



UNIVERSIDAD NACIONAL
de LA PAMPA



**“EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE
Sinorhizobium meliloti EN CONDICIONES
CONTROLADAS EN SUELOS
ESTERILIZADOS”**

Autores:

Bravo Matías Cruz
Disavia Joaquín

Director:

Gómez Héctor Eduardo

Codirector:

Zoratti Carlos

Carrera: Ingeniería Agronómica
Facultad de Agronomía
UNLPam

Año: 2013

INDICE

Resumen	3
Introducción	4
Objetivos	6
Materiales y métodos	8
Resultados y discusión	14
Conclusiones	24
Bibliografía	25

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el crecimiento de la cepa de *Sinorhizobium meliloti* en suelo esterilizado proveniente de dos manejos diferentes: agricultura y pastura de pasto llorón. Se utilizó un suelo haplustol entico, típico de la Región semiárida pampeana, sometido a dos formas contrastantes de manejo: agricultura y pastura de pasto llorón. Los que fueron sembrados con similar densidad bacteriana. Los experimentos se realizaron durante trece semanas bajo condiciones controladas en laboratorio. Durante la incubación se determinó en ocho oportunidades la evolución de la población mediante la técnica de recuento en placa. Se construyeron las curvas de crecimiento de la población microbiana bajo las condiciones descriptas. Se analizó la validez de los datos mediante un análisis estadístico (ANOVA) y el test de Fisher. No existieron restricciones físicas y químicas para el desarrollo de *Sinorhizobium meliloti* en el suelo estudiado.

Se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos, por lo que se confirmó que el manejo del suelo afectó el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti*.

PALABRAS CLAVES: Crecimiento microbiano, suelos estériles, *Sinorhizobium meliloti*.

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico, permite la reducción de N_2 a NH_4^+ mediante el sistema enzimático nitrogenasa. La fijación biológica de nitrógeno junto con la fotosíntesis son procesos fundamentales para el mantenimiento de la vida en la biosfera. El proceso de fijación biológica de nitrógeno es llevado a cabo en forma exclusiva por organismos procariotas, en el caso de la simbiosis de las plantas en familia *Favaceae* (*Leguminosae*), estas se asocian con bacterias del género *Rhizobium*. En estudios de laboratorio con cepas de *Rhizobium sp.* que son utilizadas como inoculantes de semillas de leguminosas, es común investigar el comportamiento de microsimbiontes en suelos estériles y no estériles (Chowdhury *et al.*, 1968, Alexander, 1977).

El sistema fijador rizobio-leguminosa se caracteriza por aportar cantidades significativas de nitrógeno al suelo, hecho que ha permitido manejos productivos eficientes centrados en el uso de leguminosas sin utilización de fertilizantes nitrogenados. Así numerosas leguminosas son utilizadas en agricultura con singular éxito. Los cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*), tréboles (*Trifolium sp.*), *Melilotus*, *Vicia* y Soja (*Glycine max*), entre otros, están muy extendidos y son de alto valor económico. El cultivo de alfalfa en la región semiárida y subhúmeda pampeana está muy difundido integrando los planes de manejo y de rotación de cultivo (Covas, 1980, Viglizzo, 1995). La simbiosis rizobio-alfalfa, a través de la fijación biológica de nitrógeno, incorpora anualmente al suelo cantidades variables e importantes de nitrógeno (Sauberan *et al.*, 1964).

Distintos estudios determinaron que la fijación de nitrógeno simbiótica por alfalfa es de gran importancia por las cantidades aportadas al cultivo y al suelo. Los montos de

nitrógeno fijados por dicha leguminosa varían entre 200 y 600 kilogramos por hectárea, con promedios anuales cercanos a 300 kilogramos (Pronalfa 1993, Racca *et al.*, 2001).

Asimismo por la extensa y prolongada difusión del cultivo de alfalfa, se ha determinado en los suelos de la región pampeana, la existencia de una población naturalizada de *Sinorhizobium meliloti* que compite con las cepas incorporadas por inoculación. (Pacheco Basurco *et al.*, 1993; White, 1986).

Estudios previos comprobaron la presencia y supervivencia de poblaciones de *S. meliloti*, en ausencia de leguminosas en suelos cultivados con cereales (Sagardoy 1979).

