

Potencial uso agro-biotecnológico de cepas del género *Burkholderia* aisladas de huertas de mango (*Mangifera indica* L.) v. Ataulfo en México.

S. de los Santos-Villalobos^{1*}, C. Barrera-Galicia², L.E. Hernández-Rodríguez² y J.J. Peña-Cabriales²

¹ Catedrático CONACYT – Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México.

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León 36821 Irapuato, Guanajuato, México.

Potential agro-biotechnological use of Burkholderia strains isolated from mango (Mangifera indica L.) orchards v. Ataulfo in Mexico.

Abstract

Mango orchards v. Ataulfo located in the main producer states of this fruit in Mexico were selected for this study: Chahuities (Oaxaca), Tapachula (Chiapas), and Apatzingan (Michoacan). The molecular characterization -through the analysis of the 16S rRNA gene- of isolates obtained from collected soil indicated the presence of *Burkholderia caribensis* XV (Chahuities), *B. caribensis* XVI (Apatzingán) and *B. cepacia* XXVI (Apatzingán). The metabolic characterization showed a great potential for agro-biotechnological applications of these isolates, *B. caribensis* XV strain was found to be a promising strain for plant growth promotion due to the acetylene reduction assay (60.3 ± 0.2 nmol ethylene produced ml^{-1} medium h^{-1}), ACC deaminase activity (538.4 ± 9.0 nmol α ketobutyrate mg^{-1} protein h^{-1}), and production of carboxylate type siderophore. Similarly, *B. cepacia* XXVI showed a great potential for use as a biological control agent because of its production of hydroxamate type siderophore, inhibiting the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC MYA 456 (causal agent of anthracnose), up to 97 ± 3 %. In addition, these three strains showed a great potential to be used as remediation agents by their tolerance to 100 mg ml^{-1} of lead (minimum inhibitory concentration) and 500 mg ml^{-1} of phenanthrene (maximum concentration tested). In conclusion, *Burkholderia* strains obtained in this study represent a promising agro-biotechnological alternative to increase the plant growth, reduce the incidence of diseases in crops, and remediate contaminated sites in a sustainable way.

Key words: Biological nitrogen fixation, indol acetic acid, ACC deaminase, *Colletotrichum gloeosporioides*, siderophores.

Resumen

Huertas de mango v. Ataulfo fueron seleccionadas para este estudio, localizadas en las principales entidades federativas productoras de este fruto en México: Chahuities (Oaxaca), Tapachula (Chiapas), y Apatzingán (Michoacán). La caracterización molecular -a través del análisis del gen 16S RNAr- de los aislados obtenidos del suelo colectado en dichos sitios indicó la existencia de *Burkholderia caribensis* XV (Chahuities), *B. caribensis* XVI (Apatzingán) y *B. cepacia* XXVI (Apatzingán). La caracterización metabólica de estos aislados mostró su gran potencial agro-biotecnológico, principalmente *B. caribensis* XV como cepa promisoría para la promoción de crecimiento vegetal, debido su actividad de reducción de acetileno ($60.3 \pm$

*Autores de correspondencia
Email: sergio.delossantos@itson.edu.mx

0.2 nmoles de etileno producidos ml^{-1} medio h^{-1}), actividad ACC desaminasa (538.4 ± 9.0 nmoles de α cetobutirato mg^{-1} proteína h^{-1}), y producción de sideróforo de tipo carboxilato. De manera similar, *B. cepacia* XXVI mostró gran potencial como agente de control biológico debido a la producción de sideróforo de tipo hidroxamato, inhibiendo el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC MYA 456 (agente causal de la antracnosis), en un $97 \pm 3\%$. Además, las tres cepas mostraron potencial para ser utilizadas como agentes remediadores debido a su tolerancia al plomo, hasta $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (concentración mínima inhibitoria) y fenantreno $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ (concentración máxima evaluada). Así, las cepas de *Burkholderia* obtenidas constituyen una promisoriosa alternativa agro-biotecnológica para potenciar el crecimiento vegetal, disminuir las pérdidas agrícolas causadas por enfermedades, y remediar sitios contaminados de manera sostenible.

Palabras clave: Fijación biológica de nitrógeno, ácido indol acético, ACC desaminasa, *Colletotrichum gloeosporioides*, sideróforos.

Introducción

El mango (*Mangifera indica* L.) es originario del Noroeste de la India, Región Indo-Birmánica, punto de dispersión a otras áreas tropicales y subtropicales del mundo (Jain y Pryadarshan, 2009). Este cultivo es uno de los principales frutos tropicales producidos a nivel mundial, ocupando el quinto lugar con una producción superior a 30×10^6 t en 2014, siendo la India el principal productor con una contribución del 40%, seguido por China con 11%, 7% de Pakistán y México con 6%. El panorama cambia positivamente para México en relación a la exportación, ocupando el segundo lugar con el 21%, sólo superado por la India con el 23% (FAOSTAT, 2014).

