

PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS POR BACTERIAS DE LA RIZOSFERA

PLANT GROWTH PROMOTION BY RHIZOSPHERE BACTERIA

Gina Holguin^{1§}, Yoav Bashan¹, Esther Puente¹, Angel Carrillo¹, Gabor Bethlenfalvai¹, Adriana Rojas¹, Patricia Vázquez¹, Gerardo Toledo², Macario Bacilio Jiménez¹, Bernard R. Glick³, Luz González de Bashan¹, Vladimir Lebsky¹, Manuel Moreno¹ y Juan Pablo Hernández¹

¹ Grupo de Microbiología Ambiental. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Calle Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Sta. Rita. 23090 La Paz, Baja California Sur, México. ² Diversa Corporation. San Diego, CA, USA. ³ Department of Biology. University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canadá. §Autor para correspondencia: gholguin@cibnor.mx

RESUMEN

Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP) benefician a las plantas a través de diferentes mecanismos, como son: la fijación de N₂, la producción de fitohormonas y sideróforos, la solubilización de fosfato y la síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas y biocontrol de los fitopatógenos. La BPCP *Azospirillum* es de particular interés debido a su versatilidad metabólica, capacidad para fijar nitrógeno, producción de fitohormonas y células tipo quistes, las cuales brindan a esta bacteria la capacidad de resistir a diferentes tipos de estrés ambiental y a la capacidad de adherirse a cualquier sistema de raíces. En este ensayo se analizaron los avances de investigación sobre bacterias promotoras de crecimiento en plantas, específicamente en *Azospirillum*, desarrollados durante 1992 a 2003. También se presenta evidencia que apoya la hipótesis de que las bacterias participan en el sostenimiento de las comunidades de manglar; además de considerar los trabajos sobre manipulación genética de *Azospirillum* y sus perspectivas en la agricultura. Los resultados revelaron abundantes interacciones sinérgicas e interdependencia entre las plantas y las bacterias en el ecosistema de manglar.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, cactáceas, fijación de nitrógeno, manglar, solubilización de fosfato.

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria (PGPB) help plants through different mechanisms such as nitrogen fixation, the synthesis of phytohormones, siderophores and enzymes that can alter the level of ethylene inside the plant, the solubilization of phosphate and the biological control of pathogens. The PGPB *Azospirillum* is of particular interest due to its metabolic versatility, ability to colonize any root system, and capacity to fix nitrogen, produce phytohormones and cyst-like cells, which confer the bacterium the ability to tolerate environmental stresses. In this assay we analyzed the advances on PGPB research conducted from 1992 to 2003. Evidence is shown that support the hypothesis that the PGPB play a role in the maintenance of the mangrove community. Also, advances are shown on the genetic manipulation of *Azospirillum* and its perspectives in agriculture. Results showed that in the mangrove ecosystem there are multiple synergistic interactions and interdependence between plants and bacteria.

Key words: *Azospirillum brasilense*, mangrove, nitrogen fixation, phosphate solubilization.

*Fecha de recepción: 29 de mayo de 2002

Fecha de aceptación: 6 de octubre de 2003

INTRODUCCIÓN

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) benefician a éstas a través de diferentes mecanismos, por ejemplo: fijación de N_2 (reducción de N_2 a NH_3), producción de fitohormonas, sideróforos, solubilización de fosfato, síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas y biocontrol de fitopatógenos (Glick *et al.*, 1999). La BPCP *Azospirillum* es de particular interés debido a su versatilidad metabólica, su capacidad para fijar nitrógeno, su producción de fitohormonas, sus células tipo quistes, las cuales le brindan la capacidad de resistir diferentes tipos de estrés ambiental y, finalmente, su capacidad para adherirse a cualquier sistema de raíces (Bashan y Holguín, 1997). Algunos efectos benéficos de *Azospirillum* en las plantas son incremento en altura, área radicular y rendimiento total de la cosecha (Bashan *et al.*, 1992).

En este estudio se analizaron los avances de investigación de bacterias promotoras de crecimiento en plantas, específicamente en *Azospirillum*, desarrollados durante el período de 1992 a 2003, además de considerar los trabajos sobre manipulación genética de *Azospirillum* y sus perspectivas. También se presenta evidencia que apoya la teoría de que las bacterias son responsables del sostenimiento de las comunidades de manglar.

