

MÉTODO EFECTIVO PARA LA DESINFECCIÓN TOTAL DE ESPORAS DE HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES (HMA): AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDOSPÓRICAS EN *Glomus clarum*

Lorelí Mirabal[✉], E. Ortega, Rosa Rodés y F. Fernández

ABSTRACT. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate endosymbionts, which are present in many natural and agricultural ecosystems and have a great responsibility in plant physiology integrity. This research work is based on different isolations of *Glomus clarum*, coming from pure cultures of INCA strain collection. 25 endosporic bacterial strains were isolated, purified and subjected to several morphological and biochemical tests, among which aerobiosis and N-fixing capacity resulted very interesting. Three isolated bacteria had coincident characteristics with *Gluconoacetobacter diazotrophicus* diazotroph endophyte. Besides, an effective method for the complete disinfection of the outer AMF spore wall is presented.

Key words: endosporic bacteria, *Glomus clarum*, total disinfection, vesicular arbuscular mycorrhizae (AMF)

RESUMEN. Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) son endosimbiontes obligados, presentes en muchos ecosistemas naturales y agrícolas, con gran responsabilidad en la integridad fisiológica de la planta. Esta investigación se basa en la realización de diferentes aislamientos de *Glomus clarum*, proveniente de cultivos puros del cepario del INCA. Se aislaron y purificaron 25 cepas bacterianas endospóricas, a las cuales se les realizaron varias pruebas morfológicas y bioquímicas, siendo muy interesantes la aerobiosis y la capacidad nitrificadora. Tres cepas bacterianas aisladas tienen características coincidentes con el endófito diazótrofo *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. Además, se estableció un método efectivo para la desinfección total de la pared externa de las esporas de HMA.

Palabras clave: bacteria endospórica, *Glomus clarum*, desinfección total, micorrizas vesiculares arbusculares (HMA)

INTRODUCCIÓN

Uno de los microorganismos más estudiados han sido los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), los cuales forman asociaciones micorrízicas, a partir de la unión de estos con las raíces de las plantas. Estos están considerados simbiosis universales, debido a que están presentes de manera natural, aproximadamente en el 85 % de las especies vegetales con interés agronómico (1).

La interacción de los HMA con organismos del suelo es un fenómeno muy estudiado y donde los microorganismos rizosféricos juegan un papel muy importante en el desarrollo, la estabilidad y la eficiencia de las micorrizas.

La germinación de los HMA se produce eficientemente en suelo no estéril, destacando la importancia de los organismos del suelo relacionados con este fenómeno (2).

Observaciones morfológicas con colorantes fluorescentes han revelado alrededor de 250,000 bacterias vivas en el interior de cada espora (3).

Bacterias endófitas diazótropas pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* y *Acetobacter*, han sido detectadas en micelio de HMA en suelos tropicales (4) y recientemente se detectó la presencia del género *Burkholderia* en aislamiento de HMA *Gigaspora margarita* (BEG 34) (5).

Debido a la importancia tanto económica como agrícola de los HMA, el siguiente trabajo tiene como objetivos estandarizar un método efectivo para la desinfección total de esporas, así como detectar y caracterizar posibles bacterias endospóricas en HMA *Glomus clarum* del cepario del INCA.

Lorelí Mirabal, Reserva Científica y Dr.C. F. Fernández, Investigador Auxiliar del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas; Dres.C. E. Ortega y Rosa Rodés, Profesores Titulares del Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

✉ loreli@inca.edu.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y desinfección de esporas. Las esporas de *Glomus clarum* se aislaron del suelo por centrifugación (6), procedentes de cultivos puros del cepario del INCA y se depositaron en viales de 1.5 mL, a razón de 50 esporas por vial.

