

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE *TSUKAMURELLA PAUROMETABOLA* C-924 Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL PROCESO

Autoría principal: Marieta Marín Bruzos¹

Otros autores: Jesús Mena, Idania Wong, Rolando Morán, Ramón Franco, Pavel Chavelis, Graciela García, Rosa Basulto, Armando Hernández, Liuven Veloz, Eulogio Pimentel, Alain Moreira y Sonia González Blanco

Colaboradores: Nemecio González, Ileana Sánchez, Diasmarys Salinas, Yamilka Ramírez, Licette León, Madelyn Sardiñas, Irian Mendoza, Sonia Casas, Carmen García, Idianis Saldivar, Marilín Domingo, Oscar Compte, Jesús Zamora, Eladio Salazar, Marianela García y Carlos Borroto

Laboratorio de Microbiología. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Circunvalación Norte y Avenida Finlay, Camagüey, Cuba. CP 70100.

Otra entidad participante: Estación Experimental de Suelos de Camagüey

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico: marieta.marin@cigb.edu.cu

MSc. Marieta Marín Bruzos (39%). Experimentos de actividad de la cepa en diferentes cultivos de interés económico. Experimentos de interacción con otros microorganismos biofertilizantes. Caracterización de las potencialidades como Promotor del crecimiento vegetal. Determinación de la producción de ácido indolacético, salubilización de fosfatos y exoenzimas líticas. Escritura y presentación de publicaciones arbitradas y presentación de trabajos en eventos.

Dr. Jesús Mena (15%). Aislamiento de la cepa. Experimentos de interacción con diferentes cultivos. Coordinación de experimentos y revisión de resultados y manuscritos de publicaciones. Escritura de patentes.

Dra. Idania Wong (15%). Experimentos de interacción de *T. paurometabola* C-924 con plantas. Determinación de la producción de proteasas. Escritura y revisión de publicaciones.

Dr. Rolando Morán (5%). Coordinación de experimentos y revisión de resultados y manuscritos de publicaciones. Escritura de patentes.

MSc. Ramón Franco (4%). Experimento de interacción con hongos micorrizógenos.

MSc. Pavel Chavelis (4%). Experimento de interacción con otros microorganismos con actividad biofertilizantes en cultivos de interés económico.

Tec. Rosa Basulto (4%). Preparación de medios de cultivo, cepas, fregado de cristalería. Personal de apoyo en diferentes experimentos.

Lic. Graciela García (3%). Experimentos de interacción de *T. paurometabola* C-924 con hongos micorrizógenos.

Lic. Liuven Veloz (3%). Experimento de interacción con hongos micorrizógenos.

Lic. Eulogio Pimentel (3%). Revisión y aprobación de publicaciones.

Dr. Armando Hernández (2%). Experimentos de determinación de amoniaco.

MSc. Alain Moreira (2%). Revisión de publicaciones, coordinación de ensayos y experimentos.

Dra. Sonia González Blanco (1%). Gestión de presentación y obtención de patentes internacionales.

RESUMEN

Con el aumento de los problemas asociados al uso de productos químicos en la agricultura, se ha incrementado el interés por el empleo de microorganismos benéficos para mejorar la salud de los cultivos y aumentar la productividad. *Tsukamurella paurometabola* C-924 fue aislada en el CIGB a partir de rizosfera de plátano como antagonista de nematodos fitoparásitos; en experimentos con la cepa se observó que además de su actividad nematocida ejercía otros efectos sobre las plantas que implicaban un mejor desarrollo de estas. El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad promotora del crecimiento vegetal de *T. paurometabola* C-924 y caracterizar los principales mecanismos involucrados en el proceso. Se confirmó que la cepa posee actividad estimuladora sobre diferentes cultivos a través de mecanismos de acción directos e indirectos. Bajo las condiciones ensayadas produce ácido indolacético, fitohormona de relevante importancia para el desarrollo vegetal. Es capaz de solubilizar fosfatos, lo que enriquece la rizosfera del cultivo con este nutriente. Produce amoniaco a partir de la descomposición de la materia orgánica, que puede actuar como fuente de nitrógeno. De igual forma se comprobó que produce exoenzimas líticas que pueden lisar la pared de organismos de la rizosfera protegiendo de esta forma la planta contra el ataque de patógenos. Se estudió su compatibilidad con otros microorganismos del suelo empleados como biofertilizantes (*Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter chroococcum*) y se observó que favorece el proceso de colonización de hongos micorrizógenos, estimulando la formación de micorrizas arbusculares. Se determinó además que estimula el desarrollo de cultivos de interés económico como: frijol, maíz, plátano y lechuga. Se logró con su aplicación plantas de mayor altura, mayor desarrollo del sistema radical, mayor follaje y peso seco. La novedad científica del trabajo consiste en: Se informa por primera vez para la ciencia la actividad promotora del crecimiento vegetal para la especie *T. paurometabola*. Es la primera vez que se determina que esta especie tiene la capacidad de solubilizar fosfatos y producir