Otra serie de estudios se focalizaron en la supervivencia y el desarrollo de *R. meliloti* en suelos esterilizados bajo condiciones de laboratorio (Chowdhury *et al.*, 1968, Alexander 1977; Ducos *et al.*, 1989). Hirsch (1996) realizó un estudio acerca de la dinámica de la población de rizobios indígenas y modificados genéticamente en parcelas en Rothamsted, demostrando que la población de *S. meliloti* podría no ser detectada antes de la siembra de *Medicago sativa*, pero que se incrementaba sustancialmente con el cultivo de dicha leguminosa.

Otras investigaciones estudiaron el grado de ocupación nodular en alfalfa en cultivos de La Pampa, estableciendo que las cepas naturalizadas prevalecen en relación a las cepas provenientes del inoculo (Pronalfa, 1993; Racca *et al.*, 2001). En el caso de los ensayos en la Estación Experimental de Anguil establecieron que en promedio el 55% de los nódulos están ocupados por cepas naturalizadas. (Pronalfa, 1993).

La capacidad simbiótica de las poblaciones naturalizadas es muy variable, existiendo desde cepas eficientes a otras que no lo son. Dichas poblaciones compiten con las de los inoculantes (Pronalfa, 1993). Investigaciones realizadas en cultivos de alfalfa de la región permitió aclarar la calidad simbiótica de algunas poblaciones locales, así como la posibilidad de elaborar inoculantes con las mismas (Grassano *et al.*, 1996). Dichos

investigadores seleccionaron cepas naturalizadas tanto por el Índice de Eficiencia Relativa (IER) como por la competitividad, demostrando la posibilidad de elaborar inoculantes con estas cepas y obtener un mayor rendimiento simbiótico en la región.

Ronchi, 1994 en su tesis utilizó un medio de cultivo con nutrientes de rápida utilización por parte de *Sinorhizobium meliloti*. El extracto de levadura y la sacarosa son nutrientes de rápido metabolismo y aprovechamiento por parte de una bacteria heterotrófica aeróbica como *Sinorhizobium meliloti*. La sacarosa es un nutriente carbonado de utilización casi universal por los microorganismos y es una fuente energética por excelencia. El extracto de levadura suministra proteínas, peptonas y tiene una gran riqueza de factores de crecimiento, especialmente vitaminas del complejo B. Si pudiéramos definir a un medio de cultivo con dichos componentes deberíamos calificarlo de muy rico respecto al suelo. Algunos grupos bacterianos, calificados entre los más exigentes, prosperan en un medio como el descrito, es el caso de las bacterias Lácticas.

Además, la riqueza nutricional de los suelos es muy variable, las fuentes de C y N provienen en especial de la materia orgánica de los mismos. La materia orgánica del suelo proviene en su mayoría de los residuos vegetales y de los residuos de los microorganismos que lo habitan. La liberación de nutrientes a partir de las sustancias polimerizadas depende de la actividad microbiana que a través de las enzimas extracelulares liberan progresivamente los nutrientes energéticos y compuestos nitrogenados (Frioni, 2011).

Mishustin, (1975) consideró que en hábitats como el suelo, los microorganismos son por lo general mucho más abundantes que en otros de agua dulce o marinos. Típicamente, en los hábitats del suelo se encuentran de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de suelo. Es importante valorar los ritmos de crecimiento microbiano en el suelo Por otra

parte Grant y Long, (2013) expresaron que los estudios más finos realizados sobre la tasa de crecimiento bacteriano en el suelo permiten suponer que, en promedio, el tiempo de generación ronda los diez días. De hecho, se considera que en la mayor parte de los casos las bacterias se encuentran en una fase de latencia permanente (que sería relativamente equivalente a la fase estacionaria o al periodo de adaptación previo al crecimiento exponencial) durante largos periodos de tiempo. Es más: en algunos casos se ha podido estimar que la absorción de nutrientes por los microorganismos del suelo no les permite crecer sino que toda la energía se dirige hacia las reacciones de mantenimiento. En este sentido, el crecimiento de los microorganismos en el suelo se produciría por fases de «estallido» que seguirían inmediatamente a los aportes de elementos nutritivos limitantes.

El objetivo de este estudio fue conocer el crecimiento de una cepa de *S. meliloti* en un suelo típico de la región que fue trabajado con dos manejos contrastantes y en condiciones de laboratorio.

La hipótesis fue que el crecimiento de *S. meliloti* fue afectado por el manejo del suelo.

