



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y  
NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER  
EL GRADO ACADEMICO DE  
LICENCIADO EN QUIMICA**

“ESTRATEGIAS BIOTECNOLOGICAS PARA LA PRODUCCION DE  
BIOFERTILIZANTES EN BASE A CONSORCIOS BACTERIANOS PARA SU  
APLICACION EN CULTIVOS DE RELEVANCIA AGROINDUSTRIAL”.

Gisela Carol BONINO

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2013

"Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química, durante el periodo comprendido entre 27 de julio del 2012 y 1 de noviembre del 2013, bajo la dirección de la Lic. Carolina Castaño y la codirección de la Dra. Graciela Lorda"

Gisela Carol BONINO

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## ***Agradecimientos***

*Al Departamento de Química, por brindarme todas las herramientas para la realización de la tesina*

*A mi directora Carolina Castaño y Codirectora Graciela Lorda, por la dedicación y apoyo en todo momento durante la realización de la tesina.*

*A Mari y Marcelo, por la colaboración y compañía.*

*A Papá y Mamá, por el gran esfuerzo que han hecho para que alcance este primer logro, en mi vida profesional.*

*A mi Hermana por estar siempre acompañándome en las buenas y malas.*

*A Facu por su comprensión, apoyo y cariño de todos los días.*

*A mis amigos y compañeros, por acompañarme durante este camino y por estar siempre dispuestos a ayudarme.*

*A todos ellos GRACIAS!!!!*

## Resumen

Entre los microorganismos utilizados para la producción de biofertilizantes para leguminosas, se encuentran los géneros *Bradyrhizobium*, fijador simbiótico de N<sub>2</sub>, y *Azospirillum*, promotor del crecimiento vegetal. Actualmente se aplican estos productos formulados a partir de cultivos independientes. Se planteó, como objetivo la obtención de consorcios a partir del desarrollo conjunto de bacterias, que mantengan la viabilidad de las células durante el tiempo de almacenamiento y las propiedades PGPR. Los microorganismos utilizados fueron *A.brasilense* AZ 39 y *B.japonicum* E 109. Mediante ensayos de producción conjunta, se evaluó velocidad específica de crecimiento que fue semejante a cuando se cultivaron en forma individual. Se realizaron ensayos de viabilidad de diferentes suspensiones, donde se logró una estabilización del número de células después de los 60 días y un mantenimiento neutro del pH. Se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento de plantas. Los resultados mostraron que *A.brasilense* no tuvo incidencia sobre la capacidad de nodulación de *Bradyrhizobium*, ya que no se observó diferencia significativa en el número de nódulos/planta entre las inoculadas con *B.japonicum* y las coproducidas. No hubo diferencia significativa, en el volumen radicular, el porcentaje de nitrógeno y peso seco de la parte aérea de la planta, entre los tratamientos de inoculaciones mixtas, aunque sólo en el tratamiento proveniente de la coproducción de cultivos igualó el peso seco de plantas fertilizadas con nitrógeno inorgánico. Estos resultados muestran la posibilidad de llevar a cabo un cultivo conjunto, lo que permitiría optimizar los tiempos de proceso y reducir los costos de producción de biofertilizantes actuales.

# Índice

## Páginas

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.Cultivo de soja.....</b>	<b>1</b>
1.2.1 <i>Glycine max</i> .....	1
<b>1.3 Biofertilizantes.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Bacterias promotoras del crecimiento de vegetal o PGPRs.....</b>	<b>6</b>
1.4.1. Métodos directos.....	7
1.4.1.1 Producción de fitohormonas.....	7
1.4.1.2 Solubilización de fósforo.....	8
1.4.1.3 Producción de sideróforos.....	9
1.4.1.4 Fijación biológica de nitrógeno.....	9
1.4.1.5 Limitaciones de la simbiosis.....	11
1.4.2 Métodos indirectos.....	11
1.4.2.1 Producción de antibióticos.....	12
1.4.2.2 Resistencia sistémica inducida.....	12
1.4.2.3 Competencia.....	13
<b>1.5 Microorganismos PGPR.....</b>	<b>14</b>
1.5.1 Género <i>Bradyrhizobium</i> .....	14
1.5.2 Género <i>Azospirillum</i> .....	14
<b>1.6 Interacciones microbianas.....</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Proceso biotecnológico de producción de biofertilizantes.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivo general.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Microorganismos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Métodos de conservación.....</b>	<b>21</b>
3.2.1 Agar inclinado.....	21
3.2.2 Congelación.....	21
<b>3.3 Medios de cultivos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Determinación del crecimiento celular.....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Determinación del número de células viables de <i>A. brasilense</i> AZ 39 y <i>B. japonicum</i> E109.....	23

3.4.2 Determinación del número de células viables de <i>A. brasilense</i> AZ 39 y <i>B. japonicum</i> E 109 co-producidos.....	23
3.4.3 Condiciones de operación.....	24
3.4.4 Calculo de los parámetros cinéticos de crecimiento celular.....	24
<b>3.5 Determinación de la viabilidad y compatibilidad de los diferentes géneros bacterianos estudiados.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6 Determinación de la sobrevivencia en formulaciones de las distintas suspensiones microbianas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Determinación de la capacidad simbiótica de las cepas mediante ensayos de determinación de infectividad y efectividad en plantas.....</b>	<b>27</b>
3.7.1 Ensayos en plantas.....	27
3.7.2 Esterilización y pre-germinación de las semillas.....	27
3.7.3 Cultivo de plantas en macetas.....	27
3.7.4 Diseño experimental.....	29
<b>3.8 Evaluación de parámetros indicadores del crecimiento de plantas.....</b>	<b>30</b>
3.8.1 Número de nódulos totales por planta.....	30
3.8.2 Volumen radical por desplazamiento de agua.....	30
3.8.3 Peso seco de la parte aérea.....	30
3.8.4 Determinación de porcentaje de nitrógeno y de proteína en la parte aérea de la planta por el método Kjeldahl.....	31
3.8.5 Porcentaje de proteína.....	31
<b>3.9 Análisis estadístico.....</b>	<b>32</b>
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Estudios cinéticos de los microorganismos en estudio.....</b>	<b>33</b>
4.1.1 Cinética de crecimiento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E 109 y <i>Azospirillum brasilense</i> AZ39.....	33
4.1.2 Parámetros cinéticos de crecimiento para <i>B. japonicum</i> y <i>A. brasilense</i> .....	35
4.1.3 Cinética de crecimiento de <i>A. brasilense</i> en medio Balatti.....	36
<b>4.2 Evaluación de las colonias de <i>A. brasilense</i> AZ 39 en diferentes medios sólidos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Viabilidad y compatibilidad entre los géneros estudiado.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Cinética de crecimiento de <i>B. japonicum</i> E-109 y <i>A. brasilense</i> AZ 39 en ensayos de producción conjunta.....</b>	<b>39</b>

<b>4.5</b>	<b>Sobrevivencia de las suspensiones microbianas obtenidas.....</b>	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>Evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en plantas de <i>Glycinemax</i>.....</b>	<b>45</b>
4.6.1	Evaluación del crecimiento de las plantas.....	46
4.6.1.1	Número de nódulos totales.....	47
4.6.1.1.1	Infectividad de <i>Bradyrhizobium</i> .....	49
4.6.1.2	Peso seco de la parte aérea de la planta.....	51
4.6.1.3	Volumen radicular.....	52
4.6.1.4	Contenido de nitrógeno y proteína en la parte aérea de la planta.....	53
<b>5.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Consideraciones generales.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Perspectivas futuras.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>62</b>

## **Introducción**

Durante varias décadas se ha venido desarrollando un tipo de agricultura denominada “agricultura intensiva”. Entre sus prácticas, se incluyen el uso de dosis elevadas de fertilizantes de síntesis químicas para el incremento de la producción y otros productos fitofármacos tales como fungicidas y plaguicidas, empleados para mantener los cultivos libres de enfermedades y plagas.

La necesidad de abastecer alimentos a la población mundial, condicionó a mantener los rendimientos en los cultivos, con la intención de no provocar degradación de los recursos, ni contaminar el medio ambiente y proteger la salud humana. Estos objetivos llevaron al surgimiento de nuevas tecnologías, diseñadas para mejorar la productividad de sistemas de agricultura a largo plazo, que contribuyen a la conservación del suelo, tendiente a cultivarlo conservando al máximo la calidad del medio ambiente, con el fin último de preservar y regenerar los recursos naturales, y producir alimentos sanos y seguros (Benbrook, 1999). Un ejemplo de este tipo de tecnologías emergentes lo representa la producción de biofertilizantes, que mejoran el crecimiento vegetal, controlan patógenos, acorde con una agricultura sostenible.

### **1.2 Cultivo de soja en el país**

#### **1.2.1 *Glycine max***

La soja, se ubica sistemáticamente dentro de la Familia *Fabaceae*, Orden *Fabales*, Subclase *Rosidae*, Clase *Magnoliopsida*.

Su altura varía entre los 20 cm y los 2 m. Las vainas, tallos y hojas están cubiertas por finos tricomas marrones o grises. Las hojas son trifoliadas, y caen antes de que las semillas estén maduras. Las flores son grandes e inconspicuas, nacen en la axila de la hoja y son blancas, rosas o púrpuras (figura 1.1).

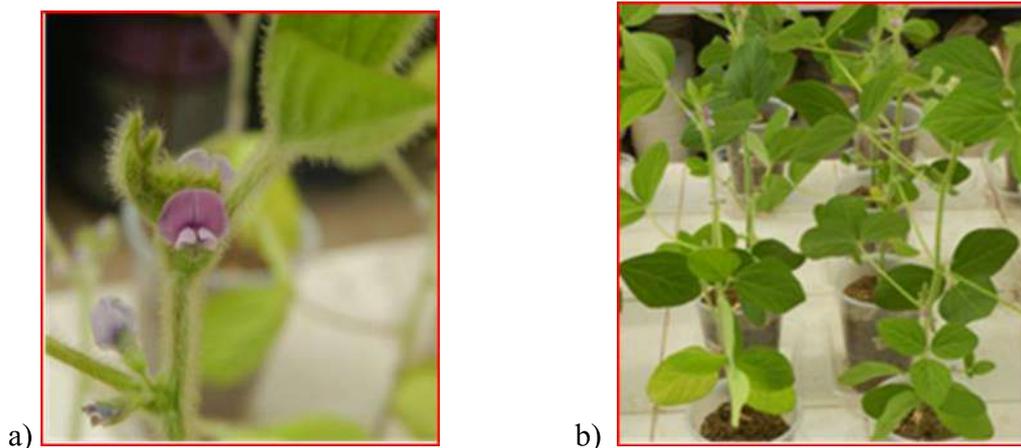


Figura 1.1: Fotografía de *Glycine max*) floración b) hojas

La soja es cultivada por sus semillas, de contenido medio de aceite y alto de proteína. El grano de soja y sus subproductos (aceite y harina de soja, principalmente) se utilizan en la alimentación humana y del ganado.

Se reconoce que la alta demanda de nitrógeno del cultivo, estimada en unos 80 kg/Tn de grano producido, es mayoritariamente cubierta a partir del proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), resultado de la simbiosis con rizobios. El cultivo, obtiene de esta forma entre el 30 y el 94% de sus requerimientos de nitrógeno.

El proceso de FBN ocurre en respuesta a relaciones fisiológicas reguladas por el cultivo, por lo que se requiere un óptimo manejo agronómico, de manera tal que la provisión de fotoasimilados no limite la correcta actividad nodular durante el período de llenado de granos. En este contexto, la nutrición balanceada (en particular fosfatada) presenta un papel preponderante e insustituible, dado que es un elemento que participa de todos los procesos energéticos en los seres vivos.

El uso de fuentes nitrogenadas, si bien induce a un mejor crecimiento de la soja, afecta negativamente el proceso de FBN y no es una práctica recomendable en condiciones de buen manejo de la inoculación. Cuando hay suficiente disponibilidad de nitrógeno en el suelo, la planta, por razones de economía energética, privilegia la incorporación de nitrógeno edáfico por sobre el derivado de la atmósfera.

Los beneficios por el uso frecuente de la inoculación en soja se traducen no sólo en los rendimientos de los cultivos sino también en su calidad, como por ejemplo, en la concentración de proteínas. La respuesta a la aplicación de inoculantes, en términos de rendimiento en grano o concentración de proteínas, es mucho mayor en lotes sin

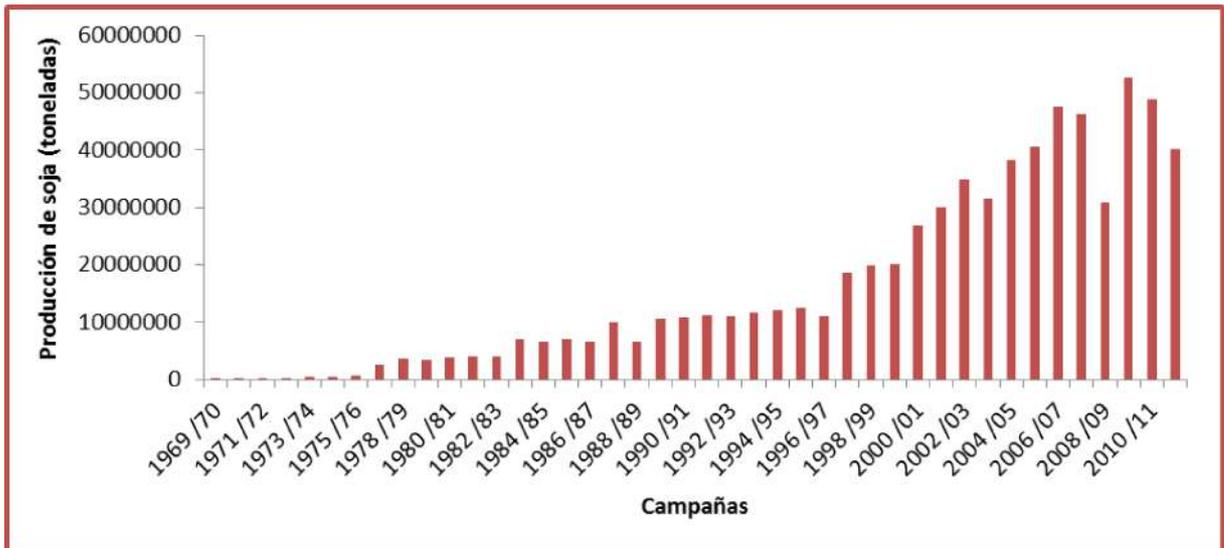
antecedentes del cultivo, dada la ausencia de cepas nativas capaces de formar simbiosis y fijar eficientemente nitrógeno (Ferraris *et al.*, 2006).

