



Universidad de La Habana
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas



Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas

**Microorganismos-asociados al interior de las esporas del
Hongo Micorrizógeno Arbuscular *Glomus mosseae*
incrementan el crecimiento de raíces y favorecen el
desarrollo del hongo *in vitro***

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: M. Sc. Loreli de los Angeles Mirabal Alonso

Tutor: Dr. C. Eduardo Ortega Delgado

La Habana, 2011

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

Mirabal-Alonso, Loreli A. Microorganismos-asociados al interior de las esporas del Hongo Micorrizógeno Arbuscular *Glomus mosseae* incrementan el crecimiento de raíces y favorecen el desarrollo del hongo in vitro [Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas] La Habana : Universidad de La Habana, 2011. 95 p.

Según Sistema de Referencia Apellido, año

Mirabal-Alonso, Loreli A. 2011. Microorganismos-asociados al interior de las esporas del Hongo Micorrizógeno Arbuscular *Glomus mosseae* incrementan el crecimiento de raíces y favorecen el desarrollo del hongo in vitro [Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas] La Habana : Universidad de La Habana. 95 p.

| INDICE | P á g s . |
|--|------------------|
| Síntesis | |
| I. Introducción | 1 |
| II. Revisión Bibliográfica | 5 |
| 2.1 La simbiosis micorrízica: Micorrizas Arbusculares | 5 |
| 2.2 Interacción Hongos Micorrizógenos Arbusculares-otros microorganismos | 7 |
| 2.3 Hongos Micorrizógenos Arbusculares y bacterias asociadas | 10 |
| 2.3.1 Simbiosis y modo de transmisión entre bacterias asociadas y H M A | 12 |
| 2.4 Germinación de las esporas de H M A | 14 |
| 2.5 El fósforo, nutriente esencial | 17 |
| 2.5.1 Microorganismos solubilizadores de fosfato | 18 |
| 2.5.2 Acumulación de polifosfatos | 19 |
| 2.6 Estudios sobre microorganismos-asociados a H M A . Estado del Arte en Cuba | 20 |
| 2.7 Desinfección de las esporas de H M A | 21 |
| III. Materiales y Métodos | 23 |
| 3.1 Material biológico utilizado | 23 |
| 3.2 Desinfección de las esporas y cultivo de microorganismos-asociados | 23 |
| 3.2.1 Metodología de desinfección de esporas para su cultivo <i>in vitro</i> | 25 |
| 3.3 Purificación de los microorganismos-asociados aislados | 25 |
| 3.4 Características morfológicas y culturales de los microorganismos-asociados aislados | 25 |
| 3.4.1 Características morfológicas. Tinción de Gram | 25 |
| 3.4.2 Características culturales (colonias) | 26 |
| 3.5 Detección de la presencia de quitina en los cultivos de los aislados | 26 |
| 3.6 Coloración de las colonias en medio Agar Papa modificado | 27 |
| 3.7 Coloración de las colonias en medio NFb | 27 |
| 3.8 Extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación | 27 |
| 3.9 Características bioquímicas de los microorganismos-asociados aislados | 28 |
| 3.9.1 Producción de ácido a partir de carbohidratos | 28 |
| 3.9.2 Hidrólisis del almidón | 29 |
| 3.9.3 Reducción del nitrato | 29 |
| 3.9.4 Actividad catalasa | 30 |
| 3.9.5 Requerimientos de oxígeno | 30 |
| 3.9.5.1 Crecimiento en medio Tioglicolato | 30 |
| 3.9.5.2 Determinación del crecimiento en condiciones de anaerobiosis | 30 |
| 3.9.6 Características del crecimiento en condiciones salinas | 30 |
| 3.9.7 Respuesta de los aislados a determinados antibióticos | 31 |
| 3.10 Capacidad solubilizadora de fosfatos y concentración de fosfato solubilizado por los microorganismos-asociados | 32 |
| 3.11 Detección de polifosfatos en los microorganismos-asociados | 34 |
| 3.12 Influencia de los microorganismos-asociados aislados sobre el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz | 35 |
| 3.12.1 Producción de indol | 35 |
| 3.13 Efecto de los microorganismos-asociados aislados, sobre la germinación y el crecimiento hifal de <i>Glomus mosseae</i> (IN CAM -2) en condiciones <i>in vitro</i> | 36 |
| 3.14 Determinaciones Estadísticas | 37 |
| IV. Resultados | 38 |
| 4.1 Desinfección de las esporas de H M A <i>Glomus mosseae</i> | 38 |
| 4.2 Microorganismos-asociados a esporas del H M A <i>Glomus mosseae</i> | 41 |
| 4.3 Características morfológicas de los aislados | 43 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 4.4 | Ubicación taxonómica de los microorganismos-asociados aislados de esporas de HMA <i>Glomus mosseae</i> que fueron conservados | 43 |
| 4.4.1 | Características de los microorganismos-asociados aislados EndoGm1 y EndoGm11 | 43 |
| 4.4.1.1 | Análisis molecular de los microorganismos-asociados aislados EndoGm1 y EndoGm11 | 45 |
| 4.4.2 | Aislados con características de bacterias | 46 |
| 4.4.2.1 | Característica del crecimiento de los aislados en medio Agar Papa modificado y NFb | 47 |
| 4.4.2.2 | Extracción, purificación y secuenciación del 16s ARNr | 48 |
| 4.4.3 | Caracterización de los microorganismos-asociados aislados a partir de esporas de <i>G. mosseae</i> (INCAM-2) | 49 |
| 4.4.3.1 | Producción de ácido a partir de carbohidratos | 50 |
| 4.4.3.2 | Hidrólisis del almidón | 50 |
| 4.4.3.3 | Reducción de nitrato | 51 |
| 4.4.3.4 | Actividad catalasa | 51 |
| 4.4.3.5 | Características del crecimiento en condiciones salinas | 51 |
| 4.4.3.6 | Respuestas a 12 antibióticos diferentes en distintas concentraciones de los microorganismos-asociados aislados con características de bacterias | 52 |
| 4.5 | Relación con el metabolismo del fósforo de los microorganismos-asociados aislados de las esporas desinfectadas de <i>Glomus mosseae</i> | 53 |
| 4.5.1 | Capacidad solubilizadora de fosfatos y concentración de fosfato solubilizado | 53 |
| 4.5.2 | Acumulación de polifosfatos | 55 |
| 4.6 | Influencia de microorganismos-asociados a esporas de <i>Glomus mosseae</i> sobre el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz | 57 |
| 4.7 | Efecto de los microorganismos-asociados, aislados de esporas desinfectadas de <i>Glomus mosseae</i> (INCAM-2) sobre la germinación y el crecimiento hifal del hongo micorrizógeno en condiciones <i>in vitro</i> | 59 |
| V. Discusión | | 66 |
| 5.1 | Desinfección de esporas del HMA <i>Glomus mosseae</i> (INCAM-2) | 66 |
| 5.2 | Microorganismos-asociados a esporas de HMA <i>Glomus mosseae</i> | 68 |
| 5.2.1 | Aislados con características de levaduras | 70 |
| 5.2.2 | Aislados con características de bacterias | 72 |
| 5.3 | Caracterización de los microorganismos-asociados aislados a esporas de <i>G. mosseae</i> | 75 |
| 5.4 | Interacción entre esporas y microorganismos-asociados | 76 |
| 5.5 | Capacidad solubilizadora de fosfatos | 78 |
| 5.6 | Acumulación de polifosfatos | 82 |
| 5.7 | Influencia de microorganismos-asociados a esporas de <i>G. mosseae</i> sobre el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz | 85 |
| 5.8 | Experimento <i>in vitro</i> . Efecto de los microorganismos-asociados, aislados de esporas desinfectadas de <i>Glomus mosseae</i> (INCAM-2) sobre la germinación y el crecimiento hifal de este HMA | 88 |
| 5.9 | Consideraciones generales | 91 |
| VI. Conclusiones y Recomendaciones | | 94 |
| VII. Referencias bibliográficas | | 96 |
| Anexos | | |

Síntesis

El método de desinfección CTCf eliminó los contaminantes externos de las esporas del hongo micorrizógeno arbuscular (HMA) *Glomus mosseae* (INCAM-2). A partir de esporas desinfectadas e intactas no hubo crecimiento microbiano en tres medios de cultivo durante siete días, sin embargo a partir de esporas igualmente desinfectadas pero maceradas se obtuvo crecimiento de colonias microbianas en medio de cultivo axénico, lo cual indicó la existencia de microorganismos íntimamente asociados a las esporas del HMA *Glomus mosseae*. Las determinaciones morfológicas y moleculares demuestran la existencia en las esporas de las especies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* y *Delftia acidovorans* y las levaduras del género *Rhodotorula* y *Cryptococcus*.

La mayoría de los microorganismos-asociados ensayados solubilizan fosfato tricálcico y fosfato de hierro y algunos acumulan polifosfatos, lo que sugiere la participación de la microbiota-asociada al HMA en la nutrición fosfórica de la planta y una potencial triple interacción microorganismos-asociados-hongo-planta. En un experimento de interacción *in vitro*, algunos de los microorganismos-asociados y en ausencia de órgano vegetal alguno, provocan y acortan el tiempo de germinación de las esporas de *Glomus mosseae* e incrementan las ramificaciones de las hifas. Ocurre la formación de nuevas esporas y se evidencia la atracción de las hifas por las colonias microbianas. Además se demostró que cinco de los aislados de microorganismos-asociados de las esporas de *Glomus mosseae* favorecen *in vitro* el desarrollo radical en plántulas de arroz. Estos resultados pudieran ser indicativos del papel de los microorganismos-asociados en la posible triple interacción microorganismos-asociados, HMA y planta.

I- Introducción

La simbiosis micorrízica está universalmente extendida en los ecosistemas terrestres y agrosistemas (Jeffries y Barea, 2011). Al colonizar las raíces de las plantas el hongo completa su ciclo de vida y extiende su micelio por el suelo rizosférico (Finlay, 2008). Alrededor del 80% de las especies vasculares (~1000 géneros) forman asociaciones simbióticas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) (Smith y Read, 2008). Este hecho explica las continuas investigaciones que se realizan, con el objetivo de contribuir al entendimiento de las funciones biológicas y ecológicas de las micorrizas (Azcón-Aguilar *et al.* 2009). Esta simbiosis forma parte de la evolución de las plantas y hoy juega un importante papel en la sucesión, salud y estabilidad de las comunidades vegetales (Khasa *et al.* 2009). El HMA *Glomus mosseae* objeto de nuestro estudio, constituye una de las cepas de la colección del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; existen resultados positivos que avalan el uso de esta cepa en distintos cultivos de interés agronómico (Rivera *et al.* 2007) y es uno de los microorganismos que forma parte del biofertilizante ECOMIC.

Las raíces colonizadas por HMA potencian el crecimiento de las plantas, debido al incremento en la toma de nutrientes (particularmente P y N) (Barea *et al.* 2005; Richardson *et al.* 2009; Fitter *et al.* 2011), aumentan la protección contra hongos patógenos del suelo y estreses ambientales (St-Arnaud y Vujanovic, 2007; Rinaudo *et al.* 2010) y mejoran el estado hídrico de las plantas (Jeffries *et al.* 2003; Barea, 2010).

Muchas bacterias completan su ciclo de vida dentro de células eucarióticas, ofreciendo ejemplos de simbiosis con diferentes niveles de integración entre las partes (Lambers *et al.* 2009). Ellos incluyen asociaciones con patógenos y relaciones mutualistas que son filogenéticamente diversas con rasgos distintivos del genoma (Moran y Wernegreen, 2000). Dichas bacterias residentes pueden ser encontradas dentro de células especializadas de insectos, gusanos del reino animal y dentro de órganos especializados (nódulos) en un número pequeño de especies de plantas que establecen simbiosis con procariontes fijadores de nitrógeno (Hartmann *et al.* 2009). La recién descubierta invasión intracelular de algas verdes en salamandras, -mutualismo ectosimbiótico- única asociación conocida entre vertebrados y algas eucarióticas, y la transferencia de fotosintatos del simbiote al hospedero (Kerney *et al.* 2011), puede dar una idea de la novedad del tema de las simbiosis en los estudios biológicos.

Los HMA no sólo juegan un papel importante en la biología y la ecología de la mayoría de las plantas terrestres, sino que interactúan con diferentes tipos de bacterias durante su ciclo de vida (Bianciotto *et*

al. 2001; Barea *et al.* 2005) e incluso se ha encontrado que ofrecen un nicho ecológico para otros microorganismos (Hijri *et al.* 2002). En el reino de los hongos hay un limitado número de ejemplos de endobacterias viviendo en asociación con hongos: *Geosiphon pyriformis* es un hongo recientemente ubicado en el phylum Glomeromycota y relacionado con los HMA (Schüßler y Walker, 2011), con la posibilidad de hospedar cianobacterias en la región apical de la hifa (Schüßler y Wolf, 2005; Schüßler y Walker, 2011).

Desde hace relativamente poco tiempo se encontró que los HMA pueden hospedar microorganismos del suelo, los cuales influirían beneficiosamente en la fisiología y desarrollo del hongo (Xavier y Germida, 2003; Artursson *et al.* 2006; Lumini *et al.* 2006; Lekberg *et al.* 2010). Los microorganismos pueden estar en el suelo circundante o adheridos a las esporas; numerosos estudios con enfoque ecológico han mostrado que muchos microorganismos del suelo interactúan con hongos hipogeos promoviendo actividad antagónica, competencia o sinergismo (Buzzini *et al.* 2005).

Uno de los primeros indicios sobre la interacción de HMA con otros microorganismos fue el trabajo de Walley y Germida (1996) quienes observaron estructuras parecidas a bacterias, que denominaron BLOs (Bacteria Like Organisms), asociadas a la capa de la pared celular externa de la espora de *Glomus clarum* NT4, pero consideraron su presencia debido a ineficiencias en la descontaminación de las esporas. En *Gigaspora margarita*, Bianciotto *et al.* 1996, plantearon que las esporas y el micelio pueden albergar organismos semejantes a bacterias. Más recientemente, fueron asignadas a una nueva especie y género bacteriano, "*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*", en el citoplasma de espora y el micelio simbiótico de especies de hongos *G. margarita*, *Scutellospora persica* y *Scutellospora castanea* (Bianciotto *et al.* 2003). Según Lumini *et al.* 2006, algunas bacterias parecen ser endosimbiontes obligados no cultivables y estar presentes en todas las etapas del ciclo de vida del hongo. En adición a esto, dos hongos filamentosos con diferentes fenotipos y secuencias semejantes al ADNr de ascomicetos fueron aislados de esporas saludables maceradas o esporas muertas de *Scutellospora castanea* (Hijri *et al.* 2002).

En este documento se utiliza el término "*microorganismos-asociados*" para denominar a los microorganismos procedentes del interior de las esporas de HMA desinfectadas completamente en el exterior, y bajo este mismo precepto se emplean los términos "*bacterias-asociadas*" y "*levaduras-asociadas*".

Bacterias aisladas del suelo circundante de las esporas del HMA tienen importancia ecológica debido a que se ha informado que tienen habilidad para influir en la germinación de las esporas y en el crecimiento hifal (Mosse, 1962; Walley y Germida, 1996; Xavier y Germida, 2003), degradar biopolímeros como proteínas, quitina y celulosa (Filippi *et al.* 1998, Roesti *et al.* 2005), inhibir el crecimiento de diferentes patógenos de plantas (Budi *et al.* 1999) y mejorar la estructura del suelo (Andrade *et al.* 1995). Recientemente se informó que *Paenibacillus validus* asociadas a esporas de *Glomus intraradices* tienen potencial para estimular el crecimiento de este hongo hasta la formación de esporas fértiles en ausencia de hospedero (Hildebrandt *et al.* 2006).

A partir de los antecedentes anteriores se plantea la siguiente **hipótesis: Asociados al interior de las esporas del HMA *Glomus mosseae* cohabitan microorganismos, que pueden ser aislados y tienen funciones relacionadas con la actividad biológica de las micorrizas en la nutrición de las plantas.**

Objetivo general: Determinar si existen microorganismos-asociados al interior de las esporas de *Glomus mosseae* (INCAM-2) y si se detectan en estas funciones relacionadas con la actividad biológica de los HMA.

Objetivos específicos:

1. Establecer una metodología de desinfección externa de las esporas de HMA *G. mosseae* (INCAM-2), que logre esporas completamente asépticas en sus paredes externas.
2. Aislar e identificar microorganismos-asociados al interior de la espora de *G. mosseae* (INCAM-2), asépticas en su ambiente externo y estudiar las características morfológicas y bioquímicas de los aislados.
3. Determinar las capacidades de los microorganismos-asociados aislados en la nutrición fosfórica de las plantas y en el desarrollo radical de las plantas en cultivo axénico.
4. Determinar si los microorganismos-asociados, ejercen alguna influencia sobre la germinación de las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2) y sobre el crecimiento de las hifas en condiciones *in vitro*, sin presencia de órganos vegetales en el medio de crecimiento.

Novedad Científica: Se desarrolló una nueva metodología de desinfección eficaz de las esporas de *Glomus mosseae*, que permitió el aislamiento de microorganismos a partir de estas, sin interferencia de la comunidad microbiana externa a las mismas. Por primera vez se describe el aislamiento de microorganismos-asociados al interior de esporas del género *Glomus* y se aíslan y cultivan nuevos géneros de bacterias-asociadas. En los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) se aíslan por

primera vez levaduras-asociadas a las esporas. Siete de los microorganismos-asociados (dos levaduras y cinco bacterias) fueron inscritos en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos y se brinda en la tesis sus Números de Acceso. Se informa por primera vez los microorganismos aislados en íntima asociación con esporas de HMA del género *Glomus* que tienen la capacidad de solubilizar fosfatos y acumular polifosfatos, fenómenos ambos estrechamente relacionados con el papel favorable de los HMA en la nutrición fosfórica de las plantas. Se demostró la influencia de los microorganismos-asociados a esporas de *G. mosseae* sobre el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz (longitud promedio, biomasa y número de las raíces). Se demostró por primera vez que algunos de los microorganismos-asociados encontrados, permiten la germinación de las esporas y el crecimiento hifal de *G. mosseae* en condiciones *in vitro* y sin la presencia de ningún órgano o extracto vegetal en el medio e incluso hasta la formación de nuevas esporas. Las funciones de los microorganismos-asociados permiten plantear un hipotético papel en una triple interacción, posiblemente simbiótica: “microorganismos-asociados”-hongo-planta.

Importancia teórica: Este trabajo descubre la presencia de microorganismos-asociados a las esporas del HMA *G. mosseae* y contribuye a incrementar el conocimiento sobre la biología de estos microorganismos-asociados; aporta nuevas metodologías para la desinfección, el aislamiento y la conservación de estos microorganismos una vez extraídos de su hábitat natural. Se ofrecen evidencias sobre el papel multifuncional de estos microorganismos-asociados y su identificación con métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares.

Importancia práctica: Se demostró la eficiencia del método de desinfección (CTCf) en esporas de *G. mosseae* y su utilidad para el aislamiento de microorganismos-asociados al interior de las esporas. Se revela la coinoculación natural de esporas de *G. mosseae* con bacterias o levaduras beneficiosas, lo que pudiera aprovecharse estableciendo sistemas agrícolas sostenibles, como parte de la estrategia de manejo integrado de cultivos, disminuyendo el uso de productos químicos y contribuyendo a mitigar el deterioro ambiental. Los resultados permiten sugerir el cultivo de hongos micorrizógenos arbusculares en medios artificiales, aprovechando la influencia beneficiosa de la levadura-asociada *Rhodotorula glutinis*, aislada e identificada en esta tesis como una posible vía de producción de biofertilizantes a base de HMA, en un medio artificial, sin suelo y sin órganos de plantas, como es obligatorio hasta el momento en la práctica de la producción de biofertilizantes a base de hongos micorrizógenos.

II- Revisión bibliográfica

2.1- La simbiosis micorrízica: Micorrizas Arbusculares

Tomando en consideración la distribución ecológica de la simbiosis, su morfo-anatomía y estructura, las micorrizas se clasifican en tres grupos principales: ectomicorrizas, endomicorrizas y ectendomicorrizas (Peyronel *et al.* 1969).

Las ectomicorrizas se pueden visualizar macroscópicamente, pues el hongo rodea a la raíz formando una capa o manto de micelio. Previamente, las hifas colonizan la corteza de la raíz y se introducen entre las células, sin que ocurran penetraciones intracelulares formando de esta manera la red de Harting. En las raíces ocurren cambios anatómicos evidentes, entre otros, el crecimiento dicotómico de las raíces (Garrido, 1988; Strullu, 1991).

