradas en un círculo azul), éstas características son representativas del género *Azospirillum* sp. Las demás colonias, presentaban una tonalidad de rosada, por lo tanto, no se tuvieron en cuenta para realizar una caracterización.



Figura 3. Macroscopia de *Azospirillum* sp., en agar Rojo Congo.

Entre las especies que se conocen de *Azospirillum*, se dice que *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*, son capaces de tomar un color rojo escarlata que permite la diferenciación de otros géneros bacterianos⁶. A las colonias encontradas en el medio Rojo Congo, también se les realizó catalasa, pero el resultado fue negativo, a pesar de que la mayoría de las cepas de éste género, son catalasa positiva. Sin embargo, la colonia de catalasa negativa puede asociarse a las características con la cepa tipo *A. brasilense*⁷.

Caracterización microscópica (Figura 4): A las colonias rojo escarlata, se les realizó Tinción Gram y se observaron al microscopio con el objetivo de 40X, bacilos medianos, Gram Negativos, con extremos puntiagudos y formando largas cadenas.

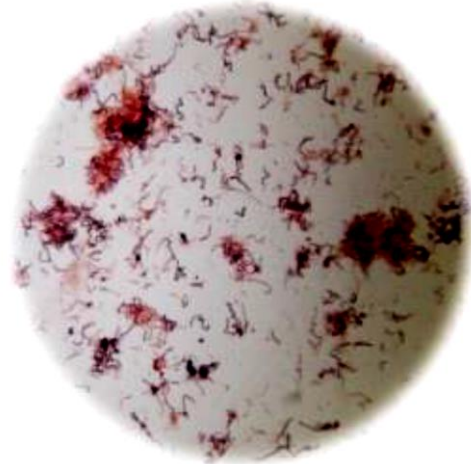


Figura 4. Microscopia de *Azospirillum* sp., en objetivo de 40X.

Dentro de las aplicaciones se encontró que *Azospirillum brasilense*, produce una hormona de crecimiento vegetal que al aplicarse a los campos, se asocia a la raíz de la planta e incide en el aumento de volumen de la misma, fenómeno que permite una mejor asimilación de los nutrientes del suelo, puede inhibir a los patógenos de raíz, fija el nitrógeno atmosférico (mismo que sirve como fertilizante) y permite solubilizar fósforo⁸.

Algunas compañías en diferentes países han registrado inoculantes de *Azospirillum* para maíz y otros cultivos⁹. Burdman y col. refieren que en Sudáfrica se lleva a cabo la producción de inoculantes a base de *Azospirillum* para 150,000 hectáreas de maíz y 12,000 de trigo¹⁰.

En Agar Levadura Manitol (LM), se aísla presuntivamente el género *Rhizobium*, basándose en las características específicas que éste presenta.

El extracto de levadura sirve como una buena fuente de aminoácidos fácilmente disponibles. El manitol es la fuente de azúcar fermentable. El magnesio ofrece cationes esenciales para el crecimiento de rizobios. En éste medio se llevaron a cabo (4) repiques, las cuales presentaron características representativas de *Rhizobium sp.*

Características macroscópicas (Figura 5): Se observaron (2) colonias, que presentaban colores muy similares, eran de blanco a beige, A y B, eran colonias circulares, pequeñas, de forma regular, sin elevación y de aspecto un poco más compacto que el que presentaban las colonias C y D, pues su aspecto era mucoso, forma irregular y elevación convexa.

Sin embargo, las colonias típicas de *Rhizobium sp.*, se caracterizan por ser generalmente blancas o beige, circulares convexas, semitranslúcidas y mucilaginosas o mucoides en Agar Levadura Manitol¹¹.

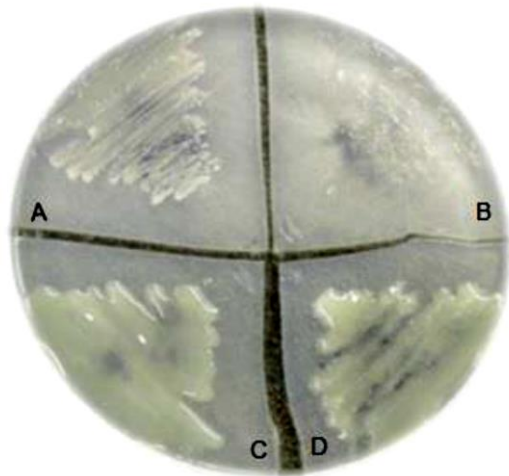


Figura 5. Macroscopia de cuatro colonias en agar Levadura Manitol.