De las veintitrés provincias de nuestro país, doce poseen superficie implantada con soja, y su mayor producción se da en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires (Figura 1.2). La producción de soja total del país se ha incrementado en forma casi exponencial a partir de la campaña 1997/98, siendo la producción de la última campaña de 52.677.371 toneladas (Figura 1.3). En nuestra provincia, su cultivo ha aumentado a partir de la campaña 2000/01, pasando de 38.200 hectáreas de superficie implantada en 1999/00 a 148.500 hectáreas de superficie implantada en 2000/01. Así mismo la producción aumentó de 78.800 toneladas en 1999/00 a 253.945 toneladas en 2000/01 (Figura 1.4). Tanto la superficie implantada, como la producción de soja en la última campaña, 2009/10, ha superado al cultivo de girasol, que hasta ahora era el cultivo más importante de la provincia, siendo la superficie implantada de soja de 405.400 hectáreas y la producción de 786.356 toneladas, frente a 334.400 hectáreas y 390.850 toneladas de girasol ([www.minagri.gob.ar](http://www.minagri.gob.ar)).

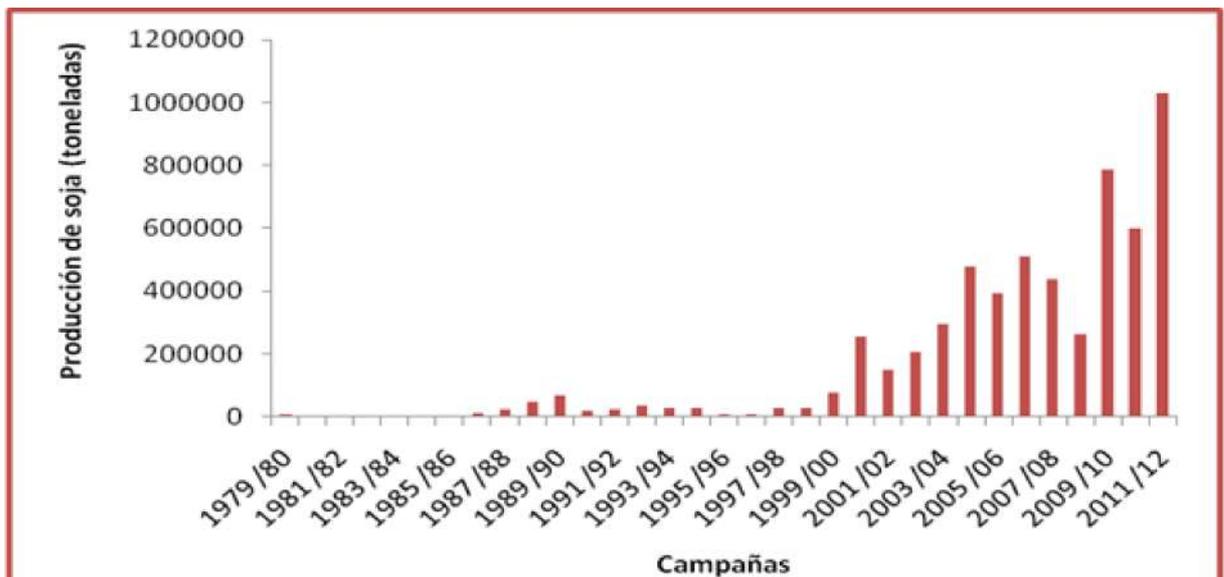
Argentina es el tercer país productor de soja a nivel mundial, ubicado detrás de Estados Unidos y Brasil, y es el primer exportador a nivel mundial de harina y aceite de soja, lo cual representa el 34 % de las exportaciones mundiales totales. La mayor parte de las exportaciones de soja y sus derivados tienen como destino China. Se calcula que los ingresos debido a la exportación ascienden a 8.600 millones de dólares, aproximadamente, para la campaña 2010/2011 ([www.fyo.com](http://www.fyo.com); [www.usda.com](http://www.usda.com)).



**Figura 1.2:** Dispersión geográfica del cultivo de soja en el país, en función del área sembrada promedio de las últimas cinco campañas. SAGPyA/CNA 2002



**Figura 1.3:** Producción de Soja, Total País. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP.)



**Figura 1.4:** Producción de Soja, Provincia de La Pampa. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP).2013

La inoculación mixta de leguminosas con diferentes especies de rizobacterias promotoras del crecimiento de vegetal (PGPR) ha sido reportada como responsable del incremento en la tasa de nodulación, materia seca y rendimientos, en diferentes leguminosas (Cassán *et al.*, 2009). Por lo tanto, un aspecto fundamental a ser estudiado sobre el empleo de co-inoculaciones, es la evaluación de la interacción que puedan tener los microorganismos y los efectos de esa interacción sobre la planta (Felici *et al.*, 2008).

### **1.3 Biofertilizantes**

Los biofertilizantes o también conocidos como inoculantes son productos tecnológicos cuyo principio activo son microorganismos vivos, que tienen la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente.

Los estándares de calidad de los inoculantes varían según los países. La legislación Argentina establece una concentración estándar en los inoculantes de  $10^9$  UFC/gr o ml, a la fecha de elaboración y  $10^8$  UFC/gr o ml al vencimiento (SAGyP Resolución 310/94: 1994). En cuanto a la presencia de contaminantes, la legislación no establece que los inoculantes deban ser formulados sobre soportes estériles. Por definición, un soporte estéril debe estar libre de contaminantes y, en la práctica, un requerimiento común es la presencia de menos de  $10^6$  UFC/g o ml de contaminantes, en un producto que contenga  $10^9$  UFC/g o ml de rizobios.

Además, se debe tener en cuenta los requerimientos para que un inoculante sea de buena calidad, o sea, ser potencialmente eficiente, que son: a.- que provea un adecuado número de bacterias al momento de su utilización, b.- que no contenga o contenga una baja población de microorganismos contaminantes, c.- que produzca una efectiva promoción del crecimiento vegetal y d.- que el soporte utilizado otorgue las propiedades adecuadas a la sobrevivencia de los rizobios (Gómez *et al.*, 1997).

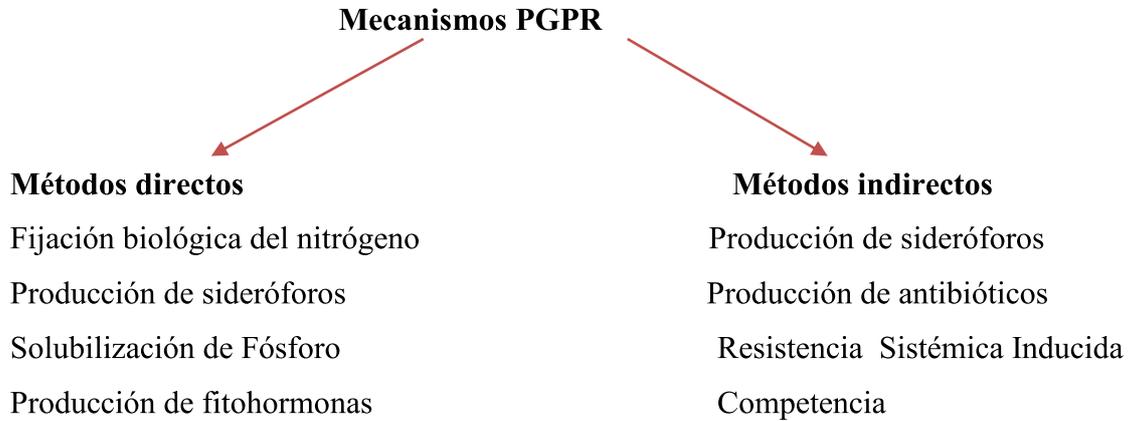
Sin embargo, Gómez *et al.*, (1997) evaluaron inoculantes comerciales provenientes de diversas compañías de Argentina y señalaron que la calidad promedio era pobre, dada la cantidad de rizobios que estos productos aportarían por semilla, la cual no sería la adecuada por ejemplo, para lograr una nodulación eficiente. Sin embargo, indicaron que la tecnología de producción de inoculantes de calidad está disponible, y que el control de su eficacia sería una herramienta necesaria para mejorar los inoculantes que se ofrecen en el mercado. Al mismo tiempo, el costo de estos productos biológicos, debe ser competitivo en relación a los fertilizantes tradicionalmente empleados en base a productos químicos, respecto tanto a los resultados que se obtengan como a la demostración de ser una práctica menos contaminante para el medio ambiente.

#### **1.4 Bacterias promotoras del crecimiento de vegetal ó PGPRs:**

El suelo, es un sistema natural colonizado por varios microorganismos incluyendo bacterias, hongos y actinomicetos (Foster, 1988) y se denomina rizosfera, a la zona donde induce la proliferación de microorganismos por la presencia de raíces de las plantas y es a su vez donde tiene lugar una interacción dinámica entre la planta y los microorganismos que la habitan. Las bacterias que crecen en la rizosfera se denominan rizobacterias. Dentro de este grupo, se encuentran las que poseen algún tipo de mecanismo directo o tienen alguna capacidad para promover el crecimiento de las plantas, se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento de vegetal óPGPRs (de la sigla en inglés *PlantGrowth-PromotingRhizobacteria*) (Kloepper *et al.*, 1989; Glick, 1995). Dentro de este grupo se encuentra un amplio número de géneros bacterianos tales como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, entre otros.

Dada la enorme expansión en el estudio de estas bacterias, actualmente se propone la separación en dos grupos: las PGPB o Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas que afectan estrictamente el crecimiento vegetal, y las “biocontrol-PGPB”, cuando se refiere a bacterias que controlan fitopatógenos, ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta. Aunque esta propuesta parece no haber sido ampliamente aceptada, el termino de PGPB es aplicable a bacterias que influyen directamente sobre el metabolismo de plantas, promoviendo el aumento de toma de agua y nutrientes, el desarrollo del sistema radical y la estimulación del funcionamiento de otros microorganismos beneficiosos presentes en la rizosfera. Pueden afectar el crecimiento vegetal mediante el suministro de nutrientes a la planta o facilitando la captación de nutrientes. La clasificación biocontrol-PGPB, es utilizada para describir las bacterias que adicionalmente tienen la capacidad de suprimir a fitopatógenos por la producción de metabolitos inhibitorios o por la inducción de resistencia natural en la planta. Esta clasificación, permite incluir otras bacterias beneficiosas que no son rizobacterias. Los mecanismos que explicarían las respuestas de desarrollo y productividad de los cultivos a la inoculación con estos consorcios bacterianos, pueden ser directos o indirectos. Entre los primeros, se puede mencionar por ejemplo, la fijación simbiótica de nitrógeno, transformación de especies químicas de fósforo y/o hierro en formas asimilables para la planta, liberación de fitohormonas. Los mecanismos indirectos, implican controles biológicos de parte del microorganismo

PGPR, disminuyendo o previniendo el efecto deletéreo de otros fitopatógenos(Dobbelaereet *al.*, 2003).



#### **1.4.1 Métodos directos**

La promoción directa comprende aquellos microorganismos que proveen a la planta compuestos que ellos mismos sintetizan ó bien facilitan a los vegetales la toma de ciertos metabolitos inmovilizados en el medioambiente.

##### **1.4.1.1 Producción de fitohormonas**

Las fitohormonas están involucradas en el control del crecimiento vegetal y son la base de todos los procesos importantes para el desarrollo de las plantas. La secreción bacteriana de fitohormonas puede impactar sobre la arquitectura de la raíz mediante la inducción de pelos radiculares y raíces laterales que participan en la absorción de agua y nutrientes contribuyendo así al crecimiento vegetal (Persello Carticaux *et al.*, 2003).

Las fitohormonas más comunes producidas por PGPRs son auxinas, citoquininas, giberelinas y en menor medida etileno. La mayor atención ha sido puesta en los microorganismos productores de auxinas. Los microorganismos aislados de la rizosfera de varios cultivos poseen un gran potencial para producir y liberar auxinas al medio como metabolitos secundarios (Brow, 1974; Kampert *et al.*, 1975). El ácido indol acético (AIA) es la más común y mejor caracterizada de las auxinas. Este promueve la longitud y la formación de las raíces laterales (Pilet and Saugy, 1987). El desarrollo precoz de las raíces es una ventaja para las plántulas jóvenes ya que favorece su capacidad de anclarse en el suelo y obtener agua y nutrientes de su ambiente,

favoreciendo su supervivencia. Son productores de auxinas los géneros bacterianos *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, hongo micorrízicos y algas, entre otros.

Las citoquininas son una clase de fitohormonas producidas tanto por plantas como por microorganismos (Aloni *et al.*, 2006). La producción de citoquinina ha sido reportada en varias PGPR incluyendo, *Arthrobacter spp.*, *Azospirillum spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Paenibacillus polymyxa* (Cacciari *et al.*, 1989; Salamone *et al.*, 2001; Perrig *et al.*, 2007; Timmusk *et al.*, 1999). Éstas estimulan la división celular de las plantas, inhiben la elongación de la raíz primaria y la formación de raíces laterales, pero puede promover el desarrollo pelos de la raíz (Riefler *et al.*, 2006; Silverman *et al.*, 1998).

Las giberelinas mejoran el desarrollo de los tejidos de la raíz de la planta y promueven la elongación de la raíz y extensión de las raíces laterales (Barlow *et al.*, 1991; Yaxley *et al.*, 2001). La producción de giberelinas se ha documentado en varios PGPR como *Azospirillum spp.*, *Azotobacter spp.*, *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *Heraspirillum seropedicae*, *Gluconobacter diazotrophicus* y rizobios (Bottini *et al.*, 2004; Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001).

Un grupo diverso de microorganismos patógenos y no patógenos son capaces de producir etileno. Algunos PGPRs como *A. brasilense* han demostrado que producen pequeñas cantidades de etileno a partir de la metionina como un precursor (Perrig *et al.*, 2007; Thuler *et al.*, 2003), y esta capacidad parece promover el desarrollo de pelos de la raíz en plantas de tomate (Ribaudó *et al.*, 2006).

#### **1.4.1.2 Solubilización de fósforo**

Se han aislado de diferentes suelos, bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a distintos géneros, tales como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Nahas, 1996; Kumar *et al.*, 2001). Resulta de interés que estas bacterias además posean otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal. El empleo de microorganismos que ayuden a la solubilización de este elemento, podría permitir una mayor eficiencia de absorción de este nutriente en suelos con bajo contenido de

fósforo. Después del nitrógeno, el fósforo es el nutriente inorgánico más requerido por las plantas y microorganismos. Además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en forma orgánica como inorgánica (Alexander, 1980). Las plantas deberán absorberlo del suelo donde se encuentra en muy baja concentración, debido a que el fosforo soluble reacciona con iones como el calcio o el aluminio que provoca su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Rodriguez and Fraga, 1999).

Se considera que la solubilización de diferentes rocas fosfatadas y otras fuentes de fósforo inorgánico por los organismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad disponible para las plantas (Illmer and Schinmer, 1992).

#### **1.4.1.3 Producción de sideróforos**

La capacidad de producir sideróforos, es uno de los mecanismos por los cuales las bacterias PGPR pueden ejercer antagonismo frente a microorganismos fitopatógenos (Carson *et al.*, 1992). Por ejemplo, el control de hongos fitopatógenos, que provocan enfermedades en diferentes cultivos de gran importancia económica.

En condiciones de escasez de hierro producen y excretan los sideróforos al medio. Esta posibilidad de quelar el hierro favorece la competencia por este nutriente de la bacteria productora frente al patógeno vegetal sin afectar el crecimiento de la planta, ya que la misma necesita cantidades menores a las requeridas por los microorganismos.