Las endomicorrizas son difícilmente apreciables a simple vista, no forman capas fúngicas externas y se propagan a través de las raíces, alcanzando el interior de las células corticales, pero sin franquear la endodermis. Las hifas penetran la pared celular y se diferencian formando los arbusculos. Estos son estructuras intracelulares, altamente especializadas y ramificadas, con hifas muy finas para el intercambio de nutrientes y señales entre los simbiosiontes (Smith y Read, 2008).

Finalmente, como un nivel intermedio, están las ectendomicorrizas, que presentan características de los dos tipos de simbiosis anteriores (Garrido, 1988; Strullu, 1991).

Datos fósiles y moleculares han demostrado que los HMA son muy antiguos, datan de alrededor de 350 a 400 millones de años (Bianciotto *et al.* 1996; 2000). Existen varias hipótesis que defienden distintas teorías acerca del origen de la simbiosis. Pirozynski y Malloch (1975) sugirieron que fuese un alga semiacuática con quien se asociara el hongo. Recientemente ha surgido la hipótesis de que un hongo llamado *Geosiphon pyriformis* (Kuts & Wettstein) (Morton, 1990), que no se asocia con plantas superiores sino con cianobacterias fijadoras de CO₂ y de N₂. Otros trabajos demostraron que en *Geosiphon pyriformis* existen secuencias de nucleótidos (18S ARNr), que tienen gran similitud con hongos pertenecientes al phylum Glomeromycota, que con hongos fuera de este phylum (Gehrig *et al.* 1996) y sus esporas guardan cierta semejanza con especies típicas del género *Glomus* (Schübler *et al.* 1994).

Debido a la actividad fisiológica de la simbiosis hongo-cianobacteria, se conoce que es capaz de vivir en autotrofia de carbono y nitrógeno (Schüßler y Walker, 2011); quizás la asimilación de carbono por el micobionte, debido a los fotosintatos que libera la cianobacteria en el proceso de fotosíntesis indiquen una estrecha relación; constituyendo este un indicador de parentesco con hongos del orden Glomales, lo cual sugiere que ha existido una estrecha y obligada relación con procariontes autotróficos.

De relevancia para la presente investigación fue conocer que en *Geosiphon pyriformis* se detectaron microorganismos procariontes asociados; observándose especies de la cianobacteria *Nostoc* (usualmente *N. punctiforme*) (Schüßler y Walker, 2011). Sin embargo, *Geosiphon* junto al endosimbionte han sido considerados como un raro sistema endocitobiótico primitivo, porque los procariontes encontrados en su interior pueden ser separados experimentalmente (Kluge *et al.* 1997), poniéndose en evidencia no solo el origen de estos HMA, sino también que en el hongo reconocido como más antiguo se ha detectado la presencia de organismos semejantes a bacterias.

La importancia de la simbiosis micorrízica arbuscular ha sido reconocida hace algunos años (Varma y Hock, 1998; Smith y Read, 2008). La inmensa mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre viven asociadas, en forma de simbiosis mutualista, con los HMA. Las plantas, entre ellas las de interés agronómico (incluida orto-fruticultura), así como las especies arbustivas, sub-arbustivas y herbáceas, propias de los ecosistemas forestales, forman las llamadas “micorrizas arbusculares” (MA). El hongo MA, microscópico, coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, sin causar daño a la planta, llegando a ser fisiológica y morfológicamente parte integrante de dicho órgano. El hongo también desarrolla un micelio externo que, a modo de sistema radical complementario y altamente efectivo, coloniza el suelo que rodea la raíz y ayuda a las plantas a adquirir nutrientes minerales y agua. Se ha comprobado que las hifas del hongo en conjunto con otros microorganismos del suelo, contribuyen a la formación de agregados estables necesarios para mantener la estructura y por tanto, la calidad del suelo (Alocón, 2001).

La fina hifa externa del hongo penetra en las partículas del suelo y explora agua y nutrientes que envía a la raíz de la planta. El intercambio de nutrientes ocurre principalmente en los arbusculos, el hongo recibe el 20% del carbono orgánico fijado por la planta, probablemente como glucosa. La colonización radical ayuda a las plantas a competir en condiciones ambientales adversas, tales como: deficiencias de

nutrientes, daño por patógeno, estrés causado por fuerte acidificación del suelo o contaminación por metales pesados y sales (Khasa *et al.* 2009). Esto hace que la simbiosis micorrízica tenga amplias implicaciones y desde el punto de vista ecológico sea la simbiosis más importante que se establece en la naturaleza; más del 80% de las plantas son colonizadas por HMA (Barea, 2010).

La distribución geográfica de las asociaciones micorrízicas es muy amplia, encontrándose desde los polos hasta los trópicos (Mosse, 1973, Perry, 1990). Estos endófitos fúngicos tienen la capacidad de colonizar diversos ambientes y su éxito ecológico refleja un alto grado de diversidad en las capacidades genéticas y fisiológicas. No debe sorprender, entonces, hallar especies vegetales formando este tipo de asociación en la mayoría de los ecosistemas terrestres, siendo quizás las excepciones algunas plantas de zonas pantanosas y acuáticas (Solaiman e Hirata, 1995).

A las asociaciones micorrízicas se les han atribuido múltiples funciones, entre las que se destacan el mejoramiento de la superficie adsorbente del sistema radicular a través de un aumento significativo de éstas, aumento de la tolerancia a las toxinas, resistencia a condiciones adversas (sequía, salinidad, entre otras), cierta protección contra los patógenos radicales y como relevante el hongo formador de micorriza arbuscular ayuda a la planta asociada para incrementar la captación de iones, principalmente fosfatos, la cual puede ser seis veces superior a la que conseguirían en su ausencia (Azcón, 2001; Barea *et al.* 2008).

2.2- Interacción Hongos Micorrizógenos Arbusculares-otros microorganismos

En adición a la bien conocida interacción entre plantas y hongos, las micorrizas ofrecen un excelente nicho ecológico para otros microorganismos (Bonfante, 2003). Los hongos frecuentemente hospedan microorganismos del suelo, los cuales pueden influir de manera beneficiosa en la fisiología y el desarrollo de los propios hongos (Xavier y Germida, 2003; Artursson *et al.* 2006; Lumini *et al.* 2006). Estos microorganismos pueden encontrarse en el suelo circundante o ser transportados externamente por esporas de hongos.

Desde el punto de vista ecológico, muchos estudios muestran que numerosos microorganismos del suelo interactúan con los hongos, influyendo en el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis (Buzzini *et al.* 2005). Estas interacciones pueden ser positivas (Bagyaraj y Menge, 1978; Meyer y

Linderman, 1986 a, b; Gryndler *et al.* 1996), negativas (McAllister *et al.* 1995; Gryndler *et al.* 1996) o neutrales (Edwards *et al.* 1998).

Interacciones negativas incluyen reducción de la germinación de la spora y largo de la hifa en el estado extramitótico, decrecimiento de la colonización radical y declinación de la actividad metabólica del micelio interno (Gryndler *et al.* 1996).

Interacciones positivas incluyen el mejoramiento del establecimiento, desarrollo y funcionamiento de las micorrizas. Interacciones positivas sinérgicas han sido informadas entre HMA y bacterias promotoras del crecimiento de las plantas tales como fijadoras de nitrógeno, pseudomonads fluorescentes y bacilos esporulados (Hameeda *et al.* 2007). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal como por ejemplo *P. putida* han mostrado un incremento de la colonización radical de los HMA en plantas como el trébol subterráneo (Meyer y Linderman, 1986a).

Por otro lado, Azcón en 1987, informó que el crecimiento del micelio de las esporas de *G. mosseae*, se alarga en presencia de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas. Las bacterias que nodulan como por ejemplo *Frankia*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* generalmente establecen interacciones sinérgicas con los HMA. Se piensa que la simbiosis micorrízica arbuscular reduce el estrés de fosfato para la planta, siendo beneficioso para el sistema nitrogenasa en bacterias fijadoras de nitrógeno, resultando en un incremento en la fijación y mejorando por ende el contenido de nitrógeno en la planta (Fraga-Beddiary Le Tacon, 1990; Bethlenfalvay, 1992). A modo de conclusión se puede afirmar que el tipo de interacción entre el HMA y algunas bacterias depende del entorno del suelo, de las especies bacterianas, de las especies de HMA y de las especies de plantas también.

Las bacterias que habitan el suelo poseen amplio rango de capacidades metabólicas y actividades fisiológicas, entre ellas podemos encontrar: bacterias solubilizadoras de fosfatos, bacterias que participan en el reciclaje de los nutrientes, bacterias antagónicas, rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas, así como bacterias de vida libre o simbióticas diazotróficas que juegan un papel esencial en la fijación de nitrógeno atmosférico (Linderman, 1992).

Artursson y Jansson (2003) confirmaron la importancia de las bacterias asociadas a las micorrizas, las que años anteriores Garbaye (1994) había identificado como bacterias que ayudan a la micorrización y las denominó *mycorrhization helper bacteria* (MHB). Estos autores propusieron cinco mecanismos que

explican el comportamiento de las MHB: cambios beneficiosos en el suelo rizosférico, mejoramiento del reconocimiento entre la raíz y el hongo, incremento de la susceptibilidad de las plantas a la colonización micorrízica, mejoramiento del estado nutricional del hongo y estimulación de la germinación de los propágulos del hongo.

Estas poblaciones bacterianas tienen un efecto beneficioso en el crecimiento del HMA, no solo porque mejoran la colonización radical y estimulan el crecimiento de la hifa extrarradical, sino porque facilitan la germinación de las esporas (Gryndler *et al.* 2000). Este efecto ha sido visualizado con *Actinomycetes*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Bacillus* sp. (Xavier y Germida, 2003).

Después de varias investigaciones, Garbaye y Bowen (1989) señalaron que existían bacterias que ayudaban al hongo a adaptarse a vivir en simbiosis, localizándose en la vecindad del hongo en el suelo; con mucha frecuencia observaron *Pseudomonas fluorescens*, que en un 80% traían consigo un efecto positivo sobre la formación de las micorrizas y en un 20% exhibían un halo inhibitorio, revelando entonces que en la relación bacterias y su efecto sobre la formación de las micorrizas, no se debe ser totalmente absoluto.

También fueron encontradas bacterias formando parte de la simbiosis entre el hongo y la planta, en diversas condiciones de sitios muestreados y en diferentes combinaciones hongo-planta. Estas bacterias rizosféricas en gran medida son las responsables de los cambios beneficiosos en la rizosfera, como por ejemplo la transformación de las propiedades fisicoquímicas del suelo, con el objetivo de facilitar la colonización micorrízica (Garbaye y Bowen, 1989).

Los Actinomicetos se han encontrado en esporas y ascocarpos no desinfectados de HMA (Filippi *et al.* 1998) y representan un componente normal de su microflora. Estos microorganismos promueven la germinación de las esporas, debido a la producción de compuestos volátiles como por ejemplo 2-methylisoborneol (Carpenter-Boggs *et al.* 1995). Otros han detectado hongos filamentosos en esporas de HMA; plantearon que los HMA podían ser habitados por numerosos microorganismos y aislaron dos hongos Ascomicetos con fenotipos diferentes, desde esporas vivas y muertas del HMA *S. castanea* con secuencias muy parecidas o semejantes a ascomycetos (ascomycete-like) (Hijri *et al.* 2002). Estas secuencias pueden haber sido aisladas de hongos contaminantes que pudieran haber estado habitando la superficie de las esporas de HMA; otra posibilidad es que las secuencias fueran de hongos ascomicetos

que viven en el interior de las esporas de HMA y la tercera, podría ser que las secuencias sean originadas desde el genoma de la espora (Hijri *et al.* 2002). Investigaciones futuras podrían revelar si la presencia de tales hongos juega un papel importante en el funcionamiento de los HMA o en su interacción con las plantas.

2.3- Hongos Micorrizógenos Arbusculares y bacterias asociadas

La micorrizosfera es el suelo que se encuentra rodeado e influenciado por el hongo micorrizógeno arbuscular (Rambelli, 1973), donde el hongo coloniza la raíz y modifica los agregados del suelo que rodean la misma y también la distribución de agua en el suelo a través de la hifa extrarradical (Andrade *et al.* 1998). Muchos tipos de bacteria han sido encontrados y asociados en la micorrizosfera representando desde un simple tipo de simbiosis hasta una aparente e íntima y obligatoria simbiosis (Perotto y Bonfante, 1997; Johansson *et al.* 2004).

La composición de la población bacteriana en la micorrizosfera de las plantas micorrizadas puede afectar la interacción entre las plantas y los HMA (Andrade *et al.* 1997), o alternativamente el HMA puede influir en la selección de grupos específicos de bacterias en la rizosfera de plantas micorrizadas, por ejemplo potenciando bacterias anaerobias facultativas y disminuyendo otras como pseudomonads fluorescentes (Meyer y Linderman, 1986b).

El cambio o selección en las poblaciones bacterianas puede ser debido a competencia por nutrientes, cambios en la estructura del suelo, cambios en los exudados radicales de las plantas y compuestos ricos en energía provistos por el micelio extrarradical del HMA (Mayo *et al.* 1986; Andrade *et al.* 1997; Ravnsko *et al.* 1999; Söderberg *et al.* 2002).

Por otro lado algunas bacterias muestran capacidad de asociarse con las estructuras del hongo. Mansfeld-Giese y colaboradores (2002) han informado que bacterias del género *Paenibacillus* se encuentran íntimamente asociadas con el micelio del HMA *G. intrarradices*. Artursson y Jansson (2003) encontraron que *Bacillus cereus* aislado desde suelo mostró altos niveles de adherencia con la hifa de *G. dussii* en comparación con la adherencia encontrada con otros cultivos bacterianos. Al parecer algunas bacterias son más específicas para algunos HMA en particular, lo que puede deberse a la secreción de exudados específicos por especies específicas de HMA.

Mosse (1962) planteó algunas hipótesis sobre la posible presencia de organismos parecidos a bacterias en el citoplasma de Endogonaceae, en la actualidad orden Glomales. Este autor observó que los organismos semejantes a bacterias eran capaces de suplir con productos metabólicos a las esporas en períodos de rápida multiplicación. No obstante planteó que otros autores habían manifestado que estos organismos semejantes a bacterias podían estimular, inhibir o matar las esporas en procesos de germinación.

A pesar de haberse hecho esta observación en años tan tempranos, no fue hasta los años 90 que se hicieron estudios que demostraron que los organismos parecidos a bacterias eran verdaderas bacterias (Bianciotto *et al.* 1996) y que las bacterias asociadas a las esporas podían influir en la formación de la micorrizosfera (Budi *et al.* 1999). Además, Budi *et al.* (1999) encontraron que algunas bacterias asociadas a los hongos micorrizógenos arbusculares pudieran tener potencial antagónico contra varios patógenos.

El interés de las investigaciones sobre bacterias asociadas a la superficie de esporas ha cobrado mayor interés debido a que han mostrado potencial en el soporte del hongo MA para completar su ciclo de vida y producir esporas *in vitro* en ausencia de hospedero (Hildebrandt *et al.* 2002; 2006).

Las bacterias asociadas descritas por Bianciotto y col. (2003) son Gram negativas con forma bacilar y presentes en varias especies de HMA como por ejemplo *Acaulospora laevis*, *Gigaspora margarita* y *Glomus versiforme*. Inicialmente fueron identificadas como *Burkholderia* debido al análisis de las secuencias del 16S ARNr pero recientemente han sido asignadas a un nuevo taxón llamado "*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*". Estas bacterias asociadas nunca habían podido ser cultivadas en medios libres de células y estos autores informaron 10^5 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por spora (Bianciotto *et al.* 2004; Jargeat *et al.* 2004); aunque el crecimiento en medio axénico no rebasa los 80 días, independientemente del número inicial de bacterias, tanto en medio TY como en agua a dos temperaturas. Los mecanismos que controlan la asociación de la bacteria con el hongo y las raíces de las plantas en la micorrizosfera (Artursson *et al.* 2005) aun no han sido dilucidados.

Las bacterias asociadas a las esporas sin desinfectar de los HMA son de varios tipos y tienen características diferentes. Algunas tienen la habilidad de hidrolizar biopolímeros tales como proteínas, quitinas y celulosa (Filiippi *et al.* 1998; Roesti *et al.* 2005). Otras pueden degradar material de la planta

y paredes celulares del hongo y mejorar la estructura del suelo (Andrade *et al.* 1995). Algunas bacterias asociadas a esporas sin desinfectar de HMA como *Bacillus pabuli* tienen la habilidad de incrementar la colonización radical (Xavier y Germida, 2003) y pueden además mejorar el crecimiento de la planta (Artursson *et al.* 2006). Budi *et al.* (1999) informaron que *Paenibacillus* sp. aislada desde la micorrizosfera de esporas de *G. mosseae* estimula significativamente la colonización en *Sorghum bicolor*. De esta forma, las bacterias asociadas a las esporas pueden tener doble funcionalidad, ellas ayudan a la micorrización y además son bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB). La multifuncionalidad le puede dar cierta ventaja a las bacterias que colonizan la superficie de las paredes de las esporas y asegurar su supervivencia en micro hábitats específicos donde existe competencia por nutrientes y por el espacio con otros microorganismos del suelo.

La comunidad bacteriana asociada con las esporas de *Glomus* es más influenciada por la identidad del HMA que por la planta hospedera. Las esporas proveen un micro hábitat con condiciones particulares para el desarrollo de poblaciones bacterianas específicas. Las diferencias en la composición de la pared de la espora o de sus exudados en dos especies de *Glomus* pueden jugar un papel en la selección de la población bacteriana que habita en la espora (Roesti *et al.* 2005).

2.3.1- Simbiosis y modo de transmisión entre bacterias asociadas y HMA

Muchas bacterias completan su ciclo de vida dentro de células eucarióticas, ofreciendo ejemplos de simbiosis con diferente nivel de complejidad entre las partes (Moran y Wernegreen, 2000). Los HMA representan un nicho especializado para bacterias con formas bacilares encontradas en la familia Gigasporaceae y en todas las etapas del ciclo de vida del hongo: esporas, hifas germinadas y estructuras simbióticas (Bianciotto *et al.* 1996; Bianciotto *et al.* 2000).

La transmisión vertical ha tenido consecuencias importantes en la evolución. La teoría de la evolución predice que la simbiosis mutualista evoluciona desde el parasitismo (Ewald, 1994). Como consecuencia, la simbiosis patogénica se transmite horizontalmente mientras que la simbiosis mutualista puede seleccionar la transmisión vertical. Existen modelos matemáticos que soportan la idea que la eficiente relación mutualista depende grandemente de la transmisión vertical (Yamamura, 1997). Un segundo punto de interés es la transferencia directa de simbiontes bacterianos desde padres hospederos a las progenies a través de un estado unicelular causando la reducción de la población

bacteriana, evento que tiene consecuencias importantes en la ecología de la simbiosis bacteriana (Mira y Moran, 2002).

No todas las simbiosis mutualistas involucra transmisión vertical (Douglas, 1995; Douglas, 1998). En algunas asociaciones como por ejemplo leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno, la bacteria debe reentrar a sus células hospederas. Algunos microbios se transmiten horizontalmente y existen mecanismos moleculares, semejante a un sistema de secreción III el cual los ayuda a entrar en la célula hospederas (Dale *et al.* 2002).

Otros modelos matemáticos, han tenido en cuenta otras definiciones de las condiciones dentro de las cuales la simbiosis mutualista puede evolucionar hacia la transmisión vertical (Genkai-Kato y Yamamura, 1999).

Desde 1990, a través de técnicas microscópicas de avanzada se observaron organismos semejantes a bacterias y años más tardes poblaciones bacterianas han sido observadas en el citoplasma de *G. margarita* BEG 34. El mecanismo de transmisión de dichas endobacterias no es conocido, mientras que en el caso de *G. pyriforme* ha sido demostrado que las cianobacterias entran cíclicamente a través de evento de endocitosis (Schüßler y Kluge, 2001, Schüßler y Walker, 2011), el hecho que *G. margarita* requiera de una planta para completar su ciclo de vida dificulta cualquier investigación. Sin embargo, Bianciotto y col. (2004), informaron el desarrollo de un sistema experimental que permitió demostrar que "*Candidatus G. gigasporarum*" se transmite verticalmente a través de las generaciones de esporas del HMA (SG0 hasta SG4), ó sea que una bacteria endocelular se ha confirmado que se transmite de generación en generación. Para este análisis, raíces transformadas de zanahoria (Ri T-ADN) fueron inoculadas con esporas de *G. margarita* y la presencia de endobacterias fue visualizada y cuantificada a través de varias generaciones del hongo por microscopía confocal y el uso de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa.