En México, la producción de mango en 2014 fue de 1.8×10^5 t; siendo las principales entidades federativas productoras del fruto, en orden descendente: Guerrero, Sinaloa, Nayarit, Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Michoacán, Colima y Jalisco (SIAP, 2014). Sin embargo, constantemente la producción de mango es afectada por diversos factores, tales como: el manejo de la fertilización y las enfermedades.

El manejo de la fertilización constituye una de las prácticas determinantes para potenciar la expresión genética de la planta, destinado a la producción de frutos (Avilán y Rengifo, 1992). Entre los elementos químicos más importantes para el crecimiento y desarrollo del árbol de mango se encuentran Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) (Prieto et al., 2005). Esta demanda de nutrientes por el cultivo se ve reflejado en los costos de producción, donde la fertilización representa el 22% (Ayala-Garay et al., 2009). Por lo cual, manejos inadecuados en este sentido pueden conducir a

costos excesivos por la aplicación de fertilizantes, conduciendo a problemas de contaminación ambiental, así como mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades por el cultivo.

El mango, como cualquier especie vegetal, es susceptible a plagas y enfermedades que limitan su productividad. La principal enfermedad en mango, a nivel mundial, es la antracnosis -causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*-, tanto en condiciones de campo como en postcosecha (Rondón et al., 2006), donde las pérdidas de producción pueden alcanzar hasta el 60% (Kuo, 2001). Actualmente, el control precosecha y postcosecha de la antracnosis se lleva a cabo mediante la aplicación de fungicidas químicos como bencimidazoles, imidazoles, fungicidas de cobre, y ditiocarbamatos (Ploetz y Prakash, 1997). Sin embargo, el uso de estos fungicidas no es una práctica económica y ambientalmente sustentable, ya que su uso excesivo ha conducido a graves problemas de contaminación ambiental, residuos tóxicos en los frutos y resistencia de los patógenos (Wu et al., 2009), además de grandes pérdidas económicas ya que el control de enfermedades representa el 14% de los costos totales de producción de este fruto (Ayala-Garay et al., 2009).

En los últimos años ha surgido interés en el desarrollo de sistemas integrales de fertilización y combate a enfermedades a través de la inoculación de microorganismos con capacidad de estimular el crecimiento vegetal y promover resistencia a enfermedades, bajo diferentes mecanismos: fijación biológica de nitrógeno, producción de fitohormonas, sideróforos, antibióticos, enzimas (1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)

desaminasa, quitinasas, β -glucanasas y celulasas), compuestos volátiles y solubilización de fosfato (Emmert y Handelsman, 1999; Vessey, 2003; Kennedy *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005; Hontzeas *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). Además, diversas cepas de estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal pueden transferir, estabilizar, descomponer y/o degradar contaminantes de suelo, sedimentos y agua, entre los que destacan plaguicidas, explosivos, elementos radiactivos, metales pesados e hidrocarburos poliaromáticos, convirtiéndolos también en agente biorremediadores de diversos ecosistemas (McGrath *et al.*, 2001; Lasat, 2002), a través de mecanismos como la excreción de compuestos quelantes, acidificación del microambiente, y por cambios en el potencial redox (Jing *et al.*, 2007).

Dentro de este grupo de microorganismos se encuentra el género *Burkholderia*, comprendido por al menos 17 β -proteobacterias (Shommu *et al.*, 2015), las cuales ocupan diversos hábitats y nichos ecológicos. A pesar que algunas especies del género *Burkholderia* han sido descritas como bacterias patógenas, la mayoría de éstas poseen la capacidad de asociarse a plantas promoviendo el crecimiento de las mismas, así como mostrar el potencial de ser utilizados como agentes de biorremediación (Akar *et al.*, 2005; Mahenthalingam *et al.*, 2008; Onofre-Lemus *et al.*, 2009; Senen-Barcos *et al.*, 2015).

El presente trabajo se centró en el aislamiento de cepas de *Burkholderia* asociadas al cultivo del mango en México, así como en el estudio de la diversidad genética y metabólica de éstas. El objetivo fue identificar cepas de este género con capacidades metabólicas de interés agrobiotecnológico, con potencial de ser utilizadas para contribuir en el desarrollo del árbol, disminuir las pérdidas causadas por la antracnosis, y biorremediar sitios contaminados con metales pesados e hidrocarburos.