#### **1.4.1.4 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)**

La fijación biológica de nitrógeno llevada a cabo por la simbiosis de bacterias con leguminosas, tiene una gran importancia en agricultura, no solo por las cantidades de nitrógeno que incorpora al suelo, que puede alcanzar cifras superiores a los 200 kg N/ha.año, sino que trata de un sistema más eficiente, menos contaminante y más económico que la fertilización mineral.

Para que tenga lugar con éxito, dada su especificidad, es preciso que haya en el suelo poblaciones nativas capaces de nodular y fijar nitrógeno de forma efectiva con la leguminosa que se vaya a cultivar. En ocasiones, por causas muy diversas, no existen esas poblaciones, su densidad en el suelo es baja, o la capacidad de fijación de nitrógeno con la leguminosa a cultivar es pobre, siendo necesario incorporar con la semilla,

rizobios altamente efectivos en la fijación de nitrógeno, mediante la práctica de la inoculación.

La simbiosis se inicia con el intercambio de señales entre los rizobios y las raíces de las leguminosas con el objeto de reconocerse mutuamente, ya que esta relación es muy específica (Broughton *et al.*, 1999). Para cada especie de leguminosa existe un conjunto de rizobios que puede formar simbiosis exitosa (Sawada *et al.*, 2003).

Las plantas leguminosas secretan compuestos específicos que atraen a los rizobios y en respuesta a ellos activan una serie de genes implicados en la nodulación. El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. La comunicación entre los simbioses comienza con la liberación a la rizósfera por parte de la leguminosa, de metabolitos secundarios contenidos en sus exudados de semilla y de raíz, principalmente flavonoides, que hacen que específicamente los rizobios, sean atraídos químicamente hacia la región apical de los pelos radicales. Estas moléculas varían en cantidad y composición, dependiendo de la especie vegetal de que se trate. Así, estos compuestos son la primera molécula señal emitida dentro del diálogo molecular que se establece entre la planta y la bacteria. En estas últimas se inicia la transcripción de los genes denominados de nodulación (genes *nod*). La transcripción de los genes *nod* de la bacteria involucra a una proteína de origen bacteriano llamada NodD, la cual al entrar en contacto con los flavonoides modifica su conformación y activa el proceso. La expresión de los genes *nod*, da como resultado la producción de un conjunto de enzimas encargadas de la síntesis y secreción de los denominados factores de nodulación (factores Nod) (Cooper, 2007). No todos los rizobios forman los mismos factores Nod, la estructura química incluye la adición de diferentes grupos químicos, lo que los hace específicos de cada especie de rizobio. Este hecho marca el alto grado de especificidad en esta relación simbiótica. Los factores Nod juegan un papel esencial dentro del establecimiento de la simbiosis y mimetizan muchas de las respuestas que se inducen en los pelos radicales en presencia de los rizobios. (Cooper, 2007). Los factores Nod específicos secretados a la rizósfera por el rizobio, al ser reconocidos por la planta huésped, inducen a concentraciones muy bajas (pico y nanomolares) una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la planta. La bacteria penetra entonces en el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal de infección, que avanza por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales, y estimula la división de las células vegetales. Esta

serie de sucesos originarán un nuevo órgano responsables de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico denominado nódulo (Long, 1989; van Rhijn and Vanderleyden, 1995; Cooper , 2007) De esta manera, cuando el cultivo está bien nodulado, hasta el 80% de los requerimientos de nitrógeno, puede provenir de la fijación biológica que realizan estas bacterias (González *et al.*, 1997). Si la nodulación no se produjo o no está funcionando adecuadamente, este aporte de nitrógeno del aire se reduce o se anula. En particular, ha sido muy estudiada la interacción simbiótica de ciertos rizobios con leguminosas, entre los cuales se pueden citar los géneros *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*.

#### **1.4.1.5 Limitaciones de la simbiosis**

Las carencias de P, K, Ca, S y de micronutrientes disminuyen la formación de nódulos y por consiguiente la FBN. La simbiosis es sensible a condiciones de anegamiento, con sólo 2-3 días de inundación se puede provocar una alta mortandad de nódulos.

Los efectos del estrés hídrico son directos sobre la nodulación y la FBN: las siembras en condiciones secas provocan la mortandad de bacterias y disminuyen la posibilidad de lograr una nodulación apropiada; la falta de agua en etapas tempranas retrasa la aparición de los nódulos y la falta de agua en etapas reproductivas limita la FBN, restringiendo los rendimientos por menor aporte de nitrógeno para la formación de granos.

La salinidad y la falta de aireación en el suelo también influyen en forma negativa sobre la simbiosis. Se ha detectado con frecuencia en sitios con muchos años de agricultura (Norte de Buenos Aires, Sur de Santa Fe, Córdoba Centro, etc.) una fuerte compactación del suelo, esto disminuye las posibilidades de lograr una óptima nodulación por problemas de aireación y promueve a una senescencia temprana de los mismos.

#### **1.4.2 Métodos indirectos**

Cuando la estimulación del crecimiento de las plantas es indirecta, la bacteria libera algún metabolito, que afecta a otros factores rizosféricos que revierten en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta (Kloepper, 1992).

#### **1.4.2.1 Producción de antibióticos**

Muchas bacterias, en particular las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, son capaces de controlar patógenos, sobre todo hongos, sintetizando moléculas antifúngicas. Asimismo, existen cepas bacterianas capaces de sintetizar sustancias contra otras bacterias, los antibióticos (Whipps, 2001) (Figura 1.5 a).

Principalmente el género *Pseudomonas sp.* tiene la capacidad de producir antibióticos, los cuales están involucrados directamente con la inhibición de otros microorganismos del suelo. Por ejemplo dentro de estos compuestos tenemos al 2,4 diacetilfloroglucinol (DAPG), amicina, fenazina, pirrolnitrina, pioluterina entre otros, los cuales han demostrado ser altamente eficientes en el control biológico de fitopatógenos (Handelsan and Stabb, 1996).

#### **1.4.2.2 Resistencia sistémica inducida**

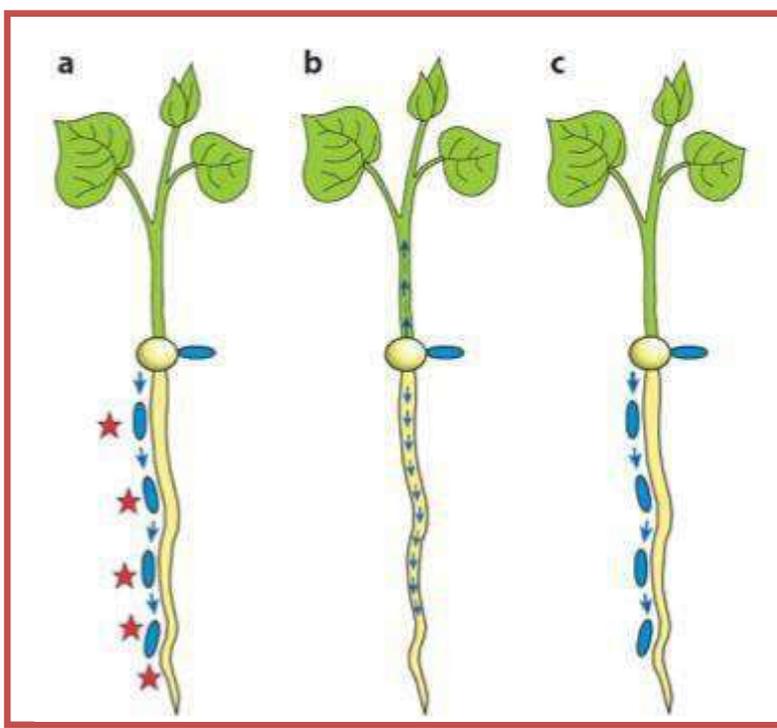
En diferentes cepas bacterianas, la resistencia sistémica inducida ha sido demostrada contra hongos, bacterias y virus en diversos cultivos (van Loonet *al.*, 1998). Determinadas bacterias inducen la resistencia sistémica, produciendo diferentes compuestos tales como lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico; sin embargo, esta inducción depende de que las bacterias colonicen el sistema radical en número suficiente (Figura 1.5 b). Un ejemplo son las bacterias del género *Pseudomonas* las cuales son capaces de inducir resistencia por parte de la planta, incrementando la velocidad y los niveles de síntesis de compuestos llamados fitoalexinas, implicados en la defensa de la planta. La señal responsable de la inducción de resistencia y del aumento en la acumulación de fitoalexinas está inducida por los lipopolisacáridos de la bacteria (Lemanceau and Alabouvette, 1993).

Existe dos tipos de resistencias : la resistencia sistémica adquirida y , que es la respuesta ante la agresión de un patógeno y la resistencia sistémica inducida, que es la respuesta de la interacción de la planta con los microorganismos no patógenos, donde no media ningún tipo de agresión. La primera se caracteriza por la acumulación de ácido salicílico y proteínas relacionadas a la patogénesis, desacatando entre ellas a las glucanasas y quinasas que permiten aumentar la resistencia de las plantas (van Loon *et al.*, 1998). En la resistencia sistémica inducida no se conoce en detalle cuales son los inductores responsables de la reacción de defensa del vegetal. Un microorganismo que

induzca la resistencia sistémica inducida, después colonizar la raíz, debe producir una señal que recepta la planta, y este mensaje transportado a través de la misma dispara una serie de eventos que concluyen con un estado de defensa ante un amplio espectro de patógenos.

### 1.4.2.3 Competencia

Las bacterias PGPR presentan una agresiva colonización de la rizósfera desplazando así a otras bacterias y hongos perjudiciales para la planta (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Esta competencia entre los microorganismos se genera por el espacio o por nutrientes como el C, N, Fe, u ocupar efectivamente un nicho en la rizósfera. (Figura 1.5 c).



**Figura 1.5:** Mecanismos de control biológico de enfermedades en plantas por bacterias. En todos los casos ilustrados aquí, el biocontrol comienza con el revestimiento de semillas con las bacterias de biocontrol. **(a)** Antibiosis. La bacteria coloniza las raíces en crecimiento y libera moléculas antibióticas alrededor de la raíz, perjudicando así los patógenos próximos a la raíz (indicado por las estrellas). **(b)** La Resistencia Sistémica Inducida (ISR). Muchos productos bacterianos inducen el sistema de señalización, lo cual puede resultar en la protección de toda la planta contra las enfermedades causadas por organismos diferentes. **(c)** Competencia. Las bacterias de control biológico actúan compitiendo por los nutrientes y los nichos que ocupan en la raíz. (Lugtenberg and Kamilova, 2009)

## **1.5 Microorganismos PGPRs:**

### **1.5.1 Género *Bradyrhizobium*.**

Estas bacterias son bacilos de 0,5-0,9 x 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ , Gram negativas. Se mueven con un flagelo polar o subpolar. Este género consiste de cepas de crecimiento lento, tienen un tiempo de generación de aproximadamente 8 hs o más. Son productoras de álcali, crecen en colonias circulares hasta 1 mm, opacas, rara vez translúcidas, blancas y convexas entre 5 y 7 días de incubación, con tendencia a tener textura granulosa (Wang and Martínez, 2007). Las tres especies definidas de este género, *B. japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* y *B. liaoningense*, pueden nodular soja (*Glycine max*) y fijar nitrógeno molecular; y en algunos casos se ha reportado que solubilizan compuestos de fósforo inorgánico (Halder and Chakrabartty, 1993). *B. japonicum* tiene una amplia gama de plantas huéspedes, incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas.

### **1.5.2 Género *Azospirillum***

Son actualmente reconocidas 7 especies en este género, las primeras descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* siendo estas, las más ampliamente estudiadas.

*Azospirillum* es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizosfera de la plantas. Tiene un metabolismo muy versátil que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo ambiente rizosférico. Como fuente nitrogenada esta bacteria puede utilizar un amplio rango de sustratos como amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorables pueden enquistarse, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciéndose una acumulación de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), que le sirve como reserva de fuente de carbono (Okonet *al.*, 1976).

Esta bacteria presenta movilidad en espiral, que le es característica para su identificación rutinaria en el microscopio, al igual que su forma vibroide y el pleomorfismo (Döbereiner, 1992). En medio líquido produce un solo flagelo mientras que en medio sólido se induce varios flagelos laterales, la presencia de estos le proporciona la movilidad para migrar a lugares con nutrientes más favorables.

Para su aislamiento se puede partir de suelo rizosférico o de la superficie de las raíces de numerosas plantas hospedadoras o del interior de los tallos o raíces. El medio cultivo

utilizado para el enriquecimiento de estas especies de *Azospirillum* es el Nfb con malato como fuente de carbono, (Döbereiner *et al.*, 1976) este es utilizado para evaluar la actividad reductora de acetileno, como indicativo de la fijación de nitrógeno. Donde el vire del azul de bromotimol es considerado como positivos para el aislamiento en cultivo puro de la bacteria.

Una característica fenotípica para el reconocimiento tentativo de este género es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en el medio con colorante de Rojo Congo (Rodríguez-Cáceres *et al.*, 1982) aunque en este medio pueden hallarse colonias mutantes de *Azospirillum* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no indentificados. (Bastarrachea *et al.*, 1987).

En los últimos años se ha visto un creciente interés en las bacterias de este género, por su posible contribución en el rendimiento de varios cereales (Kapulnik *et al.*, 1983).

Se ha demostrado que los cultivos de *Azospirillum* producen auxinas, citoquininas y sustancias similares a giberelinas, hormonas que participan en el desarrollo vegetal (Kapulnik *et al.*, 1985) por lo tanto, resultan beneficiosas para la estimulación del desarrollo vegetal, el rendimiento del grano y semillas y fijación de nitrógeno (Okon, 1982). Además, la capacidad de producir sideróforos por algunas cepas de *A. brasilense* puede ser de gran importancia durante la colonización del ambiente rizosférico y de la superficie de las raíces al ejercer efectos antagónicos contra otros miembros de la comunidad microbiana patógena.

Por otra parte, existen varios reportes que describen efectos benéficos de *Azospirillum* spp, sobre la simbiosis entre rizobios y leguminosas (Raverker and Konde, 1988; Burdman *et al.*, 1997; Tilak *et al.*, 2006; Remans *et al.*, 2007), mediante la estimulación de la cantidad de flavonoides exudados por la raíz de la planta, los que a su vez inducen la expresión de los genes nod, favoreciendo la nodulación y por tanto el nitrógeno fijado. (Itzigsohn *et al.*, 1993;; Burdman *et al.*, 1996a; Burdman *et al.*, 1997; Remans *et al.*, 2007). Al mismo tiempo, Remans *et al.*, (2008) resaltan que existe la necesidad de continuar investigando al respecto, con el fin de evaluar por un lado, la relevancia de estos hallazgos en escala de campo, y por el otro, para optimizar procedimientos de co-inoculación para su aplicación en las prácticas agrícolas.

Las especies *Azospirillum* posee la capacidad de agregarse y flocular, y esta propiedad podría afectar positivamente su dispersión y sobrevivencia en el suelo. Los datos sugieren que los EPS y CPS están involucrados en esta agregación. Por otra parte, estos polisacáridos juegan un importante rol en la interacción de *Azospirillum* con las raíces de las plantas, (Jofre' *et al.*, 2004; Burdman *et al.*, 2000; Michiels *et al.*, 1991; Moens and Vanderleyden, 1996; Steenhoudt and Vanderleyden, 2000).