REFORESTACIÓN DEL DESIERTO UTILIZANDO *Azospirillum*

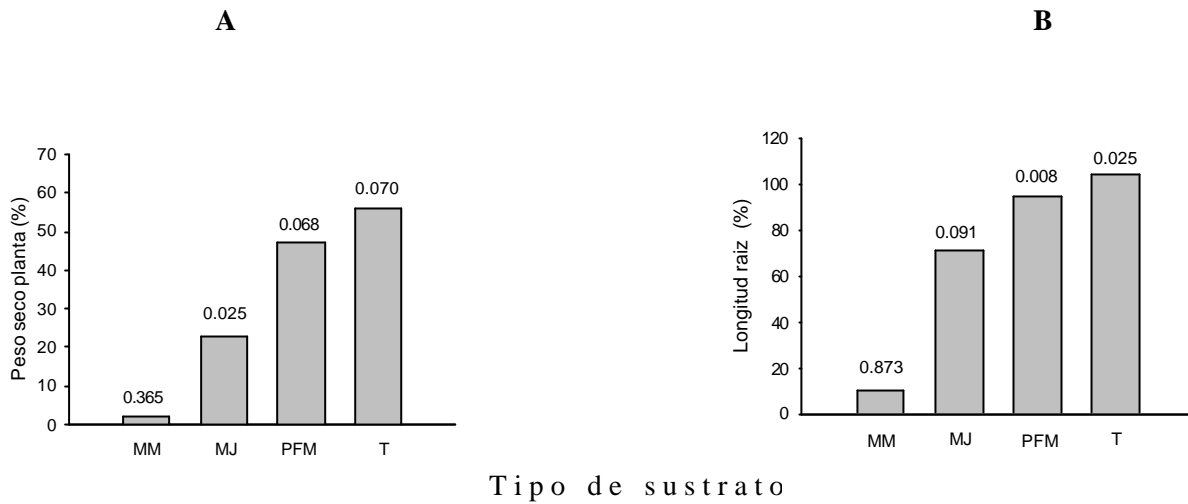
En el estado de Baja California Sur existe una gran variedad de cactáceas; predomina el cardón (*Pachycereus pringlei*) de gran tamaño y belleza. En el estado existe una tala indiscriminada de esta cactácea y el suelo se utiliza para actividades agrícolas, no obstante que estos suelos no son propicios para el cultivo de hortalizas o gramíneas, por lo que eventualmente son abandonados, lo que contribuye a la desertificación acelerada, concomitante a la generación de polvo, el cual afecta la salud de la población. La Secretaría de Salud revela que 30% de la población, principalmente niños, sufre enfermedades respiratorias provocadas por la

contaminación con polvo (Subsecretaría de Coordinación, 1992). El objetivo de esta investigación fue prevenir la erosión del suelo y la contaminación por polvo a través de la reforestación de zonas desertificadas mediante el uso de bacterias promotoras del crecimiento.

Se inocularon plantas de cardón con la BPCP *Azospirillum brasilense*, establecidas en cuatro tipos de sustrato, que fueron: mezquite maduro (MM), mezquite joven (MJ), palo fierro maduro (PFM) y terracería (T), con lo cual se logró incrementar la altura y el volumen de la planta (Puente y Bashan, 1993); sin embargo, los resultados variaron en función del tipo de sustrato (Figura 1) y hubo una relación inversa entre la calidad del sustrato y el efecto de *Azospirillum* sobre las plantas (Carrillo-García *et al.*, 2000). En la Figura 1 se observa que las plántulas de cardón crecidas en macetas con MM no respondieron a la inoculación con *Azospirillum*; por el contrario, plántulas inoculadas y cultivadas en T mostraron incrementos en el peso seco y longitud de la raíz a pesar de que la concentración de carbono ($g\ kg^{-1}$) y de nitrógeno ($g\ kg^{-1}$) fue mayor en MM que en MJ, PFM y T (Carrillo-García *et al.*, 2000).

En otros experimentos se colectaron cardones en el campo, se inoculó la mitad de ellos con *Azospirillum* para después trasplantarlos a un camino de terracería con una distancia de 3 m entre los cardones inoculados y los no inoculados (Bashan *et al.*, 1999). En los cardones inoculados se observó un incremento significativo en su volumen (Figura 2) y sobrevivieron los 42 meses que duró el experimento; sin embargo, los no inoculados murieron después de 13 meses, resultados similares se obtuvieron con garambullo (*Lophocereus schottii*) y pitaya dulce (*Stenocereus thurberi*).

En cuanto a las propiedades del suelo resembrado con cardón, se observó un incremento en la concentración de fósforo y nitrógeno al compararse con el suelo no resembrado, debido probablemente a la exudación radicular y a la actividad metabólica de la rizosfera asociada.



MM= Mezquite maduro; MJ= Mezquite joven; PFM= Palo fierro maduro y T= Terracería. Los números sobre las barras son valores de probabilidad ($p \leq 0.05$ o $p \leq 0.01$) y no arbitrarios.

Figura 1. Porcentaje de cambio en el peso seco de planta (A) y en la longitud de la raíz (B) de plántulas de cardón inoculadas con *Azospirillum brasilense* (Carrillo-García *et al.*, 2000).

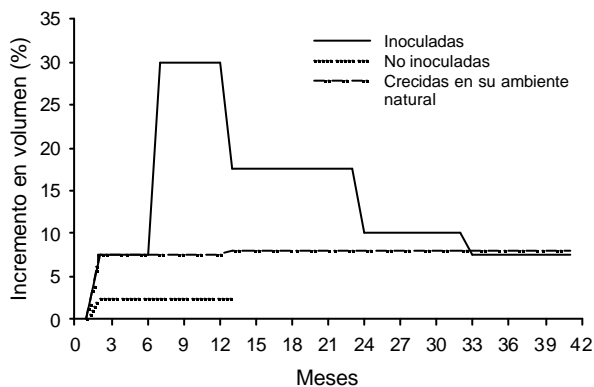


Figura 2. Incremento en el volumen de plantas de cardón sujetas a diferentes tratamientos (Bashan *et al.*, 1999).