Materiales y métodos

El área de estudio se localizó en el sector central de la región Semiárida Pampeana, en la unidad cartográfica de las Planicies Medanosas. En esta región que ocupa una superficie de 1,2 millones de hectáreas predominan Haplustóles Enticos (H) con importantes inclusiones de Ustipsamientos Típicos (U). El suelo elegido es representativo de la región y pertenece a la Estación Experimental del INTA de Anguil (departamento Capital) cercano a la localidad de Santa Rosa, La Pampa.

El suelo utilizado es franco arenoso y sus características están señaladas en la Tabla N° 1. Tiene instalado un cultivo de pasto llorón desde hace más de 40 años, el cual es sometido al pastoreo por parte de hacienda bovina.

Una parte de éste fue utilizada para uso agrícola en los últimos 12 años. La secuencia de cultivos identificados fue

- 2001 Girasol siembra convencional
- 2002 Centeno siembra convencional.
- 2003 a 2006 Centeno bajo siembra directa.
- 2010 a 2011 Maíz bajo siembra directa.
- 2013 Centeno siembra convencional.

Los dos tratamientos en los que se realizó este estudio fueron Pasto Llorón y Agricultura cuyas características se detallan en Tabla N° 1y se visualizan en las fotografías N° 1, 2, 3, y 4.

Las muestras de suelos fueron compuestas, tomadas de la capa arable (0 - 20 cm), sobre una superficie de 2500 m². Se determinaron las siguientes características de los suelos: contenidos de nitrógeno total (NT.), fósforo (P.), pH, materia orgánica total (Mot.),

textura, estabilidad de agregados, biomasa microbiana de C, capacidad de retención de agua y número de bacterias heterotróficas aerobias, tal como se detalla en la Tabla 1.

Tabla N° 1. Características físicas-químicas de los lotes Agricultura (0) y Pasto Llorón (1).

Perfil estudiado 0-20cm.	Agricultura	Pasto Llorón
Materia Orgánica (%).	1,7	1,9
P (ppm)	13,3	4
pH	6,5	7
Microflora total	$3,5 \cdot 10^5$ UFC/gr. suelo	$3,8 \cdot 10^5$ UFC/ gr. suelo
Textura Arena	50,65	49,55
L + A	46,36	49,36
Capacidad de campo (%)	21,50	22
Índice de inestabilidad	0,88	0,41
Densidad (g/cm ³ .)	1,21	1,17



Fografía N° 1: Suelo Agricultura.



Fotografía N° 2: Suelo Agricultura



Fotografía N° 3: Suelo Pasto llorón.



Fotografía N° 4: Suelo Pasto llorón.

La cepa utilizada provino de la colección del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UNLPam, proveniente de aislamientos de los mismos suelos (población naturalizada).

Esterilización del suelo

En cada tubo se colocó 1g de suelo, previamente secado y tamizado a través de un tamiz de 1 mm.

La esterilización del suelo se realizó mediante dos esterilizaciones en autoclave con temperatura de 121 °C durante 60 minutos con un tiempo de reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. La esterilidad del suelo se constató por no haber desarrollo de colonias en siembras en medios de cultivo. La humedad final (luego del agregado de cada cepa) fue del 75 % de la capacidad de campo.

Cepa de *Sinorhizobium meliloti*

El microsimbionte se cultivó en medio de cultivo agarizado, el inóculo se obtuvo a partir del desarrollo superficial. Para la siembra se tomó material, exclusivamente del crecimiento microbiano, con un anillo, cuidando de no incorporar parte del medio de cultivo. Se diluyó en agua estéril hasta obtener una concentración celular baja.

Incubación

La incubación se realizó durante 5-6 días a 28°C. (Ducós *et al* 1989). La duración de cada experimento fue de 13 semanas. El estudio se realizó por duplicado en cada muestra de suelo investigado y con 3 placas por dilución sembradas. Los tubos se incubaron en condiciones de laboratorio a 25 °C.

