

BACTERIAS ENDOFÍTICAS DE *ELODEA POTAMOGETON* (“LLACHU”) DEL LAGO TITICACA

ENDOPHYTIC BACTERIA OF *ELODEA POTAMOGETON* (“LLACHU”) FROM TITICACA LAKE

Pedro Ubaldo Coila Añasco¹, Julio César Bernabé Ortiz², Domingo Alberto Ruelas¹

(1) Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Perú.
(2) Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa - Perú

RESUMEN: El “llachu” (*Elodea potamogeton*) es una planta acuática del Lago Titicaca, alimento para el ganado vacuno del anillo circunlacustre. Algunas zonas del lago se han eutrofizado por la polución; aun así, la planta crece. Siendo uno de los mecanismos de sobrevivencia, la interacción simbiótica con microorganismos, el objetivo del estudio fue aislar y caracterizar molecularmente algunas bacterias endofíticas de la planta. Para el aislamiento, las muestras fueron lavadas y desinfectadas con alcohol 70%, hipoclorito de sodio 0,5% y Tween 80%; luego, se homogenizó y una alícuota sembrada en medio Luria-Bertani (LB), se eligieron tres cepas para su resembrado en agar LB sólido. De las cepas puras, se extrajo DNA con la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, cuantificándose por espectrofotometría. Se amplificó el gen 16S rDNA por PCR; los amplicones se remitieron a la Functional Biosciences Inc. de Estados Unidos para su secuenciamiento. Las secuencias se editaron con BioEdit 7.0.0 y se eligieron secuencias similares con BLASTn del GenBank, para realizar el alineamiento múltiple de secuencias con Clustal W. Para determinar las relaciones evolutivas se utilizó el MEGA7 construyéndose árboles filogenéticos por el método de Neighbor-Joining. El análisis molecular demuestra que la cepa Sample10ped corresponde a *Pantoea* sp. con una identidad superior al 76%; la cepa Sample11pe a *Pseudomonas* sp. con un 100% de identidad; y, a la cepa Sample12ped a *Raoultella terrigena* sp. o *Klebsiella* sp. con una identidad de 99%. Las secuencias de las dos últimas, fueron registradas en el GenBank, cuyas accesiones son SUB4288247 y SUB4252655.

Palabras clave: Bacteria endofítica, *Elodea potamogeton*, gen 16S rDNA, filogenia.

ABSTRACT: The “llachu” (*Elodea potamogeton*) is an aquatic plant from Lake Titicaca, food for the cattle of the circumlacustrine ring. Some areas of the lake have been eutrophied by pollution; even so, the plant grows. Being one of the survival mechanisms, the symbiotic interaction with microorganisms, the objective of the study was to isolate and molecularly characterize some endophytic bacteria of the plant. For isolation, the samples were washed and disinfected with 70% alcohol, 0.5% sodium hypochlorite and 80% Tween; then, it was homogenized and an aliquot seeded in Luria-Bertani (LB) medium, three strains were chosen to be reseeded on solid LB agar. From the pure strains, DNA was extracted with the phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture, quantifying by spectrophotometry. The 16S rDNA gene was amplified by PCR; amplicons were submitted to Functional Biosciences Inc. in the United States for sequencing. The sequences were edited with BioEdit 7.0.0 and similar sequences were chosen with BLASTn from GenBank, to perform multiple alignment of sequences with Clustal W. To determine evolutionary relationships, MEGA7 was used, constructing phylogenetic trees by the Neighbor-Joining method. Molecular analysis shows that the Sample10ped strain corresponds to *Pantoea* sp. with an identity greater than 76%; the Sample11pe strain to *Pseudomonas* sp. with 100% identity; and, to the strain Sample12ped to *Raoultella terrigena* sp. or *Klebsiella* sp. with an identity of 99%. The sequences of the last two were registered in GenBank, whose accessions are SUB4288247 and SUB4252655.

Keywords: Endophytic bacteria, *Elodea potamogeton*, 16S rDNA gene, phylogeny.