Caracterización microscópica (Figura 6): Se les realizó Tinción Gram a las cuatro colonias crecidas en LM para poder descartar diferencias entre ellas. Se observó al microscopio, con el objetivo de

100X. Afortunadamente se encontraron las mismas características en las cuatro colonias, forma de Bacilos, Gram Negativos.

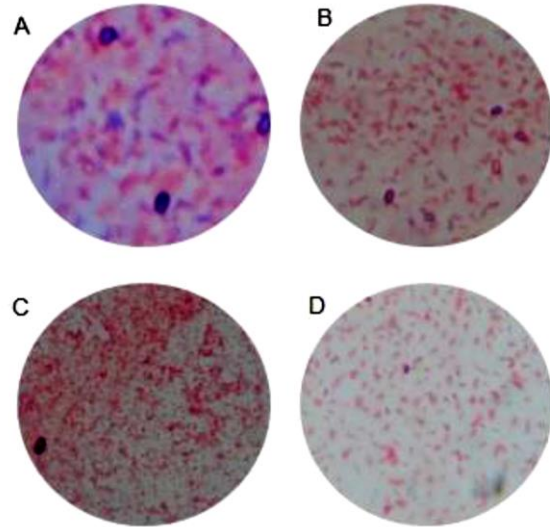


Figura 6. Microscopia de cuatro colonias aisladas en agar Levadura Manitol, vista en objetivo de 100X.

De acuerdo a las características observadas, y basándose en las características propuestas por literatura, podemos inferir que la cepa C y D, hacen referencia presuntivamente al género *Rhizobium*.

La inoculación con bacterias de *Rhizobium* al suelo o a las semillas la hizo por primera vez Voeleker en 1896, las bacterias fueron crecidas en agar y disueltas en agua. Éste género de bacterias, producen pectinasas y celulasas, los cuales son promotores de crecimiento que alteran la raíz¹².

En estudios realizadas recientemente, se ha demostrado la acción de endófito de *Rhizobium*, ésta invade inter e intracelularmente y penetra los tejidos extracelulares, en nuestro caso las raíces del Buchón de Agua. La entrada de las bacterias dentro de las raíces es un proceso activo mediados por enzimas (exogluconasas y endogluconasas) degradadoras de polímeros de la pared celular¹³.

La función de estas bacterias endófitas, promueven el crecimiento de las plantas, suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica del nitrógeno¹³.

CONCLUSIONES

El aislamiento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Buchones de Agua, fue exitoso, ya que al utilizar medios selectivos que permitieran el crecimiento de éstas bacterias, se puede determinar que los géneros aislados fueron *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*.

Las bacterias que se encuentran en la rizósfera de las plantas, sintetizan sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como, vitaminas y hormonas vegetales que intervienen directamente con el desarrollo de la planta.

Las Bacterias Fijadoras de Nitrógeno encontradas en los Buchones de Agua, a futuro pueden ser utilizadas en la estimulación del crecimiento de otras plantas, reemplazando los fertilizantes químicos.

El sistema de raíces que presenta el Buchón de Agua, aloja gran variedad de microorganismos, los cuales permiten que ésta planta sea beneficiosa en aguas contaminadas, cuidando su proliferación.

REFERENCIAS

1. Vanegas, M y Zapara, M. AISLAMIENTO DE LEVADURAS CAPACES DE PRODUCIR ALCOHOL A PARTIR DE MACROFITAS ACUÁTICAS EXTRAÍDAS MECÁNICAMENTE DE LA LAGUNA DE FÚQUENE.

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis408.pdf>

2. Pérez, G y Ramírez, J. FUNDAMENTOS DE LIMNOLOGÍA

NEOTROPICAL. Segunda Edición. Editorial Universidad de Antioquia. 2008. Página 309.

3. PLANTAS ACUÁTICAS EN LOS HUMEDALES DE BOGOTÁ. <http://humedalesbogota.com/2012/08/01/plantas-acuaticas-en-los-humedales-de-bogota/>

4. Sordó René (1997). Ingeniero Agrónomo de la Universidad de la Habana, con especialidad en Microbiología del Suelo.

5. Rodríguez-Cáceres, E. 1982. IMPROVED MEDIUM FOR ISOLATION OF AZOSPIRILLUM SPP. Appl. Environ. Microbiol. 44:990-991.

6. Caballero-Medallo, J. EL GÉNERO AZOSPIRILLUM. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Mor., México. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>

7. Pazos, M., Hernández, A., Paneque, M y Santander, J. L. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO *Azospirillum* AISLADAS DE DOS TIPOS DE SUELOS DE LA LOCALIDAD DE SAN NICOLÁS DE BARI. <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215152003.pdf>

8. BIOFERTILIZANTE PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS AGRÍCOLAS. <https://journalmex.wordpress.com/2009/03/02/biofertilizante-para-aumentar-la-produccion-de-plantas-agricolas/>

9. Itzigsohn, R., S. Burdman, Y. Okon, E. Zaady, R. Yonatan, and A. Perevolotsky. 2000. PLANT-GROWTH PROMOTION IN NATURAL PASTURES BY INOCULATION WITH AZSOPIRILLUM BRASILENSE UNDER SUBOPTIMAL

GROWTH CONDITIONS. Arid Soil Res. Rehab. 13:151-158.