Materiales y métodos

Sitios de estudio

Huertas de mango v. Ataulfo localizadas en tres de las principales entidades federativas productoras de este fruto en México fueron seleccionadas: Chiapas con una producción anual de 1.4×10^5 t, Oaxaca 1.7×10^4 t y Michoacán 7.0×10^3 t (SAGARPA, 2014); en los municipios de Tapachula ($14^\circ 56'00''$ N y $092^\circ 16'00''$ O, 179.0 MSNM, 26.4° C y 2,037.1

mm de precipitación promedio anual), Chahuites ($16^\circ 15'00''$ N y $094^\circ 14'00''$ O, 35.0 MSNM, 27.4° C y 1,010.4 mm de precipitación promedio anual) y Apatzingán ($19^\circ 06'4.7''$ N y $102^\circ 12'51.4''$ O, 477 MSNM, 27.3° C y 808.7 mm de precipitación promedio anual), respectivamente (SMN, 2014).

Muestreo

Muestras de suelo, hoja y fruto fueron colectadas de los sitios de estudio de manera aleatoria. Éstas fueron colocadas en cámaras húmedas a 4° C para su traslado al laboratorio, y posterior análisis microbiológico.

Aislamiento de cepas de *Burkholderia*.

El medio BAZ fue utilizado para el aislamiento de cepas de este género, teniendo la siguiente composición (g l^{-1}): 0.4 K_2HPO_4 , 0.4 KH_2PO_4 , 0.2 MgSO_4 , 0.02 CaCl_2 , 0.01 FeCl_3 , 0.002 Na_2MoO_4 , 0.5 extracto de levadura, 0.075 azul de bromotimol, 0.08 cicloheximida y 5.0 arabinosa; pH 6.0 (Estrada de los Santos *et al.*, 2001). Las hojas y frutos fueron lavados y desinfectados superficialmente con agua, alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 4%. 10 g de muestra de suelo o material vegetal (desinfectado) fueron macerados en 90 ml MgSO_4 0.01 M estéril, y homogenizado durante 1 h a 150 rpm. Posteriormente, se realizó la siembra de esta suspensión por el método de diluciones seriales, para lo cual el material macerado y homogenizado fue llevado hasta la dilución 10^{-3} , y 1 ml de ésta fue inoculado en cajas de Petri conteniendo los medios de cultivo utilizados. Las cajas de Petri inoculadas fueron incubadas a $28 \pm 2^\circ$ C durante siete días.

Identificación Molecular

Los aislados microbianos obtenidos fueron caracterizados molecularmente para su identificación taxonómica. Para lo cual, DNA de éstos fue extraído mediante el kit Fungal Bacterial DNA (Cat. D6005) Zymo Research, el cual fue utilizado como templado para la amplificación del gen 16S RNAr bajo las condiciones reportadas por Weisburg *et al.* (1991). Los amplicones obtenidos fueron purificados mediante el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cat. 28-9034-70) Illustra, secuenciados y comparados con las secuencias del gen 16S RNAr de otras cepas de *Burkholderia* depositadas en el banco de genes del NCBI.

Análisis Filogenético

Las secuencias del gen 16S RNAr obtenidas fueron alineadas utilizando el programa ClustalX 2.0.12 (Thompson *et al.*, 1997), y el programa MEGA 4.0 fue utilizado para construir el árbol filogenético de éstos mediante el método Neighbor-Joining. La secuencia del gen 16S RNAr de *Bradyrhizobium* sp. (No. de acceso AB105539) fue utilizada como grupo externo. La estabilidad de los clados fue evaluada con un reensamble de bootstrap igual a 1000. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el banco de genes del NCBI. Los aislados identificados molecularmente como especies del género *Burkholderia* fueron caracterizados metabólicamente, como se muestra a continuación.

Caracterización Metabólica

Fijación Biológica de Nitrógeno. La Actividad de Reducción de Acetileno (ARA) fue cuantificada en las cepas de *Burkholderia* obtenidos, para lo cual 5×10^3 células fueron inoculados en viales conteniendo medio Baz semisólido (1.8 g L^{-1} agar) como medio de cultivo. Los viales inoculados fueron incubados a 28°C durante seis días; posteriormente 10% del aire en éstos fue sustituido por acetileno (Cavalcante y Dobereiner, 1988). La concentración de etileno producida por cada aislado fue estimada usando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 7890A, acoplado a un detector de ionización de flama Hewlett Packard modelo 6890.

Producción de Ácido Indol Acético (AIA). 5×10^3 células de cada cepa fueron inoculadas en tubos de polipropileno con capacidad de 50 ml, conteniendo 30 ml de medio líquido Baz suplementado con $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de triptófano. Los tubos inoculados fueron incubados a 28°C y 100 rpm, durante seis días. Después del periodo de incubación, 1 ml de cultivo bacteriano fue centrifugado a 13 000 rpm por 10 min, y 2 ml de reactivo de Salkowski fueron agregados a 1 ml del sobrenadante. La reacción se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente por 20 minutos (Glickmann y Dessaux, 1995). Las muestras fueron medidas a 540 nm en un espectrofotómetro TECAN modelo GENios.