1. INTRODUCCIÓN

A casi 4 000 m de altitud, el Lago Titicaca cumple un rol importante en la vida del poblador altoandino, tanto ecológica como económicamente.

Sin embargo, en los últimos tiempos, viene sufriendo un acelerado proceso de contaminación y de eutrofización, por un mal manejo de las aguas residuales y de residuos sólidos de las ciudades y pueblos aledaños. Al evaluar la calidad del agua de la bahía interior de la ciudad de Puno, se concluyó que es una zona crítica en contaminación, alcanzándose niveles hipereutróficos (1); pero, a pesar de estas condiciones, muchas plantas sobreviven en ese ambiente, siendo una de ellas el “llachu”

(*Elodea potamogeton*) una macrófita que sirve de alimento para el ganado vacuno que se cría en todo el anillo circunlacustre.

Es probable, que alguna asociación simbiótica entre la planta y microorganismos rizosféricos y endofíticos cumplan un rol importante en la vida de estas especies. Los endofíticos son microorganismos que colonizan la planta, sin causar ningún signo o enfermedad aparente (2). Existen muchos estudios que demuestran las interacciones simbióticas de las bacterias endofíticas con las plantas. Algunas bacterias endofíticas promueven el crecimiento y proporcionan tolerancia al estrés ambiental (3)(2); otras actúan como agentes de control biológico para los fitopatógenos a través de sus metabolitos secundarios, otras interactúan con los patógenos y aumentan la resistencia de las plantas a las enfermedades mediante la producción de agentes antifúngicos, antibacterianos, sideróforos o confiriendo inmunidad (3),

Correspondencia:
Pedro Ubaldo Coila Añasco
Email: pcoila@unap.edu.pe

mientras que otras aumentan la capacidad de fijación de nitrógeno y aceleran la germinación de semillas y el crecimiento de plantas.

En la actualidad, existe un interés por caracterizar las bacterias endofíticas de diversas especies vegetales con fines biotecnológicos; especialmente, en la biorremediación, en la biofertilización y en el control biológico de los agentes patógenos de las plantas, ya que el uso de fertilizantes químicos, pesticidas y otros, tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente y la salud humana y animal. En ese contexto, el presente estudio se diseñó con el objetivo de aislar y caracterizar molecularmente a través de la amplificación y análisis del gen 16S rDNA. algunas bacterias endofíticas de la macrófita *Elodea potamogeton* ("Ilachu") que desarrolla en aguas de la bahía interior del Lago Titicaca, Puno, Perú.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento, purificación y conservación de las bacterias endofíticas

Las muestras se sometieron a un proceso de desinfección y esterilización superficial, siguiendo el protocolo de Sakiyama (4). Para el aislamiento de las bacterias endofíticas se empleó el método de Vincent (5), el cual consta de un proceso de homogenización en NaCl 0,9%, centrifugación y siembra de una alícuota del sobrenadante en medio LB (Luria-Bertani), para finalmente seleccionar las colonias y cultivarlas en placa con medio LB sólido a 37°C por 24 horas. Los cultivos puros obtenidos se conservaron en viales con glicerol 15%, los que fueron congelados primero a -20°C y luego a -70°C.

Extracción de DNA

La extracción de DNA de los cultivos puros se realizó mediante la técnica descrita por Sambrook(6), mediante la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mientras que la precipitación y purificación con alcohol isopropílico y etanol al 75% en frío. La cuantificación de DNA se realizó por espectrofotometría ultravioleta (UV) a 260 nm de longitud de onda. La integridad del DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la visualización en cámara ultravioleta previo tinte de etidio con bromuro de etidio.