La simbiosis intracelular trajo consigo cuestiones fascinantes acerca de la adquisición, transmisión y evolución de los endosimbiontes (Dale *et al.* 2002). Margulis y Chapman (1998), informaron la importancia de la endosimbiosis como mecanismos de evolución y distinguieron entre endosimbiosis permanente y cíclica. La simbiosis encontrada en el reino de las plantas es cíclica: cada evento de colonización micorrízica requiere de la reasociación del hongo con la planta hospederas, similares

eventos son bien descritos para *Rhizobium* y otros microorganismos fijadores de nitrógeno (Brewin, 1991), también en *G. pyriforme*, en el cual la cianobacteria penetra en las estructuras del hongo por un proceso de endocitosis (Schübler y Walker, 2011).

Con respecto a la simbiosis de naturaleza permanente, entre *G. margarita* y las endobacterias, existen muchos cuestionamientos, previas observaciones mostraron que la bacteria encontrada en las esporas del hongo, aisladas desde distintas áreas geográficas, están relacionadas o emparentadas (Bianciotto et al. 2000), lo que sustenta el antiguo establecimiento de esta interacción. La adquisición de bacterias por el HMA durante la evolución es un evento raro y conservado estrictamente por transmisión vertical (simbiosis permanente). La reproducción asexual típica de los HMA (Kuhn et al. 2001) y la naturaleza cenocítica del micelio en Glomeromycota pueden facilitar este tipo de transmisión.

2.4- Germinación de las esporas de HMA

Existen varios factores que afectan la germinación y la conservación de las esporas, entre ellos podemos citar la dormancia, el pH, la temperatura, el CO₂, la humedad, la luz, radiación, aireación, iones inorgánicos, factores nutricionales, los microorganismos, agentes oxidantes, antibióticos y pesticidas (Siqueira y Sylvia, 1985).

Muchas bacterias del suelo pueden afectar la germinación de las esporas de los hongos micorrizógenos arbusculares: algunas son inhibitorias mientras que otras como por ejemplo las bacterias asociadas pueden promover la germinación y el desarrollo de las hifas.

La extensión de la hifa del hongo va a depender de la especie, del estado de desarrollo de la simbiosis y de las condiciones ambientales (Smith y Read, 1997).

Las bacterias y hongos son organismos del suelo que están estrechamente relacionadas con el efecto rizosfera. La presencia de bacterias rizosféricas puede estimular el crecimiento del tubo germinativo de los HMA (Mosse, 1959; Azcón, 1987) debido a la producción de compuestos difusibles. Estimulación muy fuerte fue observada en la germinación de la espора cuando esta estaba en contacto con bacterias asociadas, según Mayo y col. (1986) observaron que la germinación de las esporas de *G. versiforme* fue incrementada cuando bacterias fueron adicionadas.

Los HMA pueden emitir el tubo germinativo a partir de esporas por tres vías principalmente:

- Compartimiento periférico observado en *A. laevis* (Mosse, 1970), *Gigaspora nigra* (Old et al. 1973), *Gigaspora gilmorei* (Sward et al. 1978) y *Gigaspora aurigloba* (Hall, 1977).
- Germinación directa a través de la pared de la espora en *G. margarita* (Sward, 1981).
- Recrecimiento de la hifa adherida a la espora, generalmente ocurre en *Glomus* (Mosse, 1956; W arcup, 1985) aunque esporas de *Glomus* pueden ocasionalmente germinar a través de la pared de la espora (Tommerup y Kidby, 1980).

Los resultados sugieren que numerosas bacterias normalmente encontradas en el suelo son capaces de estimular la germinación de las esporas de HMA. La producción de algunos compuestos bioactivos (Bécard y Piché, 1989) probablemente sea una razón de tal estimulación.

Como se mencionó anteriormente uno de los factores que puede afectar la germinación de las esporas pueden ser los antibióticos. Concentraciones de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de estreptomycin y penicilina pueden inhibir la germinación de las esporas.

Algunas bacterias del suelo producen moléculas orgánicas activas tales como vitaminas (Vancura, 1986), antibióticos o reguladores del crecimiento de las plantas; ellos pueden ser importantes en la ecología del hongo porque afectan el crecimiento hifal por algunos componentes difusibles. Paulitz y Linderman, (1989) observaron la muerte de esporas en germinación del HMA *G. etunicatum*, en tratamientos inoculados con cultivos de *Pseudomonas* que producen antibióticos comparado con cultivos de este género microbiano que no producen tales compuestos. Por tanto la habilidad de las bacterias de producir antibióticos es un factor determinante en el efecto de interacción con otros HMA. Cultivos bacterianos producen reguladores del crecimiento de las plantas (ácido indol 3-acético, ácido giberelínico y kinetina) que estimulan la colonización micorrízica de raíces de *Medicago*. El crecimiento de la hifa de *G. mosseae* fue inhibido por concentraciones micromolares de ácido indol 3-acético (Gryndler et al. 1988). Otros derivados del indol fueron mucho menos activos. Acorde a estos resultados, los reguladores del crecimiento de las plantas pueden afectar el crecimiento de la hifa del hongo a concentraciones relativamente altas que son muy poco probables de encontrar en los tejidos de las plantas.

Wilson et al. (1989) encontraron que las esporas del hongo pueden ser reprimidas en suelos no estériles por la microflora antagónica, aunque Azcón-Aguilar et al. (1986) mostraron que la germinación de la

espora y el crecimiento hifal de *G. mosseae* fueron incrementados por algunas bacterias rizosféricas. Similares resultados fueron encontrados por Linderman y Paulitz en 1990 y Mayo *et al.* (1986) utilizando *G. versiforme* y bacterias aisladas desde superficies no desinfectadas.

Por otro lado, Tylka *et al.* (1991) encontraron que tres especies de *Streptomyces* aislados de suelo, tienen efectos diferentes en la germinación de la espora de tres HMA lo que sugiere que pudieran existir interacciones específicas entre estos microorganismos en el proceso de germinación de las esporas.

La mayoría de las plantas en la naturaleza se encuentran micorrizadas. El hongo micorrizógeno arbuscular puede interactuar con numerosos factores externos, como los microorganismos del suelo, los que influyen en la formación y función de la simbiosis (Barea y Jeffries, 1995). Las esporas de los HMA son vulnerables al parasitismo de los microorganismos del suelo (Fitter y Garbaye, 1994). Se destacan algunas bacterias (Mayo *et al.* 1986) y hongos (Vidal-Domínguez, 1991) asociados a esporas no desinfectadas que incrementan la germinación de la espora y el crecimiento hifal.

La frecuencia de germinación de la espora de *Glomus decipiens* se incrementa por incubación de la espora con *Burkholderia vietnamiensis* lo que indica que la unión procarionte-eucarionte es fructífera y antigua (Levy *et al.* 2003). En muchos casos el efecto positivo en la germinación de la espora y la formación de micorrizas en plantas ha sido atribuido a compuestos volátiles producidos por las bacterias (Mugnier y Mosse, 1987; Tylka *et al.* 1991).

Otros autores plantean que el proceso de maduración y eventual germinación de esporas de HMA puede ser beneficiado por la actividad de microorganismos degradadores en la superficie de la pared hialina de la espora (Roesti *et al.* 2005).

Las bacterias asociadas a las esporas de HMA colonizan principalmente la pared externa de la espora y se han encontrado muy pocos informes que indican la presencia de bacterias-asociadas dentro de las capas de las paredes y citoplasma de la espora (Bianiotto *et al.* 2001; Cruz *et al.* 2008). El papel de estas bacterias no está totalmente dilucidado, sólo se han mencionado algunas características y se ha observado que estimulan la germinación de la espora por degradación de las paredes (Filippi *et al.* 1998; Maia *et al.* 1998) por producción de compuestos estimuladores tales como CO₂ y otros

compuestos volátiles (Carpenter-Boggs *et al.* 1995) o por la influencia en la adquisición de fósforo en el hongo (Ruiz Lozano y Bonfante, 2000).

2.5- El fósforo, nutriente esencial

El fósforo es componente esencial de todos los sistemas vivientes, juega un importante papel en el metabolismo celular. Es incorporado dentro de los fosfodiéster de las moléculas de ADN y ARN, en forma de nucleótido libre, mono, di y trifosfatos. Participa directamente en la generación de energía bioquímica necesaria para impulsar procesos anabólicos en las células; participa en la fosforilación de proteínas; es el elemento regulatorio en el camino de señalización de muchos crecimientos esenciales y procesos de desarrollo. Por estas razones, junto al nitrógeno y al potasio es clasificado como macronutriente mineral esencial de las plantas (Goldstein, 1995).

Las transformaciones biológicas del fósforo no presentan la peculiaridad de transitar por la atmósfera como en el ciclo del nitrógeno, estando enmarcadas a la circulación suelo - planta - animal - microorganismo - suelo. La fuente primaria en los ciclos biológicos del fósforo son las rocas fosfatadas. A diferencia de otros nutrientes, el fósforo transita por los sistemas biológicos, tanto en forma orgánica como inorgánica en un solo estado de oxidación. Los vegetales como los microorganismos lo absorben de las soluciones del suelo, predominantemente en forma de ión fosfato (H_2PO_4). Básicamente este ión está sometido a un equilibrio entre las fases sólidas y líquidas del suelo, el cual controla la disponibilidad del mismo (Azcón, 2000).

Una gran porción del fósforo inorgánico aplicado al suelo como fertilizante es rápidamente inmovilizado después de ser aplicado y convertido en una forma no asequible para las plantas (Nautiyal, 1999).

Es conocido que los HMA toman fósforo del suelo y lo transfieren a las plantas, constituyendo este el efecto nutricional más notorio de los hongos micorrizógenos arbusculares (Azcón, 2000). En las plantas micorrizadas ocurre el aumento de la absorción de fósforo, paso que limita el crecimiento vegetal de plantas no micorrizadas en la mayoría de los suelos, pues aunque esté presente en grandes cantidades, su accesibilidad a las raíces absorbentes es difícil, debido a interacciones con coloides, a reacciones de precipitación con aluminio, hierro, calcio y a su reducida difusión, favoreciendo el desarrollo de zonas de agotamiento alrededor de las raíces absorbentes (Trimble y Knowles, 1995).

2.5.1- Microorganismos solubilizadores de fosfato

La solubilización de fosfato es mediada por PGPR (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) (Richardson, 2001). El fósforo es muy reactivo en el suelo y como resultado la concentración de iones fosfato (HPO_4^{2-} y H_2PO_4^-) es muy baja, contradictorio esto con la relativa abundancia de P total en muchos suelos. Debido a la alta reactividad del P, la difusión de iones fosfato en suelo es un proceso extremadamente lento y la disponibilidad de P ofrece limitaciones en el crecimiento de las plantas en sistemas naturales (Bielecki, 1973; Richardson, 2001).

Estos hongos son capaces de tomar el fósforo del suelo, incluso el insoluble (Bago et al. 1999) y transferirlo a las plantas; para ello cuentan con hifas extrarradicales, capaces de explorar el suelo de forma más eficiente que las raíces no micorrizadas (Pinton et al. 2001; Barea et al. 2008).

El papel de la hifa del hongo micorrizógeno arbuscular en la absorción de fosfatos no asequibles para las plantas es ampliamente demostrado (Mosse, 1973; Gianinazzi-Pearson, 1984; Azcón-Aguilar et al. 1986). La hifa puede absorber y fijar el P más exitosamente que la raíces de las plantas (Smith y Read, 2008; Barea et al. 2008).

En suelos existen muchos tipos de compuestos de fosfato de calcio y es reconocido que en bacterias Gram negativas existen las bases genéticas de un fenotipo de solubilización del sustrato mineral. Se ha observado esta propiedad debido a la producción de una zona clara alrededor de la colonia bacteriana en medios de crecimiento con compuestos insolubles como una fuente de fosfato, atribuida al fósforo solubilizado, por la producción de ácidos orgánicos, ejemplo el ácido glucónico, el ácido 2-ketoglucónico y el ácido 2.5 ketoglucónico (Goldstein, 1995).

Durante los últimos diez años se ha incrementado significativamente el conocimiento acerca de los microorganismos solubilizadores de fosfato. Muchos cultivos de especies de bacterias y hongos han sido descritos e investigados por sus capacidades solubilizadoras. Dentro de los microorganismos solubilizadores de fosfato, las bacterias son las más conocidas, destacándose las especies pertenecientes a *Pseudomonas*, *Bacillus* (Richardson, 2002) y grupos de *Rhizobia*, aunque existen otros géneros como *Acinetobacter* o *Enterobacter* que también han sido descritos como solubilizadores de fosfato (Peix y Martínez - Molina, 2002). Se suman a esta lista de microorganismos los caracterizados por Kämpter (2002), por su alto potencial de solubilización de fosfato, destacándose *Paenibacillus*, *Escherichia*,

Rahnella y *Burkholderia*, coincidiendo este autor con Piex y Martínez - Molina (2002) y Richardson (2002), en los géneros que anteriormente se citan.

Dentro de los microorganismos eucariontes con capacidad de solubilizar fosfato Piex y Martínez - Molina (2002), destacan los hongos *Aspergillus*, *Penicillium* y la levadura *Yarrowia lipolytica*. Richardson (2002), plantea que estos hongos juegan un importante papel en la solubilización, estando asociados comúnmente a la rizosfera de las plantas.

2.5.2- Acumulación de polifosfatos

Los polifosfatos contienen fósforo, y a su vez el fósforo constituye la mayor subunidad de vida, encontrándose en nucleótidos, azúcares y fosfolípidos (Nesmeyanova, 2000). Los polifosfatos inorgánicos son una línea de polímeros de cientos de ortofosfatos, residuos enlazados por bandas de alta energía fosfoanidrida y probablemente constituyen precursores prominentes en la evolución prebiótica. Pueden ser encontrados en volcanes condensados, en respiraderos de vapor de profundos océanos, sin embargo, pese a todo esto han sido ignorados en muchos textos como “fósiles moleculares”.

Numerosas funciones biológicas son ejecutadas por los polifosfatos, dependiendo de su necesidad y localización en especies, células o compartimentos subcelulares. Pueden ser utilizados como reservorio de energía y fosfatos, como tampón contra álcalis, como cápsula en bacterias, en competencia por transformaciones bacterianas y de gran interés en el crecimiento fisiológico (Kornberg, 1995).

En dependencia de la localización de los polifosfatos en la célula, será su función en los compartimentos celulares. En las levaduras si se encuentran en el citosol se utilizan como compuestos de reserva; en la envoltura celular participan en procesos de biosíntesis y mantenimiento ante cambios negativos; en las mitocondrias participan en procesos bioenergéticos; en las vacuolas constituyen fuentes de reserva y mantienen el pH constante en la célula; en el núcleo participan en la regulación de la actividad genética y en la membrana celular participan en procesos de transporte (Kulaev *et al.* 2000).

En las células bacterianas se observa la presencia de polifosfatos solo al final de la fase de latencia y comienzos del crecimiento logarítmico. Cuando el cultivo pasa al crecimiento exponencial el nivel de polifosfatos decrece entre cinco y diez veces (Kulaev *et al.* 2000).

Otros autores tienen otras evidencias sobre el momento en que ocurre la acumulación de los polifosfatos en los microorganismos. En *Micrococcus lysodeikticus* los gránulos de polifosfatos acumulados durante la fase exponencial, desaparecen en la fase estacionaria. Por el contrario en algunos cultivos de *Acinetobacter*, se acumulan polifosfatos al final de la fase logarítmica o a la par en la fase estacionaria. En Micobacterias la acumulación de polifosfatos es mayor en la fase estacionaria (Nesmeyanova, 2000).

Para la detección de gránulos de polifosfatos en células microbianas existen diversas metodologías descritas en la literatura, por ejemplo, la tinción con DAPI (Hung *et al.* 2002), la tinción con Azul de Toluidina (Onda y Takii, 2002), tinción de Neisser (Stante *et al.* 1997), tinción con Sudán Negro (Murray, 1963), tinción de Albert (Tandoi *et al.* 1990) tinción con azul de metileno (Grocetti *et al.* 2000) y la tinción de Gram (Melasniemi y Hernesmaa, 2000). A pesar de existir numerosos tipos de tinciones su detección muchas veces resulta ineficaz, lo que puede deberse a la edad de las células, al tiempo de exposición de las mismas o al estado de los colorantes.

2.6- Estudios sobre microorganismos-asociados a HMA. Estado del Arte en Cuba

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) se trabaja desde 1992 en la utilización y extensión de los HMA para la nutrición vegetal en general y en la fosforada en particular, con la recomendación de cepas por tipo de suelo, teniendo en cuenta pH, contenido de materia orgánica y nivel de fertilidad (Rivera *et al.* 2007), de forma tal que el cultivo sea eficientemente micorrizado, logrando con ello una mayor tolerancia al estrés térmico e hídrico de las plantas (Dell'Amico *et al.* 2002). El manejo efectivo de esta simbiosis no solo ha logrado impacto económico al incrementar rendimientos y disminuir cantidades de biofertilizantes, sino también de conservación del medio ambiente y ha resultado una vía para la sostenibilidad del sistema (Rivera *et al.* 2003; Rivera *et al.* 2007). Sin embargo, a pesar de existir tantos trabajos sobre manejo de los HMA y de su estudio durante tantos años, el trabajo con microorganismos-asociados a las esporas de los HMA hace poco que comienza a consolidarse en el mundo, al menos porque algunas investigaciones han logrado trabajar con metodologías de desinfección y esporas completamente desinfectadas en la pared externa, lo que ha permitido en algunos casos detectar y en otros aislar bacterias asociadas al interior de las esporas de los HMA.

El único informe cubano anterior a este trabajo que indica la posible presencia de bacterias en esporas de HMA, fue realizado a partir de muestras de suelo rizosférico de caña de azúcar por Velazco *et al.* (1993). Los autores detectaron a partir de esporas vivas y muertas de la familia *Endogonaceae* principalmente en *Glomus* sp. y *Acaulospora* sp., bacterias que crecían en medio LGI. Al realizar pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, producción de H₂S, utilización de azúcares, hidrólisis del almidón e hidrólisis de gelatina y tinción de Gram) encontraron que los siete aislados que crecían en medio LGI, tenían coincidencias con las características de *Acetobacter diazotrophicus* y concluyeron que los aislados eran cepas pertenecientes a esta especie y que las esporas podían constituir un reservorio de esta bacteria fijadora de nitrógeno. En el mencionado trabajo la desinfección sólo se realizó con estreptomycinina (no se especifica la concentración) y agua destilada, y no hubo una comprobación de la completa desinfección de las esporas. Este trabajo tiene el merito de haber sido pionero en Cuba en la idea de bacterias-asociadas al interior de esporas de HMA pero en nuestra opinión las evidencias presentadas por los autores no constituyen una verdadera prueba de que las cepas aisladas sean el microorganismo al que se hace alusión por falta de pruebas taxonómicas y mucho menos que los resultados obtenidos probaran la presencia de bacterias provenientes del interior de las esporas de los hongos micorrizógenos.

2.7- Desinfección de las esporas de HMA

La desinfección total de las esporas ha sido intentada con diferentes objetivos, lograr cultivos *in vitro* de los HMA y detectar bacterias-asociadas, en ambos casos es un requisito imprescindible. La descontaminación de la superficie es requerida para evitar la proliferación de microorganismos contaminantes y evitar que los mismos influyan en los resultados experimentales, siendo las esporas jóvenes más sensibles al proceso de descontaminación que las maduras (Walley y Germida, 1996).

En la literatura se encuentran publicados un gran número de métodos rutinarios, con el objetivo final de proveer la superficie estéril de las esporas. A pesar de existir tantas metodologías es muy difícil lograr la completa desinfección de la pared externa de las mismas. El éxito en el uso de estas metodologías de desinfección es altamente dependiente de cómo son manipuladas las técnicas y sobre qué material se aplican.

Reis *et al.* (1999) sugirieron que los métodos de desinfección superficial no son capaces de eliminar el 100% de los microorganismos que pueden estar adheridos a las esporas, debido a la cantidad de microorganismos que pudieran estar localizada en el lumen de las esporas así como incrustadas en las paredes de las hifas.