### **1.6 Interacciones microbianas**

Las bacterias están sujetas constantemente a cambios ambientales, que requieren de una coordinación en su comportamiento colectivo para poder adaptarse y sobrevivir. Esto es particularmente importante en bacterias que interactúan con hospedadores eucarióticos, durante el establecimiento de asociaciones patogénicas o simbióticas. Una forma de lograr esta coordinación es a través del sistema regulatorio conocido como *quorum sensing* (QS). Esta forma de regulación, media la expresión génica a través de la interacción de moléculas señal y proteínas regulatorias en una forma dependiente de la densidad poblacional. Los procesos mediados por QS incluyen: patogénesis, simbiosis, conjugación de plásmidos y producción de antibióticos. Desde una perspectiva ecológica amplia, los comportamientos modulados por QS facilitan la adquisición de nutrientes, la ocupación de nichos, la respuesta colectiva ante competidores y el escape comunitario ante una probable destrucción de la población. Muchas leguminosas secretan compuestos que pueden interferir con las moléculas de QS, en un proceso conocido como *quorum quenching* (Patankar y González, 2009, a; Badri, *et al.*, 2009).

En respuesta a las densidades celulares, las señales de QS o autoinductores permiten a las poblaciones bacterianas coordinar la expresión de genes importantes para la colonización e infección de sus hospedadores. Estas señales, también participan en la señalización entre reinos, induciendo respuestas específicas por parte de los hospedadores. En el caso de la interacción microorganismo- leguminosa, se cree que la planta podría distinguir entre señales de *quorum sensing* provenientes de distintas especies bacterianas, produciendo así respuestas específicas (Soto *et al.*, 2009).

### **1.7 Proceso biotecnológico de producción de biofertilizantes**

La producción de inoculantes, implica una primera fase de selección de estirpes que sean capaces de nodular y establecer simbiosis efectivas con las variedades de leguminosas cultivadas. Según las circunstancias, será necesario también que estas estirpes compitan con éxito con las nativas, para colonizar el suelo y nodular. También interesa que las estirpes seleccionadas se adapten al proceso de producción de inoculantes, siendo capaces de alcanzar altas concentraciones en medios de cultivo estándar, en fermentadores industriales, tolerando los soportes y envases que se utilizan comercialmente, sobreviviendo bajo condiciones normales de almacenamiento y sobre las semillas inoculadas.

Actualmente, la industria de los inoculantes utiliza preferentemente formulados en base a suspensiones de rizobios en soluciones acuosas u oleosas debido a su fácil aplicación. Las bacterias deben ser capaces de mantener su viabilidad por períodos de hasta seis meses, lo cual implica una adaptación para sobrevivir, en muchos casos, bajo condiciones de estrés térmico y/o ausencia de nutrientes, manteniendo su capacidad de establecer simbiosis efectiva con el huésped y competir con especies nativas o naturalizadas. A tal fin, se incorporan aditivos que favorecen la adhesión y la viabilidad de las bacterias sobre las semillas inoculadas. Este conjunto de requerimientos, ha llevado a intensificar los estudios hacia la optimización del proceso biotecnológico de producción de biofertilizantes y hacia el mejoramiento de las prácticas de inoculación (Thuar *et al.*, 2007).

Por otro lado, cabe señalar que la legislación actual respecto de la formulación de inoculantes para leguminosas, exige un alto número celular, del orden de  $10^8$  microorganismos/mL al momento del vencimiento. Existe gran variedad de reportes bibliográficos que indican que la densidad celular, a través de “moléculas señal” producidas por las células, actuaría como reguladora para una multiplicidad de respuestas como por ejemplo, en este caso particular, sobre el comportamiento simbiótico, en cuanto a la infectividad y la capacidad de nodular de la cepa (Sánchez-Contreras *et al.*, 2007). En este sentido, la bibliografía es controversial, indicando comportamientos opuestos, dependiendo de cada rizobio en particular. Por ejemplo, en

*Bradyrhizobium japonicum* la acumulación de la molécula señal en cultivos de elevada densidad celular, estaría regulando negativamente la expresión de los genes de nodulación (Loh and Stacey, 2003), mientras que para *Sinorhizobium meliloti*, este comportamiento sería opuesto (Patankaret al., 2009). De esta manera, la densidad celular estaría jugando un papel fundamental sobre el comportamiento simbiótico de los rizobios, si se considera que la capacidad infectiva podría traducirse en una competitividad diferencial frente a cepas nativas existentes en la rizósfera, cuando se los inocula a campo.

Hoy en día, la generación de consorcios microbianos para la producción de fertilizantes mixtos, representa un desafío importante para el diseño de los mismos. La diversidad de las especies en un consorcio garantiza la supervivencia, pero al estar presentes diversas vías metabólicas entre sus miembros, mejoraría la adaptación del mismo a entornos cambiantes. Srinivasan y Mathivanan, (2009) reportaron efectos beneficiosos en cultivos de girasol tras la aplicación de un consorcio bacteriano para biocontrol, en el que se establecería un sinergismo entre los cuatro microorganismos que lo conforman.

Sin embargo, son escasos los reportes sobre el proceso biotecnológico de producción de las diversas suspensiones microbianas y su posterior estabilización, para ser usadas en las prácticas agrícolas de inoculación de cultivos. Es por ello, que en este trabajo se proponen estudios para determinar la compatibilidad entre los géneros bacterianos *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* en un mismo medio de cultivo, orientados a la optimización del proceso de obtención de consorcios microbianos por medio del crecimiento conjunto, como una propuesta estratégica, más rápida y flexible, que podría adaptarse para el desarrollo de diferentes microorganismos PGPR y fijadores simbióticos de nitrógeno, teniendo en cuenta los diferentes factores que pueden afectar la producción, los rendimientos y la productividad, tales como composición de los medios de cultivo, factores físico-químicos, sistemas de cultivo, entre otros.

En base a las consideraciones anteriores, es que se plantea como objetivo de este trabajo de tesina, realizar el desarrollo conjunto, en un mismo proceso fermentativo, de dos géneros bacterianos diferentes, que asegure la obtención de suspensiones celulares de alta concentración celular y óptimo estado fisiológico, destinados a la preparación de consorcios microbianos, que además de mantener la viabilidad de las células durante el tiempo de almacenamiento, mantengan las propiedades PGPR de los mismos, considerando que el tiempo de almacenamiento y la interacción de los diferentes

microorganismos en el consorcio pueden limitar el efecto beneficioso de éstos. De esta manera se podría prevenir los riesgos de ineffectividad de la promoción de crecimiento de las plantas a partir de estos preparados biológicos.

## **2. Hipótesis y objetivos**

### **2.1 Hipótesis**

Es posible desarrollar en forma conjunta dos géneros bacterianos diferentes, que mantengan la viabilidad y las propiedades PGPR, para ser utilizados en la elaboración de biofertilizantes.

### **2.2 Objetivo general**

Obtención de suspensiones bacterianas a través del cultivo conjunto de los géneros *Bradyrhizobium* y *Azospirillum*, destinadas a la producción de biofertilizantes, para la inoculación de cultivos de soja.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1 Microorganismos**

Se utilizaron para el desarrollo del trabajo las siguientes bacterias *Azospirillum brasilense* AZ 39 y *Bradyrhizobium japonicum* E 109. Ambas cepas fueron cedidas por INTA Castelar.

#### **3.2 Métodos de conservación**

Para la conservación de cada cepa se prepararon placas de Petri con medio sólido Balatti (tabla 3.1) para *B. japonicum* E109 y Rojo Congo (tabla 3.3) para *A. brasilense* AZ 39; las cuales fueron sembradas con un repique de tubos que contenían las diferentes cepas. En estas placas se aislaron colonias que se utilizaron para conservar los microorganismos, según las técnicas que se describen a continuación.

##### **3.2.1 Agar inclinado**

Para la conservación a corto plazo en agar inclinado, se prepararon tubos con medio Balatti (tabla 3.1) para *B. japonicum* E 109 y medio Rojo Congo (tabla 3.3) para *A. brasilense* AZ 39. La siembra se realizó por repique de las colonias aisladas obtenidas en las placas y se dejaron crecer en cuarto estufa durante diferentes tiempos, según el microorganismo. Cuando se alcanzó un buen crecimiento, se cubrió la tapa con papel film y se guardaron en heladera a 4 °C.

##### **3.2.2 Congelación**

Para la conservación a largo plazo, se prepararon dos inóculos por cepa, los cuales fueron sembrados con repique de las mejores colonias aisladas obtenidas en las placas anteriormente mencionadas. Estos inóculos se cultivaron en distintos tiempos, según el microorganismo. Se tomó una muestra para determinar la homogeneidad del cultivo mediante observación microscópica. Luego se colocaron en tubos eppendorf y tubos de ensayo, se agregó glicerol al 20% como crioprotector, se cubrió la tapa con papel film y se guardaron en freezer a -20 °C.

### 3.3 Medios de cultivo

En la tabla 3.1 se indica la composición del medio de cultivo Balatti empleado para *Bradyrhizobium japonicum* E 109.

Componentes	Concentración inocular	Concentración Proceso
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 (g/L)	0,50 (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50 (g/L)	0,50 (g/L)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20 (g/L)	0,20 (g/L)
NaCl	0,10 (g/L)	0,10 (g/L)
KNO <sub>3</sub>	0,80 (g/L)	0,80 (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30 (g/L)	0,30 (g/L)
FeCl <sub>3</sub> sc. 10%	0,06 (g/L)	0,06 (g/L)
MnSO <sub>4</sub> sc 10%	0,06 (g/L)	0,06 (g/L)
Extracto de levadura	2,00 (g/L)	2,00 (g/L)
Glicerol	5,00 (g/L)	10,00 (g/L)
pH	6,8-7	6,8-7

**Tabla 3.1:** Composición del medio de cultivo Balatti(Balatti, 1992).

Para medio sólido se adicionó agar-agar en una concentración de 15 g/L y 10 ml /L de Rojo Congo.

Para el crecimiento de *A.brasilense*AZ 39se utilizó el medio de cultivo líquido Nfb descrito en la tabla 3.2

Componentes	Concentración
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 (g/L)
MgSO <sub>4</sub>	0,20 (g/L)
NaCl	0,10 (g/L)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 (g/L)
FeCl <sub>3</sub>	150 (µl/L)
KOH	4,00 (g/L)
Extracto de levadura	0,50 (g/L)
Solución micronutrientes*	2,00 (ml/L)
Acido málico	5,00 (g/L)
Azul de bromotimol	2,00 (ml/L)
pH	6,7-8

**Tabla 3.2:** Composición del medio de cultivo para *A.brasilense* Nfb(Döbereiner *et al.*, 1976).

\* Solución de micronutrientes: CuSO<sub>4</sub> (0.4 g/l); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.12 g/l); H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>(1.4 g/l);Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (1.0 g/l) MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1.5 g/l)

Para el recuento de colonias en placa de *B.japonicum* y *A.brasilense* se utilizaron los medios sólidos Balatti(tabla 3.1) y Rojo Congo RC (tabla 3.3) respectivamente.

Componentes	concentración
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5(g/L)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2(g/L)
NaCl	0,1(g/L)
Extracto de levadura	0,5(g/L)
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,015(ml/L)
Acido málico	5(g/ml)
KOH	4,8(g/L)
Agar	20(g/L)
Rojo congo	15(ml/L)
pH	7

**Tabla 3.3:** Medio Rojo Congo utilizado para *A. brasilense* (RC) (Cáseres Rodríguez, 1982).

### **3.4 Determinación del crecimiento celular**

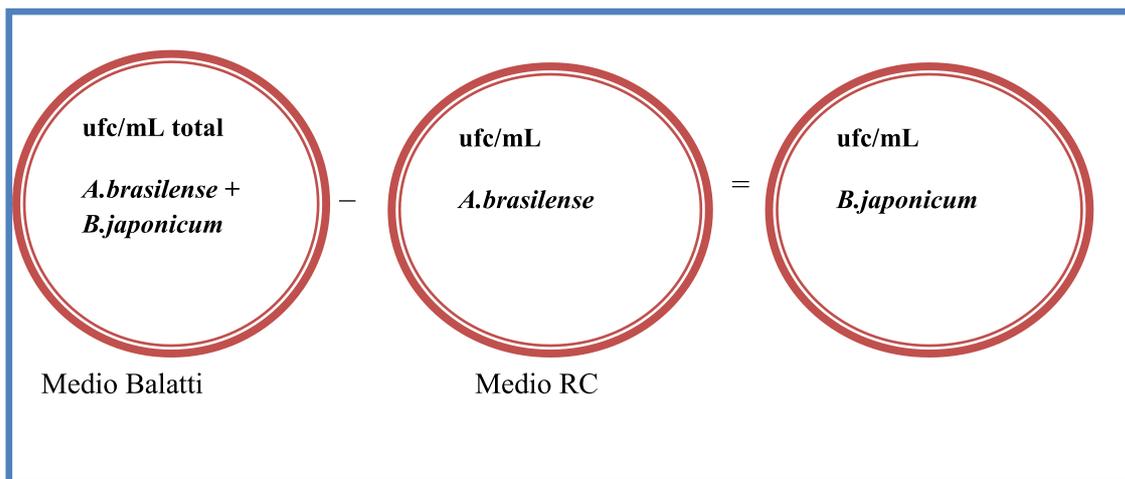
Para la determinación del crecimiento de los microorganismos estudiados, se utilizaron las siguientes técnicas:

#### **3.4.1 Determinación del número de células viables de *A. brasilense* AZ 39 y *B. japonicum* E 109:**

Para la determinación del número de células viables de las cepas estudiadas, se utilizó el método de diluciones seriadas y plaqueo. Esta técnica consistió en realizar diluciones seriadas de las muestras y posterior siembra en las placas de Petri ya adicionado el medio solido de cultivo (Koch, 1981). Estas se colocaron en estufa a 28 °C durante el tiempo necesario para el desarrollo de las colonias dependiendo de la cepa y luego se contaron de las placas que contengan un número de colonias entre 30 y 300.

#### **3.4.2 Determinación del número de células viables de *A. brasilense* AZ 39 y *B. japonicum* E 109 co-producidos:**

Para el recuento de células viables en los ensayos en los cuales se realizó la co-producción de *A. brasilense* y *B. japonicum*, se utilizó el método de diluciones seriadas y plaqueo como se describió anteriormente, diferenciándose en que en este caso primero se procedió a un conteo del número de unidad formadora de colonia (ufc/ml) en el medio Balatti correspondientes al número total y con el medio RC las correspondientes a *A. brasilense*, restándole este último al total se obtuvo el número de ufc/ml de *B. japonicum*. En la figura 3.1 se representa como se procedió para la determinación del número de células viables de las cepas co-producidas.



**Figura 3.1:** Representación de la metodología utilizada para la determinación del recuento de células viables en placas de Petri, en los ensayos de coproducción de las cepas.

### 3.4.3 Condiciones de operación:

Para el desarrollo de los cultivos se utilizó un agitador rotatorio a 250 rpm con 2,5 cm de excentricidad, en cuarto estufa a 28°C.