ácido indolacético, amoniaco y exoenzimas líticas. Asimismo aporta conocimientos a las ciencias biológicas por primera vez en relación a la caracterización de una cepa de *T. paurometabola* con actividad promotora del crecimiento vegetal. De igual forma contribuye a enriquecer el conocimiento ecológico de los ambientes rizosféricos, así como a lograr un mejor manejo de este tipo de microorganismos para su empleo en diferentes cultivos de interés. La importancia práctica de los resultados radica en que las potencialidades de *T. paurometabola* C-924 como estimuladora vegetal permitirá su empleo como biofertilizante en diferentes sistemas agrícolas. Con su aplicación se podrán obtener mayores rendimientos en las cosechas, a la vez que se sustituyen fertilizantes químicos dañinos para el medio ambiente, los productores y los consumidores. De igual forma se podrá extender el uso del bionematicida Hebernem para ser empleado también como estimulador del crecimiento vegetal con lo que aumentarían las posibilidades de mercado. En ese sentido este resultado aportó información valiosa que permitió la obtención de una patente biofertilizante que ya se encuentra concedida en Cuba, la Comunidad Europea, Sudáfrica y otros países. Este trabajo está avalado por 2 patentes, 3 publicaciones científicas y 5 presentaciones en eventos. Fue seleccionado por la Sociedad General de Microbiología del Reino Unido para ser presentado en su Conferencia de Primavera Manchester 2013.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

Con el aumento de los problemas asociados al uso de productos químicos en la agricultura, se ha incrementado el interés por el empleo de microorganismos benéficos para mejorar la salud de los cultivos y aumentar la productividad. Es en este contexto, que numerosos microorganismos del suelo han mostrado sus potencialidades y han sido incluidos en diferentes prácticas de manejo integrado de plagas y mejora de los rendimientos. En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología se aisló la cepa *Tsukamurella paurometabola* C-924, bacteria Gram positiva que ha mostrado ser un control eficaz de nematodos parásitos de plantas y constituye el principio activo del producto bionematicida HeberNem (Mena *et al.*, 2004). Algunos elementos observados en el desarrollo de las plantas tratadas, indicó que esta bacteria podría también estimular el crecimiento de los cultivos en la ausencia de estos patógenos. De acuerdo con lo anterior se propuso como objetivo determinar la capacidad promotora del crecimiento vegetal de *T. paurometabola* C-924 y caracterizar los principales mecanismos involucrados en el proceso.

Resultados y discusión

La producción de fitohormonas se considera el mecanismo directo de promoción del crecimiento vegetal más importante a través del cual una bacteria puede

incidir sobre la fisiología de las plantas. El ácido indolacético (AIA) es la fitohormona mejor estudiada de las producidas por rizobacterias y regula importantes procesos vegetales. En el trabajo se informa por primera vez la producción de AIA para una cepa de *T. paurometabola* y para este género. Al cultivar *T. paurometabola* C-924 en el medio Caldo Triptona Soya (CTS), se determinó la presencia de ácido indolacético con niveles comparables a los presentados por otros autores para cepas con actividad promotora del crecimiento vegetal (Figura 1A). *T. paurometabola* C-924 produjo niveles de hasta 8,06 mg. L⁻¹ en la fase estacionaria del cultivo, que se corresponden con los informados por Mehnaz *et al.* (2010) para las cepas de *P. putida* CR7 y *Sphingobacterium canadense* CR 11 aislados de maíz (Marín *et al.*, 2013a).