Las esporas antes del proceso de desinfección presentan una coloración oscura a su alrededor debido a los contaminantes (Walley y Germida, 1996). Cuando las esporas son desinfectadas e incubadas en medio Agar agua, la germinación de las esporas es limitada; niveles de germinación del 28% fueron obtenidos después de una exposición en Cloramina T al 5% por 120 minutos. La exposición prolongada de las esporas en Cloramina T puede inhibir su germinación.

Existe contradicción en cuanto a la eficiencia o no de los métodos de desinfección. Mosse (1962) planteó que con el uso de una solución de Cloramina T al 2%, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomina y trazas de detergente biológico se lograba un 90% de esporas descontaminadas; sin embargo Mertz *et al.* (1979) informaron que con dicho método sólo se conseguía del 32 - 64% de esporas desinfectadas.

La búsqueda de un método de desinfección que deje completamente las esporas descontaminadas puede tener costos en términos de la germinación de la spora. MacDonald y Chandler (1981) reconocen lo difícil de conseguir la superficie de las esporas de los HMA completamente estériles y regularmente colocan las esporas desinfectadas en Agar Nutriente después que las esporas han sido descontaminadas. Esto puede constituir una alternativa para verificar la descontaminación completa de un número de esporas, siendo su uso aconsejable en los procedimientos de descontaminación que proveen solo una porción de esporas descontaminadas con un limitado impacto en la germinación.

La importancia de evaluar con éxito los procesos de descontaminación usando condiciones propicias para el crecimiento de los contaminantes externos es una opción. El éxito relativo del método, en términos de descontaminación y subsecuentes niveles de germinación va a ser dependiente de la especie de HMA y de la edad de spora. Es aconsejable que el éxito de cualquier procedimiento de descontaminación sea previamente evaluado como uso rutinario, con el objetivo de interpretar los y Germida, 1996).

III- M a t e r i a l e s y M é t o d o s

3.1- M a t e r i a l b i o l ó g i c o u t i l i z a d o

Para la realización de las investigaciones programadas se utilizó la cepa INCAM -2 de *Glomus mosseae* procedente de la colección de cepas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba. El inóculo certificado de *Glomus mosseae* (100 g), que contiene una mezcla de arcilla caolinítica y propágulos fúngicos (esporas, hifas, micelio), se usó para la siembra de plantas de sorgo (*Sorghum vulgare*) en potes de cultivo con seis litros de un sustrato mineral estéril. A los 90 días de crecimiento, se eliminó la parte aérea de las plantas y el sustrato con las raíces micorrizadas se utilizó como fuente de esporas. El material homogeneizado manualmente fue almacenado durante 15 semanas a 4 °C. Este procedimiento fue patentado por Fernández *et al.* (2000).

Para el aislamiento de las esporas se tomaron 50 g del material homogeneizado y se hizo un tamizado húmedo de una pasta obtenida por mezcla del sólido con agua, entre dos tamices (40 y 400 μm de luz) con la adición de agua para facilitar el proceso. El residuo que quedó se recogió en el tamiz de 40 μm y con una espátula se pasó a un tubo de centrífuga en el cual se mezcló con solución de sacarosa (720 g de sacarosa y 20 g de Tween 80 L^{-1}), sobre la cual se depositó una capa de agua destilada. Una centrifugación a 446 g durante cinco minutos permitió recobrar con una pipeta Pasteur las esporas en la interface sacarosa-agua (Gedermann *et al.* 1963, modificado por Herrera *et al.* 1995). Todas las esporas se colectaron 24 h antes de iniciar los ensayos y se mantuvieron a 4°C en una solución Ringer osmóticamente protectora. Los componentes de la solución Ringer por L de solución son: NaCl 7,5 g, KCl 0,075 g, CaCl₂ 0,1 g y NaH₂CO₃ 0,1 g.

3.2- D e s i n f e c c i ó n d e e s p o r a s y c u l t i v o d e l o s m i c r o o r g a n i s m o s - a s o c i a d o s

Para la desinfección de las esporas y posible cultivo de microorganismos-asociados se probaron dos procedimientos de metodologías de desinfección. Uno fue el método propuesto por Nair *et al.* (1991); modificado por Reis *et al.* (1999), al que se ha llamado Nair-Reis, consistente en tres lavados con solución de Cloramina T al 2% , luego cuatro lavados con una solución de Sulfato de Estreptomicina 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, seguido de cuatro lavados con solución de SDS 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 30 minutos. Finalmente se hicieron tres lavados con agua destilada estéril de 30 minutos cada uno.

El segundo método se denominó CTCf. Las esporas se lavaron cinco veces con solución de Cloramina T al 5%, al decantar el primer lavado se le añadió una gota de Tween 40 al residuo de Cloramina T que había quedado en el vial. Con ayuda de un equipo Vortex-Genie 2tm a una intensidad media, se obtuvo una mezcla homogénea entre el Tween y la solución de Cloramina. Después de los lavados con solución de Cloramina - Tween, se utilizó una solución de Cefalexina ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) para la desinfección final. Las esporas se lavaron cinco veces con la solución de antibiótico. Finalmente las esporas quedaron en reposo en la última alícuota de antibiótico durante 16 h en un refrigerador doméstico (aproximadamente a $15 \text{ }^\circ\text{C}$). Pasado ese tiempo se hicieron tres lavados con agua destilada estéril. Siempre se utilizó agua destilada para preparar las soluciones y se añadió un mL de las soluciones al vial eppendorf con las esporas. El equipo Vortex se utilizó en todos los lavados para que las esporas estuvieran en movimiento y en contacto con los líquidos. En todo el proceso se colocó una malla de $40 \text{ }\mu\text{m}$ de luz en la boca del vial como filtro para impedir la salida de las esporas. En ambas metodologías se colocaron unas 50 esporas en cada vial y se hicieron seis réplicas.

Después de la desinfección, por CTCf se investigó la ausencia de microorganismos contaminantes en la superficie de las esporas y la presencia de microorganismos-asociados en el interior de las mismas. En el caso de la desinfección por el método Nair-Reis sólo se investigó la esterilidad en la superficie de las esporas intactas.

Procedimiento: Se tomaron tres viales con 50 esporas y se inocularon intactas en los medios de cultivos y tres viales con 50 esporas cada uno, las que fueron inoculadas en los mismos medios de cultivo luego de ser rotas y maceradas. La ruptura y macerado se realizó manualmente en un mortero de porcelana estéril, añadiendo pequeños volúmenes (un mL) de agua destilada estéril. Las esporas intactas (50) y las maceradas (0,1 mL del producto macerado de semejante cantidad de esporas) se inocularon y esparcieron de forma superficial en placas Petri con los diferentes medios de cultivo sólido. Se hicieron tres réplicas en cada tratamiento.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo (Anexo 1): LGI-P modificado (0,1 g de extracto de levadura, con 10% de sacarosa y pH 5,5), según Döbereiner *et al.* (1993), AN (Agar Nutriente) según Romão (2001) y SYP (extracto de levadura, sacarosa y sales, pH 6,2), según Caballero Mellado y

Martínez Romero (1994). En todos los casos, la incubación de las esporas intactas y maceradas en medio de cultivo se realizó durante siete días a 30 °C.

Se utilizó el medio AN y SYP por ser medios ricos en macroelementos y facilitar el crecimiento de la mayoría de los microorganismos cultivables, el medio LGI-P modificado es un medio más específico y crecerían posibles fijadores de nitrógeno.

3.2.1- Metodología de desinfección de esporas para su cultivo *in vitro*

Se siguió la metodología propuesta por Cranenbrouck *et al.* (2005). En ella se emplean 100 esporas de *G. mosseae* (INCAM-2) que se pusieron en contacto con una solución de Cloramina T al 2% y dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos. En un segundo paso se lavaron las esporas con una solución de antibióticos que contenía sulfato de estreptomina 0,02% y sulfato de gentamicina 0,01% ,10 minutos, pasado este tiempo las esporas fueron lavadas con agua destilada estéril e inoculadas en el medio de cultivo SRM (Strullu y Romand, 1986).

3.3- Purificación de los microorganismos-asociados aislados

Se prepararon tubos de cultivo y placas Petri que contenían 15 mL de los medios LGI-P modificado sólido, AN y SYP. El material utilizado y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave, durante 20 minutos. Se utilizó en todos los casos papel indicador para comprobar la veracidad de la esterilización, además se realizó control de contaminantes en los medios de cultivo, incubando tres placas sin inocular con los tres medios de cultivo utilizados.

Las colonias que crecieron en los tres medios de cultivo inoculados con el macerado de las esporas, se sembraron por estría en placas Petri que contenían el mismo medio donde habían crecido. El proceso (refrescamiento de las colonias en estos mismos medios) fue repetido cuatro veces hasta que se obtuvieron cultivos puros.

3.4- Características morfológicas y culturales de los microorganismos-asociados aislados

3.4.1- Características morfológicas. Tinción de Gram

Los microorganismos aislados se sembraron en medio SYP e incubaron en anaerobiosis con el objetivo de tener crecimiento de los aislados en 24 h. Para realizar la tinción de Gram se utilizó la metodología descrita por Cortés (2001)

Las preparaciones se observaron al microscopio óptico haciendo uso del objetivo de inmersión y aumento total de 1000X. Las bacterias Gram positivas aparecen de color púrpura debido a que no se decoloran con el alcohol, y las Gram negativas aparecen de color rosa (Cortés, 2001).

La forma de los microorganismos se observó en la tinción de Gram. El tamaño de las células se determinó mediante el micrómetro ocular calibrado, y con aumento 1000X en el microscopio óptico (De la Torre y Callejas, 1975). Para determinar la longitud de los microorganismos (μm) se hizo coincidir su extremo con el cero de la escala del micrómetro ocular. Se multiplicó el número de divisiones cubiertas por la bacteria por la escala previamente calibrada, para lo cual se utilizó un portaobjeto de calibración (1:0.01).

3.4.2- Características culturales (colonias)

Para estas determinaciones se hicieron observaciones al microscopio estereoscópico, analizando forma, tamaño, color, opacidad, elevación, superficie, borde, consistencia, facilidad para emulsionarse y olor de las colonias (Harrigan y MacCance, 1968). El color fue referido al sistema Hexagesimal del atlas de colores que aparece en CEST Color (<http://www.wtv-zonc.com/phyrst/color/convertor.html> y <http://gotomy.com/color.html>).

3.5- Detección de la presencia de quitina en los cultivos de los aislados

La presencia o no de quitina se analizó haciendo uso de la tinción con calcofluor white, según Melasniemi y Hernesmaa (2000). Se tomó una asada de las células de los aislados, así como controles positivos y negativos, crecidos previamente en medio SYP sólido, durante 48 h, que se colocaron sobre portaobjetos limpios dejándose secar al aire del flujo laminar. Pasado dos minutos se aplicaron sobre las películas de células dos gotas de la solución de Calcofluor (un mg de Calcofluor disuelto en un mL de agua estéril al que se adicionaron 20 μL de NaOH 0,1 M). Se dejó en el flujo laminar durante 30 minutos y se observó con un aumento de 40X en el microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX40, haciendo uso del sistema óptico U-M W U. El mismo procedimiento se siguió para películas celulares preparadas de igual forma pero sin teñir con Calcofluor. Controles positivos fueron hifas de *G. mosseae* y control negativo la bacteria *Gluconoacetobacter diazotrophicus*.

3.6 - Coloración de las colonias en medio Agar Papa modificado

Para determinar la posible presencia de *Gluconoacetobacter diazotrophicus* se utilizó el medio de cultivo Agar Papa modificado (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Para ello, se hirvieron por 30 minutos rebanadas de papas peladas (200 g), en 1000 mL de agua destilada. El cocimiento se filtró a través de una mota de algodón y a ese filtrado se le añadió sacarosa 10 g, Agar 15 g y el volumen resultante se llevó a un L con agua destilada. En este medio de cultivo se inocularon por estría los aislados que habían crecido durante 72 h en medio AN sólido. La aparición de colonias carmelitas es indicativo de la presencia de la bacteria *Gluconoacetobacter diazotrophicus*.

3.7 - Coloración de las colonias en medio NFb

Se utilizó este medio con el objetivo de detectar la posible presencia de *Azospirillum* sp. entre los aislados (Döbereiner *et al.* 1976). Los aislados, que habían crecido en medio AN sólido durante 72 h, se inocularon por estría en medio NFb.

Contenido del medio NFb (por Litro): Ácido málico 5 g, K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; NaCl 0,1 g; Agar 15 g, Solución de sales (disueltas en un L: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,40 g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,12 g; H_2BO_4 1,40 g; $Na_2MO_4 \cdot H_2O$ 1 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1,50 g 2 mL; Bromotimol azul 2 mL; Solución Fe EDTA 1,64% 1 mL; Solución de vitaminas (Biotina 0,1 mg/mL, Piridoxal-HCl 0,2 mg/mL) 1 mL; pH 6,8.

3.8 - Extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación

Debido a la necesidad de crecimiento en 24 h para los análisis de extracción de ADN, se incubaron los microorganismos-asociados en una cámara de anaerobiosis. Para dos de los aislados-asociados (EndoGm1 y EndoGm11) eso no fue necesario, ya que en 24 h en el medio SYP tenían abundante crecimiento.

Para la obtención de ADN ribosómico en los aislados se siguieron los siguientes pasos, según la metodología modificada y descrita por Harwood en 1990:

Se inoculó medio SYP (3 mL) con una asada de un cultivo de siete días de crecimiento en medio SYP líquido, se incubó a 30 °C con agitación hasta fase estacionaria. A las 24 h se recuperó el cultivo en tubos eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 14000 g. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 150 µL de solución tampón de lisis (0,1 M NaCl y 50 mM EDTA, pH 7,5). Se añadieron 15 µL de N-lauril sarcocine, se mezcló agitando con Vortex para completar la lisis. Se añadió a la solución viscosa 200 µL

de fenol frío y se mezcló con Vortex. Se centrifugó cinco minutos a 21883 g. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.

A este nuevo tubo se le adicionaron 20 µL de solución de acetato de sodio 3 M a pH 4,8 ó 5,2 y sin agitar se adicionaron 500 µL de etanol frío. Se incubó durante 20 minutos a 4 °C. Se centrifugó a 21883 g durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 500 µL de etanol al 70%. Se invirtió hasta que se desprendió el pellet. Se centrifugó a 21883 g por cinco minutos. Por último se eliminó el sobrenadante, se secó el pellet y se resuspendió en 200 µL de agua destilada y se guardó a 4 °C.

Los cebadores utilizados fueron:

fD1/rp2 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG/ACGGCTACCTTGTACGACTT) para los microorganismos-asociados *EndoGm3*, *EndoGm5*, *EndoGm6*, *EndoGm7*, *EndoGm10* y *EndoGm12* y el par de cebadores fD2/rp2 (ACAGTTTGATCATGGCTCAG/ACGGCTACCTTGTACGACTT) para *EndoGm8*. Estos cebadores amplifican regiones de los genes ribosómicos 16S (bacterias).

Después de tener el ADN, se hizo un PCR cuyo programa fue el siguiente: 94 °C cinco minutos, (94 °C durante 30 segundos, 50 °C un minuto, 72 °C un minuto, 72 °C cinco minutos) esto se repitió 25 veces y por último 4 °C durante 30 minutos. Luego se cargó un gel (1% de agarosa) de electroforesis con los productos del PCR (10 µL del producto de PCR).

Para los aislados *EndoGm1* y *EndoGm11* se siguió el procedimiento descrito por Persoh y Rambold (2002), usando 60–80 µg de ADN microbiano purificado y los cebadores fueron ITS4: –TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC– (White *et al.* 1990) y 1055F: –GGT GGT GCATGG CCG– (Gunderson *et al.* 1986). Estos cebadores amplifican regiones de los genes ribosómicos 18S (hongos).

3.9- Características bioquímicas de los microorganismos-asociados aislados

3.9.1- Producción de ácido a partir de carbohidratos

La formación de ácido a partir de carbohidratos se investigó según la metodología propuesta por Gordon *et al.* (1973). El medio utilizado contiene en g.L⁻¹: (NH₄)₂HPO₄ 1; KCL 1; MgSO₄ x 7H₂O 1; extracto de levadura 1; bromocresol púrpura (0,04%) 0.15; Agar 8; pH 7. Se prepararon soluciones de los carbohidratos glucosa, sacarosa, arabinosa, manitol, maltosa, diluyendo un gramo de cada uno en 20 mL de agua destilada. De la solución correspondiente se adicionaron 0,5 mL a cada tubo de cultivo

inmediatamente después del proceso de esterilización. La inoculación de los aislados se realizó a partir de un inóculo crecido durante 72 h en medio AN que se sembró haciendo estrías en los tubos con el medio basal de Gordon. Evidencia de un resultado positivo es el cambio de color del medio de azul violáceo a amarillo debido a un cambio de pH del mismo por formación de ácido.

3.9.2- Hidrólisis del almidón

La determinación se realizó en medio Agar-almidón (Harrigan y McCance, 1968), que tiene la siguiente composición: almidón soluble 2 g; Agar Nutriente 28 g y agua destilada 1000 mL. La siembra de los microorganismos (crecidos durante 48 h en AN) se hizo por estría en la superficie del medio, que se incubó a temperatura de 30 °C durante tres días. Pasado ese tiempo se adicionó solución Lugol (yodo 5 g y yoduro de potasio 10 g; agua destilada 100 mL). La presencia de un halo transparente en el medio de cultivo después de la adición de solución Lugol, indica que el almidón ha sido hidrolizado y por consecuencia actividad de la enzima amilasa.

3.9.3- Reducción del nitrato

Se realizó en medio LGI-P semisólido suplementado con KNO_3 hasta obtener una concentración 0,1% en NO_3^- . Se le llamó a este medio LGI- NO_3 . Se inocularon cinco mL de medio LGI- NO_3 con 0,1 mL de la suspensión de microorganismos haciendo uso del asa calibrada (0,1 mL) a partir de un cultivo preestablecido de 48 h en medio LGI-P semisólido. Se hicieron cuatro réplicas por cada muestra.

El cultivo se examinó periódicamente para observar la presencia o no de burbujas. La aparición de burbujas sugirió la formación de N_2 a partir del NO_3^- y desnitrificación (Koneman *et al.* 1997). A los tres y seis días de edad del cultivo se tomaron dos replicas, con el objetivo de observar la presencia de actividad nitrato reductasa. Para ello se tomaron 0,1 mL del cultivo y se añadieron un mL de solución A y un mL de solución B. La aparición de un color rosado indicó la presencia de nitrito y por tanto actividad de la enzima nitrato reductasa.

Solución A: dihidrocloruro de N, N-Dimetil-1-naftilamina 0,6 g en 100 mL de solución de ácido acético 5M y Solución B: ácido sulfanílico 0,8 g en 100 mL de solución de ácido acético 5N. Las soluciones A y B fueron obtenidas por calentamiento suave en una campana de extracción de gases.

3.9.4- Actividad catalasa

Para esta determinación se emulsionó una asada de un cultivo fresco (24 h de crecimiento en medio SYP) en unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno al 10% , en un portaobjeto limpio. La efervescencia causada por la liberación de oxígeno, en forma de burbujas, indicó la actividad de la enzima (Cortés, 2001).

3.9.5- Requerimientos de oxígeno

3.9.5.1- Crecimiento en medio Tioglicolato

Este medio contiene: Tioglicolato 29,5 g, Azul de metileno 0,002 g; Agar 1 g; Agua destilada 1000 mL. Los microorganismos-asociados aislados se hicieron crecer en medio SYP líquido durante 72 h. La inoculación se realizó por punción en el centro del medio de cultivo sólido en tubos de ensayo y se observó la zona de crecimiento del microorganismo. Los aerobios estrictos crecen en la parte superior del medio de cultivo, los anaerobios estrictos en la parte inferior, los anaerobios facultativos en todo el medio, y los microaerófilos solo crecen en el borde superficial del medio (Cortés, 2001).

3.9.5.2- Determinación del crecimiento en condiciones de anaerobiosis

Se prepararon las placas Petri con medio de cultivo SYP que se inocularon por estría y se colocaron dentro de la jarra de anaerobios en presencia de un sobre GasPak (que contenía una tableta de borohidruro sódico, una tableta de bicarbonato de sodio y ácido cítrico y una fracción de papel de filtro) que se activo cuando se añadió agua. Al transcurrir una hora después de la activación, se ha generado aproximadamente 4-10% de CO₂. Esto permitió el rápido crecimiento de microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos.