Para la desinfección total de las esporas se emplearon dos metodologías: método 1, cloramina-T 2 %, sulfato de estreptomycin 200 mg L⁻¹ y SDS 200 mg L⁻¹ durante 30 minutos, seguido de tres lavadas con agua destilada estéril durante 30 minutos (7) y una variante de este método hecha por los autores, para la cual se utilizó cloramina-T al 5 % (se lavó cinco veces), *tween* 40 (1 gota por vial) y cefalexina (2.5 g por litro); los viales se dejaron en reposo durante seis horas conteniendo el antibiótico. Al pasar este tiempo se lavaron las esporas con agua destilada estéril (tres veces) y se inocularon en los medios de cultivo: LGI (libre de nitrógeno, 10 % de sacarosa y pH 5.5) (8), AN (Agar nutriente) y SYP (medio de cultivo enriquecido con extracto de levadura, sacarosa y sales, pH 6.2) (9).

Aislamiento y purificación de bacterias endospóricas. Se inocularon de forma superficial esporas intactas (aproximadamente 30 esporas por placa de cultivo) y maceradas (0.1 mL del producto macerado por placa de cultivo). Se incubaron durante siete días a 30°C. Las colonias obtenidas fueron seleccionadas teniendo en cuenta su morfología y frecuencia de aparición en el medio de cultivo, las cuales fueron observadas al microscopio estereoscópico. La purificación tuvo lugar en medio LGI, donde se inocularon por agotamiento las bacterias para conseguir colonias aisladas.

Caracterización morfológica y bioquímica de los aislados. A los aislados se les realizó tinción de Gram (10), provenientes de cultivos frescos de Agar nutriente (24-48 horas). Para la detección de la enzima catalasa se utilizó peróxido de hidrógeno al 10 % y para observar los requerimientos de oxígeno (11) se trabajó con el medio de cultivo tioglicolato.

Se evaluó la actividad de reducción de acetileno (ARA) mediante cromatografía gaseosa (12). Se empleó un detector Taguchi, con aire como gas portador a una presión de ocho libras por pulgada cuadrada (55kPa), con columnas rellenas con Porapak. Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa *Logger Pro. Vernier Software*, versión 1.06, 1997.

Las bacterias con forma bacilar, Gram negativas, reductoras de acetileno y formadoras de colonias naranjas en medio de cultivo LGI, fueron inoculadas en medio Agar papa (13) y medio basal de Gordon (14), para los que se probaron seis azúcares: manitol (M), manosa (m), lactosa (l), fructuosa (f), glucosa (g) y sacarosa (s). Se considera resultado positivo el cambio de color del medio de malva amarillo, el indicador utilizado fue bromocresol púrpura. En el caso del medio Agar papa se utilizó una cepa de *G. diazotrophicus* como control positivo.

Las características morfológicas de las colonias fueron observadas al microscopio estereoscópico, incubadas durante siete días a 30°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la desinfección superficial de las esporas, autores como Reis han empleado seis metodologías, con el objetivo de validar la presencia de la bacteria endófito *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en esporas de HMA, en cultivos de caña de azúcar en Río de Janeiro (15). Otros autores plantean que existen fallos en la descontaminación de la pared de las esporas, producto de la asociación de estas con bacterias (16).

En este trabajo se emplean varias metodologías con el objetivo de obtener una completa desinfección de la pared externa de las esporas. Con el método 1 (ver Materiales y Métodos) aparecían muchos contaminantes en las placas de cultivo, generalmente hongos, los cuales no permitían un aislamiento de las bacterias obtenidas. Además, este no era lo suficientemente efectivo como para desinfectar totalmente la pared externa de las esporas, ya que se observó un crecimiento bacteriano en placas petri donde se inocularon esporas intactas. Debido a ello, en estos experimentos se trabajó con modificaciones del método 1 (7), persiguiendo la completa desinfección de la pared externa de las esporas y para tener la certeza de que las bacterias aisladas fueran bacterias endospóricas.