Lectura y análisis de resultados

Las determinaciones fueron realizadas a los: 0, 1, 10, 18, 24, 37, 51, 77, 88 días. El procedimiento consistió en extraer el suelo de cada tubo, dispersarlo con agua estéril y realizar las diluciones necesarias. Para ello se realizaron diluciones decimales de suelo en agua estéril a razón de 1 mL por caja. El medio utilizado fue “Agar manitol extracto de levadura” (Vincent, 1975), incubándose durante cuatro días a 25°C, realizándose a continuación el recuento de las colonias desarrolladas. Con dichos datos obtenidos se construyeron curvas de crecimiento. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y las diferencias entre medias a través del test de Fisher LSD ($p < 0.05$), utilizando el software InfoStat (InfoStat, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer experimento

En el suelo se determinó el número de bacterias heterotróficas aerobias que estaban presentes en el mismo.

Tabla 2: número de UFC/ g de cada muestra de suelo sin esterilizar

Suelo Agricultura	3,5 10 ⁵ UFC / g suelo.
Suelo Pasto Llorón	3,8 10 ⁵ UFC/g suelo.

Segundo y Tercer experimento: incubación de suelos estériles con siembra de *Sinorhizobium meliloti* (Tabla 3).

Tabla 3: número de UFC/ g de suelo en ambas muestras de suelos.

Días	Tratamiento	n° UFC	Log	Tratamiento	n° UFC	Log
	Agricultura			P. Llorón		
0		1,3 10 ⁶	6,1		1,7 10 ⁶	6,252
1		4,5 10 ⁶	6,6612		2,7 10 ⁶	6,4451
10		6,41 10 ⁸	8,8073		1,2 10 ⁹	9,0762
18		7,48 10 ⁸	8,873		8,93 10 ⁸	8,945
24		2,21 10 ¹¹	11,344		7,7 10 ¹⁰	10,8671
37		2,025 10 ¹¹	11,306		8,3 10 ¹⁰	10,9199
51		5,7 10 ¹⁰	10,749		7,8 10 ¹⁰	10,8836
77		4,8 10 ¹⁰	10,671		6,75 10 ⁹	9,8247
88		1,6 10 ⁸	8,1662		5,41 10 ⁸	8,7255

AGRICULTURA

La población de *S. meliloti* se incrementó desde una población inicial de 1,3 10⁶ UFC/ g suelo hasta el día 24 en 2,21 10¹¹ UFC/ g suelo y decayendo en el día 51 a 5,7 10¹⁰ UFC/ g suelo hasta finalizar el día 88 con 1,6 10⁸ UFC/ g suelo.

PASTO LLORÓN

La población de *S. meliloti* se incrementó desde una población inicial de $1,7 \cdot 10^6$ UFC/g suelo hasta el día 37 en $8,3 \cdot 10^{10}$ UFC/ g suelo; decayendo en el día 77 a $6,75 \cdot 10^9$ UFC/ g suelo hasta finalizar el día 88 con $5,41 \cdot 10^8$ UFC/ g suelo.

En los experimentos 2 y 3 se evidenció un notable crecimiento poblacional.

De acuerdo a la bibliografía el crecimiento microbiano en los suelos es dependiente del status nutricional de los mismos, (Mishustin, 1975 y Ronchi, 1994).

En contraste en el primer experimento la cifra poblacional de $3,5 \cdot 10^5$ UFC / g suelo es mucho menor, y es la habitual en estos suelos.

En el caso de los experimentos con *S.meliloti* debió existir una disponibilidad adecuada de nutrientes que facilitó el crecimiento del microsimbionte.

Las cifras también evidenciaron que en los suelos estudiados no existieron limitantes físicas y químicas para el crecimiento.

Los estudios de crecimiento en medios de cultivo en laboratorio, de cepas similares, realizados por Ronchi, (1993) mostraron aumentos poblacionales similares a los obtenidos en éste trabajo. La autora utilizó medios de cultivo de gran riqueza nutricional que lograron crecimientos significativos en cortos períodos de tiempo (48 – 72 h). Los resultados logrados en los experimentos N° 2 y 3 con suelos estériles mostraron crecimientos similares, aunque en mayor tiempo de desarrollo, que en nuestro caso fue de 88 días. Se demuestra que en condiciones de suelo es posible lograr desarrollos de *S. meliloti* similares, pero necesitando mayor tiempo de crecimiento.

