



Ponencia sobre un Biofertilizante para plantas basado en bacterias de *Rhizobium* con capacidad mejorada de fijación de nitrógeno

Adrián Mendoza Montalvo

Licenciatura en Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

adrian.mendozamontalvo@viep.com.mx

DOI: 10.13140/RG.2.2.27427.89124

Sesión 141

Resumen

Esta ponencia se basa en la patente de (Mora Celis & Peralta Diaz, 2003), No. Patente: WO 03/089640 A2 [1]. Se discuten los puntos mas relevantes de la patente y el potencial que tiene para la agricultura.

Contenido

Actualmente, debido a la elevada demanda de hortalizas en el mundo y su mayor producción a gran escala en poco tiempo, se ha requerido de la fertilización de suelos para el desarrollo de los cultivos de interés; incorporando al suelo elementos esenciales como potasio, nitrógeno y fósforo, siendo el nitrógeno el componente de mayor necesidad.

Dentro de los problemas del uso de fertilizantes sintéticos, es que afectan a la economía en los agricultores. Sin embargo, el mayor impacto es el ambiental, debido a que contaminan cuerpos de agua y suelo con las grandes cantidades de nitrógeno, provocando el envenenamiento de lagos y ríos, siendo mortal para plantas, animales y el ser humano. La sustentabilidad se puede lograr gracias al uso de biofertilizantes debido a que estos son amigables con el medio ambiente. Además, se ha visto su beneficio en cultivos de consumo popular, incrementando la calidad de las cosechas, el rendimiento de las plantas y la nutrición del suelo.

Gracias al uso de bacterias o desechos orgánicos, se ha visto que se mejora la capacidad de procesamiento químico del nitrógeno atmosférico a especies químicas biodisponibles para las plantas, conocido como fijación del nitrógeno. Los microorganismos que catalizan esta serie de reacciones son bacterias del género *Rhizobium* con la capacidad de fijación simbiótica con la planta o *Azotobacter* y *Klebsiella* siendo bacterias de vida libre. La biofertilización se puede dar de diversas maneras, sin embargo, una mejora considerable se ha visto en géneros relacionados a *Rhizobium*. Estas bacterias se asocian a plantas leguminosas, no leguminosas y gramíneas.

Sin embargo, las leguminosas aportan una mayor nutrición en compuestos nitrogenados como proteínas, es por esto que mejorar la fijación de nitrógeno para estos cultivos es de gran interés para países que sufren trastornos de alimentación.

Un método de fijación de nitrógeno funcional debe ser exitoso si después de biofertilizar, no se presentan riesgos ambientales y el método debe de ser de manufactura barata para poder ser competitivo con fertilizantes sintéticos ya existentes en el mercado.

Es por ello que se propone una innovación usando la bacteria *Rhizobium etli*, la cual es simbionte del frijol, especializada en la fijación del nitrógeno al suelo; para que la bacteria mejore esta catálisis. Es necesario modificar la maquinaria molecular que realiza esta serie de reacciones, llevadas a cabo gracias a el complejo multienzimático de la nitrogenasa bacteriana: compuesta por la nitrogenasa reductasa, nitrogenasa alfa y nitrogenasa beta, este complejo es sintetizado gracias a la codificación del gen *nifHDK* y 20 proteínas adicionales.

Esto se podría obtener mediante modificaciones genéticas a la bacteria de interés. Cuando se realice la manipulación genética es necesario que este cambio favorezca el éxito en la actividad simbiótica entre la bacteria y la planta. También es importante que la eficiencia de fijación de nitrógeno sea considerable y que se tomen en cuenta los protocolos de bioseguridad para que la cepa transgénica se pueda liberar en campo.

Rhizobium etli, es una bacteria simbionte de la planta de frijol, lleva a cabo la actividad catalítica gracias a su complejo multienzimático de la nitrogenasa; del operón *nifHDK*, *R. etli*, contiene 3 copias llamadas copia a, copia b y copia c.