3.9.6- Características del crecimiento en condiciones salinas

El objetivo fue visualizar el crecimiento de los distintos aislados ante condiciones de estrés salino en el medio (Caballero Mellado y Martínez Romero, 1994), provocadas por la sal común a diferentes concentraciones. El medio de cultivo contiene en g.L⁻¹: sacarosa 10; extracto de levadura 3; K₂HPO₄ 1; KH₂PO₄ 3; Agar 15; pH 6,2. Se adicionó NaCl en la cantidad necesaria para obtener la concentración deseada en el medio. Se hicieron diluciones con agua destilada estéril y se inocularon tres diluciones por

placa Petri, de modo que al mismo tiempo que se verificaba el crecimiento de los aislados se podían contar las UFC (unidades formadoras de colonias).

3.9.7- Respuesta de los aislados a determinados antibióticos

Se utilizó un sistema de Multidiscos Combinados (BIO-RAD) que es un agente de diagnóstico para el estudio *in vitro* de la sensibilidad bacteriana a 12 antimicrobianos empleados en diferentes concentraciones (Tabla 1).

Tabla 1: Antibióticos y concentraciones que se probaron en el antibiograma. Fotografía del disco con los antibióticos.

| Antibióticos | Concentración |
|------------------------------|---------------|
| Ampicilina | 10 µg |
| Amikacina | 30 µg |
| Trimetoprim - Sulfametoxazol | 25 µg |
| Ceftriaxona | 30 µg |
| Gentamicina | 10 µg |
| Netilmicina | 30 µg |
| Enoxacina | 10 µg |
| Penicilina | 10 U |
| Dicloxacilina | 1 µg |
| Cefalotina | 30 µg |
| Cloranfenicol | 30 µg |
| Eritromicina | 15 µg |



Se esterilizaron placas Petri de 140 mm de diámetro en las que se vertieron 60 mL de medio SYP que se dejó solidificar; las placas con medio fueron guardadas de forma aséptica a 2 °C en una bolsa de plástico para disminuir las pérdidas de agua por evaporación y antes de usarse se colocaron en incubadora a 35 °C por 30 minutos para eliminar la humedad excesiva. Se siguió el crecimiento de cada uno de los microorganismos-asociados en anaerobiosis. Posteriormente, se tomaron de cuatro a cinco colonias similares en morfología, que se suspendieron en un mL de medio SYP líquido. De esta suspensión microbiana se tomó 100 µL con pipeta; que se inoculó en las placas Petri de 140 mm y se esparció muy bien con espátula hasta que el medio de cultivo absorbiera completamente el inóculo vertido en él. Luego de secadas las placas (tres a cinco minutos), se colocó el disco de papel de filtro (un disco por placa) que contenía los antibióticos con pinza estéril en el centro de la placa, el disco se presionó ligeramente para asegurar el contacto con la superficie y garantizar que los antimicrobianos difundieran en el medio de

cultivo formando un gradiente de concentración el cual permitiría o inhibiría el crecimiento de los microorganismos. Luego de 15 minutos de haber colocado los discos se invirtieron las placas Petri y fueron incubadas a 30 °C durante 20 h.

Al analizar los resultados se colocó R (resistentes), I (intermedias) ó S (sensibles) en dependencia del valor del diámetro de inhibición para cada antibiótico. El diámetro de inhibición (halo transparente) fue medido con un calibrador automático, Mitutoyo, Japón (modelo SR 44).

La cepa control utilizada fue *Escherichia coli* (ATCC 25922).

3.10- Capacidad solubilizadora de fosfatos y concentración de fosfato solubilizado por los microorganismos-asociados

Para determinar la capacidad solubilizadora de fosfatos se utilizó el medio NBRIP (Nautiyal, 1999) y en dependencia del experimento se le adicionó la fuente de fósforo poco soluble, bien fosfato tricálcico β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ó fosfato de hierro $\text{Fe}(\text{PO}_4)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. El medio se esterilizó sin la fuente de fosfato insoluble, ésta se adicionó inmediatamente que el medio fue autoclavado

El inóculo se obtuvo en medio SYP líquido. Al cabo de siete días de crecimiento se tomaron 0,7 mL del cultivo, se centrifugaron en tubos eppendorf a 5468 g y se eliminó el sobrenadante. El “pellet” se lavó con medio NBRIP sin fosfato. Al mismo se le añadieron 0,5 mL de NBRIP y se agitó en Vortex para obtener una suspensión homogénea. Un volumen de 0,2 mL de la suspensión se inoculó con micropipeta en el centro de placas Petri con medio NBRIP sólido y se incubó a 30 °C.

La aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano se interpretó como provocado por la solubilización del fosfato insoluble por los microorganismos-asociados. Las placas fueron revisadas a las 24 y 72 h. Se midió el diámetro del halo con una regla graduada en milímetros. Para ello se midió el diámetro del conjunto formado por el halo y el crecimiento de la colonia microbiana; por sustracción del diámetro de la colonia microbiana al diámetro total, se obtuvo el tamaño del halo.

Para determinar la concentración de fosfato solubilizado por los microorganismos-asociados, se realizó un experimento previo para conocer la dinámica de aparición de fósforo soluble en cultivos líquidos e individuales en medio NBRIP (Nautiyal, 1999). El fósforo soluble se determinó por métodos colorimétricos a las 24, 48, 72 y 96 h. En ensayos posteriores, y para todos y cada uno de los aislados, se

realizó la determinación colorimétrica de fósforo solubilizado a las 72 h de crecimiento, pues en los experimentos anteriores se había observado que el pico máximo de fósforo soluble se producía a ese tiempo.

Se preparó un preinóculo en medio de cultivo SYP (100 mL) líquido, a partir de cepas crecidas en cuñas con este mismo medio y se incubó siete días a 30 °C. Al cabo de ese tiempo se centrifugaron 0,6 mL de cada uno de los cultivos de los microorganismos-asociados a 5468 g, durante diez minutos. La pastilla creada en el tubo se lavó con medio NBRIP sin fósforo. Después de los lavados, las células se homogenizaron al agitar con Vortex y 0,5 mL de la suspensión homogénea se inocularon en tubos de cultivo con 15 mL de medio NBRIP, el que contenía fosfato tricálcico o fosfato de hierro.

A las 72 h de crecimiento se tomaron alícuotas del cultivo que se centrifugaron (11162 g, 10 min) para separar el sobrenadante en el cual se realizó la determinación de fósforo soluble. Del sobrenadante se tomó 0,1 mL para determinar la concentración de fosfato por colorimetría.

Medio NBRIP autoclavado y no inoculado se utilizó como control y como blanco de la curva colorimétrica. Medio NBRIP contiene en g.L⁻¹: Glucosa 10; β -Ca₃(PO₄)₂ 5; MgCl₂ · 6H₂O 5; MgSO₄ · 7H₂O 0,25; KCl 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,1. Cuando se utilizó en vez de β -Ca₃(PO₄)₂, el Fe(PO₄)₃ · 4H₂O se adicionó 7,2.

La determinación colorimétrica de fósforo se hizo realizando los siguientes pasos (Jackson, 1970):

- 1- Se añadió 0,1 mL del sobrenadante y se pasó a una probeta de cinco mL a la que se le adicionó agua destilada hasta tres mL
- 2- Se añadió una gota del indicador 2,4 dinitrofenol.
- 3- Se añadió una gota de NaOH al 5% y se mezcló el contenido de la probeta.
- 4- Se añadió de dos a tres gotas de ácido sulfúrico 1 mol.L⁻¹ hasta justamente decolorar la solución.
- 5- Se añadió 0,2 mL de solución de molibdato de amonio y se mezcló el contenido de la probeta dando pequeños golpes y se enrasó la probeta hasta cinco mL con agua destilada.
- 6- Se añadió una gota de cloruro estannoso. Se agito bien, virando varias veces la probeta.
- 7- Reposo diez minutos.

Pasado este tiempo se leyeron las muestras en un espectrofotocolorímetro tipo SPEKOL 11 a una longitud de onda de 660 nm.

Para determinar la concentración de fósforo soluble en la solución del cultivo se realizó una curva patrón. Se procedió de la siguiente manera: de una solución de hidrógeno fosfato de potasio de 50 ppm de P, se tomaron cinco mL y se enrasó en un volumétrico de 50 mL. De esa solución se tomaron 0,2; 0,4 y 0,6

mL. Se procedió a la determinación colorimétrica de forma semejante que a las muestras, con la variante que el blanco en este caso fue agua destilada. Finalmente los valores de densidad óptica de las muestras fueron transformados en valores de concentración de fósforo soluble.

3.11- Detección de polifosfatos en los microorganismos-asociados

Se realizaron tinciones con DAPI, azul de toluidina y azul de metileno con el objetivo de visualizar la presencia de polifosfatos en las células de los aislados. Todas las tinciones se hicieron en cada uno de los cultivos, crecidos durante 48 h en medio SYP sólido.

Tinción con 4',6 diamidino-2-phenilendiole (DAPI): Se realizó según Hung *et al.* (2002). Una asada del cultivo de interés se colocó sobre un portaobjetos limpio y se dejó secar al aire del flujo laminar; pasado dos minutos se colocaron dos gotas de solución de DAPI ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) encima de las células, de forma tal que se cubriera toda la película de células. El portaobjeto se colocó en la oscuridad durante una hora y luego se realizó la observación de la preparación en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX40, haciendo uso del sistema óptico U-MWU. El mismo procedimiento se siguió para células sin añadir DAPI. La observación de células fluorescentes amarillas es indicativo de polifosfatos, mientras las células sin polifosfatos fluorescen de color azul (Hung *et al.* 2002).

Tinción con Azul de Toluidina: Se siguió la metodología descrita por Melasniemi y Hernesmaa (2000). Una asada del cultivo se colocó sobre un portaobjeto limpio y se fijó a la llama del mechero. Se adicionó solución de azul de toluidina (1%) y pasado uno ó dos minutos se realizaron varios lavados vertiendo sobre la placa solución de H_2SO_4 (1%). Células de color azul oscuro ó púrpura indican presencia de polifosfatos y células coloreadas azul pálido indican ausencia de polifosfatos (Melasniemi y Hernesmaa, 2000).

Tinción con azul de metileno: Se siguió el método de Grocetti *et al.* (2000). Una asada del cultivo se fijó a la llama del mechero. Se realizó la tinción con solución de azul de metileno al 1% durante 15 segundos. Se diferenció con ácido acético al 1%, se lavó con agua corriente y se secó con papel de filtro. Una coloración azul oscura ante un fondo de células mucho más pálidas denota la presencia de polifosfatos.

3.12- Influencia de los microorganismos-asociados aislados sobre el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz

Se probaron 15 aislados microbianos-asociados que se encontraban viables en esta fase del trabajo. Las semillas de arroz fueron desinfectadas utilizando cloruro de mercurio al 0,1% según la metodología descrita por Ortega y Rodés (1986).

Se utilizaron tubos de cultivo de 47 mL para crecer las plantas de arroz. A los mismos se les añadieron 15 mL de medio LGI-P modificado (sacarosa al 2%). Se colocaron dos semillas de arroz, previamente desinfectada, por tubo y los aislados bacterianos se inocularon con una asada (asa calibrada 0,1 mL) de cultivos de siete días, que crecían en cuñas, en medio LGI-P modificado. Para estudiar la esterilidad del experimento se utilizaron como controles tres tubos con medio LGI-P modificado y tres tubos con medio LGI-P sembrados con semillas de arroz sin inocular con microorganismo. Por cada aislado microbiano-asociado se inocularon tres tubos con semillas de arroz y se colocaron por diez días a una temperatura aproximada de 30 ± 3 °C, a la luz artificial (10 h de oscuridad y 14 h de luz) de $250 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una humedad relativa de 75-85%. Pasado ese tiempo, se separaron las raíces de las plántulas, se lavaron con agua destilada estéril y se separaron en placas Petri para ser medidas y cortadas. Se midió en las raíces: peso seco, longitud y número de raíces por plántula. Al final del período de crecimiento de las plantas, se realizaron conteos de microorganismos para lo cual se utilizó cámara de Neubauer.

3.12.1- Producción de indol

Cualitativo: A partir de cultivos que se encontraban en medio LGI-P modificado, se determinó la producción de indol en medio caldo de triptona (Cortés, 2001). El principio de la prueba está basado en la formación de un complejo rojo, que se produce cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Para revelar el resultado se utilizó reactivo de Kovacs. Control positivo (produce indol): *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Cortés, 2001). Control negativo (no produce indol): cepa 9C; bacteria endófito de la caña de azúcar, aislada en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de la Habana (Loiret, 2001).

Cuantitativo: Se utilizó el método de Selvakumar *et al.* (2008), modificado. Se añadió 100 μL del aislado en tubos con 5 mL de medio líquido SYP y se incubó 72 h con agitación a temperatura ambiente,

determinándose la DO a 600 nm y ajustando con agua destilada estéril una suspensión de DO igual a 0,5. A continuación se añadieron 500 µL de esta suspensión bacteriana a tubos con medio líquido SYP, se prepararon seis tubos por aislado, tres con SYP (8 mL) más un mL de triptófano y tres tubos con nueve mL de medio SYP.

Al medio se le adicionó triptófano hasta alcanzar la concentración 5 mM, el cual se esterilizó por filtración y se añadió al medio SYP estéril, se aplicó agitación con Vortex y se incubó 72 h sin agitación a 30 °C.

Se tomaron 1,5 mL del cultivo y se centrifugó durante 15 min a 11662 g. El AIA producido por mL de cultivo se estimó mediante el método de Gordon y Weber (1951) mezclando 500 µL del sobrenadante con un mL del reactivo de Salkouski. El desarrollo de color rosado indica la producción de AIA. A los 30 minutos se realizó la lectura a 530 nm del sobrenadante de la muestra. Se preparó una curva de calibración con diferentes concentraciones de AIA utilizando una solución patrón de cantidad de sustancia conocida de AIA.

3.13- Efecto de los microorganismos-asociados aislados, sobre la germinación y el crecimiento hifal de *Glomus mosseae* (INCAM-2) en condiciones *in vitro*

Los aislados ensayados (EndoGm1, EndoGm3, EndoGm5, EndoGm6, EndoGm7, EndoGm8, EndoGm10 y EndoGm12) fueron cultivados en medio SYP líquido hasta obtener 10^6 UFC. Las esporas de *G. mosseae* cepa INCAM-2 fueron desinfectadas por la metodología propuesta por Cranenbrouck *et al.* en el 2005, posibilitando el inicio y mantenimiento del cultivo monoaxénico del HMA. El experimento se realizó en placas Petri de nueve centímetros con medio de cultivo SRM (Strullu y Romand, 1986) (Anexo 3), el mismo tiene un balance de nutrientes y permite el crecimiento del microorganismo-asociado aislado y la germinación de las esporas, según el esquema que se representa en la Figura 1. Las placas fueron incubadas a 27 °C, a esta temperatura crecen las bacterias y germinan *in vitro* las esporas del HMA (Cranenbrouck *et al.* 2005). El experimento fue revisado cada 48 h durante 45 días. Tanto el porcentaje de esporas germinadas como el tamaño total de las hifas fueron analizados a los 23 días de tener en contacto las esporas y los microorganismos-asociados aislados.

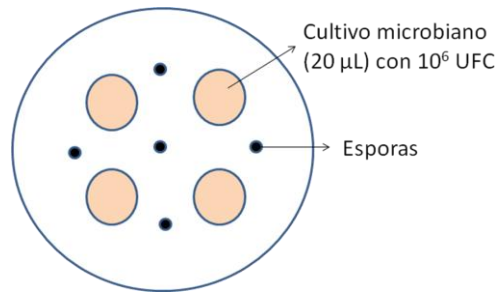


Figura 1: Esquema que representa la forma en que fueron ubicadas las esporas y las colonias de los microorganismos-asociados durante los experimentos de interacción de estos con las esporas de *HMA G. mosseae* INCAM-2 *in vitro*. Para cada aislado de microorganismo-asociado se emplearon tres placas (5 esporas por placa) para un total de 15 esporas inoculadas por aislado de microorganismo-asociado que se estudió en esta fase.

Las fotografías del cultivo *in vitro* de las esporas en presencia o no de los microorganismos-asociados fueron tomadas con microscopio Carl Zeiss y con ayuda del Software AxioVision.

3.14- Determinaciones Estadísticas

Los datos del experimento 3.12 fueron sometidos a Análisis de Varianza de clasificación simple y posterior Test de Tuckey, con el fin de identificar las diferencias significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$, después de comprobada la normalidad y la homogeneidad de varianza (Test de Brown-Forsythe), utilizando el paquete STATISTIC versión 6.1. En los experimentos 3.10 y 3.13 se utilizó también el programa STATISTIC versión 6.1.

IV - Resultados

4.1- Desinfección de las esporas de HMA *Glomus mosseae*

El cultivo de HMA bajo condiciones axénicas constituye una necesidad y representa uno de los retos de la Biología moderna. El uso de metodologías de desinfección eficaces es necesario para obtener esporas asépticas y para tener éxito en el cultivo *in vitro* de los HMA.

El análisis de los distintos métodos de desinfección de esporas previamente informados nos indicó que el método de Nair *et al.* (1991), modificado por Reis *et al.* (1999) (denominado en este trabajo como método Nair-Reis), fue uno de los que mejores resultados había arrojado para la desinfección superficial de esporas de HMA en investigaciones previas (Reis *et al.* 1999). Los autores declaraban que este método de desinfección Nair-Reis impedía el crecimiento de bacterias a partir de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (Reis *et al.*, 1999), lo que motivó que se incluyera en la experimentación inicial de este estudio.

Sin embargo, la prueba de descontaminación de la superficie externa de las esporas de *G. mosseae* siguiendo dicha metodología arrojó resultados no satisfactorios (Tabla 2). Las observaciones realizadas indicaron que al inocular y cultivar, en condiciones asépticas, distintos medios de cultivos con esporas intactas, “desinfectadas” por el método Nair-Reis, hubo crecimiento de microorganismos que formaron colonias con características de bacterias y hongos (Tabla 2).

Los microorganismos que crecieron a partir de las esporas intactas “desinfectadas” representaron en este documento una contaminación, ya que el propósito era la eliminación total de microorganismos asociados a la pared externa de las esporas. Por esta razón se denominó “contaminante” a los microorganismos que crecieron en el medio de cultivo después de inocular esporas intactas tratadas con un método que pretendía la desinfección externa total.

Las colonias bacterianas contaminantes observadas en los distintos medios de cultivo, de forma general fueron pequeñas (1 – 1,5 mm) y redondas. En AN los colores de las colonias variaron, la mayoría amarillas y con menos frecuencia anaranjadas ó blancas.

En la mayoría de los casos la contaminación fue producida por hongos formadores de colonias blancas grandes (4 - 7 mm). En algunas ocasiones las placas fueron contaminadas rápidamente por hongos

formadores de colonias negras, que hicieron difícil la observación de las colonias bacterianas contaminantes.

Tabla 2: Detección de crecimiento o no, en placas Petri (tres réplicas) después de la inoculación de esporas intactas de *Glomus mosseae*, “desinfectadas” con el método Nair-Reis (N-R) ó con el método CTCf ó con esporas maceradas que habían sido previamente desinfectadas con la metodología CTCf.

| Tratamiento de desinfección de la spora | Observaciones ^{a,b} | | | | | | | | | | | |
|---|------------------------------|--------------------|-----|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | | 96 h | | |
| | AN | LGI-P ² | SYP | AN | LGI-P ² | SYP | AN | LGI-P ² | SYP | AN | LGI-P ² | SYP |
| Esporas intactas, método N-R | - | - | - | + m ¹ | - | + m ¹ | +++ m ¹ | - | +++ m ¹ | +++ m ¹ | + | +++ m ¹ |
| Esporas intactas, método CTCf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Esporas maceradas, método CTCf | + m | - | - | ++ m | - | + m | +++ m | - | ++ m | +++ m | + m | +++ m |

^a m: colonias microbianas, ¹ además aparecen hongos contaminantes, ² LGI-P modificado

^b - no detección de crecimiento, + crecimiento microbiano (colonias por placa de 9 cm de diámetro: +, 1-5; ++, 6-8; +++, 9-20)

En el medio LGI-P modificado el crecimiento de colonias bacterianas muy pequeñas y difíciles de apreciar, fue observado a las 96 h de inocular las esporas.

