

Evaluación in vitro de la capacidad biofertilizante y promotora de crecimiento de levaduras nativas aisladas de biofermentos de Microorganismos de Montaña

Mora López Marcela¹, López Daniel Andrés², Osorio Víctor Manuel¹ & Botero Liliana Rocío²

¹ Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia

² Grupo de investigación GRINBIO. Universidad de Medellín

Resumen. El uso excesivo de agroquímicos y minerales insolubles para la nutrición vegetal incrementa los costos de producción agrícola, reduciendo a su vez la competitividad, causando simultáneamente impactos negativos al medio ambiente. La aplicación de biofermentos de Microorganismos de Montaña es una práctica que se propone para mejorar la calidad de los suelos, siendo una fuente potencial de microorganismos con actividad biofertilizante que ayudaría a mitigar el impacto negativo de los fertilizantes químicos. Este estudio evalúa en condiciones de laboratorio la producción de ácido indol acético y la capacidad biofertilizante de siete levaduras nativas aisladas de biofermentos líquidos de Microorganismos de Montaña. Luego de siete días de cultivo en agar NBRIP modificado, las levaduras GRB-LB01 Y GRB-LB13 evidenciaron capacidad de solubilizar potasio mediante la producción de ácidos orgánicos; sin embargo, tras siete días de cultivo en agar NBRIP, la solubilización de fósforo por parte de estas fue baja. La capacidad de promoción de crecimiento fue evidenciada para cuatro levaduras productoras de ácido indol acético en un rango de 0,7 a 12 ppm, siendo GRB-LB06 quien obtuvo el valor más alto de producción. Los resultados de este estudio soportan el potencial las levaduras GRB-LB01 y GRB-LB06 en agricultura para el manejo nutricional de los suelos.

Palabras clave: Levaduras, biofertilización, ácido indol acético, solubilización

Introducción.

El incremento de las prácticas agrícolas en los últimos años ha generado la disminución de la materia orgánica y la biodisponibilidad de nutrientes en el suelo como el fósforo y el potasio, esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal (1). Para suplir estas necesidades nutricionales, los agricultores, implementan técnicas de fertilización mineral aplicando mica y roca fosfórica, sin embargo, más del 80% de estos elementos no se transforman en compuestos disponibles para las plantas por ausencia de microorganismos solubilizadores (2), convirtiéndose en una práctica insatisfactoria. Una de las prácticas que se han propuesto, es la implementación de biopreparados obtenidos a partir de fermentaciones sólidas y líquidas de microorganismos de montaña (MM), los cuales son obtenidos de suelos nativos no intervenidos con agroquímicos. Dentro de las características que presentan estos MM se resalta la actividad biocontroladora, biofertilizante y promotora de crecimiento (microorganismos eficientes) que permite mitigar los diversos problemas que se presentan en la agricultura (3).

Objetivo.

Este estudio ha pretendido evaluar a nivel in vitro, la capacidad biofertilizante y promotora de crecimiento de siete levaduras nativas aisladas de biofermentos líquidos de microorganismos de montaña.

Metodología.

Material biológico. se utilizaron siete levaduras aisladas de biofermentos líquidos de microorganismos de montaña por el grupo de investigación GRINBIO de la Universidad de Medellín codificadas como GRB-LB01, GRB-LB02, GRB-LB05, GRMBLB-06, GRB-LB11, GRB-LB12, GRB-LB13.

Evaluación de la capacidad solubilizadora de fósforo. Un fragmento circular de 0,5 cm de diámetro con colonia proveniente de un cultivo de 48 horas en YPDA fue extraído con sacabocados y transferido a medio NBRIP, las cajas inoculadas se incubaron a temperatura ambiente durante siete días hasta la aparición de halos claros como indicador de solubilización. El tamaño de los halos se calculó según el índice de solubilización ($SI = \text{diámetro del halo} / \text{diámetro de la colonia}$) (4).

Evaluación de la capacidad solubilizadora de potasio. Un fragmento circular de 0,5 cm de diámetro con colonia proveniente de un cultivo de 48 horas en YPDA fue extraído con sacabocados y transferido a medio NBRIP modificado, las cajas inoculadas se incubaron a temperatura ambiente durante siete días hasta la aparición de un halo amarillo alrededor de la colonia por la liberación de ácidos orgánicos, responsables de la solubilización de potasio. El tamaño de los halos permitió calcular el índice de solubilización ($SI = \text{diámetro del halo} / \text{diámetro de la colonia}$) (4).

Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento. Para esta prueba se cuantificó la producción de Ácido Indol-acético (AIA), para ello, se siguió la metodología descrita por Celis y Gallardo (5). Para determinar la producción de AIA por cada microorganismo, se preparó una suspensión celular con una concentración de 1×10^6 células/mL, y se inoculó 1 mL en 100 mL de caldo tripticasa de soya. Los tratamientos, se incubaron a temperatura ambiente, a 100 rpm durante 96 horas, tiempo en el cual se alcanzan los picos máximos de producción de AIA (5). Transcurrido este tiempo, se tomaron 5 mL de caldo de cultivo y se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm posteriormente, se recuperó 1 mL de sobrenadante y se adicionaron 2 mL de reactivo de Salkowski, la mezcla se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 530 nm, la concentración de AIA se calculó con base en la curva estándar realizada previamente.

Análisis de datos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con un diseño completamente aleatorio. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando una

prueba de análisis de varianza y una prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) utilizando el software estadístico Minitab17®.