No solo la producción de fitohormonas es una de las vías por las cuales una PGPR puede estimular a las plantas. El incremento de la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera es otro de los mecanismos directos mediante el cual las bacterias pueden promover el crecimiento vegetal. Se determinó la capacidad de solubilizar fosfatos de *T. paurometabola* C-924 en medio NBRIP sólido y líquido y se empleó *P. aeruginosa* ATCC 25922 como control positivo. Tras diez días de incubación a 30 °C se observaron halos de solubilización de fosfatos alrededor de las colonias de ambos microorganismos (Figura 1B). En cuanto al crecimiento en medio NBRIP líquido, ambas cepas mostraron capacidad para solubilizar fosfatos en las condiciones probadas. Sin embargo, a los cinco días de cultivo la solubilización de fosfatos de *T. paurometabola* C-924 fue significativamente superior a la determinada para *P. aeruginosa* ATCC 25922 (Marín *et al.*, 2013a).

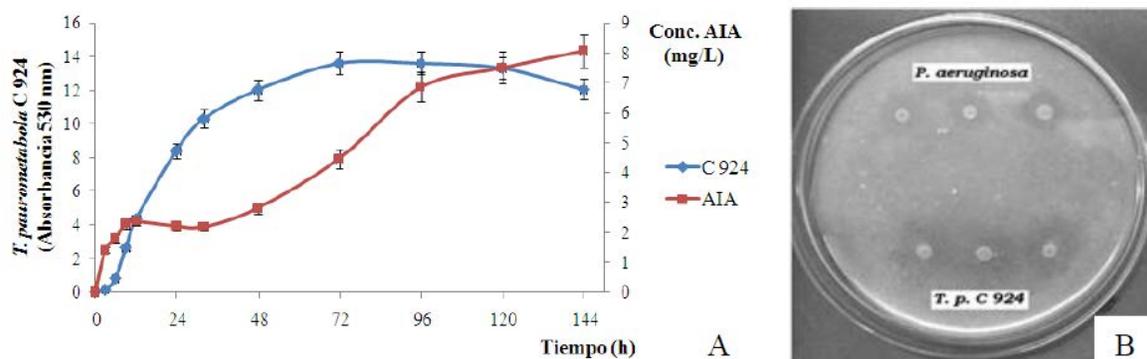


Figura 1 A: Cinética de crecimiento de *T. paurometabola* C-924 y producción de ácido indolacético (AIA) en medio CTS a 30 °C y 200 r min⁻¹. B: Solubilización de fosfatos por *T. paurometabola* C-924 y *P. aeruginosa* ATCC 25922.

Otro de los principales nutrientes de las plantas que se encuentra en poca disponibilidad en el suelo es el nitrógeno. Desde inicios de siglo XX, una de las formas de fertilización empleada en la agricultura fue la inyección de amoníaco en los suelos. *T. paurometabola* C-924 resultó ser una cepa altamente productora de amoníaco cuando se cultiva en un medio rico en aminoácidos como el CTS. Esto se debe al proceso de desaminación oxidativa que ocurre al metabolizar los aminoácidos presentes en el medio y es un evento muy favorable ya que el

amoníaco producido por la cepa en el suelo al convertirse en amonio podría servir como fuente de nitrógeno para las plantas.

Se determinó que *T. paurometabola* C-924 secretó quitinasas durante el crecimiento en presencia de quitina coloidal. La media de los diámetros de los halos de hidrólisis en los pocillos inoculados con sobrenadante del cultivo de *T. paurometabola* C-924 (6,2 mm) fue significativamente similar a la media de los inoculados con *Serratia marcescens* ATCC 13880 (6,6 mm). Se evaluó la producción de proteasas para sobrenadantes de cultivo de *T. paurometabola* C-924 en medio CTS. En todas las muestras tomadas, se observaron halos de hidrólisis de gelatina. Se determinó que la excreción de estas proteínas al medio está relacionada con el crecimiento celular del microorganismo. Para corroborar la actividad enzimática y determinar el peso molecular las proteasas se realizó una zimografía con muestras semidesnaturalizadas y desnaturalizadas del sobrenadante de cultivo de *T. paurometabola* C-924. En ambas muestras se observaron bandas de hidrólisis de la gelatina a los 43 kDa, que coincidieron con similares de la colagenasa IA (Marin *et al.*, 2013a).

Las proteasas no son importantes solamente desde el punto de vista de la capacidad antagónica de un microorganismo. Debido a la abundancia de proteínas en los residuos orgánicos presentes en el suelo, las proteasas juegan un papel central en el suministro del N en una forma disponible para las plantas. En este sentido, las proteasas excretadas por *T. paurometabola* C-924 podrían ser un factor importante en la promoción del crecimiento de los cultivos estudiados.

