

INMOVILIZACIÓN DE *AZOTOBACTER VINELANDII* COMO INÓCULO EN PLÁNTULAS DE TOMATE

Victoria Conde-Avila¹, Luis Daniel Ortega Martínez¹, Martha Elba Sánchez Rodríguez¹, Octavio Loera², Elie Girgis el Kassiss¹, Beatriz Pérez Armendáriz¹

¹Facultad de Biotecnología, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, México. 13 Poniente No. 1927 Col. Barrio de Santiago, C.P.72410, Puebla, Pue. México. ²Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc. 09340 Ciudad de México, CDMX. beatriz.perez@upaep.mx

Palabras clave: alginato, *Azotobacter*, *Lycopersicum*

Introducción. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria que destaca por su eficiencia en la fijación de N y producción de sustancias promotoras de crecimiento (1). Pese a sus efectos positivos, su bioaugmentación en suelo puede presentar dificultades relacionadas con su sobrevivencia y efectividad a largo plazo. Ante ello, la inmovilización celular es una técnica promisoría para favorecer el establecimiento y colonización de bacterias benéficas, ya que brinda a los microorganismos mayor viabilidad, tolerancia y protección a factores externos (2). Algunos autores han sugerido un aumento en el endofitismo y tolerancia a contaminantes (3). Sin embargo, son escasas las investigaciones sobre el uso de esta tecnología para aplicaciones *in situ*. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *A. vinelandii* como inóculo libre e inmovilizado y su efecto en la promoción del crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L).

Metodología. La cepa *A. vinelandii* CDBB-1952 fue cultivada en medio NBRC para su propagación e incubada a 28° C por 48h a 120 rpm. La encapsulación se llevó a cabo empleando Na-alginato al 2% (2) (Fig.1). Los inóculos se prepararon en solución líquida y por encapsulación con 1.61×10^9 UFC/mL. Se aplicaron 2 mL de inóculo por plántula con diez repeticiones por tratamiento y se estimó el porcentaje de germinación. La extracción de ADN se realizó a 7d de la inoculación empleando el kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymoresearch) de acuerdo con el fabricante. Para la amplificación por PCR uso una mezcla de reacción que contenía 12.5 µL de la mezcla de polimerasa (MasterMix), 2.5 µL de la mezcla de los cebadores directo y reverso (10µM) (4), 1 µL de ADN genómico extraído de muestras de suelo o raíz y 9 µL de agua MiliQ. El producto de PCR amplificado se analizó por similitud de las curvas de disociación (datos no mostrados) y cuantificó por espectrofotometría en un equipo NanoDrop. Finalmente se determinó el crecimiento de las plántulas midiendo la altura (cm) con vernier digital a 30d de la inoculación. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA y una prueba de Tukey con el programa GraphPad Prism 8.



Fig. 1. Representación de la encapsulación e inoculación de *A. vinelandii* modif. (3).

Resultados. Se detectó y cuantificó el ADN de *A. vinelandii* en muestras de suelo y de raíz inoculadas en forma líquida e inmovilizada, no obstante, en las muestras de suelo fue mayor al emplear el inóculo líquido, mientras en las raíces no hubo diferencias en la cuantificación (Tabla 1). Por otro lado, el porcentaje de germinación incrementó al usar el inóculo inmovilizado. La altura de las plántulas fue mayor al inocular la bacteria con respecto al testigo (Tabla 2).

Tabla 1. Cuantificación de ADN de *A. vinelandii* en raíces y suelo inoculado en forma líquida e inmovilizado en perlas de Ca-alginato.

Extracción	ADN (NG/µl)			p
	Testigo sin inóculo	Inóculo líquido	Inóculo perlas	
raíz	-	54.7^a (11.9)	47.9^a (5.6)	0.37
suelo	-	45.4^a (6.7)	23.6^b (4.7)	0.05

Se presenta la media de cuatro repeticiones independientes seleccionadas aleatoriamente. Las medias con la misma letra entre columnas de una misma fila no presentan diferencias estadísticas.

Tabla 2. Porcentaje de germinación y altura de plántulas de tomate inoculadas con *A. vinelandii*

Variable	Testigo sin inóculo	Inóculo líquido	Inóculo perlas
altura (cm)	19.87^b (1.16)	27.00^a (3.09)	26.67^a (3.45)
germinación (%)	70^c	80^b	90^a

Se presenta la media en negritas y entre paréntesis la desviación estándar de seis repeticiones independientes seleccionadas aleatoriamente. Las medias con la misma letra en la misma fila no presentan diferencias estadísticas.

Conclusiones.

La inmovilización de *A. vinelandii* con perlas Na-alginato restringe su distribución en el suelo pero no limita su ingreso a las raíces de la plántula.

La inoculación con *A. vinelandii* en forma libre e inmovilizada favorece el crecimiento de plántulas de tomate.

Bibliografía.

- Gurikar C, Naik MK & Sreenivasa MY (2016) *Azotobacter*. PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation. En: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Singh D, Singh H & Prabha R. (eds), Springer, New Delhi. pp. 229-244.
- Yañez-Ocampo *et al.* (2009) *J Hazard Mater.* 168: 1554-1561.
- Krell *et al.* (2018) *Biol Control.* 116: 62-73.
- Ehaliotis C *et al.* (1999) *FEMS Immunol Med Microbiol.* 30(4): 301-311.