Resultados y discusión.

Evaluación de la capacidad solubilizadora de fósforo

Luego de siete días de cultivo en medio sólido NBRIP, el aislado codificado como GRB-LB05 fue el único que presentó halo de solubilización con un índice de 1.06, que, en comparación con los resultados obtenidos por Pandi (7), es un valor menor, ya que él obtuvo índices del 28.89 a 56.67 con levaduras rizosféricas. De acuerdo con este mismo autor, el mecanismo de solubilización de fosfatos empleado por los hongos es la producción de diferentes ácidos como cítrico, oxálico, málico y glucónico que posiblemente no son sintetizados por las levaduras evaluadas en el presente estudio.

Evaluación de la capacidad solubilizadora de potasio

Luego de siete días de incubación, todas las levaduras presentaron capacidad solubilizadora de potasio, determinado por el cambio de color del medio sólido NBRIP modificado, el cual, en presencia de ácidos orgánicos solubilizan el potasio. Los mayores índices de solubilización fueron obtenidos por los aislados GRB-LB05 y GRB-LB13 con índices de 10.3 y 9.0 respectivamente. Los resultados obtenidos en esta investigación son mucho mayores a los obtenidos por Buragohain (6) quienes obtuvieron índices de solubilización entre 1.1 a 2.9 con bacterias rizosféricas, y similares a los obtenidos por Pandi (7) quien reporta índices de solubilización de 11.0 a 61.1 con levaduras. Es posible que la acidificación en este caso sea causada por otro tipo de ácidos orgánicos como ácido fórmico, butírico, acético, cítrico y málico liberados en el proceso de solubilización de potasio, viran el medio de morado a amarillo generando la diferencias encontrado en este estudio con relación a la solubilización de fósforo.

Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento.

El análisis colorimétrico con el reactivo de Salkowski indicaron que los microorganismos evaluados variaron estadísticamente en su eficiencia para la producción de AIA en caldo tripticasa de soya. De las siete levaduras, cuatro produjeron AIA en un rango de 0,7 a 12 ppm, siendo GRB-LB06 aquella con el valor más alto, seguida de GRB-LB13 con una biosíntesis de 10,8 ppm. De acuerdo con Rojas (9), las concentraciones obtenidas en este estudio son categorizadas como bajas y medianas productoras de AIA, esto se debe a que el caldo tripticasa de soya no proporciona fuentes ricas de precursores de AIA como indol, triptimina, o ácido antranílico, solo provee bajas concentraciones de triptófano (100 ppm) como precursor, el cual para obtener concentraciones superiores a 20 ppm de AIA debe estar presente en 5 mM de acuerdo con los estudios de Liu (10), quien obtuvo un rango entre 0 y 13 ppm de AIA con aislados de levadura *Saccharomyces* sp. en medio YDPA sin suplemento y de 100 a 287 ppm en medio suplementado, esto sugiere la necesidad de suplementar los medios de crecimiento de los aislados de GRINBIO con triptófano para promover la biosíntesis y alcanzar resultados similares.

Conclusión.

Los biofermentos líquidos de MM poseen levaduras con potencial agrícola para la nutrición y crecimiento vegetal. Las levaduras GRB-LB05 y GRB-LB13 presentaron capacidad de solubilización del potasio. La capacidad de solubilización de fósforo fue baja para las levaduras evaluadas. La biosíntesis de AIA fue posible para las levaduras GRB-LB01 y GRB-LB06.

Referencias.

1. Restrepo-Franco GM, Marulanda-Moreno S, De la Fe-Pérez Y, Díaz-de la Ossa A, Lucia-Baldani V, Hernández-Rodríguez A. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. Rev CENIC Ciencias Biológicas.

- 2015;46(1):63–76.
2. Osorno Bedoya L, Osorio Vega NW. Evaluación de factores que afectan la bioacidulación de roca fosfórica bajo condiciones in vitro. *Rev Colomb Biotecnol.* 2017;19(1):53–62.
 3. Umaña S, Rodríguez K, Rojas C. ¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas. *Rev Ciencias Ambient.* 2017 Jun 29;51(2):133.
 4. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170(1):265–70.
 5. Celis Bautista LX, Gallardo IR. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
 6. Buragohain S, Nath DJ, Devi YB, Bhattacharyya B, Dutta S. Molecular characterization of potassium solubilizing bacteria from crop rhizosphere of the North Eastern Region of India. *Curr Sci.* 2018;114(12):2543–8.
 7. Pandi R, Velu G, devi P, Dananjeyan B. Isolation and screening of soil yeasts for plant growth promoting traits. *Madras Agric J.* 2019;106(7–9):143–7.
 8. Teotia P, Kumar V, Kumar M, Shrivastava N, Varma A. Rhizosphere microber: potassium solubilization and crop productivity- present and future aspects. Meena VS, Maurya BR, Verma JP, Meena RS, editors. Springer. New Delhi: Springer India; 2016. 1–331
 9. Rojas Contreras A, Rodríguez Dorantes AM, Montes Villafán S, Pérez Jiménez S. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica.* 2010;29(1405–2768):131–47.
 10. Liu Y-Y, Chen H-W, Chou J-Y. Variation in indole-3-acetic acid production by wild *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* strains from diverse ecological sources and its effect on growth. *PLoS One.* 2016 Aug 2;11(8):e0160524.