Amplificación del gen 16S rDNA por PCR

Para la amplificación del gen 16S rDNA por PCR se utilizó primers universales. Las reacciones fueron realizadas en una mezcla que contenía: 2 µL de muestra (DNA), 2 µL de primers y 29 µL del master mix conteniendo la *Taq* polimerasa, MgCl₂ y los dNTPs en buffer. Se utilizó el termociclador GeneAMP PCR System bajo las siguientes condiciones de reacción: 1) desnaturalización inicial y activación de la polimerasa a 95°C/5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94°C/1 min), anillamiento (60°C/1 min) y extensión (72°C/2 min); y, una extensión final a 72°C/5 min. Los amplicones se purificaron con reactivos Qiagen System® y verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. La visualización se hizo en transiluminador UV previo tinte con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

Secuenciación y análisis bioinformático

Los amplicones del gen 16S rDNA fueron secuenciados por el método de Sanger en una plataforma Big Dye V3.1 en instrumentos ABI 3730xl. Con el BLASTn se buscaron secuencias similares en el GenBank para luego realizar el alineamiento múltiple de secuencias entre las secuencias que presentaron los más altos porcentajes de homología con Clustal W. Finalmente, se construyeron los árboles filogenéticos con MEGA7 (7), con el método de Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se eligieron tres cultivos puros de bacterias endofíticas, a las cuales se les denominó cepa 1 (**Sample10ped 16sf**), cepa 2 (**Sample11ped 16sf**) y cepa 3 (**Sample13ped 16sf**), nombres con los cuales fueron enviados a secuenciar. Las secuencias obtenidas del gen 16S rDNA para cada una de las cepas tuvieron una longitud de 1057, 1112 y 1115 nucleótidos, para las cepas 1, 2 y 3, respectivamente.

Cepa 1 (Sample10ped 16sf)

Al compararse la secuencia del gen 16S rDNA de esta cepa Sample10 con la base de datos del GenBank, se encontraron siete coincidencias cuyos porcentajes de similitud oscilan entre 76 y 80% con bacterias del género *Pantoea* sp, lo cual indicaría que la bacteria endofítica *Sample10ped 16sf* podría ser una especie de este género. Según la matriz de distancia genética entre las accesiones, la especie más relacionada es con la accesión KF202812.1 *Pantoea* sp., con la cual tiene una divergencia de 0.

La Figura 1, muestra el árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa Sample10ped 16sf con las siete bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank.

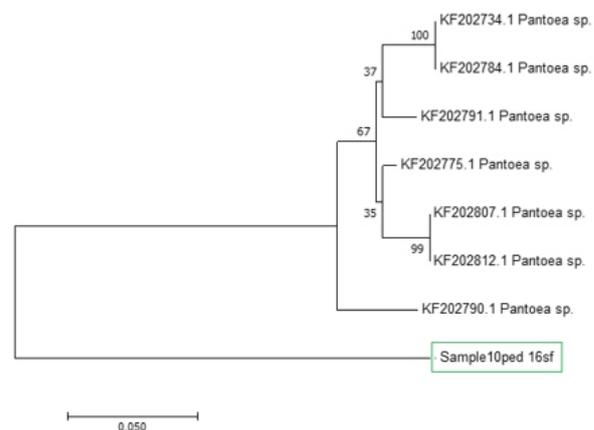


Fig. 1 Árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa *Sample10ped 16sf* y de siete bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank usando el método Neighbor-Joining

En este árbol se puede observar que la cepa de estudio se encuentra en una rama distinta, lo que demuestra una elevada variabilidad existente entre las cepas, indicando que se trataría de una nueva especie. Li et al. (2008) , indican que las bacterias endofíticas *Pantoea* sp., son solubilizadoras de fosfatos incrementando la capacidad de las plantas de absorber el fósforo del agua. Como se sabe, la mayor de fósforo se encuentra formando compuestos insolubles, poco o nada utilizables o disponibles para las plantas, pero algunas especies bacterianas como *Pantoea* sp., tienen la capacidad de solubilizar estos compuestos insolubles de fosfatos inorgánicos como el tricálcico y el dicálcico, la hidroxiapatita y las rocas fosfatadas en fósforo útil.

Lara-Cortés et al. (2019), también aislaron *Pantoea vagans* de flores de *dalia* con fines de florifagia e indican que las bacterias *Pantoea* son bacterias que se pueden encontrar en el suelo, agua y plantas, así como formando parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales y del hombre; y, que potencialmente son patógenas pudiendo ocasionar enfermedades gastrointestinales.