El fracaso de la metodología Nair-Reis para la desinfección total, demandó la búsqueda de una alternativa, por lo que se procedió a la modificación de esa metodología. Se incrementó la concentración de Cloramina T (C) como agente antimicrobiano, se cambió el antibiótico original por Cefalexina (Cf, antibiótico de primera generación) y se adicionó Tween 40 (T, detergente) con vistas a mejorar la acción del agente antimicrobiano.

El método basado en la combinación de Cloramina T, Cefalexina y Tween (CTCf) resultó eficaz para la desinfección externa de las esporas de *Glomus mosseae*. Al inocular las esporas descontaminadas con CTCf, e intactas, no se observó crecimiento microbiano en los tres medios de cultivo entre las 0 y las 96 h (Tabla 2), ni siquiera a los siete días después de la inoculación. Este resultado se observó en cinco ocasiones distintas en las cuales se repitieron los experimentos.

Sin embargo, cuando se inocularon en los mismos medios de cultivo, las esporas maceradas y previamente desinfectadas con la metodología CTCf hubo crecimiento de colonias microbianas (Tabla 2). En medio AN el crecimiento se observó a las 24 h, en medio SYP a las 48 h y en medio LGI-P modificado a las 96 h.

La Fig. 2, muestra el aspecto de la superficie externa de la espora antes y después del procedimiento de descontaminación CTCf; el diámetro de las esporas desinfectadas está en un rango de 160 - 200 μm . La superficie exterior de las esporas desinfectadas luce más lisa, nítida y clara (Fig. 2B).

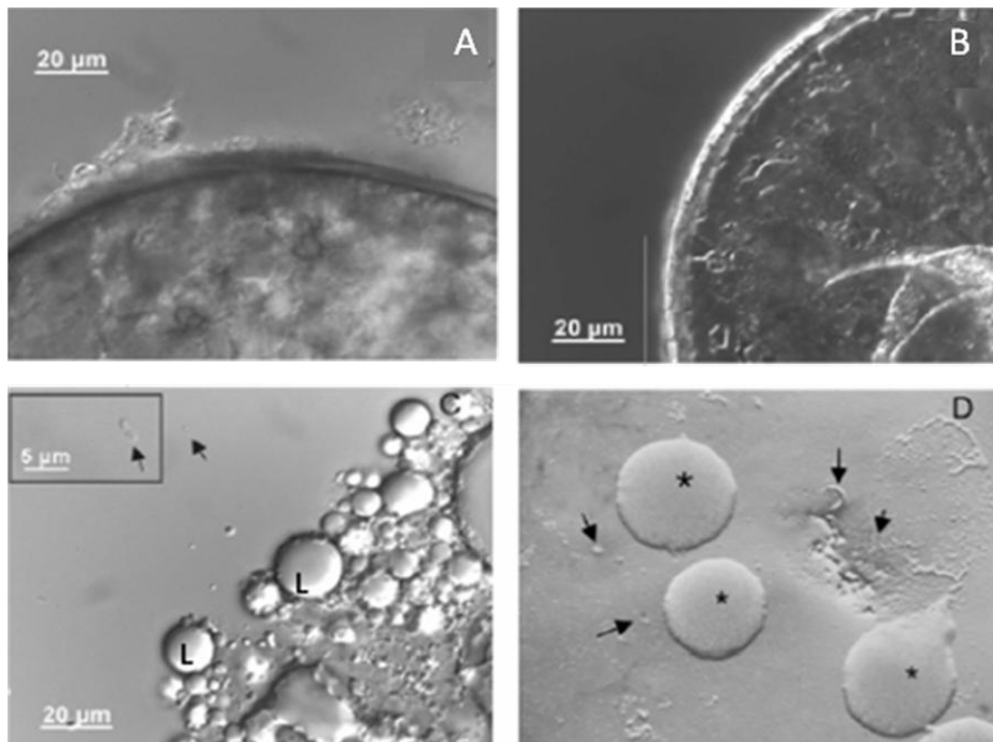


Figura 2: Espora de *Glomus mosseae*. A: antes del proceso de desinfección CTCf y B: después del proceso de desinfección. Ambas fotos fueron tomadas con microscopio óptico 1000X y la preparación fue realizada con agua; C: la fotografía fue tomada haciendo uso del microscopio óptico (1000X) después de aplastar una espora del HMA *G. mosseae* entre un porta y un cubreobjetos; se observa el contenido lipídico (L) de la espora y microorganismos-asociados a la misma con formas bacilares (señalados con flecha); D: fotografía tomada con microscopio estereoscópico a una placa Petri en la cual siete días antes se inoculó el macerado de las esporas desinfectadas con la metodología CTCf; se observan colonias microbianas (*) y se señalan con flechas algunos restos de paredes de esporas rotas.

La observación de la asepsia externa de las esporas, unido al hecho que en cinco repeticiones y en tres medios de cultivo no se observó crecimiento microbiano alguno, al inocular esporas intactas, fue evidencia de que se logró un método eficaz para descontaminar la superficie externa de las esporas de *G. mosseae* e impulsó la idea de macerar las esporas desinfectadas con esta metodología para tratar de

aislar microorganismos íntimamente asociados a ellas. Algunas colonias de microorganismos-aislados del contenido de esporas desinfectadas eficazmente de forma externa (Tabla 2), se muestran en la Fig. 2D. La morfología bacilar de algunos de estos microorganismos-asociados, al interior de las esporas, puede observarse en la imagen insertada en la Fig. 2C obtenida con mayor aumento; también se aprecia el contenido lipídico de dicha espora.

Cuando se obtuvieron estos resultados durante el proceso de investigación, la literatura internacional sólo informaba unos pocos artículos sobre el hallazgo de organismos semejantes a bacterias en *Gigaspora margarita* (Bianciotto *et al.* 1996). Nuestros hallazgos nos condujeron a muchas preguntas que fueron motor impulsor para realizar nuevos experimentos cuyos resultados se presentan en los próximos epígrafes.

4.2- Microorganismos-asociados a esporas del HMA *Glomus mosseae*

El método CTCf es eficaz para descontaminar la superficie externa de las esporas; sin embargo, al inocular esporas desinfectadas y después maceradas, se apreció crecimiento microbiano en los tres medios de cultivo (Tabla 2); esto sugiere que los microorganismos aislados se encontraban íntimamente asociados a las partes internas de las esporas y que pudieran ser resistentes a los antimicrobianos empleados para la desinfección de las mismas, sí de alguna manera ocurriese absorción por la pared de las esporas.

Todas las veces que se repitió el experimento, de forma semejante, se distinguió que las primeras evidencias de crecimiento microbiano se visualizaron a las 24 horas en AN, a las 48 horas en el medio SYP y después de un tiempo mayor (96 h) en el medio LGI-P modificado. Colonias con diferentes formas y colores fueron observadas en los tres medios de cultivo; debido a las características de los mismos éstas fueron apareciendo en distintos momentos en el transcurso del tiempo (Tabla 2).

En total se observaron al microscopio estereoscópico 30 colonias con características diferentes. En la Fig. 3 se muestran las fotografías del crecimiento de algunos de estos microorganismos-asociados aislados, las evidencias indican que viven en el interior de las esporas del HMA *G. mosseae*.

Muchos de estos microorganismos-asociados no conservaron la viabilidad durante todo el período de tiempo que se desarrollaron los experimentos; a pesar de esto, el haber podido conservar 15 tipos

diferentes de microorganismos-asociados (durante cuatro años) y siete durante 10 años es algo relevante para los propósitos de la investigación.

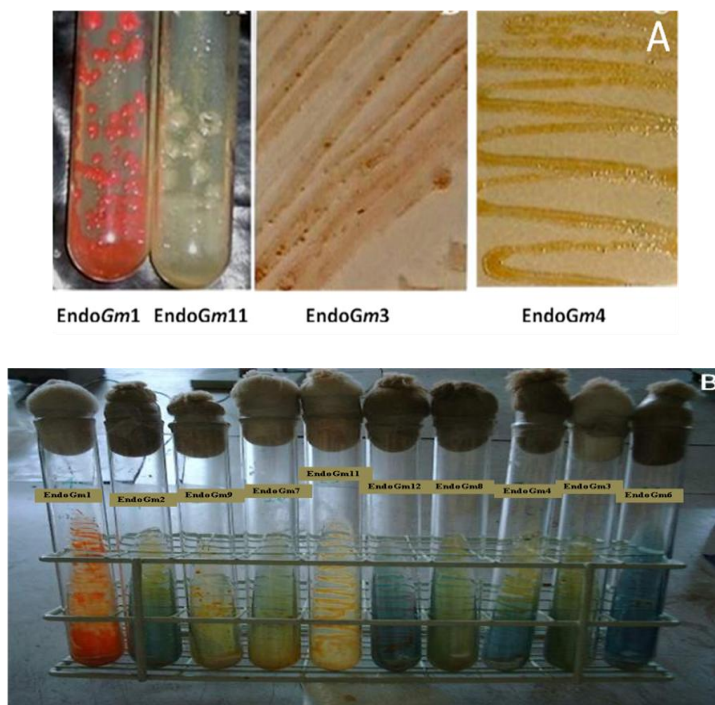


Figura 3: Cultivos de los aislados microbianos-asociados a esporas de *Glomus mosseae*, creciendo en medios de cultivos axénicos. A: *EndoGm1* y *EndoGm11* crecidos durante 15 días en medio SYP; *EndoGm3* y *EndoGm4* creciendo en SYP durante siete días B: Diez de los microorganismos-asociados conservados durante 30 días en medio LGI-P modificado.

Algunos aislados no conservaron la viabilidad en los medios de cultivo estudiados, otros nunca crecieron y a otros se les consideró “microorganismos fastidiosos” por su lento crecimiento. Estos últimos, por ejemplo crecían en LGI-P modificado pero cuando se les cultivaba en medio AN ó LB para realizar tinción no hubo crecimiento, lo que provocó un intenso trabajo con ellos para tratar de mantenerlos en medios axénicos para los análisis, pero no fue posible y como consecuencia no se pudo realizar la identificación taxonómica de todos los microorganismos-asociados aislados originalmente. Los microorganismos-asociados observados en los medios de cultivo artificiales después del macerado de las esporas, crecieron en los medios AN, SYP y LGI-P modificado (Anexo 1), y de esta misma manera se comenzó a purificar los mismos en el mismo medio donde habían crecido, en algunos casos ya no se apreció nuevamente la posibilidad de reproducción, algunos en el primer intento de cultivo luego del aislamiento, otros en el transcurso del cuarto, quinto o sexto cultivo.

Se observaron microorganismos-asociados que crecían en medio AN y SYP, también crecían en medio LGI-P modificado, y se escogió este último para su conservación, debido a que el crecimiento en este era más reducido y la posibilidad de contaminación menor debido al propio pH y escasa fuente de nitrógeno del mismo, respecto a los otros dos medios utilizados.

El medio LGI-P modificado y sólido, fue el más efectivo para la conservación de los microorganismos-asociados que se habían aislado; aparentemente este medio tuvo las características y condiciones más afines con el ambiente interior (citoplasma y paredes celulares) de las esporas de *G. mosseae*. En él se conservaron los aislados durante largos períodos de tiempo (hasta diez años) con una frecuencia de refrescamiento cada tres meses (Fig. 3B).

La reproducibilidad (cinco repeticiones) de los resultados obtenidos demuestra la eficacia del método de desinfección en la pared externa de las esporas y la existencia de microorganismos cultivables íntimamente asociados a las esporas de *G. mosseae*.

4.3- Características morfológicas de los aislados

En los microorganismos-asociados aislados que se pudieron conservar, se realizó el análisis de las características morfológicas de las colonias y de las células microbianas (Tabla 3). Predominaron microorganismos bacilares con respuesta negativa a la tinción de Gram.

La forma y tamaño de las colonias, de sus células y la respuesta a la tinción de Gram en los aislados EndoGm1 y EndoGm11 respecto al resto de los microorganismos-asociados aislados, es diferente (Tabla 3).

4.4- Ubicación taxonómica de los microorganismos-asociados aislados de esporas de HMA *Glomus mosseae* que fueron conservados

4.4.1- Características de los microorganismos-asociados aislados EndoGm1 y EndoGm11

Los aislados EndoGm1 y EndoGm11 presentaron características que llamaron la atención y se realizó un análisis de estos con mayor detalle.

En la tinción de Gram no se observó la coloración característica de las Gram positivas ni de las Gram negativas, por tanto se denominó la coloración al Gram como indeterminada (Tabla 3), (Fig. 4A y 4B).

En estos dos aislados se observan conglomerado de células de color anaranjado cuando fueron teñidas al Gram (Fig. 4C).

Tabla 3: Características morfológicas de las colonias (incubadas siete días en medio LGI-P sólido modificado) y las células de los aislados microbianos-asociados, obtenidos a partir de esporas de *Glomus mosseae* desinfectadas con la metodología de CTCf.

| Identificación de los aislados | Morfología de las colonias (diámetro promedio de 10 lecturas) | Características morfológicas de las células |
|--------------------------------|--|--|
| EndoGm 1 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (1,9 ± 0,7 mm), convexa, salmón FF655D ¹ | Células grandes redondeadas, en racimos, (3,4 – 4,6 μm ± 0,7). Gram indeterminado. |
| EndoGm 2 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (1,3 ± 0,3 mm), elevada, amarilla, FFFF66 ¹ | Bacilos largos finos, (2,4 μm ± 0,3). Gram negativo. |
| EndoGm 3 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (1,3 ± 0,3 mm), plana, rosada, FF3366 ¹ | Bacilos formando cadenas, (2,2 μm ± 0,4). Gram negativo. |
| EndoGm 4 | Circular, lisa, mantecosa, translúcida, (1,0 ± 0,2 mm), elevada, anaranjada, FF9900 ¹ | Bacilos, (2,3 μm ± 0,2). Gram negativo. |
| EndoGm 5 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (1,6 ± 0,5 mm), elevada, crema, FFCC99 ¹ | Bacilos cortos, (1,2 μm ± 0,2). Gram negativo. |
| EndoGm 6 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (0,9 ± 0,3 mm), elevada, crema, FFCC99 ¹ | Bacilos, (2,3 μm ± 0,1). Gram negativo. |
| EndoGm 7 | Circular, mate, mantecosa, opaca, (1,0 ± 0,2 mm), elevada, crema, FFCC99 ¹ | Bacilos pequeños, (1,2 μm ± 0,1). Gram negativo. |
| EndoGm 8 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (1,0 ± 0,2 mm), elevada, crema, FFCC99 ¹ | Bacilos, (2,3 μm ± 0,2). Gram negativo. |
| EndoGm 9 | Circular, lisa, mantecosa, transparente, (0,5 ± 0,2 mm), plano, amarilla, FFFF66 ¹ | Bacilos, (1,7 μm ± 0,2). Gram negativo. |
| EndoGm 10 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (1,8 ± 0,1 mm), plana, rosada, FF3366 ¹ | Bacilos, (1,7 μm ± 0,1). Gram negativo. |
| EndoGm 11 | Circular, lisa, viscosa, opaca, (2,2 ± 0,6 mm), convexa, beige, FFCC00 ¹ | Células grandes redondeadas, en racimos, (3,8 – 4,9 μm ± 0,8). Gram indeterminado. |
| EndoGm 12 | Circular, lisa, viscosa, opaca, (0,5 ± 0,2 mm), plana, rosada, FF3366 ¹ | Bacilos, (2,5 μm ± 0,1). Gram negativo. |
| EndoGm 13 | Circular, lisa, mantecosa, translúcida, (0,6 ± 0,3 mm), plana, amarilla, FFFF99 ¹ | Bacilos, (1,8 μm ± 0,1). Gram negativo. |
| EndoGm 14 | Circular, lisa, mantecosa, transparente, (1,1 ± 0,4 mm), convexa, amarilla, FFFF99 ¹ | Bacilos pequeños delgados, (1,5 μm ± 0,1). Gram negativo. |
| EndoGm 15 | Circular, lisa, mantecosa, opaca, (0,5 ± 0,3 mm), elevada, amarilla, FFFF99 | Cocos, (1,1 μm ± 0,1). Gram negativo. |

Morfología de las colonias: Forma, bordes, consistencia, opacidad, diámetro, promedio y elevación según observación al microscopio estereoscópico (40X). Color según el sistema hexagesimal. Todas tienen bordes enteros, se emulsionan fácilmente y presentan olor característico.

Características morfológicas de las células: Observación con microscopio biológico 1000X.

¹ Colores según: CEST Color (<http://www.wtv-zone.com/phyrst/color/convertor.html>),

¹ Gotom y Color Chart (<http://gotomv.com/color.html>)

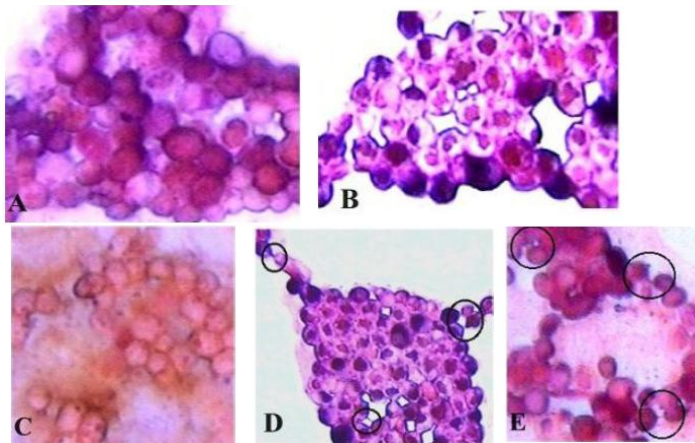


Figura 4: Respuesta a la tinción de Gram y otras características de dos microorganismos-asociados. Coloración indeterminada en la tinción Gram (A) *EndoGm1* y (B) *EndoGm11*. (C) Coloración anaranjada apreciada en los conglomerados de *EndoGm1*. Células conectadas, (D) *EndoGm1* y (E) *EndoGm11*. Fotografías tomadas con microscopio óptico (1000X) acoplado a una cámara digital, haciendo uso del programa Motic Images 2000.

EndoGm11, se detectaron estructuras características del proceso de gemación (Fig. 5A) y células formando cadenas que pueden interpretarse como posibles pseudomicelios (Fig. 5B).

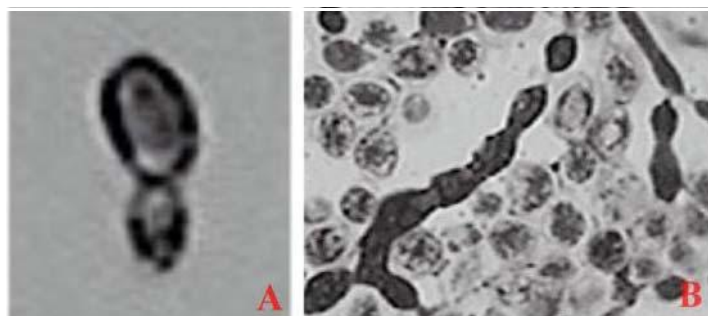


Figura 5: Estructuras que impresionan como un proceso de gemación en levaduras. (A) Formación de estructuras tipo gemas en *EndoGm1* y (B) formación de estructuras tipo gemas formando cadena en *EndoGm11*. Ambos aislados fueron crecidos en SYP durante 15 días a 30°C. Microscopio óptico 1000X.

Las células de los aislados *EndoGm1* y *EndoGm11* se observaron grandes y abultadas con un diámetro promedio de $3,4 \pm 0,2$ y $4,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Tabla 3), respectivamente. El diámetro promedio de las colonias en *EndoGm1* es $1,9 \pm 0,7 \text{ mm}$ y en *EndoGm11* es $2,2 \pm 0,6 \text{ mm}$ (Tabla 3).

En las preparaciones de estos dos aislados las células están organizadas en racimos, no se observaron células libres y presentaron hilos de conexión (Fig. 4D y 4E). En observaciones realizadas a los microorganismos-asociados *EndoGm1* y

EndoGm11, se detectaron estructuras características del proceso de gemación (Fig. 5A) y células formando cadenas que pueden interpretarse como posibles pseudomicelios (Fig. 5B). El color de las colonias de *EndoGm1* es salmón (Tabla 3). Además en la tinción con calcofluor white para determinar si existe quitina en la pared de estos aislados, se observaron células azules completamente fluorescentes (Fig. 6), esto no se observó en los controles negativos de la bacteria *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, cepa tipo PA15.