Actividad ACC Desaminasa. La actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa fue cuantificada inoculando 5×10^3 células de cada cepa obtenida, en 10 ml de Medio Sintético (MS)

(Yedidia *et al.*, 1999), con un periodo de incubación de cuatro días a 28°C y 100 rpm. La biomasa total obtenida fue transferida a 5 ml de MS sin Amonio y con ACC 3 mM, incubado por tres días a 28°C y 100 rpm. Al finalizar el periodo de incubación, los cultivos fueron resuspendidos en un volumen de Buffer Tris 0.1 M (pH 8.5). 25 μl de Tolueno fueron adicionados a una alícuota de 200 μl de suspensión celular, agitándose vigorosamente por 30 s. Posteriormente 20 μl de una solución de ACC 0.5 M fueron agregados, incubándose a 30°C por 15 minutos. Finalizado este periodo de incubación, 1 ml de HCl 0.56 N fue adicionado. Los lisados fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 10 min, y 800 μl de HCl 0.56 N y 300 μl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0.2 g en 100 ml de HCl 2 N) fueron agregados a 1 ml del sobrenadante. Después de incubar a 30°C por 30 min, 2 ml de NaOH 2 N fueron agregados, y la absorbancia fue medida a 540 nm. La actividad ACC desaminasa fue determinada por la cantidad de α -cetobutirato producida por la desaminación de ACC (Viterbo *et al.*, 2010). La cantidad de proteína fue cuantificada por el Método de Bradford (Bradford, 1976).

Actividad antagónica in vitro. Ensayos de confrontación *in vitro* fueron realizados entre las cepas estudiadas y *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. Para esto, cajas de Petri conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA), pH 6.0 fueron inoculadas (en el centro) con 2×10^6 esporas de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 y con 1×10^3 UFC de cada una de las cepas obtenidos, alrededor del hongo fitopatógeno. Las cajas Petri inoculadas fueron incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante siete días, posteriormente el porcentaje de inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 fue determinado de acuerdo con Schmidt *et al.* (2009).

Producción de sideróforos. La técnica del Chrome Azurol S agar (CAS agar) fue utilizada en este ensayo, inoculando 1×10^3 UFC de cada una de las cepas de *Burkholderia* en el medio de cultivo mencionado, el cual fue preparado a partir de cuatro soluciones estériles. La solución indicadora Fe-CAS (solución 1) se preparó con 10 ml de FeCl_3 1 mM (disuelto en HCl 1 mM) y 50 ml de CAS (1.21 mg ml^{-1}), a la solución azul resultante se le agregaron 40 ml de CTAB (1.82 mg ml^{-1}). La solución buffer (solución 2) fue preparada disolviendo 30.24 g de

PIPES en 750 ml de una solución de sales que contenía 0.3 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl y 1.0 g NH_4Cl , el pH fue ajustado a 6.8 con KOH al 50%, el volumen se ajustó a 800 ml y se agregaron 15 g de agar. La solución 3 se preparó disolviendo 2 g glucosa, 2 g manitol, 493 mg MgSO_4 , 11 mg CaCl_2 , 1.17 mg MnSO_4 , 1.4 mg H_3BO_3 , 0.04 mg CuSO_4 , 1.2 mg ZnSO_4 y 1.0 mg Na_2MoO_4 en 70 ml de agua. Una solución de 30 ml de casaminoácidos al 10% fue esterilizada por filtración (solución 4). Todas las soluciones fueron mezcladas cuidadosamente dejando al final la solución 1 (Alexander y Zuberer, 1991).

Detección de la naturaleza química de los sideróforos. 1×10^3 UFC de cada una de las cepas de *Burkholderia* fueron cultivadas en medio líquido Baz, a 28 °C durante tres días a 100 rpm; la biomasa celular fue centrifugada a 10 000 rpm por 10 min. La naturaleza química de los sideróforos producidos fue determinada en el sobrenadante mediante su análisis espectrofotométrico después de su reacción con FeCl_3 2% (Hidroxamatos y catecolatos) y CuSO_4 250 μM /buffer de acetato pH 4.0 (carboxilatos) (Baakza et al., 2003).

Tolerancia a plomo (Pb). La capacidad de tolerar gradientes de concentraciones de Pb por las cepas obtenidas fue evaluada utilizando $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. El medio de cultivo Baz fue utilizado (eliminando la fuente de fosfato, para evitar la precipitación de este metal pesado), adicionado con concentraciones de 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Pb. Las cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo descrito fueron inoculadas con 1×10^3 UFC de cada uno de las cepas de *Burkholderia* obtenidas, incubándolas a 28 ± 2 °C durante siete días. Después del periodo de incubación, el crecimiento celular de los aislados fue determinado (Massadeh et al., 2005).