En áreas no resembradas con cardón se observó una pérdida de $500 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de suelo (tasa de erosión de suelo muy alta) mientras que en las resembradas se acumularon $50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de suelo (Bashan *et al.*, 1999). Para calcular el volumen de suelo perdido por erosión en cada sitio se marcó el nivel de la superficie del suelo con cinco barras de acero enterradas a 0.80 m de

profundidad y se calculó la magnitud de la erosión (el nivel del suelo relativo al nivel original) con un nivel de albañil de tipo comercial e hilos, o bien mediante un rayo láser fijado horizontalmente al nivel original del suelo (Bashan *et al.*, 1999). La pérdida de suelo se calculó con la ecuación siguiente:

$$V = \sum_4^1 \{(W \times D)/2\}L$$

Donde: V= Volumen de pérdida de suelo; W= Ancho del camino; D= Profundidad de erosión (cm^{-1}); L= Longitud de la sección erosionada (cm).

A partir de las observaciones y los resultados obtenidos en este estudio se formuló la siguiente interpretación para explicar la acumulación de suelo en zonas revegetadas con cardones: durante la época seca (de 10 a 11 meses por año) se deposita una capa de partículas de suelo fino alrededor del cardón, cuando llega la época de lluvias (de uno a dos meses por año) el cardón desarrolla raíces pequeñas o raicillas, las cuales además de asimilar el agua, retienen el suelo, compactándolo e impidiendo la erosión. En la época seca las raicillas desaparecen; sin

embargo, la capa de suelo alrededor del cardón se retiene debido a la acción compactadora de las raicillas. Este ciclo se repite cada año logrando incrementarse la capa de suelo alrededor de los cardones (Bashan *et al.* 1999).

Los resultados obtenidos hasta ahora son prometedores y sugieren el uso de *Azospirillum* para la reforestación del desierto con cactáceas. En zonas templadas la reforestación de bosques con microflora nativa es una práctica común; por ejemplo, la inoculación del abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), con bacterias aisladas de la rizosfera de esta planta, incrementó la biomasa de las plántulas (Chanway y Holl, 1992).

MICROBIOLOGÍA DEL MANGLAR

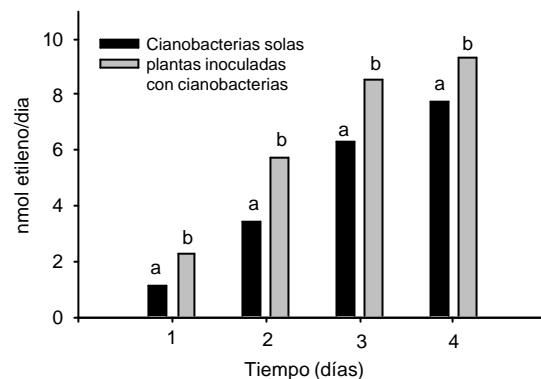
Los manglares son importantes como zonas de refugio, alimentación y reproducción para numerosos organismos, algunos de ellos de importancia comercial tales como: camarones, ostiones, mejillones y algunos peces. Los manglares son también cruciales para la sobrevivencia tanto de aves residentes como de migratorias. Se ha observado que durante el invierno y en primavera, entre 60 y 80% de las aves que se encuentran en el manglar son migratorias (Mendoza-Salgado, 1983; Holguín *et al.*, 1999).

Los manglares son ecosistemas altamente productivos pero generalmente pobres en nitrógeno y fósforo. Esta aparente paradoja se puede explicar a través de un reciclaje efectivo de nutrientes llevado a cabo por los microorganismos, los cuales logran conservar los escasos nutrientes dentro del sistema. Se considera a los microorganismos que habitan el manglar como el pilar del ecosistema y de quienes depende la salud y el desarrollo del mismo (Holguín *et al.*, 2001).

Las cianobacterias son abundantes en sistemas de manglar (Holguín *et al.*, 2001), sin embargo, se sabe que no existen estudios sobre su utilización en la inoculación de mangles; solo se han estudiado como inoculantes para promover

el crecimiento vegetal en arroz y trigo (Gantar *et al.*, 1993).

En experimentos realizados con plántulas de mangle (*Avicennia germinans*) inoculadas con la cianobacteria *Microcoleus* sp. (aislada del manglar de Balandra en Baja California Sur, México), en los cuales la cianobacteria se cultivó sola en las mismas condiciones que los tratamientos con plantas; los resultados demostraron que el nitrógeno fijado por ésta fue significativamente mayor cuando estuvo en asociación con la planta que cuando estuvo sola. Además, se encontró que su contenido de clorofila *a* fue similar al crecer sola o en asociación con la planta, lo que sugiere que el incremento en la fijación de nitrógeno observado, al asociarse la cianobacteria con la planta, no fue debido a una mayor concentración de *Microcoleus* sp. en la asociación (Figura 3) (Toledo *et al.*, 1995).



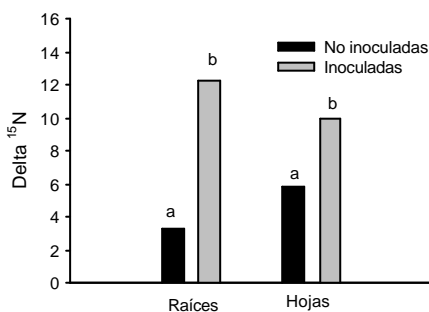
Letras diferentes sobre las barras denotan diferencia significativa entre tratamientos (tiempo) a $p = 0.05$ en la prueba *t* de student.