Cepa 2 (Sample11ped 16sf)

Las secuencias que producen alineaciones significativas con la cepa Sample11ped del GenBank (100% de identidad) corresponden a las del género *Pseudomonas* sp. por lo que se infiere que la bacteria endofítica aislada en el presente estudio pertenece a este género. Según la matriz de distancias genéticas, la cepa en estudio tiene una divergencia de 0 con las especies *P. syringae*, *P. Coronafaciens* y *Pseudomonas* sp.

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (AMS) y la reconstrucción filogenética con las 12 secuencias obtenidas en la base de datos (Figura 2).

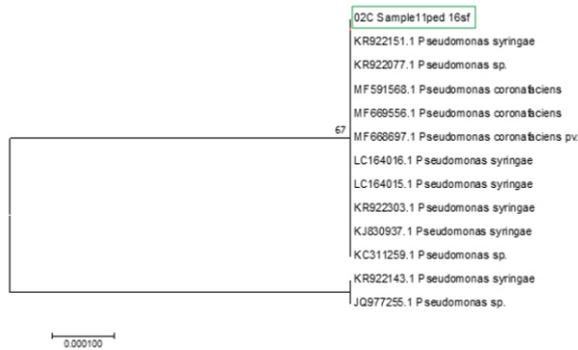


Fig. 2 *Árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa Sample11ped 16sf con las 12 bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank usando el método Neighbor-Joining*

Como se aprecia la bacteria endofítica aislada en el presente estudio (sample 11ped 16sf) quedó agrupada en una de las dos ramas generadas en el árbol filogenético. La bacteria podría corresponder a las especies *P. syringae* o *P. coronafaciens*, ya que con estas especies muestra un 100% de homología.

La mayor parte de estudios indican que las *Pseudomonas* son bacterias que habitan en el suelo y aguas estancadas y que pueden penetrar a las plantas por los estomas, heridas y otras aberturas produciendo enfermedades (10). Sin embargo, el reciente estudio de Devi et al. (2017), ha permitido identificar una bacteria endofítica promotora de crecimiento de la planta *Achyranthes aspera* L., designado como AL2-14B, el cual basados en sus características fenotípicas y fisiológicas y análisis de la secuencia del gen 16S rDNA fue identificado como *Pseudomonas aeruginosa*; este es el primer estudio en donde se indica que la especie *Pseudomonas* es una bacteria endofítica. El mismo autor, señala que la bacteria *P. aeruginosa* AL2-14B produce una buena cantidad del sideróforo (IAA, ácido indol acético) y solubiliza fosfatos inorgánicos lo que promueve el crecimiento y las propiedades antioxidantes de la planta hospedera. Por lo tanto, la cepa aislada podría ser utilizado como biofertilizante y, por su actividad antioxidante, tiene la ventaja adicional de ser utilizado como una planta medicinal, lo cual también podría inferirse a la planta *Elodea potamogeton* explorada en el presente estudio; es decir, podría ser utilizado como biofertilizante y antioxidante.

Otros estudios han demostrado que las especies de *Pseudomonas* son utilizadas para degradar detergentes en ecosistemas acuáticos, que son un problema amenazante para la flora y microbiota acuática.

Es el caso del estudio de Guevara et al. (2013), quienes utilizaron a las bacterias propias de aguas residuales para biodegradar detergentes, encontrándose que las *Pseudomonas* son las que tienen la capacidad más alta de utilizar los detergentes.

La cepa en estudio fue registrada en el GenBank bajo la accesión N°SUB4288247 (cultured Prokaryotic 16S rRNA / Sample11ped).

Cepa 3 (Sample12ped 16sf)

Al realizar la búsqueda de secuencias que producen alineaciones significativas en el GenBank, la cepa en estudio podría pertenecer a los géneros *Raoultella terrigena* sp. o *Klebsiella* sp., por los altos porcentajes de identidad con estas especies (99%) y un E-valor. La matriz de distancias genéticas muestra que la cepa aislada tiene una divergencia entre 0.01 y 0.03 con las especies indicadas.