### 3.4.4 Cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento celular

Los cálculos de los parámetros cinéticos que se calcularon fueron (Ertola *et al.*, 2001):

-velocidad específica de crecimiento  $\mu$ :  $\ln(x/x_0)/t$

-tiempo de generación  $t_g$ :  $\ln 2/\mu$

Donde:

x: concentración final de células (expresadas como n° de células viables/ml)

$x_0$ : concentración inicial de células (expresadas como n° de células viables/ml)

t. intervalo de tiempo considerado

### **3.5 Determinación de la viabilidad y compatibilidad de los diferentes géneros bacterianos estudiados**

Para la determinación de la viabilidad y compatibilidad de las cepas *A.brasilense* AZ 39 y *B.japonicum* E 109 se realizó un test de compatibilidad como el descrito por Anandaraj and Leema Rose Delapierre (2010), que consistió en un ensayo de crecimiento de las cepas, en un estriado en cruz en placas de medios agarizados tanto en RC como en medio Balatti. Los medios agarizados se prepararon y se esterilizaron. Cada medio se vertió en placas de Petri estériles y se esperó a su

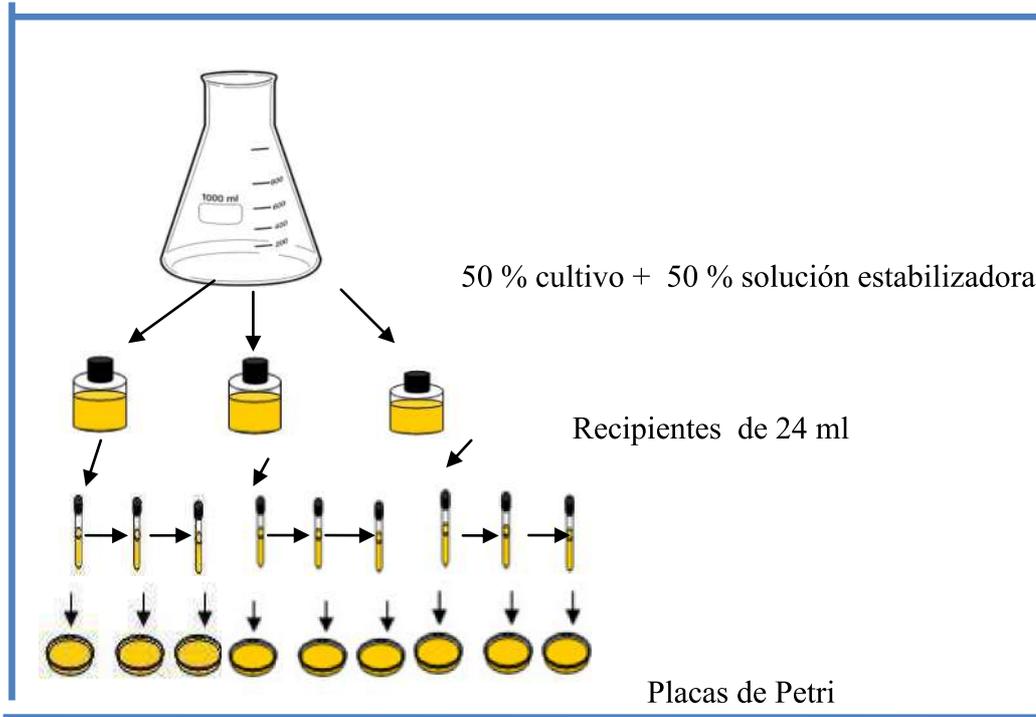
solidificación. Para comprobar la compatibilidad de *A. brasiliense* con otro cultivo, este fue estriado perpendicular a *B. japonicum*. Las placas se incubaron durante 48 h y se observó el crecimiento de cada cepa.

### **3.6 Determinación de la sobrevivencia en formulaciones de las distintas suspensiones microbianas**

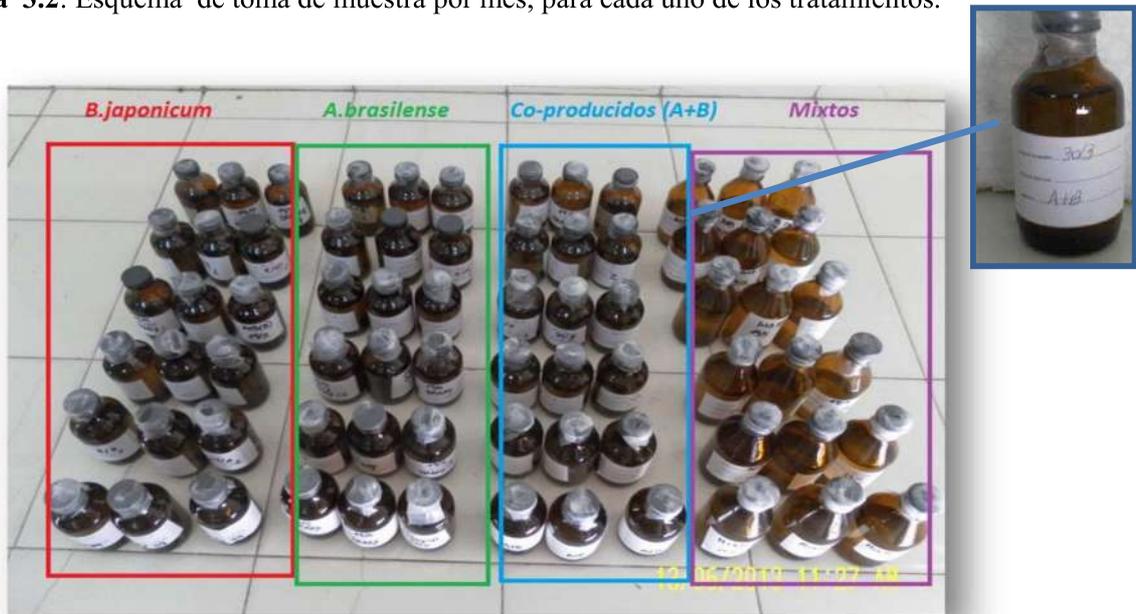
Se realizaron ensayos de sobrevivencia durante 6 meses, para medir la viabilidad de las distintas suspensiones a lo largo del tiempo. Utilizando como parámetro la concentración celular, medida como ufc/ml, realizando el seguimiento de los valores durante ese tiempo. Se efectuaron 4 tratamientos diferentes:

1. Crecimiento conjunto de las dos cepas, en medio Balattitabla 3.1 (A+B) coproducidos.
2. Crecimiento individual de las dos cepas estudiadas, cada una en su medio correspondiente y envasadas juntas en el mismo formulado (Mixtos).
3. Crecimiento individual de *B. japonicum* E 109 en su medio tabla 3.1, utilizado como testigo (B).
4. Crecimiento individual de *A. brasiliense* AZ 39 en medio Nfb tabla 3.2, utilizado como testigo (A).

Se realizaron los inóculos correspondiente para cada tratamiento y se transfirió como se indicó anteriormente al proceso. Después de 72 horas de crecimiento se procedió al envasado de las distintas formulaciones en recipientes de vidrio color caramelo de 24 ml, donde se adicionó un 50% de solución estabilizadora y un 50 % de cultivo de cada tratamiento. Se conservaron a temperatura ambiente y se tomó muestra cada 30 días, a lo largo de 6 meses. De cada uno de los tratamientos, se realizaron tres repeticiones, y para cada muestra se realizó por triplicado en determinaciones independientes. (Figura 3.2 y 3.3).



**Figura 3.2:** Esquema de toma de muestra por mes, para cada uno de los tratamientos.



**Figura 3.3:** Recipientes de 24 ml color caramelo, utilizados para el envasado de las diferentes formulaciones estudiadas: *B.japonicum*, *A.brasilense*, A+B co-producidos y Mixtos.

### **3.7 Determinación de la capacidad simbiótica de las cepas mediante ensayos de determinación de infectividad y efectividad en plantas.**

#### **3.7.1 Ensayos en plantas:**

Para determinación de la incidencia del consorcio bacteriano en la promoción del crecimiento de la planta, se llevaron a cabo ensayos en cámara climatizada, en vasos a modo de macetas, utilizando como soporte vermiculita estéril. En cada ensayo, las semillas se sembraron esterilizadas y pre-germinadas. De cada tratamiento se realizaron 8 repeticiones como mínimo y se adicionaron 8 controles sin inocular y 8 fertilizados con nitrógeno inorgánico en forma de nitrato. En todos los casos se colocaron dos semillas por tratamiento, de acuerdo al sistema utilizado.

#### **3.7.2 Esterilización y pre-germinación de semillas:**

Se colocaron las semillas en un vaso estéril y se lavaron en alcohol al 95% durante 20 segundos, se descartó el alcohol y se agregó la solución hipoclorito de sodio comercial al 2.5%, se cubren las semillas y se agitó durante 3-5 minutos y se descartó dicha solución. Seguidamente se lavó las semillas al menos 6 veces con agua estéril y se las preparó para la pre-germinación.

Las semillas estériles se colocaron en papel secante previamente esterilizado por autoclavado a 121°C y 1 atm de sobrepresión durante 20 minutos. Dicho papel debe ser previamente humedecido con agua estéril para luego dispersar las semillas a lo largo del mismo. A continuación se enrolló el papel formando un tubo que fue introducido en un recipiente estéril que impida la deshidratación del mismo. Se colocó en cuarto de estufa a 29°C durante 48h, tiempo en el cual la semilla tendrá aproximadamente una raíz de 1 cm (Somasegaran and Hoben, 1994).

#### **3.7.3 Cultivo de plantas en macetas:**

Para el armado de las macetas, se utilizó como soporte vermiculita, la cual fue esterilizada en autoclave durante 3 ciclos de 60 minutos a 1 atm de sobrepresión. Antes de proceder con la esterilización se tomó el pH de la vermiculita, que fue de aproximadamente 7.

Como paso previo a la siembra de las semillas, se procedió a humedecer las macetas con agua estéril el día anterior para lograr tener la humedad adecuada y así poder realizar los hoyos y sembrar las semillas esterilizadas y pre-germinadas.

Una vez que las macetas estaban humedecidas, se colocaron 2 semillas pre-germinadas por maceta. Nuevamente las macetas fueron regadas con agua estéril. Luego se colocaron en el invernadero. Después de 5 días se procedió a ralea dejando solo una plántula de todo el proceso a lo largo de todo el proceso.

Las plantas se observaron y se regaron de acuerdo a las necesidades diarias y se controlaron plagas e insectos.

Durante toda la experiencia los testigos se regaron con solución de riego (tabla 3.6), y al cabo de 45 días aproximadamente se realizó el análisis de ausencia o presencia de nódulos y el conteo de los mismos. Para ello se lavaron las raíces para remover la vermiculita que dificultaba la visión de los mismos.

#### Solución de riego

Componentes	Concentración g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15
FeCl <sub>3</sub>	0,0017
Solución stock de micronutrientes*	1 ml

**Tabla 3.6:** Composición de solución de riego Faharaeus libre de nitrógeno. (Somasegaran and Hoben, 1994).

Mezclar todos los constituyentes, ajustar el pH a 6.8-7 y autoclavar a 121°C por 20 minutos.

\*Solución stock de micronutrientes: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2,86 g/l), MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2,03 g/l), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,22 g/l), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,08 g/l), NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,14 g/l).

### 3.7.4 Diseño experimental en plantas

Para el ensayo en plantas se efectuaron 6 tratamientos utilizando 8 repeticiones por cada uno. Los mismos se detallan a continuación:

1. Inoculación con 1 mL de suspensión de *B.japonicum* en fase estacionaria de crecimiento. Se regó con solución de riego sin nitrógeno durante todo el ensayo.(B)
2. Inoculación con 1 mL de suspensión de *A.brasilense* en fase estacionaria de crecimiento. Se regó con solución de riego sin nitrógeno durante todo el ensayo.(A)
3. Inoculación con 1 mL de suspensión de *A.brasilense* y *B.japonicum* co-productas en fase estacionaria de crecimiento. Se regó con solución de riego sin nitrógeno durante todo el ensayo.(A+B)
4. Inoculación con 0.5 mL de suspensión de *A.brasilense* y 0.5 mL *B.japonicum* cultivados en procesos independientes en fase estacionaria de crecimiento. Se regó con solución de riego sin nitrógeno durante todo el ensayo.(MIXTOS)
5. Control sin inocular ni fertilizar. Se regó con solución de riego sin nitrógeno durante todo el ensayo.(CONTROL)
6. Testigo fertilizado. Se regó con solución de riego con nitrógeno durante todo el ensayo.(NITRATO)

En la fotografía 3.2 se muestra el ensayo en plantas en macetas, en el invernáculo.



**Figura 3.2:** Ensayo de plantas en macetas, en el invernáculo.

### **3.8 Evaluación de parámetros indicadores del crecimiento de plantas:**

Para la determinación de los parámetros de crecimiento se cuantificaron los siguientes parámetros fisiológicos:

#### **3.8.1 Número de nódulos totales por planta.**

Con la masa radicular separada de la parte aérea se procedió a contar, por cada raíz el número de nódulos presentes. Utilizando un bisturí se cortaron algunos de los nódulos para ver si presentan color rojizo. La coloración rojiza se debe a la presencia de leghemoglobina, una de las proteínas encargadas de la fijación biológica del nitrógeno.

#### **3.8.2 Volumen radical por desplazamiento de agua**

Una vez separada la raíz del tallo, se la sumergió en una probeta con agua destilada y se determinó que el volumen radicular es igual a la diferencia en el volumen de la columna de agua contenida en la probeta comparada con el volumen original.

#### **3.8.3 Peso seco de la parte aérea**

La parte aérea de la planta, una vez separada de la raíz, se guardó en un sobre de papel madera y se colocó en una estufa a 60°C, hasta que alcanzó peso constante.

### **3.8.4 Determinación de porcentaje de nitrógeno y de proteína en la parte aérea de la planta por el método Kjeldahl.**

#### **Fundamento:**

El método de Kjeldahl se basa en la hidrólisis ácida de la materia orgánica de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador sulfato de cobre. El nitrógeno se reduce en la sal sulfato de amonio, de la cual se libera con hidróxido de amonio en la forma de amoníaco y se destila. El destilado se valora con una solución patrón de ácido clorhídrico (Alaiz *et al.*, 1992).

Para la determinación se peso 0.1 g de muestra de parte aérea molida y se agrego 1.25 g de catalizador, posteriormente se agregó el ácido sulfúrico y se dejaron digestar las muestras durante una hora. Luego se realizó la destilación y titulación en equipo automático Tecator Kjeltex Auto 1030 Analyzer, utilizando ácido bórico y HCl 0.0996 N. La determinación del porcentaje de nitrógeno y el porcentaje de proteína se realizó a través de las siguientes ecuaciones:

$$M \times N = \text{meq de N}$$

$$\text{meq de N} \times 0.014 = G$$

Donde:

M: ml de HCl gastados en la valoración.

N: normalidad del HCl.

meq de N: miliequivalente de nitrógeno.

G: grs. de nitrógeno contenidos en 0.1 g de muestra.

Al referir esa cantidad a 100 g de muestra obtendremos el porcentaje de nitrógeno total.