Figura 3. Fijación de nitrógeno de plántulas del mangle *Avicennia germinans* inoculadas con *Microcoleus* sp. (Toledo *et al.*, 1995).

Experimentos con ^{15}N demostraron que las plántulas de mangle asimilan el nitrógeno fijado por *Microcoleus* sp., sobre todo en las raíces. Al medir la concentración de nitrógeno total en la plántula se observó que fue mayor en plántulas inoculadas que en las no inoculadas (Figura 4)

(Bashan *et al.*, 1998). Los resultados revelan una interacción sinérgica entre la cianobacteria y las plántulas de mangle, lo que se sugiere la posibilidad de utilizarla como inoculante para reforestación de manglares dañados o para la formación de nuevas áreas de manglar.

Por otra parte, se han aislado bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico de la rizosfera de numerosas plantas terrestres (Sundara Rao y Sinha, 1963); sin embargo, existen pocos estudios sobre este grupo bacteriano en ambientes marinos. En experimentos con bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico, aisladas de raíces de los mangles *A. germinans* y *Laguncularia racemosa*, se observó que en cultivo líquido *Bacillus licheniformis* solubilizó 350 mg de fosfato de calcio por litro de suspensión bacteriana, cantidad suficiente para abastecer a una planta pequeña de mangle de su requerimiento diario de fósforo (Vazquez *et al.*, 2000).



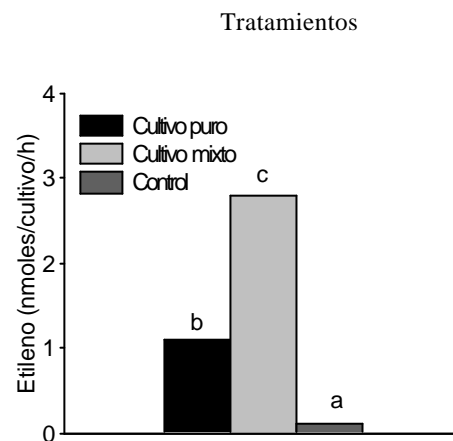
Letras diferentes sobre las barras denotan diferencia significativa a $p = 0.05$ en la prueba *t* de student.

Figura 4. Asimilación de nitrógeno en raíces y hojas de plántulas de mangle inoculadas con *Microcoleus chthonoplastes* B1 (Bashan *et al.*, 1998).

Un análisis del contenido del sobrenadante de los cultivos de bacterias solubilizadoras de fosfato por cromatografía de gases mostró la presencia de una gran variedad de ácidos orgánicos; por ejemplo, en el cultivo de *B. licheniformis* se detectó la presencia de los ácidos siguientes:

acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico. Estos resultados sugieren que la solubilización del fosfato de calcio fue mediada por los ácidos orgánicos (Vazquez *et al.*, 2000). Craven y Hayasaka (1982) reportaron una alta solubilización de fosfato, similar a la encontrada por Vazquez *et al.* (2000), causada por una bacteria no identificada, aislada de la rizosfera del pasto marino *Zostera marina*.

Experimentos realizados con cultivos mixtos de bacterias han revelado interacciones sinérgicas benéficas entre los componentes del cultivo; por ejemplo, la bacteria fijadora de nitrógeno *Phyllobacterium* sp. aislada de las raíces del mangle, incrementó la fijación de nitrógeno en 200% cuando creció en cultivo mixto con *B. licheniformis*, bacteria solubilizadora de fosfato (Figura 5) (Rojas *et al.*, 2001).



Letras diferentes sobre las barras muestran diferencia significativa en ANOVA de una sola vía a $p = 0.05$.

Figura 5. Reducción de etileno por la bacteria diazotrófica *Phyllobacterium* sp. sola o mezclada con la bacteria solubilizadora de fosfato *B. licheniformis* (Rojas *et al.*, 2001).

Así mismo, la solubilización de fosfato por *B. licheniformis* se incrementó cuando creció en cultivo mixto con *Phyllobacterium* sp. (resultados no mostrados). Experimentos con ^{15}N demostraron que al inocular plántulas de mangle con *Phyllobacterium* sp., la planta fue capaz de

asimilar el nitrógeno fijado por la bacteria (Rojas *et al.*, 2001). La inhibición o promoción de la actividad diazotrófica en bacterias fijadoras de nitrógeno al asociarse con otras bacterias parece ser un fenómeno común (Holguin y Bashan, 1996), lo que sugiere el diseño de inoculantes mixtos basado en una selección de cepas que interactúen sinérgicamente en beneficio de las plantas.