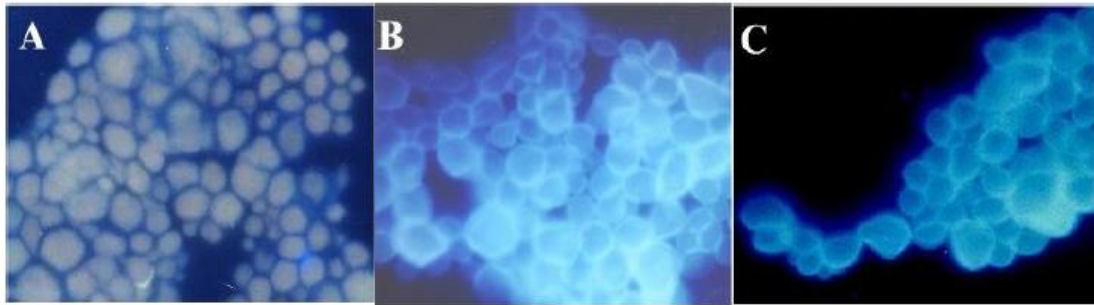


Figura 6: Fluorescencia al calcofluor. (A) células de *EndoGm1* sin teñir. Células que tienen fluorescencia azul en ambos aislados: (B) *EndoGm1* y (C) *EndoGm11*. Fotografías tomadas con microscopio de fluorescencia (O L Y M P U S B X 4 0) y objetivo de inmersión.

Además de las características descritas anteriormente, se detectó la capacidad de crecimiento rápido, abundante y en forma de crema, acentuada en el medio SYP. En los medios líquidos L G I - P modificado y SYP se apreció turbidez (asociada al crecimiento de estos dos microorganismos-asociados).

Todas las características expuestas anteriormente constituyeron evidencia para determinar que estos aislados podían ser levaduras, sin embargo en la literatura científica disponible no se habían descrito levaduras-asociadas a las esporas u otras estructuras de los H M A. Por tanto, confirmar o refutar la veracidad de tal axioma se convirtió en una necesidad del trabajo y se prosiguió a la realización de pruebas moleculares para la identificación taxonómica de estos aislados.

4.4.1.1- Análisis molecular de los microorganismos-asociados aislados *EndoGm1* y *EndoGm11*

Se secuenciaron para *EndoGm1* fragmentos de 1037 pares de bases y para *EndoGm11*, 1033; los resultados del aislamiento del 18S ADNr y la comparación de las secuencias de bases de los aislados *EndoGm1* y *EndoGm11* con los datos de la base NCBI/Blast, permitieron obtener información más detallada de las características de estos dos aislados. Se encontró una estrecha relación entre el microorganismo-asociado aislado *EndoGm1* y las levaduras *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospordium babjevae*, *Rhodospordium diobovatum* y *Rhodotorula mucilaginosa* todos con un valor de E de 0,0; mientras que *EndoGm11* mostró homología con la levadura *Cryptococcus albidosimilis*, *Cryptococcus liquefaciens* y *C. diffluens* todos con un valor de E de 0,0 (Tabla 4).

Tabla 4: Comparación y similitud de las secuencias de bases del 18S ADNr de los microorganismos-asociados aislados EndoGm1 y EndoGm11 con la información encontrada en la base de datos NCBI/Blast.

| EndoGm1 DQ643976 | Puntuación | % de Identidad | Valor de E |
|---------------------------------------|------------|-------------------|---------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | 1275 | 99 | 0.0 |
| <i>Rhodospiridium babjevae</i> | 1092 | 99 | 0.0 |
| <i>Rhodospiridium diobovatum</i> | 1086 | 99 | 0.0 |
| EndoGm11 DQ643977 | | | |
| <i>Cryptococcus albidosimilis</i> | 1228 | 100 | 0.0 |
| <i>Cryptococcus liquefaciens</i> | 1122 | 100 | 0.0 |
| <i>Cryptococcus diffluens</i> | 1120 | 99 | 0.0 |

La comparación de las secuencias del 18S ADNr revelan que el aislado EndoGm1 pertenece al género *Rhodotorula* o *Rhodospiridium*, mientras que EndoGm11 es una especie de *Cryptococcus* estrechamente relacionada con *C. albidosimilis*, *C. liquefaciens* y *C. diffluens*.

Para EndoGm1 se pudiera interpretar que existen grandes posibilidades de que sea *R. glutinis* al ser la puntuación tan alta y distante de *R. babjevae* y *R. diobovatum*.

Las secuencias de ambos aislados fueron registradas en la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica de los Estados Unidos, con Número de Acceso DQ643976 para EndoGm1, y DQ643977 para EndoGm11. De lo anterior se evidencia, que asociados a las esporas de los HMA, además de bacterias, también se pueden encontrar otros microorganismos; en las esporas de *G. mosseae* (INCAM-2) de la colección de cepas del INCA, existen levaduras-asociadas.

4.4.2- Aislados con características de bacterias.

En la Tabla 3, se aprecia que predominó la forma bacilar en 13 de los 15 microorganismos-asociados aislados que se habían conservado hasta esta fase del trabajo; la respuesta a la tinción de Gram, fue negativa, no obstante se puede apreciar en este estudio que esta no es una característica generalizable para concluir que en las esporas de HMA *G. mosseae* existe solamente bacterias con formas bacilares Gram negativas, debido a que, dentro de los 30 aislados iniciales se obtuvo un aislado Gram positivo y se observó en algunos aislados la presencia de células con forma cocoide.

Se encontró que la morfología de la colonia para los aislados (EndoGm5, EndoGm6, EndoGm7 y EndoGm8) cambia cuando el cultivo supera los siete días de crecimiento en el medio SYP; se observó una estructura tipo coral o dedos de la mano (Fig. 7), lo que hizo sospechar en bacterias del género

Pseudomonas, de otros no había características morfológicas que ayudaran en la orientación de su clasificación.



Figura 7: Crecimiento típico de las bacterias-asociadas EndoGm 5, EndoGm 6, EndoGm 7 y EndoGm 8, en medio de cultivo SYP pasados siete días a 30°C.

4.4.2.1- Característica del crecimiento de los aislados en el medio Agar Papa modificado y NFb

La viabilidad en el medio LGI-P modificado (con una cantidad de compuestos nitrogenados disponibles casi despreciable) de las bacterias-asociadas aisladas de las esporas de *G. mosseae* hizo pensar en la posible presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno. Se conoce que estos (*Gluconoacetobacter diazotrophicus* y/o *Azospirillum*) tienen grandes posibilidades de crecer en dicho medio, además de su existencia en gramíneas (Dobereiner *et al.* 1993) y las esporas de *G. mosseae* fueron multiplicadas en plantas de sorgo, por lo que se esperaría la posible presencia de estos en las mismas.

En la Tabla 5 puede apreciarse los resultados que se obtuvieron al inocular los aislados en el medio Agar Papa modificado y NFb; en la cual se observa que ninguno mostró coloración carmelita típica del crecimiento de las colonias de *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en dicho medio.

En el medio de cultivo NFb en todos los casos en que hubo crecimiento, las colonias fueron blancas y ninguna presentó el centro azul verdoso, característico de *Azospirillum*.

Las evidencias indicaron, que entre los aislados asociados a las esporas de *G. mosseae*, purificados en este estudio, no se encuentran los géneros *Gluconoacetobacter* ni *Azospirillum*.

Tabla 5: Coloración de las colonias de los aislados (siete días) en dos medios de cultivo selectivos para la identificación de los géneros microbianos *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (Agar Papa) y *Azospirillum* (NFb).

| Identificación de los aislados | Crecimiento en Agar Papa | Crecimiento en NFb |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------|
| EndoGm 2 | + (blancas) | + (blancas) |
| EndoGm 3 | + (beige) | + (blancas) |
| EndoGm 4 | + (blancas) | + (blancas) |
| EndoGm 5 | + (beige) | - |
| EndoGm 6 | + (naranjas) | + (blancas) |
| EndoGm 7 | + (beige) | + (blancas) |
| EndoGm 8 | + (beige) | + (blancas) |
| EndoGm 9 | - | + (blancas) |
| EndoGm 10 | + (naranjas) | + (blancas) |
| EndoGm 12 | + (naranjas) | + (blancas) |
| EndoGm 13 | - | + (blancas) |

+ : hubo crecimiento y - : no hubo crecimiento. n=3

4.4.2.2- Extracción, purificación y secuenciación del 16S ARNr

La amplificación del 16S ARNr de los siete aislados arrojó fragmentos de 1700 pb, como se puede apreciar en la electroforesis que se presenta en la Fig. 8. Estos fragmentos en los siete microorganismos-asociados aislados, tipo bacteria, fueron secuenciados (Anexo 2). Con ayuda de la base de datos NCBI/BLAST, no sólo conocimos entonces

que los microorganismos-asociados aislados de tipo bacteriano, pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Delftia* sino que se pudo precisar que tres de ellos (EndoGm 3, EndoGm 10 y EndoGm 12) pertenecen a la especie *Delftia acidovorans* y los restantes cuatro aislados (EndoGm 5, EndoGm 6, EndoGm 7 y EndoGm 8) a *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 6). La condición de patógeno para plantas y animales de *P. aeruginosa* (Von Bodman, et al. 2003) es algo que debe tenerse siempre presente en cualquier intento de utilizar estos microorganismos-asociados en la práctica agrícola y en todas las investigaciones que se realicen con ellos. Las reglas de bioseguridad deben cumplirse estrictamente.

En la Tabla 6 se muestran los resultados que se obtuvieron al comparar el 16S ARNr de los aislados bacterianos-asociados a las esporas de *G. mosseae* con la base de datos NCBI (Centro Nacional para Información Biotecnológica) donde están registrados los microorganismos (15 de febrero 2011, 5.42 pm) y sus números de acceso; para cinco de los aislados se dispone del número de acceso, los otros dos microorganismos-asociados están en proceso de inscripción.

En esta Tabla aparece de forma comparativa el nombre de la bacteria a la que se asemejó y dos bacterias más cuya puntuación y grado de identidad son similares; aparecen los cebadores por separado y esto se debe a que cuando fueron secuenciados los fragmentos 16S del ARNr de los aislados hubo doblete de bandas y estos fueron secuenciados independientemente. No obstante al comparar dichas

Tabla 6: Similitud del 16S ARNr de los microorganismos-asociados aislados tipo bacterias con la información presente en la base de datos NCBI/Blast. Se informa el Número de Acceso otorgado a las cepas por la base de datos NCBI para cinco de los aislados.

| EndoGm 3 (JF499695) | Puntuación | % de Identidad | Cebador | Valor de E |
|---|------------|----------------|----------|-------------|
| <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1 | 1535 | 96 | fD 1-rP2 | 0.0 |
| <i>Acidovorax delafieldii</i> | 1356 | 92 | | 0.0 |
| <i>Acidovorax ebreus</i> | 1334 | 92 | | 0.0 |
| EndoGm 10 (JF499698) | | | | |
| <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1 | 1397 | 97 | fD 1 | 0.0 |
| <i>Acidovorax delafieldii</i> 2AN ctg00941 | 1225 | 93 | | 0.0 |
| <i>Acidovorax ebreus</i> TPSY | 1218 | 94 | | 0.0 |
| <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1 | 693 | 92 | rP2 | 0.0 |
| <i>Comamonas testosteroni</i> KF-1 ctg14069 | 632 | 90 | | $2e^{-178}$ |
| <i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2 | 632 | 90 | | $2e^{-178}$ |
| EndoGm 12 (JF499699) | | | | |
| <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1 | 1110 | 96 | fD 1 | 0.0 |
| <i>Acidovorax ebreus</i> TPSY | 950 | 92 | | 0.0 |
| <i>Acidovorax</i> sp. JS42 | 950 | 92 | | 0.0 |
| <i>Delftia acidovorans</i> SPH-1 | 857 | 97 | rP2 | 0.0 |
| <i>Comamonas testosteroni</i> KF-1 ctg14069 | 797 | 95 | | 0.0 |
| <i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2 | 797 | 95 | | 0.0 |
| EndoGm 5 | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 2414 | 97 | fD 1-rP2 | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 2414 | 95 | | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 2414 | 95 | | 0.0 |
| EndoGm 6 (JF499696) | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 604 | 86 | fD 1 | $4e^{-170}$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 604 | 86 | | $4e^{-170}$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 604 | 86 | | $4e^{-170}$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 702 | 99 | rP2 | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 702 | 99 | | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 702 | 99 | | 0.0 |
| EndoGm 7 (JF499697) | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 926 | 97 | fD 1 | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 926 | 97 | | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 926 | 97 | | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 1120 | 98 | rP2 | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 1120 | 98 | | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 1120 | 98 | | 0.0 |
| EndoGm 8 | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 553 | 100 | fD 2 | $2e^{-154}$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 553 | 100 | | $2e^{-154}$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 553 | 100 | | $2e^{-154}$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 1083 | 98 | rP2 | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 1083 | 98 | | 0.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA b1 | 1083 | 98 | | 0.0 |

secuencias con la base de datos NCBI, tanto para una, como para la otra secuencia se obtiene el mismo microorganismo.

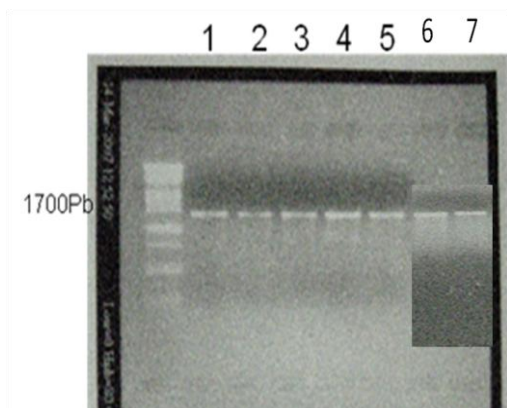


Figura 8: Amplificación del fragmento de 1700 P b (que se secuenció), seleccionado del PCR del 16S ARNr. Los aislados están colocados en el siguiente orden (1- EndoGm 3, 2- EndoGm 5, 3- EndoGm 6, 4- EndoGm 7, 5- EndoGm 8, 6- EndoGm 10, 7- EndoGm 12).

4.4.3- Caracterización de los microorganismos-asociados aislados a partir de esporas de *G. mosseae* (INCAM -2)

Los resultados de las pruebas bioquímicas en los microorganismos-asociados aislados (13 aislados) de las esporas desinfectadas de *G. mosseae* pueden apreciarse en la Tabla 7.

Tabla 7: Respuestas de los aislados a distintas pruebas bioquímicas en tres experimentos independientes.

| Identificación de los aislados | Producción de ácido a partir de carbohidratos ^a | | | | | Hidrólisis del almidón ^b (2 días) | Act. Nitrato reductasa ^b (7 días) | Catalasa ^b (3 días) | Crecimiento en SYP + NaCl ($\cdot 10^3$) ^c | | |
|--------------------------------|--|---|---|----|---|--|--|--------------------------------|---|-----|-----|
| | A | M | G | Ms | S | | | | 3 % | 5 % | 7 % |
| EndoGm 1 | - | + | + | + | + | - | - | + | | | |
| EndoGm 2 | + | - | + | - | + | - | - (bur.) | + | | | |
| EndoGm 3 | - | - | + | - | - | - | - (bur.) | + | - | - | - |
| EndoGm 4 | + | - | + | - | - | - | - | - | | | |
| EndoGm 5 | + | - | - | + | - | - | - (bur.) | + | 23 | 20 | 16 |
| EndoGm 6 | + | - | - | + | - | +(2 mm) | No crecio | + | 23 | 6 | 11 |
| EndoGm 7 | - | - | + | + | + | - | + | - | 25 | 14 | 16 |
| EndoGm 8 | + | - | + | - | + | - | - | + | 19 | 7 | - |
| EndoGm 9 | + | - | + | - | - | - | - | + | | | |
| EndoGm 10 | + | - | + | + | + | +(5 mm) | - | + | - | - | - |
| EndoGm 11 | + | + | + | + | + | - | - | + | | | |
| EndoGm 12 | + | - | - | - | - | +(1 mm) | - | + | - | - | - |
| EndoGm 13 | - | - | + | - | - | - | - | + | | | |

A - Arabinosa, M - maltosa, G - glucosa, Ms - manosa, S - sacarosa

^a Respuesta de los aislados en el medio basal de Gordon frente a distintos carbohidratos. n=3

^b Resultados cualitativos de las actividades de la enzima amilasa (distancia del halo al borde de la colonia), nitrato reductasa (bur: burbujas) y catalasa. n=3

^c Resultado cuantitativo del crecimiento (UFC) en medio SYP + NaCl con 3, 5 y 7% en el medio de cultivo. Este experimento se realizó en tres ocasiones y con tres replicas. En los otros dos experimentos la respuestas coinciden.

4.4.3.1- Producción de ácido a partir de carbohidratos

La prueba de producción de ácidos por fermentación utilizando como fuentes de carbono distintos carbohidratos: tres monosacáridos: arabinosa (pentosa), glucosa y manosa (hexosas), así como dos disacáridos: maltosa y sacarosa, puede apreciarse en la Tabla 7. Se observó que la glucosa es fermentada por diez de los aislados, la arabinosa es fermentada por nueve de ellos; la manosa y la sacarosa es fermentada por seis y el disacárido maltosa es fermentado por sólo dos de los aislados.

La levadura *EndoGm11* produce ácido a partir de los cinco carbohidratos ensayados, esta capacidad natural de dicho aislado de fermentar hexosas, pentosas y disacáridos pudiera ser de gran interés para el desarrollo biotecnológico de la industria alcoholera utilizando biomasa de origen vegetal.

Además de las diferencias antes expuestas, entre las dos levaduras (*EndoGm1* y *EndoGm11*) con el resto de los aislados obtenidos del macerado de las esporas desinfectadas de *G. mosseae*, se apreciaron diferencias (Tabla 7) en la producción de ácido a partir de carbohidratos. Dichos aislados fermentaron casi todos los azúcares y son los únicos que fermentaron maltosa.

Los microorganismos-asociados tipo bacteria produjeron ácido a partir de uno u otro carbohidrato indistintamente, sólo *EndoGm10* produce ácido frente a cuatro de los carbohidratos ensayados y *EndoGm3* y *EndoGm13* sólo producen ácido frente a glucosa.

4.4.3.2- Hidrólisis del almidón

En la Tabla 7 se observa la actividad de la enzima amilasa de los microorganismos-asociados en estudio. El almidón es un polisacárido formado por moléculas de glucosa, es el carbohidrato de reserva energética que se encuentra en mayor contenido en las plantas (Gómez, 2003), por tanto microorganismos beneficiosos con la capacidad de hidrolizar este polisacárido son importantes, aunque no deja de ser preocupante lo perjudicial que pudiera ser para las plantas esta habilidad de microorganismos que están en interacción con plantas de cultivo. De un total de 13 aislados ensayados, tres presentaron actividad de la enzima amilasa (*EndoGm6*, *EndoGm10* y *EndoGm12*), destacándose *EndoGm10* con el mayor halo claro (5 mm), obtenido después de la adición de la solución de lugol y 48 horas de crecimiento en el medio de cultivo Agar-almidón.

De los microorganismos-asociados que tienen actividad de la enzima se encuentran una cepa de *P. aeruginosa* (*EndoGm6*) y dos de *D. acidovorans* (*EndoGm10* y *EndoGm12*).

4.4.3.3- Reducción del nitrato

Las bacterias, hongos, algas y plantas superiores en condiciones aeróbicas pueden utilizar nitrato como fuente de nitrógeno inorgánico para su nutrición (Gliglione *et al.* 2000). A pesar de que la mayoría de los organismos vivos presentan actividad de la enzima nitrato reductasa, esta sólo se detectó en uno de los 13 microorganismos-asociados aislados de las esporas desinfectadas de *G. mosseae* (EndoGm7), sin embargo, se apreció gran cantidad de burbujas en los tubos de cultivo de los aislados (EndoGm2, EndoGm3 y EndoGm5), lo que pudiera ser indicativo del paso de nitrito a N₂. El hecho de no haberse observado desarrollo de color y sí producción de burbujas pudiera ser indicativo de que el nitrito existió durante un tiempo muy breve.