Posiblemente el crecimiento en el suelo, más elongado en el tiempo, se debe a que a los nutrientes naturales del suelo se les han incorporado los provenientes de los componentes celulares de los vegetales y la biomasa microbiana destruidos durante la

esterilización. El proceso de esterilización liberó vía hidrólisis térmica una gran cantidad de nutrientes que en condiciones normales, suelos no sometidos a tratamiento térmico, no hubieran estado disponibles (Powlson, 1994). Al igual que expresa Hunt *et al.*, 1985, el análisis del crecimiento sugiere que el temprano rápido crecimiento en suelo esterilizado fue en gran medida a expensas del pool de material orgánico soluble nitrogenado disponible gracias a la esterilización.

Otros factores que explicarían el lento crecimiento fueron la menor temperatura y la aireación mucho más eficiente en la tesis de Ronchi (1993).

Elaboración de curvas de crecimiento

El crecimiento de la población de *Sinorhizobium meliloti* se estudió mediante curvas de crecimiento semilogarítmicas que representan el tamaño de población en función del tiempo.

Gráficos N° 1 y 2.

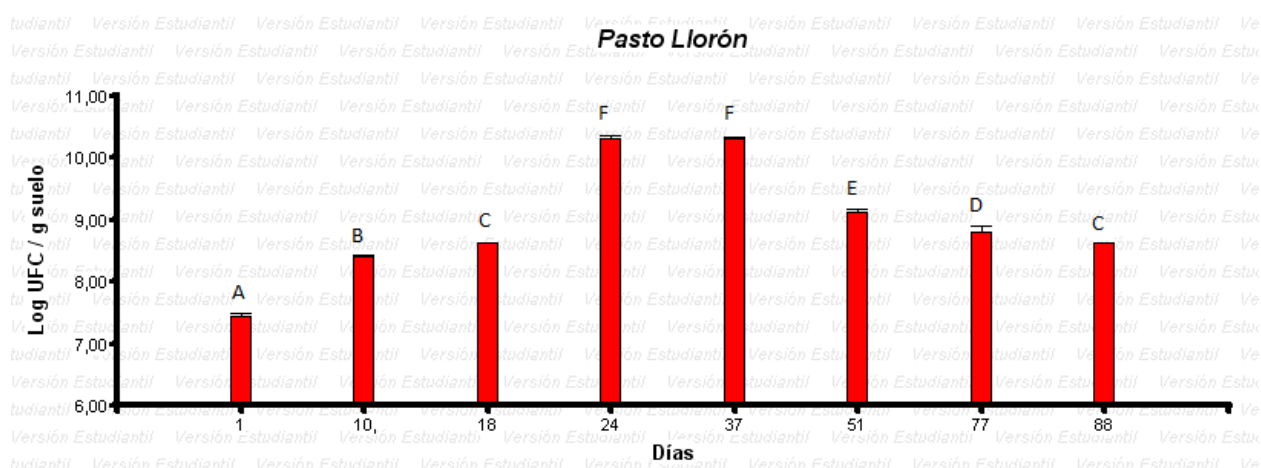


Gráfico N° 1. Variación del número de *S. meliloti*, en suelo cultivado con pasto llorón, en función del tiempo.

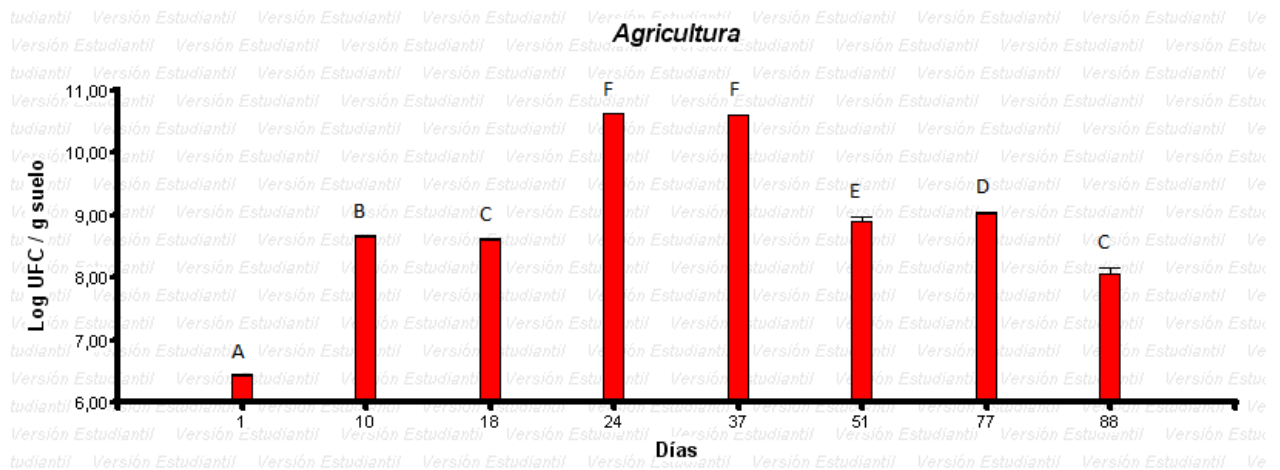


Gráfico N° 2. Variación en el número de *S. meliloti*, en suelo agricultura, en función del tiempo.