10. Burdman, S., E. Jurkevitch, and Y. Okon. 2000. RECENT ADVANCES IN THE USE OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR) IN AGRICULTURE, p. 229- 250. En N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues (ed.), Microbial interactions in agriculture and forestry, vol. II. Science Publishers, Inc. Enfield (NH), USA.

11. Carranza Meléndez, C. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS de *Rhizobium leguminosarum*, biovar *phaseoli*, DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) CULTIVADO EN LOS DEPARTAMENTOS DE JUTIAPA Y CHIMALTENANGO.

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2236.pdf

12. CONCEPTOS BÁSICOS DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO. Capítulo 3. Página 131. http://www.bdigital.unal.edu.co/3666/2/8287520.1999_2.pdf

13. Perez, C. Alexander, Dr, Rojas, S. Johanna, M.Sc. Vale, M. Helson Dr. BIOLOGIA Y PERSPECTIVA DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A PLANTAS. http://www.recia.edu.co/documentos-recia/recia2/revisiones/1_arc_01.pdf

LINKS RECOMENDADOS

<http://www.cipav.org.co/pdf/red%20de%20agroforesteria/seminarios%20y%20congresos/Panama2010/Juan.Cubillos.pdf>

DETECCIÓN DE BACTERIAS BENÉFICAS EN SUELO CON BANANP (*Musa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran enano' Y SU POTENCIAL PARA INTEGRAR UN BIOFERTILIZANTE.

Y Córdova-Bautista, MC Rivera-Cruz, R Ferrera-Cerrato, JJ Obrador-Olán, V Córdova-Ávalos. <http://www.publicaciones.ujat.mx/publicaciones/uciencia/Diciembre2009/7-%20310.pdf>

Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas. González, M., Gandarilla, J. y Martínez, R. <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/tesis/index/assoc/HASH01ec.dir/doc.pdf>

CONCEPTOS BASICOS DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO. Capítulo 4. FIJACIÓN LIBRE DE NITRÓGENO, ASOCIATIVA Y PARAIMBIÓICA (ENDÓFITICA). Página 176. http://www.bdigital.unal.edu.co/3666/2/8287520.1999_2.pdf

Tao Wang, Julio Martínez Romero, Isabel López Lara. RHIZOBIUM Y SU DESTACADA SIMBIOSIS CON PLANTAS.

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN INOCULANTE CON BASE EN *Azospirillum brasilense* C16 , DIEGO MAURICIO RIVERA BOTÍA ,Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero de Producción Biotecnológica, 2008. <http://www.corpoica.org.co/smisional/archivos/tesis/1367tesisadr.pdf>

ESTANDARIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA MULTIPLICACION DE LA CEPA C50 DE *Rhizobium* sp. TRABAJO DE GRADO, DANIEL FERNANDO ROJAS TAPIAS.REQUISITO PARA GRADUARSE DE MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL.PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. 2008. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis212.pdf>

AISLAMIENTO DE CEPAS DE RHIZOBIUM SPP., ASOCIADOS A DOS LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN EL CENTRO BIOTECNOLÓGICO DEL CARIBE, Jorge L. Hernández¹, Juan G. Cubillos-Hinojosa^{2*}, Pablo E. Milian³. 2012.

<http://acimcolombia.net/unicesar/rcmt/ARTICULO6.pdf>

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE ARROZ CULTIVADAS EN DIFERENTES SUELOS, Gastón Rariz Molloa, Lucía Ferrandob, Ana Fernandez Scavinob, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Iguá 4225 Esq. Mataojo, Montevideo, Uruguay. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/26387/Documento_completo.pdf?sequence=1

MANUAL DE REDACCIÓN CIENTÍFICA José A. Mari Mutt Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico ,Mayagüez, Puerto Rico . <http://www.uco.es/servicios/informatica/windows/filemgr/download/ecolog/Cuaderno%20redaccion%20trabajo%20cc.pdf>