4.4.3.4- Actividad catalasa

La catalasa es una enzima que esta presente en muchos tipos de células, descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Tiene como función la protección en las células del efecto tóxico del peróxido producido en distintas reacciones redox (Garrido, 2002). Casi todos los aislados microbianos presentaron actividad catalasa, sólo EndoGm4 y EndoGm7 no presentaron burbujas o éstas fueron apreciadas después de cinco minutos de comenzado a realizarse el ensayo, por lo que se consideraron microorganismos catalasa negativos. La actividad catalasa positiva es una condición importante para sobrevivir al estrés oxidativo, aspecto que se relaciona con la condición de organismos aerobios facultativos que tienen estos aislados.

4.4.3.5- Características del crecimiento en condiciones salinas

En la Tabla 7, se muestra el resultado del crecimiento de los siete aislados bacterianos que aún estaban conservados, en medio de cultivo con adición de distintas cantidades de NaCl. Las bacterias EndoGm3, EndoGm10 y EndoGm12 identificadas como *D. acidovorans* no crecieron en medio SYP con adición de NaCl, sin embargo las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* crecen abundantemente en el medio de cultivo con 3, 5 y 7 % de NaCl.

Siete gramos de esta sal en 100 mL de medio de cultivo es una concentración que puede ser nociva para la reproducción y el crecimiento de muchos microorganismos (Tejera *et al.* 2003), sin embargo estas bacterias asociadas a las esporas de *G. mosseae* tienen esta capacidad lo que pudiera estar

relacionado con las condiciones en que sobreviven las mismas en las esporas de los HMA y pudiera representar una ventaja evolutiva.

4.4.3.6- Respuestas a 12 antibióticos diferentes en distintas concentraciones de los microorganismos-asociados aislados con características de bacterias

Los aislados con características de bacterias (EndoGm3, EndoGm5, EndoGm6 y EndoGm7, EndoGm8, EndoGm10 y EndoGm12) fueron analizados en este estudio.

Con el objetivo de agrupar las bacterias para su estudio, observamos que todas son Gram negativas y tienen formas bacilares, pero la coloración de sus respectivas colonias es diferente: colonias rosadas en tres de los aislados (FF3366) y de color crema (FFCC99) para los otros cuatro aislados. De esta forma, atendiendo al color de las colonias se conformaron dos grupos: uno que incluye los microorganismos-asociados aislados EndoGm3, EndoGm10 y EndoGm12 con colonias rosadas y el otro que incluye a los microorganismos-asociados EndoGm5, EndoGm6, EndoGm7 y EndoGm8 con colonias color crema.

El antibiograma con Multidiscos, conteniendo doce antimicrobianos brinda numerosas ventajas pues en un solo filtro están impregnados los 12 antibióticos, los resultados se obtienen en un tiempo breve y se pueden apreciar con facilidad (Tabla 8).

Tabla 8: Respuesta semicuantitativa de los microorganismos-asociados tipo bacteria, al ponerse en contacto con doce antibióticos en diferentes concentración (M & M) en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con el sistema (BIO RAD). Resultado de tres experimentos independientes.

| Antibióticos | Susceptibilidad de los microorganismos-asociados tipo bacteria a los antibióticos | | | | | | |
|------------------------------|---|----------|----------|-------------------------|---------|---------|---------|
| | Colonias de color rosadas | | | Colonias de color crema | | | |
| | EndoGm3 | EndoGm10 | EndoGm12 | EndoGm5 | EndoGm6 | EndoGm7 | EndoGm8 |
| Ampicilina | R | R | R | R | R | R | R |
| Amikacina | R | R | R | S | S | S | S |
| Trimetoprim - Sulfametoxazol | S | S | S | I | R | S | I |
| Ceftriaxona | S | R | R | R | R | I | R |
| Gentamicina | R | R | R | R | R | R | R |
| Netilmicina | R | R | R | I | I | I | I |
| Enoxacina | S | S | S | S | S | S | S |
| Penicilina | R | R | R | R | R | R | R |
| Dicloxacilina | R | R | R | R | R | R | R |
| Cefalotina | R | R | R | R | R | R | R |
| Cloranfenicol | S | S | I | R | R | R | R |
| Eritromicina | R | R | R | R | R | R | R |

R - resistentes, I- intermedias, S-sensibles. n=3

Todos los microorganismos-asociados aislados con características de bacteria son resistentes a la mitad (6 de 12) de los antimicrobianos que se probaron: Ampicilina, Gentamicina, Penicilina, Dicloxacilina, Cefalotina y Eritromicina y todos son sensibles a Enoxacina. Además se observó una respuesta común respecto a algunos antibióticos, por ejemplo Amikacina y Netilmicina, a las cuales las cepas EndoGm3, EndoGm10 y EndoGm12 (colonias color rosado) son resistentes, sin embargo son sensibles al Cloranfenicol. Las cepas EndoGm5, EndoGm6, EndoGm7, EndoGm8 (colonias color crema) tienen respuesta diferenciada a estos mismos antibióticos, su respuesta es intermedia a Netilmicina y sensible a Amikacina y son resistentes al Cloranfenicol. Estos resultados aproximan a la posibilidad de que entre las bacterias-asociadas aisladas de esporas de HMA *G. mosseae* existan dos grupos diferentes en cuanto a la resistencia/sensibilidad a antibióticos.

4.5- Relación con el metabolismo del fósforo de los microorganismos-asociados aislados de las esporas desinfectadas de *Glomus mosseae*

4.5.1- Capacidad solubilizadora de fosfatos y concentración de fosfato solubilizado

La formación del halo transparente en medio NBRIP alrededor de la colonia es indicador de la capacidad solubilizadora de fosfato por parte del microorganismo-asociado inoculado.

El diámetro del halo transparente puede asociarse a la eficiencia del proceso de solubilización de la forma insoluble de fosfato añadida al medio de cultivo. La presencia o ausencia de halos (Fig. 9) a las 48 h de haber sido inoculados en el medio de cultivo es un índice de la capacidad solubilizadora de los microorganismos involucrados. La capacidad de solubilizar β -fosfato tricálcico ó fosfato de hierro fue determinada en los nueve aislados que aún se conservaban del total obtenido originalmente.

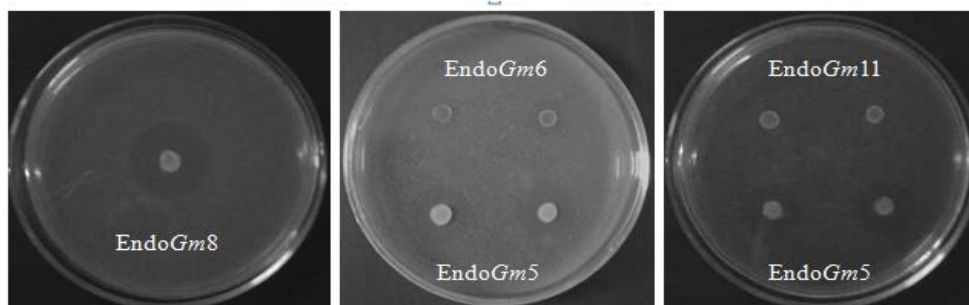


Figura 9: Evidencia de la solubilización de β -fosfato tricálcico por formación de halo transparente alrededor de las colonias. El halo se forma en el medio de cultivo por algunos aislados, en dependencia de la actividad solubilizadora, a las 48 h de crecimiento en medio NBRIP.

En la Tabla 9 se presentan los diámetros de los halos de solubilización de fosfatos que producen los nueve aislados ensayados. Una valoración general indica que es mayor la solubilización a partir de fosfato tricálcico que a partir del fosfato de hierro por los aislados ensayados.

Tabla 9: Tamaño medio del halo de solubilización, creado a las 72 h por colonias crecidas en placas con medio NBRIP sólido. Al medio se adicionaron formas insolubles de fósforo $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ó $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

| Aislados | Diámetro del halo (mm) | |
|-----------|--------------------------------|---|
| | $\beta\text{-Ca}_3\text{PO}_4$ | $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |
| EndoGm 1 | 2 | 1 |
| EndoGm 3 | - | - |
| EndoGm 5 | 5 | 3 |
| EndoGm 6 | 3 | 2 |
| EndoGm 7 | - | - |
| EndoGm 8 | 6 | 4 |
| EndoGm 10 | 5 | 2 |
| EndoGm 11 | 8 | 6 |
| EndoGm 12 | 1 | - |

Microorganismos crecidos a 30°C; n=3

--: no formación de halo

La mayoría de los aislados ensayados tienen capacidad solubilizadora de fosfato frente a los dos fosfatos insolubles utilizados. De un total de nueve aislados ensayados, cuando se utilizó fosfato tricálcico, siete formaron halo como respuesta positiva, y cuando se utilizó fosfato de hierro seis aislados lo hicieron (Tabla 9). Los aislados (EndoGm 3)

D. acidovorans y (EndoGm 7) *P. aeruginosa*

no formaron halo para ninguno de los dos fosfatos insolubles utilizados, incluso después de transcurridas 192 h (8 días) de haberse realizado la inoculación en el medio NBRIP, pero si crecieron. Los aislados EndoGm 1 y EndoGm 11 los cuales presentaron alto porcentaje de identidad con los géneros *Rhodotorula* y *Cryptococcus* respectivamente, no formaron halo en las primeras 24 h de inoculado en el medio NBRIP, lo que siempre ocurrió en todas las repeticiones del experimento. Sin embargo, EndoGm 11 (Tabla 9) fue el aislado que mostró un halo de solubilización mayor para los dos fosfatos insolubles ensayados a las 72 h.

Para una mejor comprensión de la Fig. 10 es necesario explicar que cuando se utilizó fosfato de hierro (Fig. 10A), la población bacteriana era de 10^4 UFC por mL^{-1} mientras que las levaduras (EndoGm 1 y EndoGm 11) tenían una población de 10^6 UFC por mL^{-1} , no así con fosfato tricálcico (Fig. 10B) donde todos los microorganismos ensayados tenían una población de 10^6 UFC por mL^{-1} .

Los aislados EndoGm 5 y EndoGm 6 identificados como *P. aeruginosa* son los que mayor solubilización de fosfatos presentaron a partir de fosfato tricálcico, con valores de 18 y 19 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ por 10^6 UFC respectivamente (Figura 10). A partir de fosfato de hierro, la bacteria-asociada *D. acidovorans* (EndoGm 3), la levadura del género *Cryptococcus* (EndoGm 11) y la bacteria-asociada *P. aeruginosa* (EndoGm 6) fueron los que tuvieron diferencia significativa con valores de 16, 13 y 14 μg

$\mu\text{g P mL}^{-1}$ por 10^6 UFC respectivamente, siendo mayor aún la solubilización de las bacteria-asociadas debido a que con menos células solubilizaron mayor concentración de fosfato.

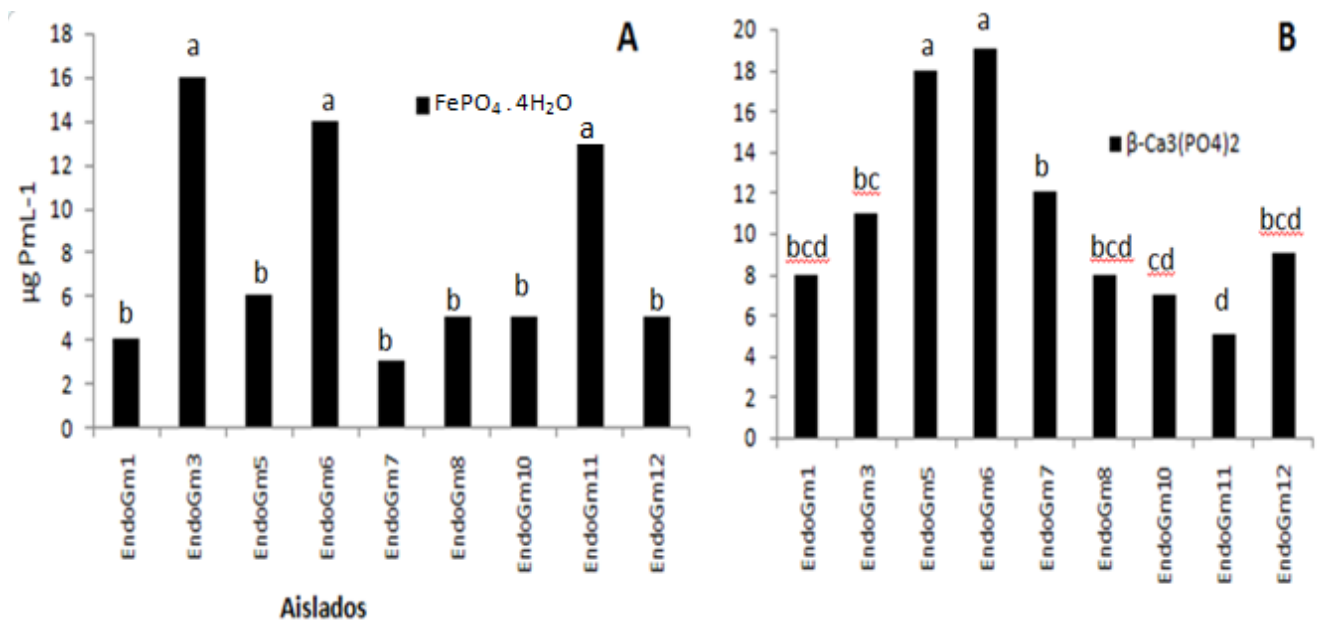


Figura 10: Concentración promedio de fosfato solubilizado por los microorganismos-asociados (A: $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y B: $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en medio NBRIP líquido a las 72 h de incubación a 30°C . $n=3$.

Tanto el fosfato tricálcico como el fosfato de hierro son fuentes de fosfatos muy poco solubles, sin embargo, la bacteria-asociada *P. aeruginosa* (EndoGm6) tiene capacidades que le ofrecen ventajas como bacteria solubilizadora de fosfato, aportando valores de concentración de fosfato solubilizado muy altos para ambas fuentes ensayadas (fosfato tricálcico $19 \mu\text{g P mL}^{-1}$ por 10^6 UFC y fosfato de hierro $14 \mu\text{g P mL}^{-1}$ por 10^4 UFC).

4.5.2- Acumulación de polifosfatos

La capacidad de acumular polifosfatos intracelularmente es común en diferentes tipos de microorganismos (Kulaev, 1979). En los microorganismos-asociados aislados los polifosfatos fueron visualizados a través de tinciones específicas. Con azul de toluidina (Melasniemi y Hernesmaa, 2000) las células de *Rhodotorula* (EndoGm1) y *Cryptococcus* (EndoGm11) aparecieron teñidas de color azul intenso (Fig. 11A y 11B) ante un fondo celular teñido de azul más claro; resultado similar fue observado después de la tinción con azul de metileno (Grocetti *et al*, 2000) (Fig. 11E), observándose células de color azul pálido. Estas dos tinciones permitieron la visualización en estos dos aislados de la posible acumulación de polifosfatos.

La tinción con DAPI (Hung *et al.* 2002) es mucho más precisa y específica para la detección de células con gránulos de volutina o polifosfatos en su interior (Hung *et al.* 2002); un resultado positivo es fácilmente apreciable por el contraste de color entre las células que presentan polifosfatos y las que no las presentan. Al realizar esta tinción (Figura 11C sin teñir y 11D teñida) se observaron células fluorescentes de color amarillo brillante para ambos aislados EndoGm1 y EndoGm11 que indican células con polifosfatos en su interior y un fondo celular de color azul, indicativo de células sin polifosfatos.

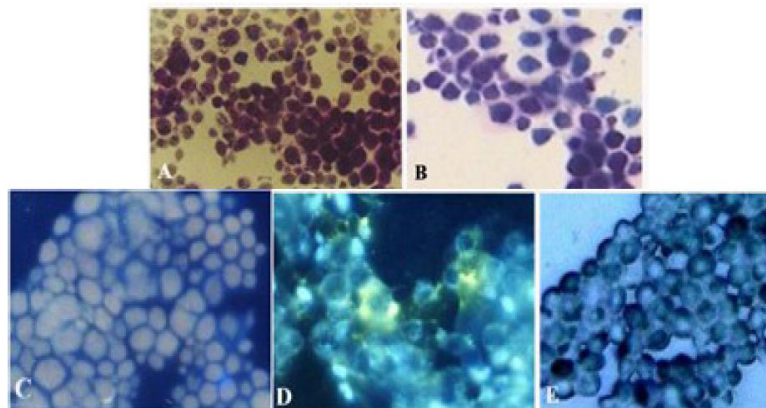


Figura 11: Evidencias de la acumulación de polifosfatos en los microorganismos-asociados. Células teñidas con azul de toluidina, (A) EndoGm11 (*Cryptococcus*) y (B) EndoGm1 (*Rhodotorula*). Células del aislado EndoGm1 antes (C) y después (D) de la tinción con DAPI. (E) células de EndoGm11 teñidas con azul de metileno al (1%). Las fotografías (C) y (D) fueron tomadas con microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX40) con objetivo de inmersión y sistema óptico (Cubo U-MWU y filtro de excitación BP 330-385); las fotos (A), (B) y (E) con microscopio óptico (1000X) acoplado a una cámara digital, haciendo uso del programa Motic Images 2000.

Todos los aislados fueron ensayados con azul de toluidina y con azul de metileno, sólo que debido al pequeño tamaño de las bacterias, en estas fue muy difícil de apreciar si existía gránulos de polifosfatos en su interior o no; sin embargo, esto fue confirmado al usar la tinción con DAPI, debido al contraste de color que se establece apreciándose puntos amarillo brillantes que indican presencia de polifosfatos en dos de los aislados bacterianos identificados como *Pseudomonas aeruginosa* EndoGm5 y EndoGm6. Los microorganismos-asociados, *Rhodotorula* (EndoGm1), *Cryptococcus* (EndoGm11) y *P. aeruginosa* (EndoGm5 y EndoGm6), acumulan polifosfatos y así lo han demostrado las distintas tinciones realizadas. Estos resultados indican que tanto bacterias como levaduras asociadas a las esporas de *Glomus mosseae* tienen la capacidad de acumular gránulos de polifosfatos, lo cual tiene relevancia

desde el punto de vista evolutivo, pudiendo también repercutir en la fisiología de la planta hospedera y en la triple interacción microorganismos-asociados, el HMA y la planta.

4.6- Influencia de microorganismos-asociados a esporas de *Glomus mosseae* sobre el crecimiento de las raíces de plántulas de arroz

Los hongos micorrizógenos arbusculares y las bacterias rizosféricas pueden interactuar sinérgicamente y estimular el crecimiento de las plantas a través de un conjunto de mecanismos que incluyen aumento en la adquisición de nutrientes e inhibición de hongos patógenos a plantas.

Las plantas de arroz que se escogieron como modelo para la realización de este experimento tienen además la característica de constituir un cultivo de importancia para Cuba.

Cuatro de los microorganismos-asociados aislados, estimularon la longitud de las raíces y tres lo inhiben (Fig. 12). Los aislados EndoGm6 (*P. aeruginosa*), EndoGm14 y EndoGm13 y EndoGm4 provocaron incrementos significativos en el largo de las raíces y ejercen efecto inhibitorio los microorganismos-asociados EndoGm7, EndoGm11 y EndoGm15. Todos los aislados estaban presentes en una población que osciló entre $2 \cdot 10^7$ y $7 \cdot 10^7$ células.mL⁻¹, apreciándose que el número de bacterias es similar y por tanto el efecto sobre el crecimiento de las raíces no estaría dado por un número superior de células bacterianas sino por la acción que estas son capaces de ejercer.

Los microorganismos-asociados también tienen efecto en la formación de biomasa de las raíces (Fig. 13). En el tiempo evaluado, los aislados EndoGm14, EndoGm6 (*P. aeruginosa*) y EndoGm4 incrementaron esta variable, con valores que casi duplicaron los de las plantas controles. Se esperaría entonces que un tiempo de interacción mayor, se incrementarían los efectos sobre el crecimiento radical. Ejercen efecto inhibitorio los aislados EndoGm2, EndoGm9 y EndoGm11 con valores que son la mitad del control.

Los microorganismos-asociados aislados también tuvieron efecto sobre el número de raíces totales de las plántulas (Fig. 14). Hubo un efecto estimulador provocado por la inoculación de siete de los aislados; sólo EndoGm15 proporcionó valores menores que el control. El aislado EndoGm6 (*P. aeruginosa*) duplicó el número de raíces que aparecieron en el control.

De los 15 aislados ensayados en este experimento de interacción, siete promovieron el número de raíces de las plantas, cuatro promovieron el alargamiento y tres incrementaron la biomasa de las raíces.