Al realizar el alineamiento múltiple de secuencias (AMS) y con las doce primeras secuencias del GenBank se construyó el árbol filogenético mostrado en la Figura 3.

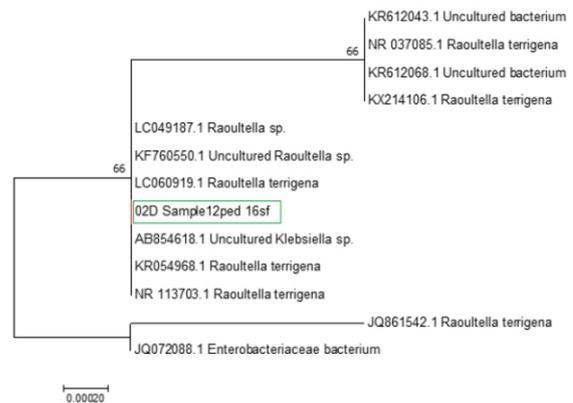


Fig. 3 *Árbol filogenético del gen 16S rDNA de la cepa Sample12ped 16sf y de bacterias relacionadas de la base de datos del GenBank usando el método Neighbor-Joining*

Brisse et al. (2006), indican que las *Klebsiella spp.* se han recuperados de ambientes acuáticos contaminados y que reciben residuos industriales y otros productos; además, señalan que son encontrados en una variedad de fuentes ambientales como suelo y plantas contribuyendo en los procesos bioquímicos y geoquímicos. Arenas et al. (2009), indican que las bacterias del género *Klebsiella* son organismos saprófitos, que crecen en zonas contaminadas con herbicidas, sugiriendo que podrían tener una relación simbiótica y benigna con su hospedero. Por lo tanto, la bacteria endofítica aislada en el presente trabajo, estaría cumpliendo un rol protector en la planta que crece en aguas muy contaminadas, tal como lo es el "llachu".

Schicklberger et al. (2015) aislaron la cepa R1Gly de *Raoultella* en medio libre de nitrógeno y utilizando glicerol como única fuente de carbono, encontrando que, además de los genes para la fijación biológica de nitrógeno, la cepa aislada contenía todos los genes necesarios para la producción de sustancias promotoras del crecimiento de la planta: ácido indol-acético, 2,3-butanodiol, entre otros.

Por otra parte, Luo et al. (2016) indican que las bacterias fijadoras de N₂ que pertenecen al género *Raoultella* de la familia *Enterobacteriaceae* están ampliamente asociadas con las plantas. Estos autores aislaron la cepa L03 de *Raoultella* sp. de las raíces de caña de azúcar y determinaron la fijación de nitrógeno atmosférico. Los resultados que encontraron fueron un incremento de la biomasa de la planta, del nitrógeno total y de la clorofila, además de aliviar los signos de deficiencia de nitrógeno de las plantas en condiciones de limitación de este elemento. Este estudio, demostró por primera vez que una bacteria *Raoultella* es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico en asociación con la planta hospedera, hecho que también estaría ocurriendo en la *Elodea potamogeton*.

La cepa en estudio fue registrada en el GenBank bajo la accesión N°SUB4252655 (cultured Prokaryotic 16S rRNA).