Se observó que el operón c se transcribe de 10 a 40 veces más que los operones a y b tanto en vida libre como en nódulo, pero la eficiencia simbiótica en la fijación de nitrógeno esta dada por el complejo de la nitrogenasa producido a partir de la transcripción de los operones a y b.

Es decir, el operón c es óptimo para transcribir, pero la eficiencia del complejo enzimático que forma es menor, mientras que los operones a y b son más difíciles de transcribir, pero sus complejos enzimáticos son altamente eficientes en la reducción del nitrógeno atmosférico.

La eficiencia de transcripción del operón c, se debe a la longitud que se genera entre el promotor y la ARN polimerasa, que en la transcripción generan un complejo muy favorable.

Para la invención del Biofertilizante a partir de *R. etli* fue necesario el uso de ingeniería genética para generar así un operón quimérico con la eficiencia de transcripción del operón c, pero con la eficiencia de productos de transcripción (enzima nitrogenasa) de los operones a o b.

Esta nueva cepa no contiene genes exógenos y esto hace biosegura a la cepa, además de que solo expresa la fijación de nitrógeno en presencia simbiótica con el frijol. El operón quimérico o construcción genética de interés por *c nifHDK* (SEQ ID No: 2, 3 y 4) no existe como tal en la naturaleza, aunque el material con el que se realizó se encuentra ya en el genoma de la bacteria *Rhizobium etli*, este fue obtenido utilizando técnicas convencionales de ingeniería genética en el laboratorio.

Uno de los operones se obtuvo del plásmido pCQ12 de la misma bacteria, se separó y se purificó, usando enzimas EcoR1 y Bgl2. La región promotora de la copia c se obtuvo del plásmido pCQ23 con digestión Bgl2, se separó y se purificó. Ambos segmentos fueron ligados obteniéndose el plásmido pHP40. De este nuevo plásmido, se obtuvo por *pr. c nifHDK*, el cual se clonó en el vector pWS233; lográndose obtener un nuevo plásmido llamado pHP789. Este es el plásmido final de interés y el que se patentó. Posteriormente por conjugación bacteriana se insertó el plásmido a todas las bacterias de *R. etli*, estas

bacterias se crecieron y se pusieron a experimentación en las plántulas en invernadero y campo; la nueva cepa se nombró como HP310.

Teniendo así excelentes resultados, las semillas de las plantas de frijol inoculadas con *R. etli* transgénica eran hasta 50 veces más nutritivas y ricas en proteínas que las semillas sin inocular o con la bacteria silvestre. Gracias al éxito, la bacteria se puso a prueba en otras plantas leguminosas como alfalfa o soja para ver su desempeño, y la construcción genética se aplicó a otros géneros bacterianos parecidos a *Rhizobium*.

En los experimentos en campo, el producto se aplicó en diversos tipos de suelo (diversas locaciones) y diversos tipos de riego, debido a que estos son factores que determinan la fijación de nitrógeno.

Sin embargo, la cepa fue exitosa y es biosegura para ser usada masivamente en el campo, gracias a esta innovación se comprueba que el uso de esta técnica de edición genética resulta benéfico. Además, se abre paso del uso de biofertilizantes más amigables con el medio ambiente y más baratos.

Finalmente, se depositó la cepa de *Rhizobium etli* con la construcción pr. c nifHDK (cepa HP310), con el registro NRRL B-30606 el 12 de julio de 2002 en la Culture Collection, Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture.

<https://sites.google.com/view/apcmac/conferencias-y-m%C3%B3dulos?authuser=0#h.jrs5irq9in3c>

Referencia

- [1] Mora Celis, J., & Peralta Diaz, H. (2003). Biofertilizante para plantas basado en bacterias de *Rhizobium* con capacidad mejorada de fijación de nitrógeno. *Organización Mundial de La Propiedad Intelectual. No. Patente: WO 03/089640 A2*, 1(No. Patente: WO 03/089640 A2), 1–45.
<https://patents.google.com/patent/WO2003089640A3/es?q=biofertilizacion>