Tolerancia a fenantreno. Las cepas de *Burkholderia* obtenidas fueron evaluadas para la capacidad de tolerar concentraciones incrementadas de fenantreno. Este ensayo fue desarrollado en el medio de cultivo Baz sin fuente de carbono, y adicionado con 100 μl de fenantreno a 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (disuelto en etanol absoluto). Posteriormente, 1×10^3 UFC de cada una de las cepas fueron inoculados, y las cajas de Petri fueron incubadas a 28 ± 2 °C por siete días, evaluando el crecimiento de éstos (Kim et al., 2003).

Análisis estadísticos

Todos los experimentos fueron replicados independientemente tres veces. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el método de Tukey–Kramer ($P = 0.05$), utilizando el software JMP-SAS v 8.0.2.

Resultados y discusión

Caracterización microbiológica y molecular de los aislados obtenidos

El presente trabajo se enfocó en el aislamiento de cepas del género *Burkholderia* asociadas al cultivo del mango en México, así como en el estudio de la diversidad genética y metabólica de éstas. El género *Burkholderia* es de gran importancia ecológica, ya que ha sido reportado como uno de los más diversos en términos metabólicos y funcionales, es decir, desde bacterias patógenas de plantas y humanos, cepas promotoras del crecimiento vegetal, hasta agentes de biorremediación promisorios (Mahenthiralingam et al., 2008; Onofre-Lemus et al., 2009).

La caracterización microbiológica y molecular de los microorganismos obtenidos en los sitios de estudio indicó la presencia de tres aislados pertenecientes al género *Burkholderia*. Los cuales fueron obtenidos sólo de las muestras de suelo, esto debido a la gran complejidad, riqueza en nutrientes y estrategias de protección que este sistema representa en relación a otros hábitats (i.e. hojas y frutos), permitiendo el exitoso establecimiento de microorganismos (Garbeva et al., 2008). La caracterización molecular de estos tres aislados, mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, mostró la presencia de dos especies *B. caribensis* y *B. cepacia*, específicamente *B. caribensis* XV, *B. caribensis* XVI y *B. cepacia* XXVI, los cuales fueron aislados de Chahuities, Oaxaca (*B. caribensis* XV) y Apatzingán, Michoacán (*B. caribensis* XVI y *B. cepacia* XXVI). La obtención de estos aislados del género *Burkholderia* en huertas de mango indica su asociación con este cultivo, siendo previamente reportado dicho aislamiento de hojas de mango maduras (Jager et al., 2001). Además, estudios filogenéticos de los aislados obtenidos mostró la formación de un grupo monofilético, el cual se divide en 2 clados soportados con valores de bootstrap de 97% (*B. caribensis*) y 86% (*B.*

cepacia) (Figura 1). Por otra parte, aislados pertenecientes a este género no fueron obtenidos de huertas de mango ubicadas en Tapachula, Chiapas, sin embargo, no existen evidencias en campo del potencial impacto del manejo agrícola sobre la presencia y/o aislamiento de cepas de *Burkholderia* en este sitio de estudio.

El aislamiento de *B. caribensis* XV, *B. caribensis* XVI y *B. cepacia* XXVI no mostró una fuerte correlación con las características fisicoquímicas y nutrimentales del suelo, ya que de acuerdo con de los Santos-Villalobos et al. (2013), los sitios de estudio presentaron diferencias significativas en relación a estas características, observando mayor contenido de materia orgánica (3.2%), nitrógeno (20.6%) y Capacidad de Intercambio catiónico (56.1 Meq 100g⁻¹) en Apatzingán vs. Tapachula y Chahuities.

Caracterización metabólica de las cepas obtenidas

En relación a la caracterización metabólica de las cepas de *Burkholderia* obtenidas se observaron diferencias significativas en los parámetros estudiados (Tabla 1). El ensayo de reducción de acetileno (ARA) fue positivo para las tres cepas, aunque en diferentes valores, indicando su potencial agronómico como fijador de nitrógeno atmosférico, permitiendo disminuir la dosis de aplicación de fertilizantes nitrogenados a los cultivos agrícolas; los valores cuantificados para estas cepas son

promisorios ya que se encuentran en el rango medio en comparación con los valores de ARA reportados para otras especies de *Burkholderia* (Xie et al., 2003; Onofre-Lemus et al., 2009). La producción de AIA (auxina) fue positiva sólo para la cepa *B. caribensis* XVI, aunque presentando valores bajos, $2 \pm 0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Hernández et al., 2004; Tsavkelova et al., 2005). Las auxinas son un grupo de compuestos involucrados en la regulación del desarrollo de las plantas, i.e. influyen en el crecimiento, la división celular y la formación de raíces (Gravel et al., 2007). De esta manera, el uso de microorganismos capaces de producir esta fitohormona en el sector agrícola es recurrente, principalmente aquellas cepas microbianas capaces de biosintetizar el ácido indol acético (auxina natural más importante), entre los géneros microbianos más importante por su producción de AIA destacan: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* (Loredo-Osti et al., 2004).