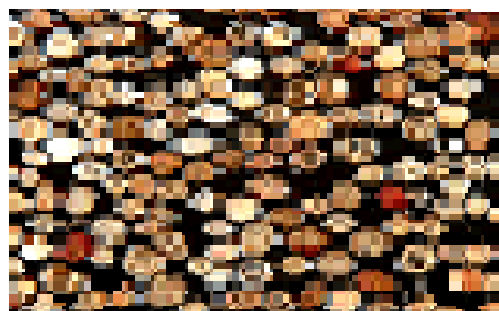


Figura 1. Esporas de *Glomus clarum*

Cuando se utilizó el método 1 (modificado por los autores) de desinfección total de la pared de las esporas, se obtuvo crecimiento bacteriano solo en las placas donde se habían inoculado bacterias maceradas, en los tres medios de cultivo citados en Materiales y Métodos. Este resultado es una evidencia de la presencia de bacterias endospóricas en HMA *Glomus clarum*. Algunos autores han observado por microscopía electrónica la presencia de estructuras en el interior de las esporas de diferentes especies de HMA (*Glomus caledonium*, *Acaulospora laevis* y *Gigaspora margarita*) (17, 18). Además, se han realizado pruebas morfológicas y moleculares que demuestran que en las esporas de *G. margarita* (aislado BEG 34) existen verdaderas bacterias; además, amplificaron ARN 16S bacteriano desde ADN total de esporas y por secuenciación directa indicaron homología con bacterias del género *Burkholderia* (3).

De las bacterias crecidas en los tres medios de cultivo, se aislaron y purificaron 25 cepas bacterianas con características morfológicas diferentes como se muestra en la Tabla I.

Tinción de Gram. A las 30 horas de incubación aproximadamente, se detectó crecimiento para la realización de la tinción, observándose predominio de microorganismos bacilares y Gram negativos (Tabla I). En la hifosfera de HMA *Glomus fasciculatum* se han observado resultados similares (19).

Tolerancia al oxígeno. Debido a la ubicación del crecimiento en tubos con medio Tioglicolato, se puede inferir que todas las cepas son aerobias, detectándose en casi todos los aislados actividad catalasa. El resultado fue negativo en las cepas 15 y 20, y difuso en las cepas 8, 19 y 21, donde no se observó claramente la efervescencia causada por la liberación de oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno en presencia de la enzima catalasa.

Capacidad reductora de acetileno. Se detectaron picos de actividad nitrogenasa en todas las cepas ensayadas. Los valores de ARA de los aislados oscilan entre 0.7 y 4 nmol de etileno producido.hora⁻¹.mL⁻¹ de medio de cultivo. La cepa *Gluconoacetobacter diazotrophicus* por sus características de microorganismo diazótrofo mostró un

valor de ARA de 29.9 nmol de etileno.hora⁻¹.mL⁻¹ de medio de cultivo.

Medio Agar papa. En este medio *Gluconoacetobacter diazotrophicus* forma colonias carmelitas. Sólo las cepas 8, 17 y 18 fueron capaces de formar colonias carmelitas similares al control positivo, siendo ésta una característica de gran importancia seguida con fines taxonómicos para el género *Acetobacter* (20) (Tabla II).

Utilización de azúcares. Las cepas 8, 17 y 18 fueron capaces de tornar el medio de malva a amarillo. Los resultados se muestran en la Tabla II. Dichas cepas fueron capaces de utilizar sacarosa como única fuente de carbono, además crecieron en medios de cultivo que solo tienen como fuente de carbono glucosa y fructuosa, y en el caso de la cepa 8 y 18, manosa.

La concentración final de estos azúcares en el medio es de 0.5 %. Para el caso de la sacarosa esta concentración no resulta relevante, ya que es sabido que son capaces de crecer en perfectas condiciones en medio LGI. Pocas bacterias crecen a tan altas concentraciones de este azúcar, lo que resulta distintivo de otros grupos bacterianos. De hecho, las cepas objeto de este estudio fueron conservadas en medio LGI durante tres meses, conservando perfectamente la viabilidad.