Para conocer el potencial de *Azospirillum* para colonizar y promover el crecimiento de plántulas de mangle y reforestar zonas dañadas de manglar, se llevaron a cabo experimentos de inoculación de plántulas de mangle con dos cepas halotolerantes de *Azospirillum*: *A. brasilense* Cd y *A. halopraeferens*. Los resultados mostraron que ambas cepas colonizaron las raíces y mantuvieron sus niveles poblacionales relativamente estables por un período de cinco días. Fotografías de microscopía electrónica de barrido indicaron capacidad para colonizar y que el mecanismo de colonización de las dos cepas fue diferente; *A. halopraeferens* produjo una sustancia mucilaginoso que cubrió las raíces y las células bacterianas, mientras que *A. brasilense* generó agregados unidos entre sí por material fibrilar (Puente *et al.*, 1999).

La planta halófila *Salicornia*, la cual crece en las costas de Baja California, presenta un potencial agrícola en cultivo regado con agua de mar. La *Salicornia* se ha utilizado como forraje y la extracción de aceite de sus semillas se considera atractiva. En experimentos de inoculación de plantas de *Salicornia bigelovii*, con diferentes mezclas de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato, se incrementó la altura de la planta en 52%, el tamaño de la espiga en 73% y el peso seco en 88%; en semillas, el contenido total de nitrógeno se incrementó en 563% (Bashan *et al.*, 2000).

La capacidad de *Azospirillum* para colonizar y promover el crecimiento de plantas que crecen en ambientes marinos tales como el mangle y la *Salicornia*, demuestra que esta bacteria no presenta especificidad hacia alguna variedad o tipo de planta hospedera. La investigación sobre la microbiología del manglar sugiere que la

fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato por bacterias asociadas a las raíces del mangle pudiera ser determinante para su crecimiento, así como para otras plantas que habitan el manglar como la *Salicornia*.

MANIPULACIÓN GENÉTICA DE *Azospirillum*

El etileno es una hormona vegetal involucrada en importantes procesos fisiológicos de las plantas; interviene en la germinación, iniciación de la raíz, crecimiento de tallo y raíz, floración, maduración de la fruta, senescencia, en la respuesta de la planta al estrés ambiental y al ataque de patógenos, entre otros procesos. Los niveles de etileno en las plantas pueden incrementarse como respuesta al estrés provocado por sustancias químicas, temperatura, escasez de agua, luz ultravioleta y ataque por patógenos, entre otros. La respuesta de la planta puede ayudarle a sobrevivir en condiciones adversas; por ejemplo, puede activar la producción de enzimas y fitoalexinas que le permiten inhibir la invasión de algunos patógenos (Glick *et al.*, 1999). Sin embargo, altas concentraciones de etileno en la planta pueden inhibir su crecimiento, provocar marchitamiento e inducir senescencia y muerte prematura. Así mismo, en algunas plantas el etileno estimula la germinación de las semillas (Esashi, 1991), pero si el nivel de etileno posterior a la germinación es demasiado alto, se inhibe la elongación de la raíz (Glick *et al.*, 1999).

En el suelo existen bacterias que pueden disminuir la concentración de etileno en la planta, mediante la degradación del precursor del etileno, que es el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC). Las bacterias llevan a cabo este proceso a través de la deaminasa de ACC, enzima microbiana no presente en tejidos vegetales, que rompe la molécula de ACC y genera productos como: amoníaco y α -cetobutirato. Las bacterias con actividad de deaminasa de ACC colonizan las raíces y utilizan como fuente de carbono y nitrógeno al ACC, presente tanto en la parte interna de las raíces como en exudados radiculares. El consumo del ACC por las bacterias induce la

difusión del ACC hacia afuera de las raíces y provoca que disminuya la concentración interna de ACC, lo que reduce a su vez la concentración de etileno (Glick *et al.*, 1999).

Algunas BPCP como *Azospirillum* sintetizan altas concentraciones de ácido indolacético (AIA), el cual induce la síntesis de etileno que estimula la actividad de la enzima sintetasa de ACC y convierte el S-adenosilmetionina a ACC (Kende, 1993). Como hipótesis de trabajo se propuso que la transformación genética de *A. brasilense* con el gen de la deaminasa de ACC (enzima no presente en *Azospirillum*) podría incrementar la capacidad de ésta para bajar concentraciones elevadas de etileno en las plantas debidas a: 1) la síntesis de AIA, 2) estrés y 3) al proceso de germinación de la semilla. El gen de la deaminasa de ACC o *acdS*, se tomó de la bacteria *Enterobacter cloacae* y se clonó en el vector pRK415; sin embargo, los exconjugantes de *A. brasilense* no mostraron actividad de la deaminasa de ACC a pesar de que se comprobó por hibridación que las bacterias contenían el gen. Para resolver el problema de la falta de expresión del gen *acdS* y considerando que su regulación de transcripción es compleja, se decidió cortar la región promotora y sustituirla por otra que *Azospirillum* pudiera reconocer. Por tanto, se crearon dos quimeras: 1) con el gen *acdS* bajo el control del promotor de la lactosa (*lac*) (Figura 6) (Holguín y Glick, 2001), y 2) con *acdS* fusionado a la región promotora del gen de resistencia a la tetraciclina (*Tet^r*) (Figura 7) (Holguín y Glick, 2003).