### **3.8.5 Porcentaje de proteína**

El porcentaje de proteína se obtuvo de multiplicar el valor de %N por un valor asignado en tablas, el cual proviene de que la proteína en promedio representa el 16 % del Nitrógeno total, de tal manera que se obtiene el valor  $100 / 16 = 6.25$  como un factor.

### **3.9 Análisis estadístico**

Para comparar la diferencia entre las medias en los diferentes ensayos, se realizó Anova de un factor. El test utilizado fue el de DMS, con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Estudios cinéticos de los microorganismos en estudio:

#### 4.1.1 Cinética de crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum* E 109 y *Azospirillum brasilense* AZ 39.

Para determinar la cinética de crecimiento de los microorganismos estudiados se utilizaron diferentes medios de cultivo, según el microorganismo, en ensayos independientes con tres repeticiones. Los medios usados fueron: medio Balatti (tabla 3.1) para *B. japonicum* E 109 y medio Nfb (tabla 3.2) para *A. brasilense* AZ 39.

Se sembraron inóculos a partir de tubos preservados en heladera, en pico de flauta. Luego de transcurrido los tiempos de desarrollo, se seleccionó un inóculo para cada cepa y, previa observación microscópica, se transfirió un 10 % desde este medio inóculo a los respectivos medios de procesos. La concentración de los inóculos al momento de la transferencia fue:

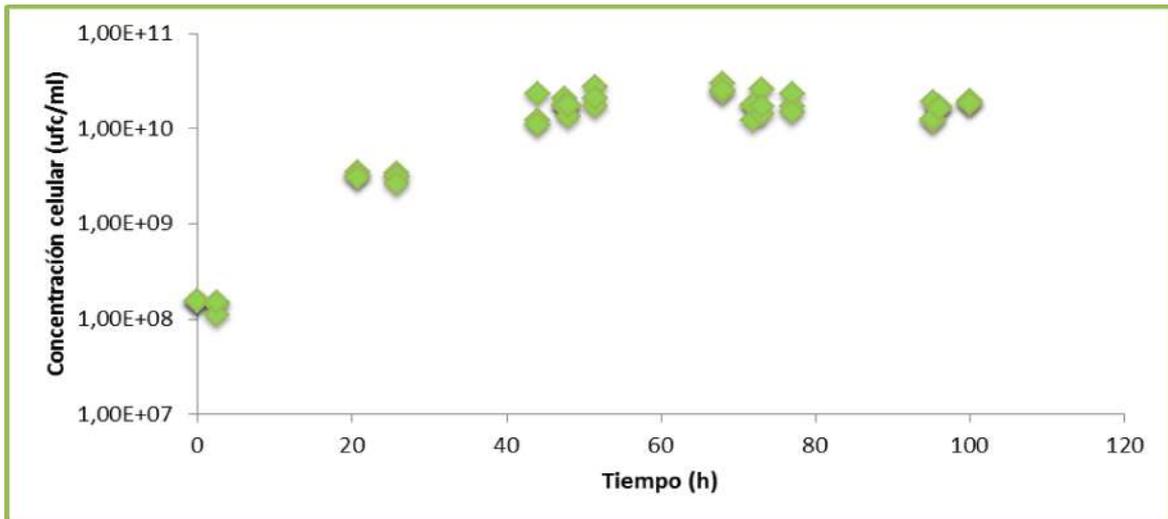
Microorganismo	Tiempo de desarrollo del inóculo (h)	Concentración celular (ufc/ml)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	48	$4 \times 10^9$
<i>Azospirillum brasilense</i>	24	$3,55 \times 10^8$

**Tabla 4.1:** Concentración de los inóculos al momento de la transferencia a proceso.

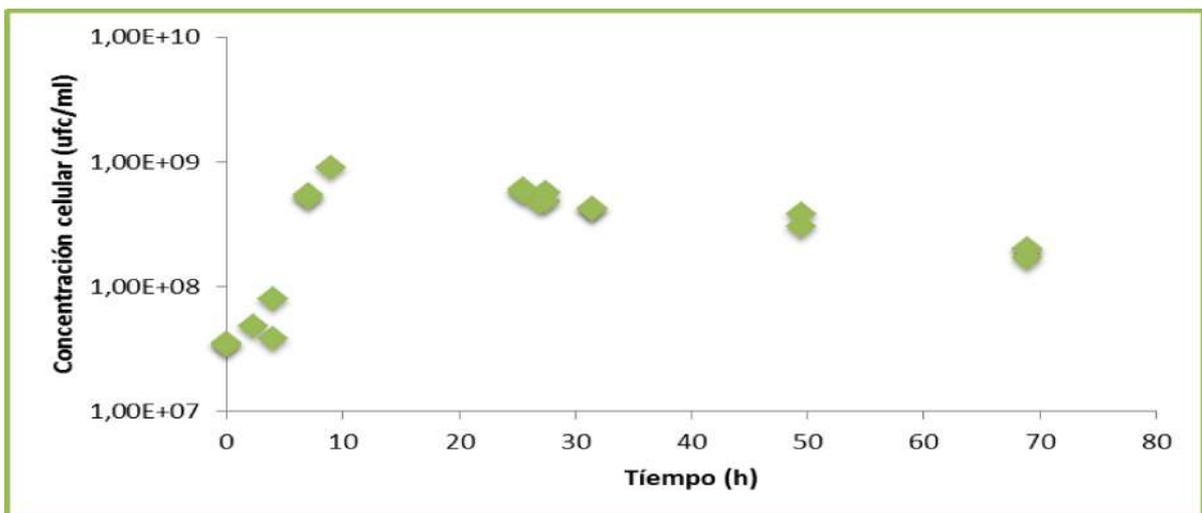
Los cultivos fueron desarrollados en cámara de cultivo a 28 °C, en agitador rotatorio a 200 rpm y 2,5 cm de excentricidad.

La concentración celular para evaluar la cinética de crecimiento de los diferentes microorganismos, se determinó con la técnica de recuento en placa (ufc/ml), como se indicó en materiales y métodos.

Las curvas de crecimiento obtenidas para *Bradyrhizobium japonicum* E 109 y *Azospirillum brasilense* AZ 39 se muestran en las Figuras 4.1 y 4.2 respectivamente.



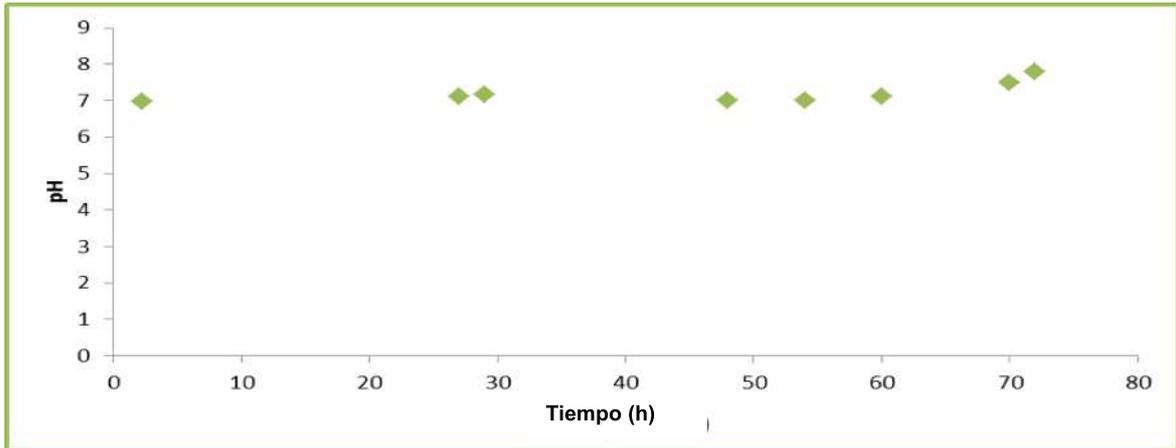
**Figura 4.1:** Curva de crecimiento de *B.japonicum* E 109 desarrollado en medio Balatti (tabla 3.1) en frascos agitados a 28°C.



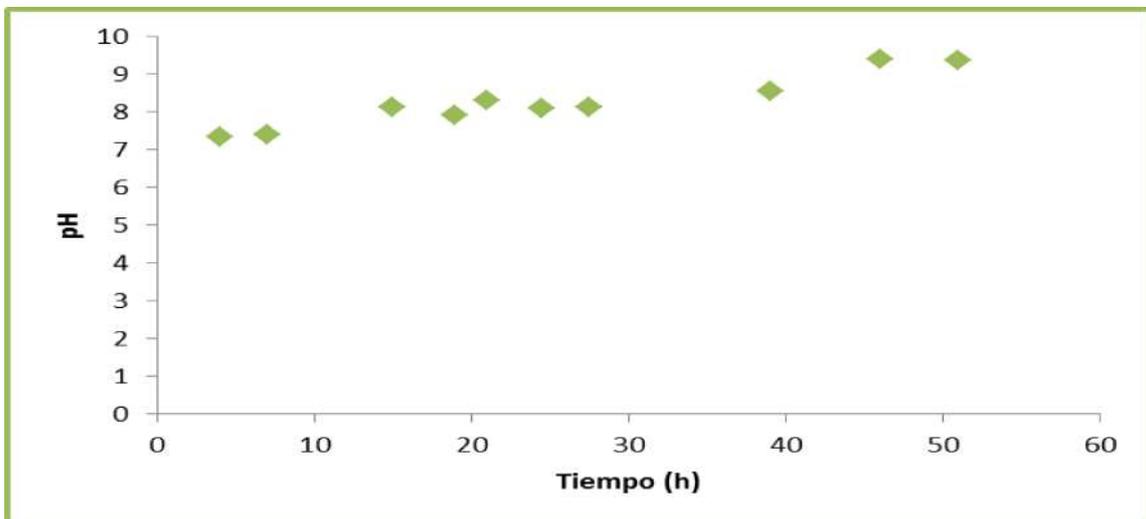
**Figura 4.2:** Curva de crecimiento de *Azospirillum brasilense* AZ 39 desarrollado en medio Nfb (tabla 3.2), en frascos agitados a 28°C.

La cinética de crecimiento es diferente entre dichos microorganismos, como se ve en las figuras mencionadas, *A. brasilense* tiene un crecimiento más rápido que *B. japonicum*. Estos ensayos permitieron realizar los cálculos de diferentes parámetros cinéticos, que se indican mas adelante.

Al mismo tiempo, se fueron registrando los valores de pH correspondientes a cada muestra analizada durante el desarrollo de los cultivos. Las curvas de evolución del pH a través del tiempo para *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* AZ 39 se muestran en la figura 4.3 y 4.4 respectivamente.



**Figura 4.3:** Curva de evolución del pH a través del tiempo de *B.japonicum*E 109 desarrollado en medio Balatti (tabla 3.1), en frascos agitados a 28°C.



**Figura 4.4** Curva de evolución del pH a través del tiempo de *A. brasiliense* AZ 39 desarrollado en el medio Nfb (tabla 3.2), en frascos agitados a 28°C.

La evolución de los valores de pH de los cultivos de *B. japonicum* no tuvo grandes variaciones a lo largo de su crecimiento, observándose una leve tendencia hacia valores alcalinos, cercanos a 8. En cambio, los cultivos de *A. brasiliense*, mostraron un marcado ascenso del pH, llegando a valores de 9, dado el progresivo consumo del ácido málico, utilizado como fuente de carbono en este medio de cultivo.

#### 4.1.2 Parámetros cinéticos de crecimiento para *B.japonicum* y *A.brasiliense*:

Con el objetivo de determinar parámetros que permitieran estudiar la cinética de crecimiento de los microorganismos según el medio de cultivo y las condiciones de operación en que se los cultivó, se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y

el tiempo de generación (Tg) para cada uno de los microorganismos, como se indica en Materiales y Métodos.

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.2:

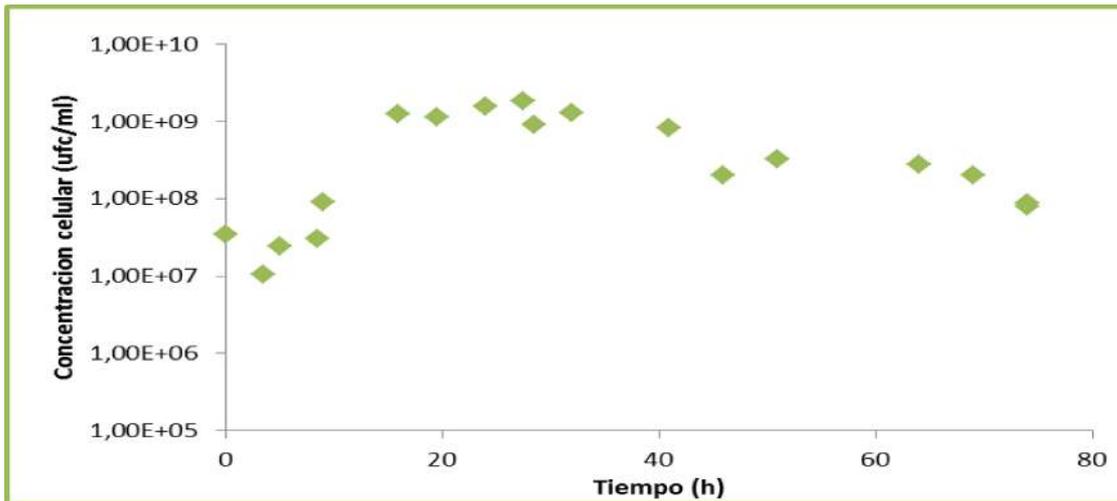
Microorganismos	$\mu$ max (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ total (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)
<i>B. japonicum</i>	0,105	0,080	8,664
<i>A. brasilense</i>	0,300	0,125	5,545

**Tabla 4.2:** Velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación para los microorganismos mencionados.

Se establecen dos valores diferentes de  $\mu$ , considerando un valor máximo que se corresponde con el punto de inflexión de la curva de crecimiento, y un valor para  $\mu$  total, que equivale a toda la fase de crecimiento exponencial. Los resultados muestran diferencias en cuanto a la cinética de crecimiento entre un género y el otro, y de esta forma, podemos clasificar a *B. japonicum* como una cepa de crecimiento lento, con tiempos de generación grandes respecto de *A. brasilense*, que correspondería a una cepa de crecimiento rápido, con tiempos de generación cortos.

#### 4.1.3 Cinética de crecimiento de *A. brasilense* en medio Balatti.

Por otra parte, dado que se planteó realizar ensayos de producción conjunta de los microorganismos, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento de *A. brasilense* en el medio de cultivo Balatti (tabla 3.1), con el objetivo de examinar un medio de cultivo que pueda ser usado en común y, que al mismo tiempo, sea favorable para el desarrollo de ambos microorganismos. La curva de crecimiento obtenida se muestra en la figura 4.5, para estas condiciones de trabajo.