La actividad ACC desaminasa sólo fue observada en la cepa *B. caribensis* XV, presentando una actividad de 538.4 ± 9.0 nmoles de α -cetobutirato mg⁻¹ de proteína h⁻¹; este valor es superior a los reportados en otras especies de *Burkholderia* (Saravanakumar y Samiyappan, 2007; Shaharoon et al., 2006). Sin embargo, Penrose y Glick (2003) han reportado que una actividad de 20 nmoles de α -cetobutirato mg⁻¹ de proteína h⁻¹ es suficiente para

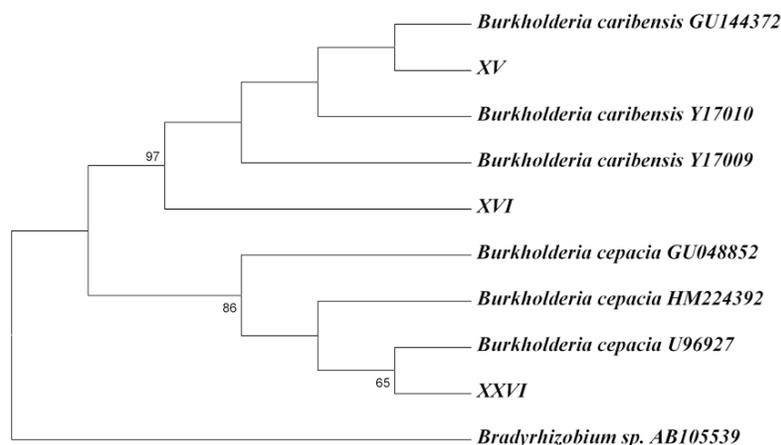


Figura 1. Árbol filogenético de los aislados de *Burkholderia*, generado mediante el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA, e inferido por el método de Neighbor-Joining utilizando MEGA 4.0. *Bradyrhizobium* sp. (No. de acceso AB105539) fue utilizado como grupo externo. Los números indican el porcentaje (> 50) de re-ensamble de bootstrap igual a 1000.

Tabla 1. Caracterización metabólica de las cepas obtenidas.

Parámetro	Cepa		
	XV	XVI	XXVI
Especie	<i>B. caribensis</i>	<i>B. caribensis</i>	<i>B. cepacia</i>
No. de acceso	HM582869	HM582870	HM582873
ARA ^a	60.3 ± 0.2	27.9 ± 10.5	37.1 ± 6.6
Producción de AIA ^b	0	2.0 ± 0.2	0
Actividad ACC Desaminasa ^c	538.4 ± 9.0	0	0
Producción de sideróforo (diámetro)	+ (1 cm)	+ (1 cm)	+ (3 cm)
Tipo de sideróforo	Carboxilato	Carboxilato	Hidroxamato
Inhibición de <i>C. gloeosporioides</i>	(-)	(-)	(+)
Tolerancia a fenantreno ^d			
0	++	++	++
50	++	++	++
100	++	++	++
250	+	+	++
500	+	+	++
Tolerancia a Pb ^e			
0	++	++	++
50	++	++	++
100	++	++	++
250	-	-	-
500	-	-	-

^aActividad de reducción de acetileno (nmoles de etileno ml⁻¹ de medio h⁻¹); ^bÁcido Indol Acético (µg ml⁻¹); ^cActividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (nmoles de α-cetobutirato mg⁻¹ de proteína h⁻¹); ^dfenantreno (µg ml⁻¹); ^ePlomo (µg ml⁻¹); (+) Positivo; (-) Negativo; ++ Crecimiento; + Crecimiento moderado; - No crecimiento.

causar promoción de crecimiento vegetal, ya que en estos rangos de actividad enzimática, la producción de ACC por la planta es el factor limitante. Así, utilizando este mecanismo, los microorganismos son capaces de promover el crecimiento vegetal a través de la disminución de los niveles de etileno en las plantas (raíz), desaminando el precursor inmediato del etileno, el ACC, lo cual conduce a la producción de insumos para la especie vegetal, tales como: NH₄⁺ y α-cetobutirato (Glick *et al.*, 1998). La producción de sideróforo fue positiva para las tres cepas, se observaron diferencias en el nivel de producción y en su clase, ya que las cepas *B. Caribensis* XV y *B. Caribensis* XVI mostraron la capacidad de producir sideróforos de tipo carboxilato (1 cm de diámetro), mientras que el aislado *B. cepacia* XXVI el tipo hidroxamato (3 cm de diámetro). Sin embargo, únicamente la cepa XXVI mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 (agente causal de la antracnosis), sugiriendo que el desarrollo de este hongo patógeno es altamente dependiente de hierro, así un ambiente limitado de este elemento (*i.e.* acción del sideróforo) resultará en su inhibición (Santoyo *et al.* 2010). Además, la producción de sideróforo en estas cepas puede estar involucrada en la captura de otros metales de baja disponibilidad necesarios para su metabolismo, por ejemplo, molibdeno y vanadio, cofactores para la