Para fusionar el gen *acdS* a *Tet^r* se llevaron a cabo dos reacciones separadas de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 7). Una para amplificar la región *Tet^r* y otra para amplificar *acdS*. Uno de los iniciadores (iniciador 2) que se utilizó para amplificar *Tet^r* contenía una región de bases complementaria a las primeras bases del gen *acdS*. De la misma manera, otro de los iniciadores (iniciador 3) utilizados para la amplificación de *acdS* contenía una región de bases complementaria a las primeras bases de *Tet^r*. Posteriormente se mezclaron los productos de ambas reacciones y se corrió otra amplificación por PCR en la cual los productos

funcionaron como iniciadores para llevar a cabo la elongación y posterior amplificación del producto deseado. (Figura 7) (Holguín y Glick, 2003).

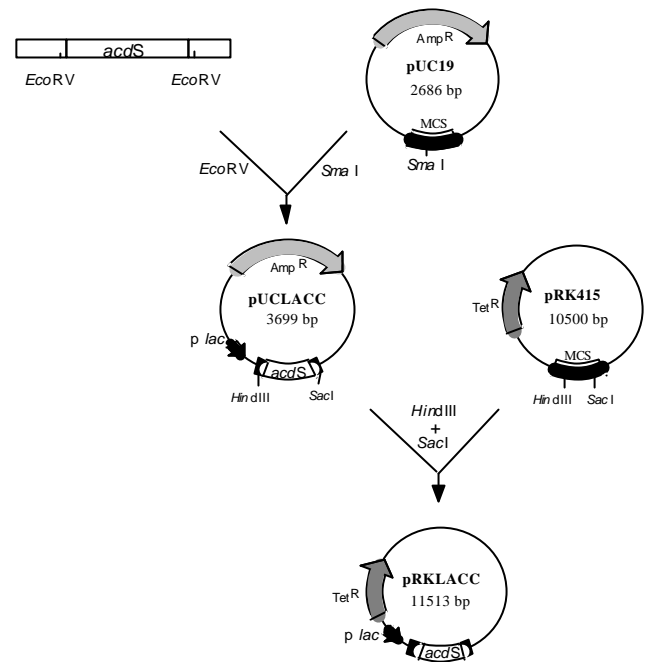


Figura 6. Clonación del gen estructural de la deaminasa de ACC (*acdS*) bajo el control de la región promotora *lac*. La región promotora silvestre se eliminó con la enzima de restricción *EcoRV* y posteriormente se clonó el gen en el plásmido pRK415 de amplio rango hospedero (Holguín y Glick, 2001).

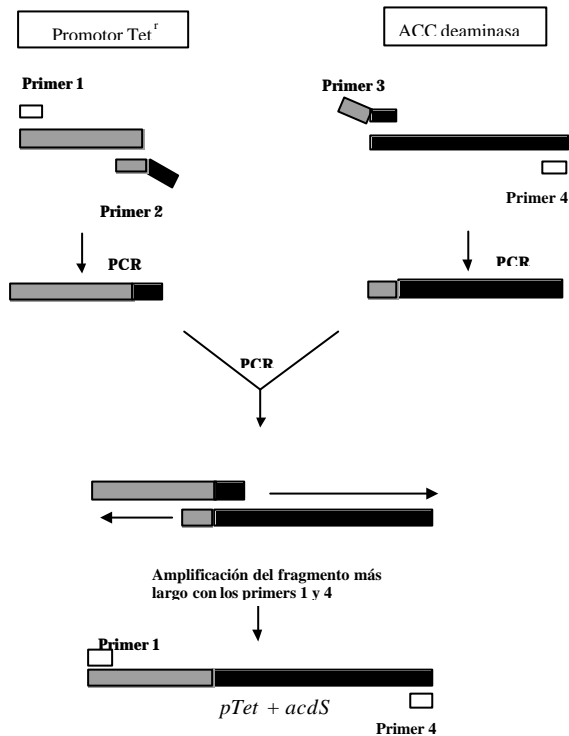
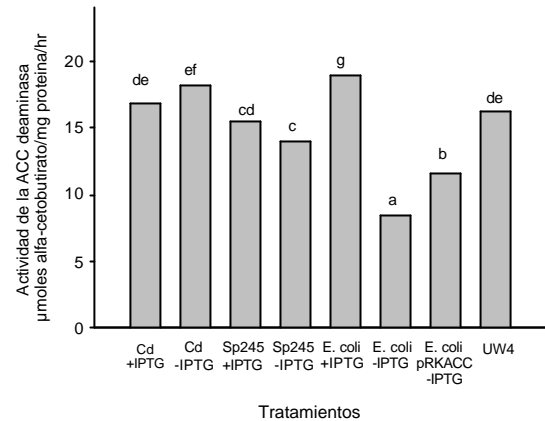


Figura 7. Fusión del gen estructural de la deaminasa de ACC (*acdS*) con la región promotora del gen de resistencia a la tetraciclina (*Tet^r*), por medio de la técnica de extensión por solapamiento con PCR (Holguín y Glick, 2003).

La actividad de la deaminasa de ACC de los exconjugantes de *Azospirillum* (transformados con el gen *acdS* bajo el control de la región promotora *lac*) fue similar a la del control (*Enterobacter cloacae* UW4) y a la de *E. coli* transformada con la misma quimera (Figura 8). A diferencia de *E. coli*, la presencia de isopropiltio-β-D-tiogalactosido (IPTG) en los cultivos de *A. brasilense* Cd o Sp245 no afectó la producción de la deaminasa de ACC, debido probablemente a que el operon de la lactosa no está presente en *Azospirillum* y, por lo tanto, no se requiere del inductor para activar la región promotora *lac*.