Se estudió la persistencia de *T. paurometabola* C-924 en el suelo durante el transcurso de los experimentos. La viabilidad de la cepa en los suelos mostró un comportamiento similar en el tiempo, con pequeñas variaciones en dependencia del cultivo. En el banano, durante la siembra la cepa se encontró en una concentración aproximada de 108 ufc g⁻¹ de suelo. A los 30 días, la viabilidad se había mantenido muy cerca de ese orden y posteriormente comenzó a declinar hasta llegar a 106 ufc g⁻¹ de suelo al final del experimento. En los cultivos de frijol y maíz, en el momento de la siembra la cepa se encontraba en una concentración en el orden de 107 ufc g⁻¹ de suelo, luego de la segunda inoculación y hasta el día 14, la viabilidad de *T. paurometabola* C-924 continuó aumentando hasta aproximadamente 109 ufc g⁻¹ de suelo. Posteriormente la población comenzó a disminuir en el tiempo hasta llegar a cerca de 105 ufc g⁻¹ de suelo. Este hecho podría estar asociado al lavado de los suelos producido por el riego, así como a factores bióticos y abióticos que influyen la sobrevivencia de las bacterias en los suelos inoculados. Sin embargo se comprobó que la cepa es capaz de persistir en los suelos inoculados durante un tiempo suficiente para actuar sobre las plantas y estimular su desarrollo.

En los experimentos de interacción en frijol y maíz se encontró que *T. paurometabola* C-924 estimuló de forma significativa la germinación de las semillas de frijol y maíz respecto a las semillas sin inocular. De manera general la inoculación con *T. paurometabola* C-924 estimuló de forma significativa el

desarrollo de los cultivos estudiados. En la interacción con las plantas de banano incrementó de forma significativa el peso fresco de las plantas en estudio. En el cultivo del maíz, la inoculación de *T. paurometabola* C-924 estimuló el desarrollo del cultivo en cuanto a la germinación, altura, diámetro del tallo y número de hojas de forma superior al control sin inocular (Tabla 1) (Marín *et al.*, 2013a).

Los resultados de la interacción con microorganismos estimuladores del crecimiento vegetal indicaron que no se observó interacción de tipo antagónica *in vitro* entre *T. paurometabola* C-924 y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal *Pseudomonas fluorescens* C 16, *Azotobacter chroococcum* INIFAT 12 y *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH. De igual forma con la aplicación de *T. paurometabola* C-924 a los cultivos se obtuvieron resultados similares o superiores a los logrados con las cepas ensayadas (Marin *et al.*, 2013b).

Tabla 1. Altura de las plantas de maíz durante el experimento

Tratamientos/días	7 días	14 días	21 días	28 días	35 días	42 días
control	11,73 b	30,5 c	43,03 c	50,6 c	69,79 c	72,4 c
<i>Tsuk. p.</i> C-924	14,15 a	35,53 a	51,71 a	59,17 a	77,70 a	83,4 a
<i>Azot. ch.</i> IN 12	11,82 b	30,58 c	45,44 bc	56,17 b	71,70 c	76,5 b
<i>Pseud. f.</i> C 16	13,03 a	32,9 b	48,5 b	58,66 ab	75,15 b	78,6 b
Error estándar	0,667*	1,471*	2,314*	1,983*	1,907*	1,825*

Letras distintas difieren significativamente entre si para p de rango múltiple de Tukey.

□ 0,05 según la

En los experimentos con hongos micorrizógenos arbusculares se observó una interacción sinérgica entre *T. paurometabola* C-924 y los hongos micorrizógenos *Glomus clarum* y *Glomus fasciculatum* en el cultivo de la lechuga. En los tratamientos en los cuales se aplicó de forma conjunta *T. paurometabola* C-924 y los hongos se obtuvo un desarrollo de las plantas significativamente superior en relación a donde se aplicaron de forma independiente (Marin *et al.*, 2010).