enzima nitrogenasa involucrada en la fijación biológica de nitrógeno (Rosconi *et al.*, 2006; Wichard *et al.*, 2009), contrastando con la actividad ARA de los microorganismos en estudio.

La evaluación de la capacidad de las cepas obtenidas de crecer en gradientes de concentración de Pb y fenantreno, resultó en evidenciar la tolerancia de éstas a dichos compuestos, hasta 100 µg ml⁻¹ (concentración mínima inhibitoria) y 500 µg ml⁻¹ (concentración máxima evaluada), respectivamente. Probablemente, la producción de sideróforo por estas cepas tiene un papel determinante en la tolerancia a Pb, ya que puede quelar este elemento con valencia Pb⁺² (Naik y Duvey, 2011; Rajkumar *et al.*, 2010). Esta caracterización es de importancia ya que metales pesados como Pb, As, y Cd ingresan constantemente a los suelos por medio de diversas actividades agrícolas e industriales (Khan, 2005). Por otra parte, la tolerancia a fenantreno amplía el potencial uso biotecnológico de estas cepas en los graves problemas de contaminación ambiental causada por la extracción de petróleo, el cual contamina el aire, agua y suelo, inclusive en el sector agrícola. El valor observado para nuestras cepas se encuentra en el rango de aquellos microorganismos reportados como altamente tolerante a fenantreno (Liu *et al.*, 2014), sugiriendo su aplicación de manera individual o en co-

interacción con plantas para generar sistemas de fito-remediación sostenible.

Conclusiones

El género *Burkholderia* se encuentra asociado a la rizósfera del árbol de mango, donde el manejo agronómico de las huertas no mostró un efecto significativo sobre la población o diversidad genética y funcional de este género.

Las cepas de *Burkholderia* obtenidas mostraron gran diversidad metabólica, la cual puede ser utilizada en la producción sostenible de alimentos y/o en la remediación de sitios contaminados, disminuyendo los costos económicos y ambientales por las actividades agrícolas e industriales actuales.

Bibliografía

- Akar, T., Tunali, S., y Kiran, I., 2005. Botrytis cinerea as a new fungal biosorbent for removal of Pb (II) from aqueous solutions. *Biochemical Engineering Journal*, 25:227–235.
- Alexander, B. y Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12: 39-45.
- Avilán, L. y Rengifo, C., 1992. El cultivo del manguero en Venezuela III Fertilización. FONAIAP Divulga, 40: 1-5.
- Ayala-Garay, A.V., Almaguer-Vargas, G., de la Trinidad-Pérez, N.K., Caamal-Cauich, I. y Rendón, R., 2009. Competitividad de la producción de mango (*Mangifera indica* L.) en Michoacán. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15: 133-140.
- Baakza, A., Vala, A.K. Dave, B.P. y Dube, H.C., 2003. A Comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311: 1-9.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cavalcante, V.A. y Dobereiner, J., 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108: 23-31.
- Compant S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. y Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951-4959.
- de Jager, E.S., Wehner, F.C., y Korsten, L., 2001. Microbial ecology of the mango phylloplane. *Microbial Ecology*, 42: 210-207.
- de los Santos-Villalobos, S., de-Folter, S., Déllano-Frier, J.P., Gómez-Lim, M.A., Guzmán-Ortiz, D. A., y Peña-Cabriales, J.J., 2013. Growth promotion and flowering induction in mango by *Burkholderia* and *Rhizobium* inoculation: morphometric, biochemical and molecular events. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 615-627.
- Emmert, E.A.B. y Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171: 1-9.
- Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R. y Caballero-Mellado, J., 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2790-2798.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., y van Elsas, J.D., 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil*, 302:19–32.
- Glick B.R., Penrose, D.M., y Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal Theoretical Biology*, 190:63-68.
- Glickmann, E. y Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 793–796.
- Gravel, V., Antoun, H., y Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39:1968–1977.
- Hernández, A., River, N., Caballero, A., Hernández A.N. y Heydrich M., 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1: 6-13.
- Hontzeas, N., Hontzeas, C.E. y Glick. B.R., 2006. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*, 24: 420–426.
- Jain, S.M. y Priyadarshan, P.M., 2009. *Breeding plantation tree crops: tropical species*. Springer Science Business Media, LLC. New York, EUA.
- Jing, Y., He, Z., y Yang, X., 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8:192–207.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., y Kecskés, M.L., 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1229-1244.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine Biology*, 18:355-364.
- Kim, T.J., Lee, E.Y., Kim, Y.J., Cho, K.S. y Ryu, H.W., 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 411–417
- Kuo, K.C., 2001. Sensitivity of mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, to the fungicide prochloraz in Taiwan. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B*, 25: 174-179.
- Lasat, H.A., 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31(1):109–120.
- Liu, J., Liu, S., Sun, K., Sheng, Y., Gu, Y., y Gao, Y. 2014. Colonization on Root Surface by a Phenanthrene-Degrading Endophytic Bacterium and Its Application for Reducing Plant Phenanthrene Contamination. *PLoS ONE*, 9(9): e108249.
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., y Espinosa-Victoria, D., 2004.