Tabla I. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas aisladas

Cepas	Tinción de Gram	Morfología del microorganismo	Crecimiento en Agar nutriente (24-48 h)	Actividad Catalasa	Características de la colonia en LGI (incubadas a 30°C durante 7 días)
1	-	Cocos grandes	+	+	Colonias elevadas, naranjas oscuras cremosas
2	-	Coco-bacilos	+	+	Colonias amarillas oscuras
4	-	Bacilos	+	+	Colonias amarillas claras
5	-	Bacilos	+	+	Colonias amarillas claras
6	+	Bacilos pequeños	+	+	Colonias rosadas oscuras
7	+	Bacilos finos y pequeños	+	+	Colonias amarillas claras
8	-	Bacilos pequeños y delgados	+	D	Colonias naranjas
9	+	Bacilos	-	+	Colonias amarillas oscuras elevadas, medianas, lisas
10	-	Cocos	+	+	Colonias amarillas oscuras
11	-	Cocos	+	+	Colonias amarillas oscuras, elevadas
12	+	Bacilos	-	+	Colonias amarillas oscuras, elevadas, medianas, lisas
13	-	Bacilos, alargados y finos	-	+	Naranjas cuando provienen del medio LGI y en medio de cultivo SYP son amarillas pálidas y más grandes
14	+	Bacilos	-	+	Colonias amarillas claras
15	+	Cocos	+	-	Colonias amarillas
16	-	Bacilos	+	+	Colonias amarillas oscuras, lisas
17	-	Bacilos pequeños	+	+	Colonias naranjas
18	-	Bacilos	+	+	Colonias naranjas
19	+	Bacilos	-	D	Colonias naranjas
20	+	Bacilos con espora central y terminal	-	-	Colonias rosadas, elevadas
21	-	Bacilos largos	+	D	Colonias amarillas oscuras.
22	+	Bacilos	-	+	Colonias blancas en cultivo jóvenes (3-7 días) en medio LGI, con más días se muestra naranja-carmelita
23	+	Cocos grandes	+	+	Colonias amarillas claras
24	-	Bacilos	+	+	Colonias amarillas, lisas
25	-	Bacilos	+	+	Colonias blancas (3 días) en medio LGI, a los 5 días comienza a tomar color amarillento

Tabla II. Comportamiento en medio Agar papa y medio basal de Gordon de los aislados con características similares a *G. diazotrophicus*

Cepas	Medio Agar papa	Formación de ácido a partir de carbohidratos
2	no creció	(M) no creció; (m) no creció; (l) no creció; (g)-; (s)-; (f)
4	verde carmelita	(M) -; (m)+; (l)-; (g) +;(s) -; (f) +
5	no creció	(M) +; (m) +; (l)-; (g) -; (s) -; (f)-
8	carmelitas	(M)-; (m)+; (l)-; (g)-; (s)+; (f)-
16	amarillo	(M)+; (m)+; (l)+; (g)+; (s)+; (f)+
17	carmelita	(M)-; (m)-; (l)-; (g)+; (s) +; (f)+
18	carmelita	(M)-; (m)+; (l)-; (g)+; (s) +; (f)+
21	rosado	(M) +; (m) +; (l)+; (g)+; (s) -; (f)+
24	rosado	(M) -; (m) -; (l)-; (g)-; (s) -; (f)+
25	amarillo oscuro	(M) -; (m) +; (l)+; (g)+; (s) +; (f)+

D-Actividad catalasa difusa

(M)-manitol, (m)-manosa, (s)-sacarosa, (l)-lactosa, (f)-fructuosa, (g)-glucosa

Resultan de gran importancia las bacterias aisladas dadas sus características diazótroficas, lo que le brinda la capacidad entonces de tomar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a una forma utilizable por las plantas. Esto contribuye a un mejor funcionamiento de los HMA en ecosistemas agrícolas, sumándose a las numerosas bondades que ofrecen estos hongos tales como absorción de varios nutrientes, tolerancia a estrés biótico y abiótico y producción de hormonas. Recientemente fueron aislados genes *nif* a partir de cultivos de bacterias endospóricas pertenecientes al género *Burkholderia* (21).