La novedad científica del trabajo consiste en: Se informa por primera vez para la ciencia la actividad promotora del crecimiento vegetal para la especie *T. paurometabola*. Es la primera vez que se determina que esta especie tiene la capacidad de solubilizar fosfatos y producir ácido indolacético, amoniaco y exoenzimas líticas. El aporte teórico de esta investigación es que aporta conocimientos a las ciencias biológicas por primera vez en relación a la caracterización de una cepa de *T. paurometabola* con actividad promotora del crecimiento vegetal. Esta actividad es posible debido a diferentes capacidades demostradas en el trabajo para esta especie. De igual forma contribuye a enriquecer el conocimiento ecológico de los ambientes rizosféricos del suelo, así como lograr un mejor manejo de este tipo de microorganismos para su empleo en diferentes cultivos de interés. La importancia práctica de los resultados radica en

que las potencialidades de *T. paurometabola* C-924 como estimuladora vegetal permitirá su empleo como biofertilizante en diferentes sistemas agrícolas y extiende el espectro de uso del producto Hebernem. Este resultado científico aportó información valiosa que permitió la obtención de una patente biofertilizante que ya se encuentra concedida en Cuba, la Comunidad Europea, Sudáfrica y otros países. Este trabajo está conforme con los lineamientos 129, 133 y 136 de la política de ciencia, tecnología, innovación y medio ambiente del PCC.

Descripción científico-técnica detallada del resultado:

Novedad científica del trabajo

1. Primer informe de caracterización de la actividad promotora del crecimiento vegetal para la especie *Tsukamurella paurometabola*.
2. Primer informe para esta especie de la capacidad de solubilizar fosfatos y de producir ácido indolacético, amoniaco y exoenzimas líticas (proteasas y quitinasas).

Importancia práctica principal del trabajo

Las potencialidades de *T. paurometabola* C-924 como estimuladora del crecimiento vegetal permitirá su empleo como biofertilizante en diferentes sistemas de cultivo. Con su aplicación se podrán obtener mayores rendimientos en las cosechas, a la vez que se sustituyen fertilizantes químicos dañinos para el medio ambiente, los productores y los consumidores. Su empleo en la agricultura podría ser un paso más en la sustitución de importaciones de los insumos agrícolas que necesita el país para elevar la producción de alimentos para la población. De igual forma se podrá extender el uso del bionematicida Hebernem para ser empleado también como estimulador del crecimiento vegetal con lo que aumentarían las posibilidades de mercado. En ese sentido este resultado aportó información valiosa que permitió la obtención de una patente biofertilizante que ya se encuentra concedida en Cuba, la Comunidad Europea, Sudáfrica y otros países.

Publicaciones:

1. Marín M., Mena J., Franco R., Pimentel E., Sánchez I. 2010. Effects of the bacterial-fungal interaction between *Tsukamurella paurometabola* C-924 and *Glomus fasciculatum* and *Glomus clarum* fungi on lettuce microrrhizal colonization and foliar weight. *Biotechnología Aplicada*; 27: 48-51.
2. Marín M., Wong I., Mena J., Morán R., Pimentel E., Sánchez I., Basulto R., Moreira A. 2013. Plant growth promotion potential of a strain of *Tsukamurella paurometabola* in *Zea mays* L. *Biotechnología Aplicada*; 30:105-110.
3. Marín M., Mena J., Chaveli P., Morán R., Pimentel E. 2013. Interacción de *Tsukamurella paurometabola* C-924 con *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH en el cultivo de frijol. *Acta Agronómica*; 62(1), *in press*.

Otras publicaciones relacionadas:

1. González N., Wong I., Pimentel E., Zamora J., Salazar E., Mena J. 2009. Expresión de proteasas extracelulares en el cultivo de alta densidad del

microorganismo con actividad bionematicida *Tsukamurella paurometabola* C-924. Tecnología química; 29(2): 83-90.

2. Mena J., Veloz L., Vazquez R., Expósito M., Marín M., Salazar E., León L., Coca Y., Ramírez Y., Rodríguez G., Hernández A., Pimentel E. 2002. Population of *Corynebacterium paurometabolum* strain C-924 in soils treated with HeberNem. Nematology; 4(2): 287.

Patentes:

- Composición Biofertilizante (2008) Mena, J. Pimentel, E., Marín, M. Hernández, A. Sánchez, I. Ramírez, Y. González, S. PCT WO 2008/131699 A2.
- Composición biofertilizante (2010) Mena J., Pimentel E., Marín M., Hernández A., Sánchez I., Ramírez Y. González S., Garcia M., Borroto C. European patent Application. Bulletin 2010/07.

Presentaciones en eventos científicos (5 eventos con 1 conferencia invitada)

- Congreso Biotecnología Habana 2008, Cuba.
- VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal 2008, Cuba.
- Congreso Biotecnología Habana 2011, Cuba.
- 20th Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizers 2012, Cuba.
- SGM Spring Conference Manchester 2013, Reino Unido. **(Conferencia invitada)**