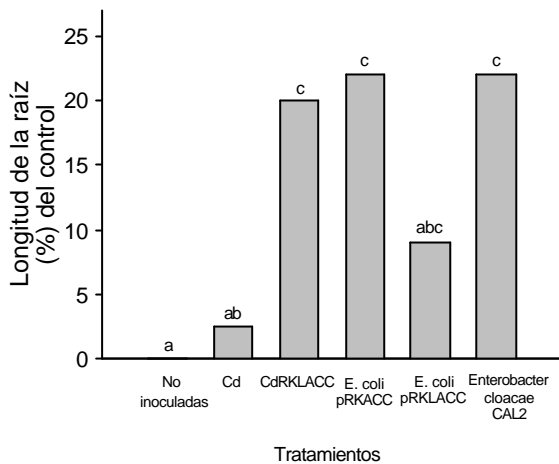


IPTG= isopropiltio-β-D-tiogalactosido que es el inductor del operon *lac*; UW4= *Enterobacter cloacae* que contiene el gen *acdS* silvestre.

Figura 8. Actividad de la deaminasa de ACC en *A. brasilense* Cd, *A. brasilense* Sp245, y *E. coli* transformada con pRKLACC (Holguín y Glick, 2001).

La inoculación de plántulas de canola (*Brassica campestris* cv. Reward) con *A. brasilense* Cd/pRKLACC y *E. coli* transformada con *acdS* promovió la elongación de la raíz (Figura 9). Esto permitió suponer que la introducción del gen *acdS* en cualquier bacteria, sea esta BPCP o no, le confiere características de BPCP. *A. brasilense* Cd/pRKLACC mostró la misma capacidad para sintetizar AIA que la cepa silvestre cuando se estableció en caldo nutritivo; sin embargo, cuando creció en el medio mínimo OAB (Okon *et al.*, 1977) la presencia de pRKLACC en *A. brasilense* Cd redujo la síntesis de AIA en 25% (Holguín y Glick, 2001). Estos resultados confirman la posibilidad de que la síntesis de la deaminasa de ACC en *A. brasilense* Cd impone una carga metabólica en la bacteria sólo cuando hay limitación de nutrientes (Glick, 1995). Inferir que pRKLACC confiere la capacidad a *A. brasilense* Cd para sintetizar AIA al asociarse con el sistema de raíces es prematuro, al considerar que *A. brasilense* presenta varias vías metabólicas para la síntesis de AIA, y que existe poca información con respecto a la regulación de la síntesis de esta

fitohormona en *Azospirillum* (Patten y Glick, 1996).



Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre tratamientos a $p = 0.05$ en un análisis de ANOVA de una sola vía.

Figura 9. Longitud de la raíz de plántulas de canola inoculadas con *brasiliense* Cd, *A. brasiliense* Cd/pRKLACC, *Escherichia coli* DH5/pRKACC (*acdS* bajo el control de su región promotora silvestre), *E. coli* DH5/pRKLACC y *Enterobacter cloacae* CAL2, utilizada como control positivo (Holguín y Glick, 2001).

La inoculación de plantas con BPCP que presentan actividad de la deaminasa de ACC suele aminorar el efecto negativo que pudieran tener diferentes tipos de estrés ambiental sobre las plantas; por ejemplo, la inoculación de canola con *Pseudomonas putida* GR12-2, la cual presenta actividad de deaminasa de ACC, promueve el desarrollo de las plantas que crecen en suelos salinos o están expuestas a temperaturas bajas (Glick *et al.*, 1997).

En resumen, la transformación de *Azospirillum* con el gen de la deaminasa de ACC le brindó a esta bacteria la capacidad de inducir la elongación de la raíz de plantas de canola, posiblemente debido a la capacidad de las células transformadas para degradar el ACC, precursor del etileno. Es factible que estos

transformantes puedan aminorar algunos efectos negativos provocados en plantas por el estrés ambiental. La capacidad de *Azospirillum* para producir deaminasa de ACC, aunada a sus otras características inherentes, pudiera hacer de esta bacteria una herramienta muy útil para la agricultura.

PERSPECTIVAS PARA *Azospirillum*

Azospirillum no sólo promueve el crecimiento de macrofitas sino también de plantas microscópicas unicelulares como la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*, utilizada en tratamientos de aguas residuales para la remoción de compuestos nitrogenados y fosfatados, así como de metales pesados (González y Bashan, 2000). La encapsulación de *A. brasiliense* y *Ch. vulgaris* en esferas de alginato, diseñadas para tratamiento de aguas residuales, provocó un incremento en el crecimiento y en la producción de pigmentos de *Ch. vulgaris*, esto a la vez promovió la remoción de amonio y fósforo por la microalga. *Azospirillum* pudiera estar alterando el metabolismo de *Chlorella* a través de la producción de fitohormonas, actividad ampliamente reportada como uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal utilizado por *Azospirillum* (Glick *et al.*, 1999). Estos resultados muestran un gran potencial para la utilización de *Azospirillum* y *Chlorella* en el tratamiento de aguas residuales (de Bashan *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