Los Gráficos N° 1 y 2 muestran el crecimiento microbiano de cada suelo en función del tiempo. Como se observa el caso del P. Ilorón presenta crecimiento exponencial hasta el día 18, seguido de una fase de crecimiento estacionario de 27 días de duración, tras la cual se produce la fase de muerte de la población. En el caso de Agricultura presenta crecimiento exponencial hasta el día 24, seguido de una fase de crecimiento estacionario de 33 días, y a continuación la fase de muerte de la población.

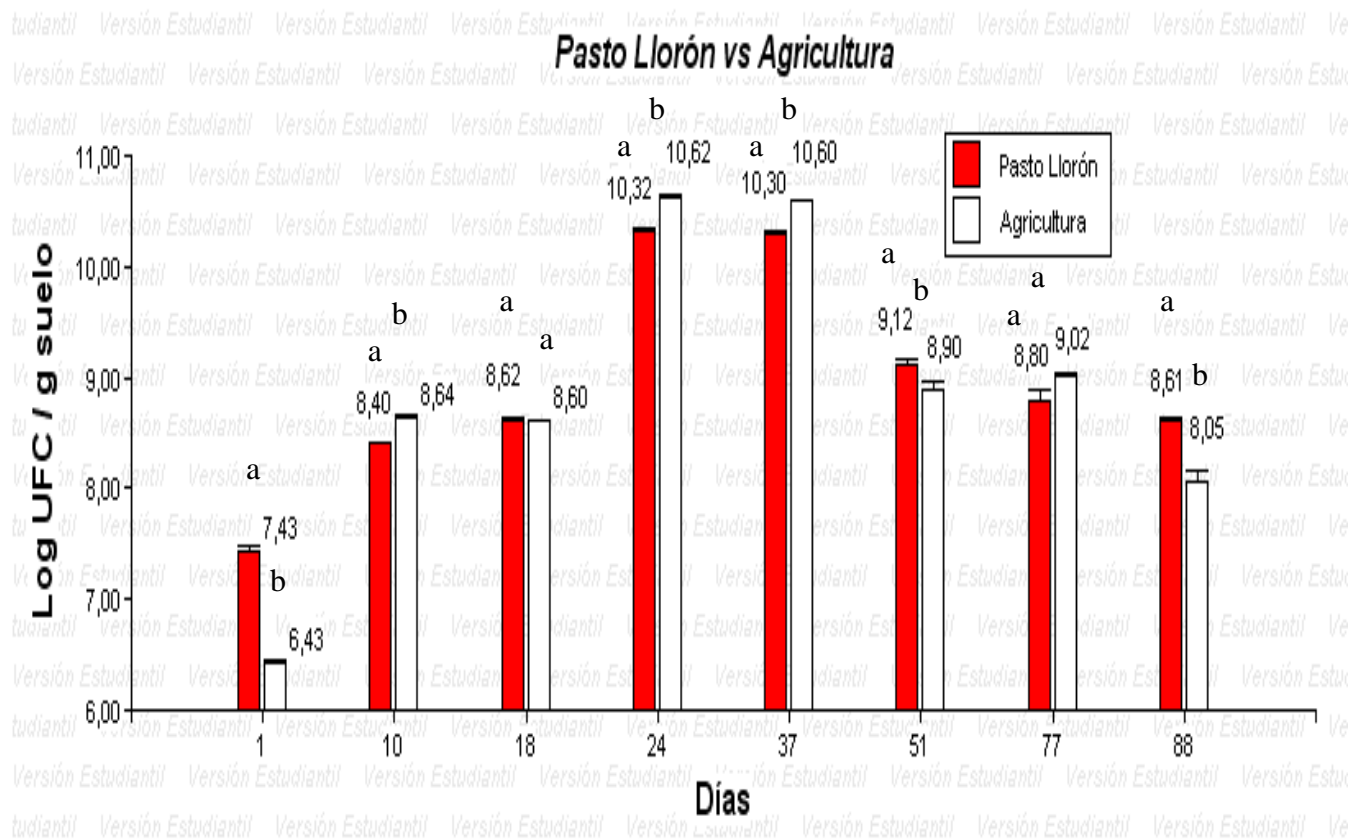


Gráfico N° 3. Variación de el número de *S. meliloti*, en suelo cultivado con pasto llorón versus agricultura, en función del tiempo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