- Plant growth-promoting bacteria in association with graminaceous species: A review. *Terra Latinoamericana*, 22: 225-239.
- Mahenthalingam, E., Baldwin, A. y Dowson, C.G., 2008. Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1539-1551.
- Massadeh, A.M., Al-Momani, F.A. y Haddad, H.I., 2005. Removal of lead and cadmium by halophilic bacteria isolated from the dead sea shore, Jordan. *Biological Trace Element Research*, 108: 259-269.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant Soil*, 232: 207-214.
- Naik, M.M., y Dubey, S.K., 2011. Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. *Current Microbiology*, 1: 1-6.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., y Caballero-Mellado, J., 2009. ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *American Society for Microbiology*, 75: 6581-6590.
- Penrose, D.M. y Glick, B.R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118: 10-15.
- Ploetz, R.C. y Prakas, O., 1997. Foliar, floral and soil-borne diseases. En: R.E. Litz (eds). *The mango: Botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 281-325.
- Prieto, M.J., Covarrubias, A.E., Cadena, A.R., Figueroa, V. J. y Munro, O.D., 2005. Paquete tecnológico para el cultivo de Mango en el estado de Colima. Gobierno del Estado de Colima.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V. y Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3):142-149.
- Rondón, O., Sanabrá de Albarracín, N. y Rondón A., 2006. Respuesta in vitro a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agronomía Tropical*, 56: 219-235.
- Rosconi, F., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Platero, R.A., González, C., González, M., Batista, S., Gill, P.R. y Fabiano, E.R., 2006. Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of nifH and nifA genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiology Letter*, 258: 214-219.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación., 2014.
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M.C., Peña-Cabriales, J.J., y Farías-Rodríguez, R., 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagonista de *Pseudomonas fluorescens* zum80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, 28:53-60.
- Saravanakumar, D. y Samiyappan, R., 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1283-1292.
- Schmidt, S., Blom, J.F., Pernthaler, J., Berg, G., Baldwin, A., Mahenthalingam, E. y Eberl L., 2009. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the Burkholderia cepacia complex. *Environmental Microbiology*, 11: 1422-1437
- Senen-Barcos, M., Peña-Cabriales, J.J., Alarcón, A. y Maldonado Vega, M., 2015. Enhanced Pb Absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. Plants Inoculated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungi Consortium. *International Journal of Phytoremediation*, 17: 405-413.
- Shaharoon, B., Bibi, R., Arshad, M., Ahmed, Z., y Hassan., Z.U., 2006. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (acc)-deaminase rhizobacteria attenuates acc-induced classical triple response in etiolated pea seedlings. *Pakistan Journal of Botany*, 38(5):1491-1499.
- Shommu, N.S., Vogel, H.J., y Storey, D.G., 2015. Potential of metabolomics to reveal Burkholderia cepacia complex pathogenesis and antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6:668.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera., 2014.
- SMN, Servicio Meteorológico Nacional., 2014.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- Tsavkelova, E.A., Cherdynseva, T.A. y Netrusov, A.I., 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74: 46-53.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. y Chet, I., 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiology Letter*, 305(1):42-48.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *American Society for Microbiology*, 173: 697-703.
- Wichard, T., Philippebellenger, J., Morel, F.M. y Kraepiel, A.L., 2009. Role of the siderophore azotobactin in the bacterial acquisition of nitrogenase metal cofactors. *Environmental Science Technology*, 43: 7218-7224.
- Wu, C.H., Bernard, S.M., Andersen, G.L. y Chen, W., 2009. Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial biotechnology*, 2: 428-440
- Xie, G.H., Cai, M.Y., Tao, G.C. y Steinberg, Y., 2003. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. *Biology and Fertility of Soils*, 37: 29-38.
- Yedidia, I., Benhamou, N. y Chet, I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 1061-1070.