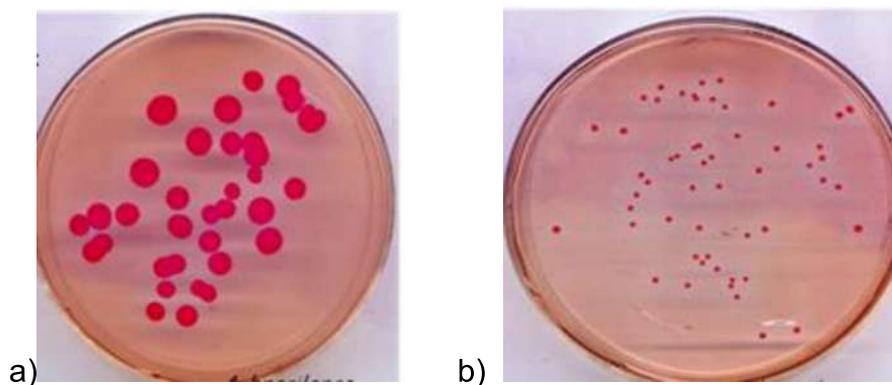


**Figura 4.5:** Curva de crecimiento de *A.brasilense* AZ39 en medio Balatti (tabla 3.1) en frascos agitados a 28°C.

A partir de éstos resultados obtenidos, se determinó que la velocidad específica máxima de crecimiento, que fue de  $0,265 \text{ h}^{-1}$ , y la velocidad específica total de crecimiento, del orden de  $0,114 \text{ h}^{-1}$ , que se corresponde con un tiempo de generación de 6,1 h. La curva y los datos de la cinética de crecimiento obtenidas en esta serie de ensayos, permitieron evaluar el comportamiento de *Azospirillum brasilense* en este medio de cultivo, donde su desarrollo fue muy similar, y por ello, aceptable, al que exhibió cuando había sido cultivado en el medio de cultivo Nfb específico para *A. brasilense*.

#### 4.2 Evaluación de las colonias de *A.brasilense* AZ 39 en diferentes medios sólidos.

Por otra parte se evaluó el desarrollo de las colonias para esta cepa en ambos medios de cultivo sólidos. En las fotografías 4.1 se puede observar el desarrollo de las colonias de las células de *Azospirillum brasilense* en ambos medios de cultivo.



**Fotografía 4.1:** Morfología de las colonias de *A.brasilense* en distintos medios de cultivo sólidos a) medio Balatti ; b) medio RC.

Las colonias presentan morfología diferente dependiendo directamente de la composición del medio de cultivo en el que se las cultivó. Se puede observar que en el medio Balattilas colonias presentan un notorio mayor tamaño que en el medio RC.

La motilidad bacteriana es una característica clave que afecta la aptitud, la supervivencia así como también la colonización en ambientes naturales. Para ello, casi todas las especies bacterianas han desarrollado diferentes dispositivos para la locomoción, tal como los flagelos. Covelli *et al.* (2013) indican que la motilidad de *B. japonicum* en medios sólidos, está influenciada por la composición del medio de cultivo, puntualmente, por la fuente de carbono utilizada, determinando la síntesis diferencial de proteínas estructurales de los flagelos.

“Swarming” es un tipo de movimiento flagelar impulsado que, contrario al movimiento en un medio líquido, se puede observar en la superficie de un medio sólido (1-2 % de agar), originando la expansión de la colonia en la superficie, desde el centro hacia los bordes. (Butler *et al.*, 2010). En este sentido, la mayor motilidad mostrada por *A. brasilense* en el medio Balatti, se podría considerar como un resultado destacado, considerando que el “swarming” podría ser necesario y beneficioso para la motilidad bacteriana en suelos o en la rizosfera, en relación con la competitividad de infección de las raíces de las plantas.

Por otra parte, se comprobó, que en los dos medios agarizados se obtenía el mismo número de colonias por placa, esto permitió utilizar el medio RC para obtener el número de colonias de *A. brasilense* y restando al número de colonias totales obtenidas en medio de cultivo solido Balatti.

#### **4.3 Viabilidad y compatibilidad entre los géneros estudiados.**

Con la finalidad de determinar la viabilidad y compatibilidad para la coexistencia en un mismo sustrato de los diferentes géneros bacterianos, se evaluó el crecimiento de ambas cepas en medios agarizados mencionados en materiales y métodos. Para ello se siguió la técnica de estriado en cruz, en una misma placa de Petri, en base a los reportes recientes de Anandaraj y Leema Rose Delapierre (2010), que muestran de esta manera, la compatibilidad entre *Rhizobium* sp., *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas fluorescens*,

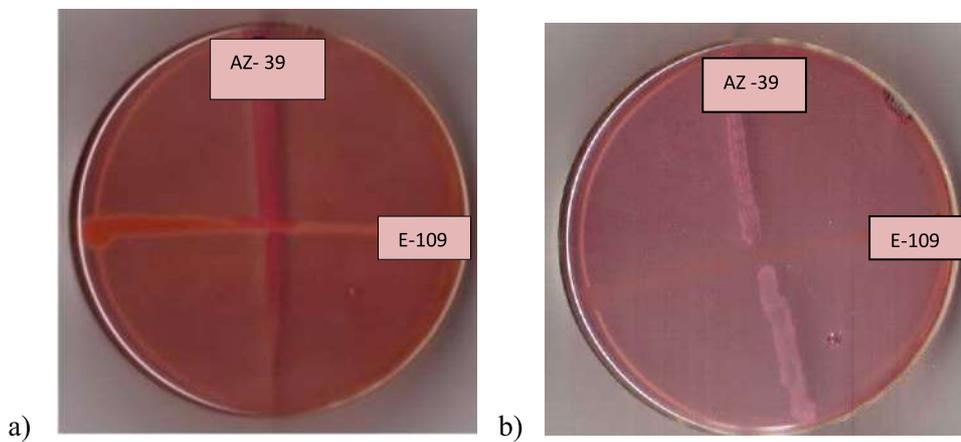
indicando que eran compatibles y capaces de crecer al mismo tiempo, en medio sólido de agar nutritivo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.3 y en la fotografía 4.2.

Medio de cultivo sólido	<i>B. japonicum</i>	<i>A. brasiliense</i>
Medio Balatti	+	+
RC	-	+

**Tabla 4.3:** Determinación del crecimiento de cada microorganismo en los distintos medios sólidos

+ se observó crecimiento en la placa, – no se observó crecimiento en la placa.



**Fotografía 4.2:** Ensayo de compatibilidad y viabilidad de las cepas *A. brasiliense* AZ 39 y *B. japonicum* E 109 en a) medio Balatti (tabla 3.1) b) medio RC (tabla 3.3).

Como se observa en la fotografía 4.2, estos resultados obtenidos permitieron establecer que las cepas *A. brasiliense* AZ 39 y *B. japonicum* E 109 en el medio Balatti, son compatibles y capaces de crecer al mismo tiempo, sin ningún tipo de inhibición en su crecimiento. En cambio, en el medio RC solo se observa crecimiento de *A. brasiliense*. Este resultado muestra que *B. japonicum* no es capaz de utilizar el ácido málico como fuente de carbono y energía, suministrada por este medio de cultivo.

#### **4.4 Cinética de crecimiento de *B. japonicum* E 109 y *A. brasiliense* AZ 39 en ensayos de producción conjunta.**

A fin de evaluar la posibilidad de desarrollar en forma conjunta, esto es, en un mismo proceso fermentativo, las dos cepas consideradas, se llevaron a cabo esta serie de

ensayos. Para ello se desarrollaron previamente inóculos de cada cepa y se transfirió un 5 % de cada uno a un mismo proceso, utilizando el medio Balatti.

La concentración y tiempos de desarrollo de los inóculos al momento de la transferencia fueron:

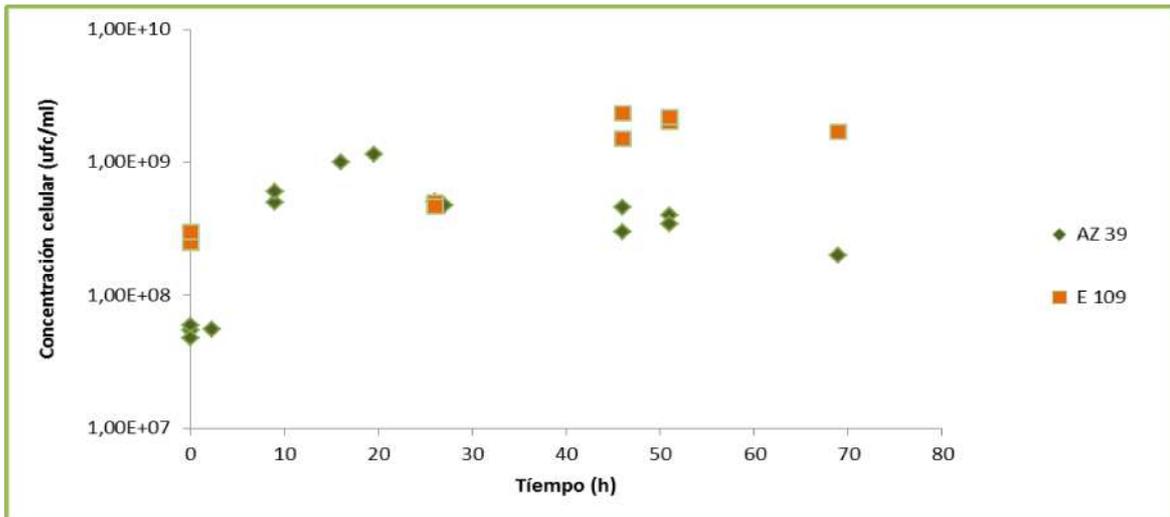
<b>Microorganismo</b>	<b>Tiempo de desarrollo(h)</b>	<b>Concentración celular (ufc/ml)</b>
<b><i>Bradyrhizobium japonicum</i> E 109</b>	48	$4 \times 10^9$
<b><i>Azospirillum brasilense</i> AZ 39</b>	24	$3,55 \times 10^8$

**Tabla 4.4:** Concentración de los inóculos al momento de la siembra de procesos co-producidos.

Los cultivos fueron desarrollados en ensayos independientes con tres repeticiones, a 28 °C, en agitador rotatorio a 200 rpm y 2,5 cm de excentricidad

En diferentes tiempos de desarrollo de los cultivos, se extrajo muestra y se determinó la concentración celular, a fin de evaluar el crecimiento y la cinética del mismo, para los diferentes microorganismos. Para eso se realizó recuento celular en placa (ufc/ml), como se indicó en Materiales y Métodos (figura 3.1).

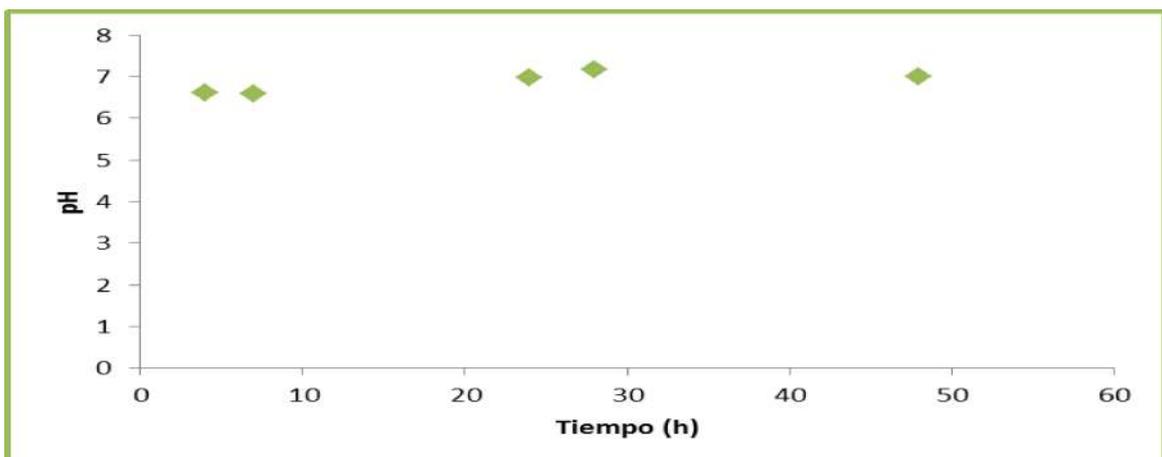
Las curvas de crecimiento, medidas como ufc / ml en función del tiempo de proceso, obtenidas para *B japonicum* E 109 y *A brasilense* AZ 39 co-cultivados se muestran en la Figura4.6.



**Figura 4.6.** Curva de crecimiento para *A. brasilense* AZ 39 y *B. japonicum* E 109 en el medio Balatti (tabla 3.1) en frascos agitados a 28°C.

Los resultados obtenidos muestran que la concentración celular alcanzada por *B. japonicum* fue de  $6 \times 10^9$  ufc/ml y por *A. brasilense* de  $5 \times 10^8$  ufc/ml, valores que prácticamente no difieren respecto de las concentraciones finales alcanzadas por cada una de las cepas cuando fueron cultivadas independientemente, y cada una en un medio de cultivo específico (figuras 4.1 y 4.2 mostradas anteriormente).

Además, se fueron registrando los valores de pH correspondientes a cada muestra analizada durante el desarrollo conjunto del cultivo. La curva de evolución del pH a través del tiempo para *B. japonicum* y *A. brasilense* co-cultivadas se muestra en la figura 4.7, donde se observa un mantenimiento del pH cercano a la neutralidad.



**Figura 4.7.** Curva de evolución de pH a través del tiempo de las bacterias co-productas, en medio Balatti (tabla 3.1) en frascos agitados a 28°C.

Para estas condiciones de crecimiento, también se calcularon los parámetros cinéticos, obteniéndose los siguientes resultados:

Microorganismo	$\mu$ max (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ total (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)
<i>B. japonicum</i>	0.100	0,077	8,956
<i>A. brasilense</i>	0.214	0,100	6,931

**Tabla 4.5:** Velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación para los microorganismos indicados, co-cultivados en un mismo medio fermentativo.

Estos resultados muestran que el desarrollo conjunto, en un mismo proceso fermentativo, de estos géneros bacterianos, permite la obtención de suspensiones celulares de alta concentración celular y óptimo estado fisiológico, que podría ser destinado a la preparación de diferentes bioformulados.

Además, estos demuestran la factibilidad de la utilización de éste método de bioprocésamiento para la formulación y el uso de consorcios microbianos sintéticos, el que a su vez, se transforma en un importante reto para llegar a convertirse en un procedimiento común en bioprocésos industriales.