0 AGRICULTURA

1 P. Llorón

Día 1**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,97	0,97	1,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,04	1	3,04	341,78	<0,0001
Columna1	3,04	1	3,04	341,78	<0,0001
Error	0,09	10	0,01		
Total	3,13	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,12139

Error: 0,0089 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.	
0	6,43	6	0,04	A
1	7,43	6	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Día 10****Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,79	0,77	0,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	1	0,17	36,85	0,0001
Columna1	0,17	1	0,17	36,85	0,0001
Error	0,04	10	4,5E-03		
Total	0,21	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08622

Error: 0,0045 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.	
1	8,40	6	0,03	A
0	8,64	6	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Día 18**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,09	0,00	0,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,4E-04	1	9,4E-04	0,96	0,3494
Columnal	9,4E-04	1	9,4E-04	0,96	0,3494
Error	0,01	10	9,8E-04		
Total	0,01	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04025

Error: 0,0010 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.	
0	8,60	6	0,01	A
1	8,62	6	0,01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Día 24****Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,87	0,86	0,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,28	1	0,28	66,83	<0,0001
Columnal	0,28	1	0,28	66,83	<0,0001
Error	0,04	10	4,2E-03		
Total	0,32	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08339

Error: 0,0042 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.	
1	10,32	6	0,03	A
0	10,62	6	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Día 37**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,96	0,95	0,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,26	1	0,26	212,54	<0,0001
Columna1	0,26	1	0,26	212,54	<0,0001
Error	0,01	10	1,2E-03		
Total	0,28	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04525

Error: 0,0012 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.
1	10,30	6	0,01 A
0	10,60	6	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Día 51****Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,40	0,34	1,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,15	1	0,15	6,57	0,0282
Columna1	0,15	1	0,15	6,57	0,0282
Error	0,23	10	0,02		
Total	0,38	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,19428

Error: 0,0228 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.
0	8,90	6	0,06 A
1	9,12	6	0,06 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Día 77**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,33	0,26	1,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,15	1	0,15	4,94	0,0504
Columnal	0,15	1	0,15	4,94	0,0504
Error	0,31	10	0,03		
Total	0,47	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,22765

Error: 0,0313 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.
1	8,80	6	0,07 A
0	9,02	6	0,07 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Día 88****Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,75	0,72	2,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,95	1	0,95	29,77	0,0003
Columnal	0,95	1	0,95	29,77	0,0003
Error	0,32	10	0,03		
Total	1,26	11			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,22920

Error: 0,0317 gl: 10

Columnal	Medias	n	E.E.
0	8,05	6	0,07 A
1	8,61	6	0,07 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparando ambas curvas se visualizó una gran similitud en el comportamiento en los dos manejos realizados. Las diferencias tienen significancia estadística, pero se observa que el crecimiento muestra rasgos típicos de un crecimiento poblacional en el que no existen restricciones nutricionales. Tiene especial significación las cifras máximas alcanzadas entre los días 24 y 37 (fase de crecimiento estacionario), en ambos experimentos coinciden, aunque muestran diferencias significativas desde el punto de vista estadístico. El manejo diferencial del suelo provocó diferencias significativas de las poblaciones con mayor número en el tratamiento Agricultura respecto al tratamiento P. llorón.

En el suelo cultivado con P. llorón existió mayor tenor de materia orgánica, pero también debieron existir diferencias en la calidad de la misma. Un indicio de esta diferencia es la estabilidad estructural mucho mayor en Pasto Llorón. La materia orgánica en este suelo posiblemente esté más polimerizada como sustancias húmicas que son muy estables y por ende de difícil descomposición. En cambio en el suelo Agrícola, con menor índice de estabilidad estructural, predomina la materia orgánica joven que es más fácil de degradar. El tratamiento térmico posiblemente tuvo una acción de hidrólisis mayor sobre la materia orgánica joven que sobre la fracción húmica.