1. Los resultados presentados en este ensayo muestran aspectos importantes de la BPCP *Azospirillum*, tal como su potencial para ser utilizada como inoculante en manglares y cactáceas para la reforestación del desierto, así como su gran versatilidad metabólica y de colonización, que le permiten asociarse tanto a plantas terrestres como marinas. Los experimentos de transformación genética de *Azospirillum* con el gen de la deaminasa de ACC demuestran que se puede ampliar la capacidad metabólica de la bacteria sin que la expresión de

acdS le imponga una carga metabólica que comprometa su capacidad promotora del crecimiento vegetal. Es importante evaluar, a través de experimentos a largo plazo, el efecto de los transformantes sobre las plantas, así como su capacidad para ayudarlas a tolerar condiciones de estrés.

2. En el ecosistema de manglar existen interacciones sinérgicas entre las plantas y las bacterias, así como entre las poblaciones bacterianas que sugieren una estrecha interdependencia entre las plantas del manglar y las bacterias que lo habitan; el continuar con el estudio de estas interacciones permitirá conocer a fondo el funcionamiento del manglar y ofrecer tecnologías efectivas para salvar o proteger estos ecosistemas de gran importancia ecológica y pesquera.

LITERATURA CITADA

- Bashan, Y.; Rojas, A. and Puente, M.E. 1999. Improved establishment and development of three cacti species inoculated with *Azospirillum brasilense* transplanted into disturbed urban desert soil. *Can. J. Microbiol.* 45: 441-451.
- Bashan, Y.; Puente, M.E.; Myrold, D.D. and Toledo, G. 1998. *In vitro* transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 165-170.
- Bashan, Y.; Moreno, M. and Troyo, E. 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. *Biol. Fert. Soils* 32: 265-272.
- de-Bashan, L.E.; Moreno, M.; Hernández, J.P. and Bashan, Y. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from syntetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.* 36: 2941-2948.
- Carrillo-García, A.; León de la Luz, J.L.; Bashan, Y. and Bethlenfalvay, G.J. 2000. Effects of resource-islands soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran desert. *Restor. Ecol.* 8: 65-73.
- Craven, P.A. and Hayasaka, S.S. 1982. Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacteria in a *Zostera marina* community. *Can. J. Microbiol.* 28: 605-610.
- Chanway, C.P. and Holl, F.B. 1992. Influence of soil biota on Douglas fir *Pseudotsuga menziesii* seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. *Can. J. Bot.* 70:1025-1031.
- Esashi, Y. 1991. Ethylene and seed germination. *In: Matto, A.K. and Suttle, J.C. (ed.). The plant hormone ethylene.* CRC Press. Florida, USA. p. 133-157.
- Gantar, M.; Kerby, N.W. and Rowell, P. 1993. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria: III. The role of a hormogonia-promoting factor. *New Phytol.* 124:505-513.
- Glick, B.R. 1995. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol. Adv.* 13: 247-261.
- Glick, B.R.; Liu, C.; Ghosh, S. and Dumbroff, E.B. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biol. Biochem.* 29:1233-1239.
- Glick, B.R.; Patten, C.L.; Holguín, G. and Penrose, D.M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, England. 267 p.
- González, L.E. and Bashan, Y. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microb.* 66: 1527-1531.
- Holguín, G., Bashan, Y., Mendoza-Salgado, R.A., Amador, E., Toledo, G. Vázquez, P. and Amador, A. 1999. La microbiología de los manglares, bosques

- en la frontera entre el mar y la tierra. *Ciencia y Desarrollo* 25(44): 26-35.
- Holguín, G. and Bashan, Y. 1996. Nitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol. Biochem.* 28: 1651-1660.
- Holguín, G.; Vázquez, P. and Bashan, Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of the mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fert. Soils* 33: 265-278.
- Holguín, G. and Glick, B.R. 2001. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecol.* 41: 281-288.
- Holguín, G. and Glick, B.R. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the Tet promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microbial Ecol.* 46:122-133.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283-307.
- Mendoza-Salgado, R. E. 1983. Identificación, distribución y densidad de la avifauna marina en los manglares: Puerto Balandra, Enfermería y Zacatecas en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México. 55 p.
- Okon, Y.; Albrecht, S.L. and Burris, R.H. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microb.* 33: 85-88.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Puente, M.E. and Bashan, Y. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15: 49-60.
- Puente, M.E.; Holguín, G.; Glick, B.R. and Bashan, Y. 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halofraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 283-292.
- Rojas, A.; Holguín, G.; Glick, B.R. and Bashan, Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 181-187
- Subsecretaría de Coordinación. 1992. Datos básicos del sistema salud. Gobierno del Estado de Baja California Sur, México. 22 p. (Reporte Técnico).
- Sundara-Rao, W.V.B. and Sinha, M.K. 1963. Phosphate dissolving micro-organisms in the soil and rhizosphere. *Indian J. Agri. Sci.* 33: 272-278.
- Toledo, G.; Bashan, Y. and Soeldner, A. 1995. *In vitro* colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 1012-1020.
- Vazquez, P.; Holguín, G.; Puente, M.E.; Lopez-Cortes, A. and Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fert. Soils* 30: 460-468.