4. CONCLUSIONES

De la planta acuática *Elodea potamogeton* ("llachu") proveniente de aguas eutrofizadas de la Bahía Interior de Lago Titicaca se lograron aislar tres bacterias endofíticas, cuyo análisis molecular a través del secuenciamiento del gen 16S rDNA, indican que pertenecen a los siguientes géneros: *cepa 1 (Sample10ped 16sf) a Pantoea sp.*; *cepa 2 (Sample11ped 16sf) a Pseudomonas sp.* y *cepa 3 (Sample12ped 16sf) a Raoultella terrigena sp. o Klebsiella sp.* Se registraron las secuencias de las cepas 11 y 12 en el GenBank del NCBI cuyas accesiones son SUB4288247 y SUB4252655, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio "ADN Uchumayo" de Arequipa, por habernos brindado sus instalaciones y equipos para la extracción de ADN y amplificación del gen 16S rDNA por PCR,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Beltrán DF, Palomino RP, Moreno EG, Peralta CG, Montesinos-Tubée DB. Calidad de agua de la bahía interior de Puno, lago Titicaca durante el verano del 2011. Rev Peru Biol [Internet]. 2015;22(3):335–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v22i3.11440> <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>
- [2] Nair DN, Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. Sci World J. 2014;2014(March).
- [3] Alvarado-Marchena L, Schmidt-Durán A, Alvarado-Ulloa C, Chacón-Cerdas R, Flores-Mora D. Molecular characterization of the endophytic bacteria found in the fig crops (*Ficus carica* var. Brown Turkey) in Costa Rica. ARPN J Agric Biol Sci. 2016;11(7):290–7.
- [4] Sakiyama CCH, Paula EM, Pereira PC, Borges AC, Silva DO. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. Lett Appl Microbiol. 2001;33(2):117–21.
- [5] Vincent JM. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria [Internet]. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Wiley; 1970 [cited 2020 May 23]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.19720120524>
- [6] Sambrook J, Russell DW. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. Cold Spring Harb Protoc. 2006 Jun;2006(1):pdb.prot4455.

- [7] Kumar S, Secher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets Sudhir. Mol Biol Evol. 2016;33(7):1870–1874.
- [8] Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. Soil Biol Biochem. 2008;40(1):238–46.
- [9] Lara-Cortés E, Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Hernández-Zárate G, León-Rodríguez R. Detección e identificación molecular de *Pantoea vagans* en flores de *Dahlia* sp. TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas. 2019;22:1–8.
- [10] Montero MM. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos [Internet]. Universitat Autònoma de Barcelona; 2012. Available from: <http://hdl.handle.net/10803/107902>
- [11] Devi KA, Pandey G, Rawat AKS, Sharma GD, Pandey P. The endophytic symbiont-*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. Front Microbiol. 2017;8(SEP):1–14.
- [12] Guevara J, Castañeda I, Juárez J, Mendoza A. Efecto de la temperatura y del pH sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04 en solución mínima de sales con detergente Ace. Rev Rebiol [Internet]. 2013;33(1):1–8. Available from: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/167/174>
- [13] Brisse S, Grimont F, Grimont P. The genus *Klebsiella*. In: The Prokaryotes. 2006. p. 159–96.
- [14] Arenas NE, Gutiérrez AJ, Salazar LM, Polanco JC, Gómez A. Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. Rev Ciencias la Salud. 2009;7(2):22–9.
- [15] Schicklberger M, Shapiro N, Loqué D, Woyke T, Chakraborty R. Draft genome sequence of *Raoultella terrigena* R1Gly, a diazotrophic endophyte. Genome Announc. 2015;3(3):1–2.
- [16] Luo T, Ou-Yang XQ, Yang LT, Li YR, Song XP, Zhang GM, et al. *Raoultella* sp. strain L03 fixes N₂ in association with micropropagated sugarcane plants. J Basic Microbiol. 2016;(56):1–7.

Recibido el 30 de octubre del 2020 y aceptado para su publicación el 20 de diciembre del 2020

Información sobre la contribución

- Pedro Ubaldo Coila Añasco realizó los siguientes roles: conceptualización, metodología, análisis formal, investigación, escritura y recursos.
- Julio César Bernabé Ortiz realizó los siguientes roles: metodología, recursos, supervisión y redacción.
- Domingo Alberto Ruelas Calloapaza realizó los siguientes roles: análisis formal, recursos y redacción

Información sobre conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Fuente de financiamiento

El trabajo fue financiado con recursos propios de los autores.

Aspectos Éticos/Legales

El estudio no incurrió en ningún problema ético o legal.