CONCLUSIONES

No existieron restricciones físicas y químicas para el desarrollo de *S. meliloti* en el suelo estudiado.

Con la idea de que el suelo es un medio de cultivo, se probó que el suelo franco arenoso utilizado fue apto para el crecimiento de *S. meliloti*. Aproximándose en su desarrollo poblacional, a lo observado en un medio de cultivo especialmente diseñado con fines industriales.

Se demostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos, demostrando de esta manera que bajo las condiciones investigadas se cumplió la hipótesis de que el manejo del suelo afecta el crecimiento de *S. meliloti*.

BIBLIOGRAFIA

- Covas, G.; Gómez, H. y Zoratti, C. 2000. Mejoramiento de la aptitud simbiótica de alfalfa (*Medicago sativa*), Actas congreso de biología del suelo, Catamarca.
- Ducos, C; Gómez. M. y Sagardoy, M.1989. Supervivencia e inhibición de una cepa de *Rhizobium meliloti* en distintos perfiles de suelos. Anales de edafología y agrobiología. Pág.445-456.
- Frioni, L. 2011. Microbiología. Básica, ambiental y agrícola. Orientación Gráfica Editora. Pág. 744.
- Gómez, H. y Zoratti, C. 1998. Interacciones de la simbiosis *Rhizobium Melilotis*-Alfalfa bajo condiciones controladas, Actas del VIII congreso Argentino de Microbiología.
- Gómez, H.; Zoratti, C. y Sagardoy, M. 2001. Simbiosis Sinorhizobium meliloti-Alfalfa bajo condiciones controladas. Tercer reunión nacional científico-técnica de biología del suelo, UNAS. Pág. 95-96.
- Grant, W. y Long, P. 2013. Microbiología ambiental Capítulo 1°. Ed. ACRIBIA.
- Grassano, A. 1994. Fijación simbiótica de nitrógeno. Estudios sobre comportamiento fisiológico de cepas de *Rhizobium Melilotis* respuesta a la inoculación de *medicago sativa* con cepas nativas e introducidas en la región pampeana. Tesis doctoral de química.
- Grassano, A; Ronchi, A. y Ballati, A. 1996. Respuesta de alfalfa a la inoculación en áreas de la provincia de La Pampa. RIA, 26 (2): 1 a 14. INTA, Argentina.
- Hunt, H. W; Cole, C. V. y Elliott, E. T. 1985. Models for Growth of Bacteria inoculated into Sterilized Soil. Soil Science. Vol 139 N° 2.
- Mishustin, E. 1975. Microbial associations of soil types. Microbial Ecology 2:97-118.
- Parker, C. A; Trinick, M. J. y Chatel, D. L. Rhizobia as soil and Rhizosphere inhabitants. Treatise on Dinitrogen Fixation. Section IV. Agronomy and ecology. Eds. R W F Hardy and A H Gibson Pág. 331-352. John Wiley and Son, New York.
- Peña Cabriales, J. y Alexander, M. 1983. Growth of *Rhizobium* in Soil Amended with Organic Matter. Vol. 47 N° (2), Pág. 241-245.

- Penny, R. y Hirsch. 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. Vol. 133, issue 1. Pág. 159-171.
- Powlson, D. S. en Beyond the biomass. 1994. Edited by KRitz, j. Dighton and K.E. Giller. British Society of soil Science.
- Racca, R.; Hijano, E. 1993. Fijación biológica de N en alfalfa para el desarrollo sostenible de los sistemas agrícola ganaderos. Proyecto Pronalfa. Ediciones INTA.
- Racca, R. *et al.*, 2001. Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana. Proyecto Pronalfa. Ediciones INTA.
- Ronchi, A. L. 1994. Tesis doctoral UNLPam. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Selección de soportes para la producción de inoculantes para leguminosas.
- Sagardoy, M. A. 1981. Change in the number of indigenous *Rhizobium meliloti* and other soil bacteria under field conditions. *Agochimica*. Vol. 25. Pág. 407-413.
- Verde, L. y Viglizzo, E. 1995. Desarrollo Agropecuario Sustentable: Estrategia para el uso agropecuario del territorio INTA-INDEC-MECON.
- Vincent, J. M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Editorial hemisferio Sur.