CONCLUSIONES

El método de desinfección total de esporas (método 1 modificado por los autores) logró una completa desinfección de la pared externa de las esporas de *Glomus clarum*. Fueron aisladas y purificadas 25 cepas microbianas de las esporas de *Glomus clarum*, siendo muy interesante su aerobiosis y su capacidad nitro fijadora. Las cepas 8, 17 y 18 son bacilos Gram negativos, formadores de colonias naranjas en medio de cultivo LGI, capaces de reducir acetileno a etileno, formadores de colonias carmelitas en Agar papa y utilizan sacarosa, glucosa, fructuosa (cepas 8, 17 y 18) y manosa (cepas 8 y 18) como única fuente de carbono, características coincidentes con el endófito diazótrofo *Gluconoacetobacter diazotrophicus*.

REFERENCIAS

1. Fernández, F. Efecto del uso de las asociaciones micorrízicas arbusculares en diferentes substratos con algunas rizobacterias sobre la producción de posturas de café (C. arabica L.). [Tesis de grado], INCA, 1999.
2. Moose, B. The regular germination of resting spores and some observation on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular micorrhiza. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 1959, vol. 42, p. 273-286.
3. Bianciotto V.; Lumini, E.; Lanfranco, L.; Minerdi, D.; Bonfante, P. y Perotto, S. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no. 10, p. 4503-4509.

4. Gryndler, M. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. En: *Arbuscular micorrizas: Physiology and Function*, 2000, p. 239-262.
5. Bianciotto, V.; Bandi, C.; Minerdi, D.; Sironi, M.; Tichy, H. y Bonfante, P. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. 62, no. 8, p. 3005-3010.
6. Gedermann, J. W. y Nicolson, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycology Society*, 1963, vol. 46, p. 235-244.
7. Nair, M. G.; Safir, G. R. y Siquiera, J. O. Isolation and identification of vesicular- arbuscular-mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, vol. 57, p. 434-439.
8. Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. A new acid-tolerant nitrogen fixation bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 1988, vol. 108, p. 23-31.
9. Caballero, J. y Martínez, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, p. 1532-1537.
10. Mateos, P. Observaciones de los microorganismos: el microscopio, preparación y examen de muestras. Dept. de Microbiología y Genética. Fac de Farmacia. Univ. de Salamanca (Internet). 2001.
11. Harigan, W. F. y McCance, M. Métodos de laboratorio en microbiología. La Habana : Editorial Academia, 19687, 82 p.
12. Mirabal, L. Otro microorganismo fijador de nitrógeno en el tallo de la caña de azúcar: ¿*Bacillus brevis*? [Tesis de grado]. Universidad de La Habana, 1999.
13. Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Reis, V. y Döbereiner, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 1991, vol. 137, p. 111-117.
14. Gordon, R. E.; Haynes, W. C. y Pang, C. H. N. The genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook*. 1973, 427 p.
15. Reis, V.; Paula, M. y Döbereiner, J. Ocorrence de micorrizas arbusculares e da bacteria diazotrofica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-acúcar. *Pesq. agropec.*, 1999, vol. 34, no. 10, p. 1933-1941.
16. Walley, F. y Germida, J. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza*, 1996, vol. 6, p. 43-49.
17. Bonfante P.; Balestrini, R. y Mendgen, K. Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution. *New. Phytol.*, 1994, vol. 128, p. 93-101.
18. Scannerini, S. y Bonfante, P. Bacteria and bacteria-like objects in endomycorrhizal fungi. En: *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. MIT Press, Cambridge Mass. 1991, p. 237-287.
19. Vancura, V.; Orozco, M. O.; Grauová, O. y Prikřil, Z. Properties of bacteria in the hyphosphere of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Agric. Ecos. Environ.*, 1989, vol. 29, p. 421-427.
20. Fernández, L. Caracterización fisiológica de dos endófitos diazótroficos de la caña de azúcar. Una posible nueva especie. [Tesis de Maestría], 2001.
21. Minerdi, D.; Renato, F.; Gallo, R.; Boarino, A. y Bonfante, P. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 2, p. 725.

Recibido: 29 de junio del 2001

Aceptado: 4 de diciembre del 2001