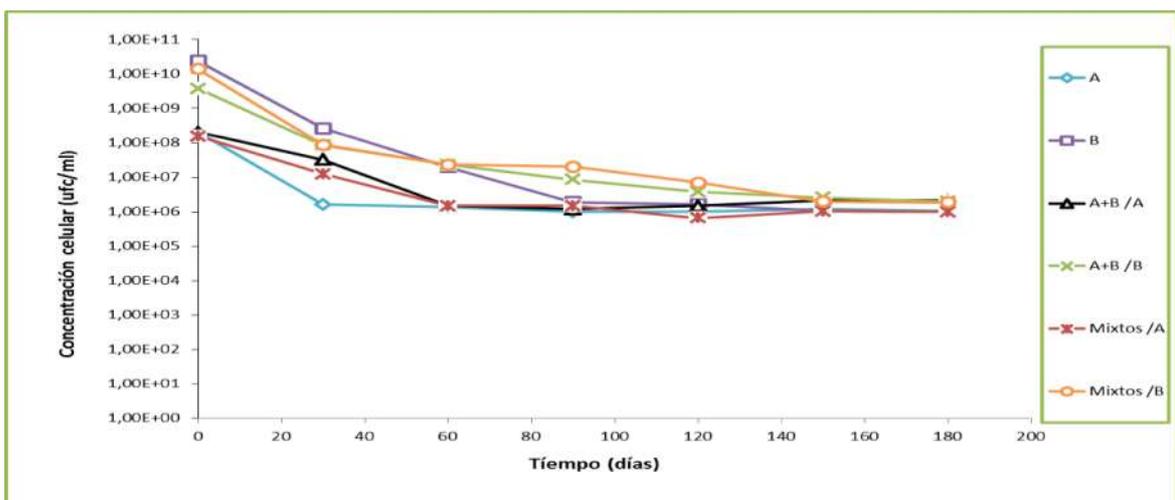
Es poco lo que se conoce hasta el momento sobre los efectos producidos entre géneros rizobianos como consecuencia de las diferentes interacciones entre ellos. Existen diversas características y/o propiedades de los microorganismos individuales que podrían verse modificadas o potenciadas, como por ejemplo, según reportes de Chebotar *et al.* (2001), la producción de sustancias promotoras del crecimiento por parte de bacterias del género *Pseudomonas*, podrían a su vez estimular el crecimiento de *B.japonicum*.

En este punto, a fin de validar esta estrategia de producción de cultivos PGPR, se plantea como imprescindible, por un lado, determinar la sobrevivencia de los mismos en el tiempo; y por el otro, evaluar el mantenimiento de la capacidad promotora de crecimiento de plantas, propiedad ampliamente demostrada para éstos microorganismos, considerando que las interacciones entre las diferentes células durante el tiempo de desarrollo, podría incidir sobre estas características.

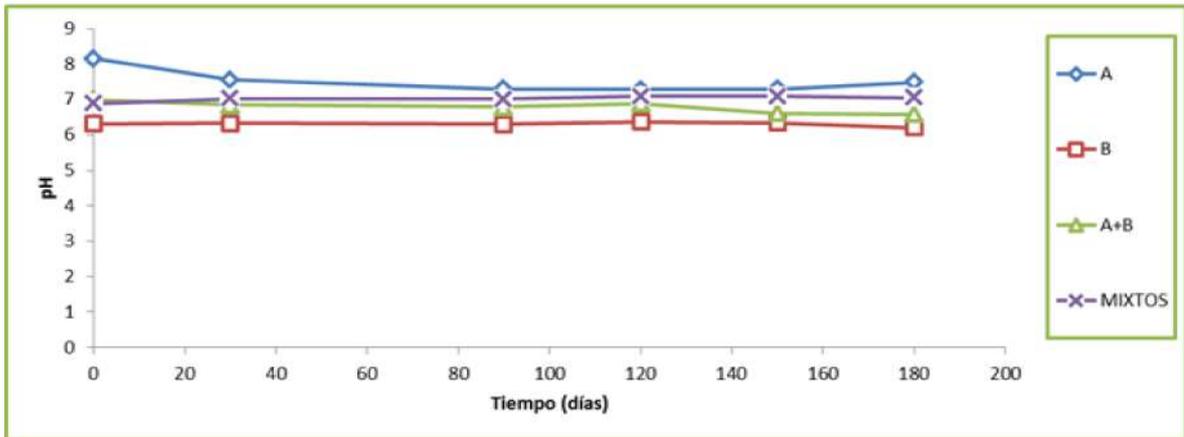
#### 4.5 Sobrevivencia de las suspensiones microbianas obtenidas

Se realizaron una serie de ensayos con el objetivo de estudiar la sobrevivencia de las suspensiones celulares obtenidas mediante los procesos de desarrollo conjunto. Para favorecer la viabilidad de las células en el tiempo, se le adicionó en una relación 1:1 , una solución estabilizadora, tendiente a preservar la integridad celular mediante el agregado de diferentes sustancias que actuarían como protectoras de la membrana plasmática, reguladores de pH y de la presión osmótica.

Los biopreparados obtenidos se almacenaron a temperatura ambiente y se evaluó la viabilidad celular y pH en el tiempo. Estas determinaciones se realizaron en forma periódica durante 180 días. Se utilizaron como tratamiento control formulados preparados a partir del desarrollo de cultivos individuales de cada una de las cepas. Los resultados se muestran en la figura 4.8 y 4.9.



**Figura 4.8:** Sobrevivencia de las diferentes suspensiones bacterianas tomando como parametro la concentración celular ( ufc/ml) a través del tiempo de: *A. brasilense* control (A), *B. japonicum* control(B) , *A. brasilense* co-productos(A+B/A) , *B. japonicum* co-productos (A+B/B) , *A. brasilense* (Mixtos /A ) y de *B. japonicum* (Mixtos/B).



**Figura 4.9:** Valores de pH de las diferentes suspensiones celulares en función del tiempo de: *A. brasilense* control (A), *B. japonicum* control (B), *A. brasilense* y *B. japonicum* (A+B), *A. brasilense* y de *B. japonicum* (B) desarrollados individualmente y juntándolos en el momento del envasado (Mixtos).

Se observa en la figura 4.8 que la sobrevida de las distintas suspensiones bacterianas disminuye marcadamente en los primeros 30 días de almacenamiento si bien sigue decreciendo hasta los 60 días aproximadamente. Luego se mantiene prácticamente constante alcanzando una concentración de  $1.10^6$  ufc/ml. Estos datos muestran una tendencia a estabilizarse en esos niveles celulares en la sobrevivencia en el tiempo, condición que es muy conveniente para este tipo de preparados, y que los presenta como muy promisorios. Luego de haber iniciado esta serie de ensayos, se halló en bibliografía reportes de Maurice *et al.* (2001) que, en estudios sobre diferentes inoculantes comerciales, mostraban que las suspensiones celulares envasadas en recipientes de polietileno con mayor espesor presentaban una menor sobrevida en comparación con los recipientes de menor espesor. Los autores atribuían esta diferencia a la limitación de transferencia del oxígeno, también indicada como un factor crítico para la supervivencia celular según estudios realizados por Griffith *et al.* (1992). En nuestros experimentos, las suspensiones bacterianas obtenidas se envasaron en recipientes de vidrio, lo que, en base a lo referido por estos autores, podría ser perjudicial para el mantenimiento de la viabilidad celular. En base a estas referencias, podría inferirse que los niveles de sobrevida en el tiempo podrían ser aún mayores si se utilizaran recipientes alternativos, como por ejemplo de polietileno de bajo espesor, intentando favorecer la transferencia de oxígeno, según indica la bibliografía.

Respecto de los valores de pH alcanzados por las diferentes suspensiones microbianas, según se puede observar en la Figura 4.9, se mantuvo prácticamente constante durante

el periodo de almacenamiento, en valores cercanos a la neutralidad. Esta es una situación deseable, considerando que estos niveles de pH favorecen la viabilidad de las células almacenadas.

Hoy en día, la generación de consorcios microbianos representa un desafío importante para el diseño de los mismos. La diversidad de las especies en un consorcio garantiza la supervivencia, pero al estar presentes diversas vías metabólicas entre sus miembros, mejoraría la adaptación y la estabilidad frente a entornos cambiantes (Brenner *et al.*, 2008).

#### **4.6 Evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en plantas de *Glycine max.***

A fin de evaluar el mantenimiento de la capacidad promotora de crecimiento de las plantas por medios de las cepas que habían sido desarrolladas en forma conjunta, se realizaron inoculaciones a plantas de soja con suspensiones bacterianas así obtenidas, generando al mismo tiempo cultivos individuales de cada cepa que pudieran ser usadas como controles, tal como se indicó en materiales y métodos; por un lapso de 45 días. Durante este tiempo las plantas crecieron de manera satisfactoria en su desarrollo tanto en la parte aérea como radicular.



**Fotografía 4.3:** Desarrollo de *Glycinemax* con los diferentes tratamientos utilizados para el ensayo.

En una comparación cualitativa de los distintos tratamientos, como se puede observar en la fotografía 4.3, hay una diferencia entre los mismos, A+B co-producidas presentan un mayor desarrollo de la parte aérea y por lo contrario, en el control se observa menor desarrollo. Esto se debe a que en el primero hay una mayor disponibilidad de nitrógeno. La inoculación mixta de leguminosas con diferentes especies PGPR ha sido reportada como responsable del incremento en la tasa de nodulación, materia seca y rendimientos, en diferentes leguminosas (Cassan *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2010). En el caso particular de asociaciones entre diferentes especies de *Rhizobium* y *Azospirillum* con leguminosas, como por ejemplo la soja, se indica en general la promoción de germinación de semillas, el crecimiento de la planta, la ramificación de la raíz y la nodulación (Khan *et al.*, 2010).

#### 4.6.1 Evaluación del crecimiento de las plantas:

En la tabla 4.6 se indica la concentración celular de las diferentes suspensiones microbianas utilizadas para la inoculación de las plantas de soja según los diferentes tratamientos indicados anteriormente.

Suspensión microbiana	Concentración celular (ufc/ml)
<i>B. japonicum</i> (B)	$1,7 \times 10^{10}$
<i>A. brasilense</i> (A)	$2,1 \times 10^8$
<i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> co-producidos (A+B)	<i>B. japonicum</i> : $9,8 \times 10^9$ <i>A. brasilense</i> : $2 \times 10^8$
<i>B. japonicum</i> + <i>A. brasilense</i> producidos en forma individual (Mixtos)	<i>B. japonicum</i> : $1,37 \times 10^{10}$ <i>A. brasilense</i> : $1,55 \times 10^8$

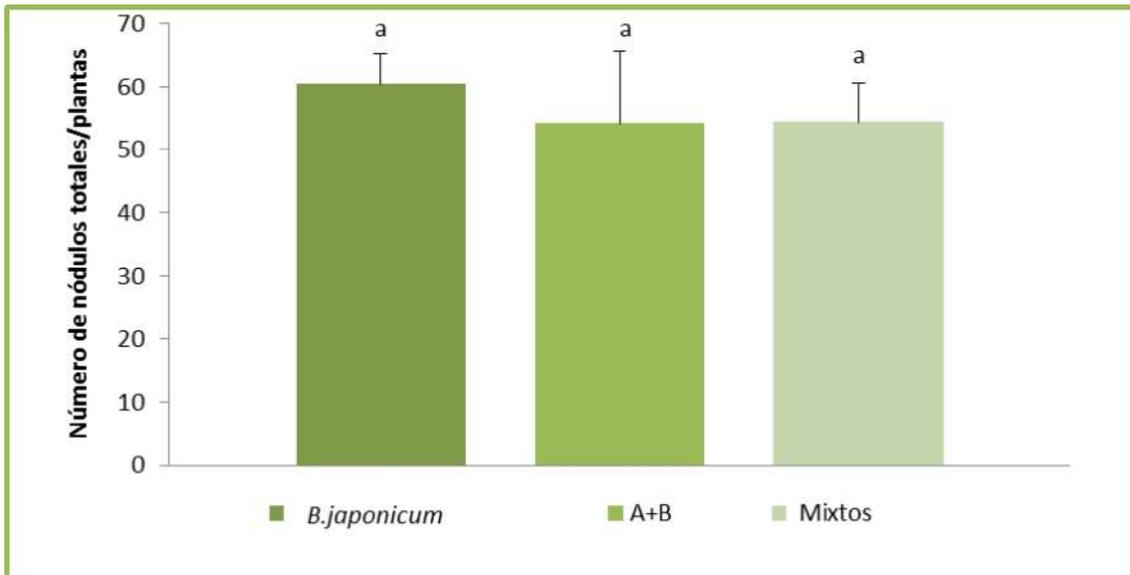
**Tabla 4.6:** Concentraciones celulares de las suspensiones bacterianas utilizadas para inocular las plantas de *Glycinemax*

#### 4.6.1.1 Número de nódulos totales

Con la finalidad de evaluar si había alguna incidencia sobre la capacidad de nodulación de la cepa simbiote, al haberla crecido en forma conjunta con las células de *A. brasilense*, se realizó el conteo del número de nódulos totales por planta, y se los comparó entre los diferentes tratamientos realizados, según se indica en materiales y métodos. De esta manera es posible analizar el efecto de dos variables:

- La condición de crecimiento conjunto.
- La incidencia de *A. brasilense* sobre la nodulación de *B. japonicum*

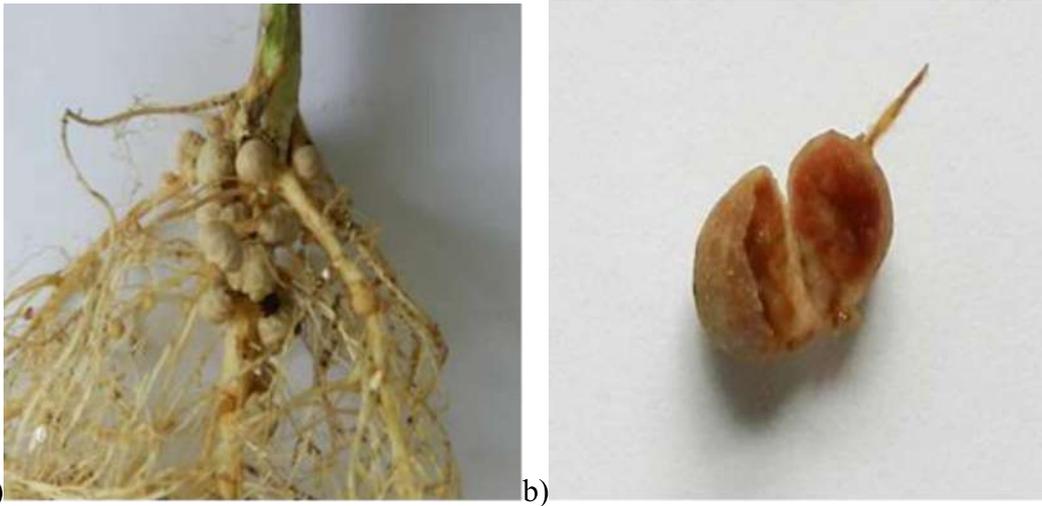
Los resultados se muestran en la figura 4.10. Se puede observar que el número de nódulos totales obtenidos de la raíz principal y secundaria, de los tratamientos utilizados no presentan diferencias significativas entre ellos. Estos resultados indicarían que *A. brasilense* no tiene incidencia sobre la capacidad de nodulación de *B. japonicum*. En este sentido, los reportes bibliográficos son bastante contradictorios. Por ejemplo, en estudios realizados por Cassán *et al.* (2009) encontraron que la co-inoculación con *A. brasilense* y *B. japonicum* en el cultivo de soja incrementaba el número de nódulos por planta y el porcentaje de plantas noduladas, comparadas con la inoculación simple con *B. japonicum*. Otros estudios realizados por Ruiz Sainz *et al.* (2002) observaron en ensayos de invernaderos tanto de frijol como *Glycine max* (soja) un incremento del número de nódulos y en el desarrollo de raíces en plantas co-inoculadas con *Azospirillum* y rizobio en comparación con las inoculadas únicamente con el rizobio. Investigaciones realizadas por Plaszinski and Rolfé (1985) y Yahalom *et al.* (1991) afirman que la co-inoculación de *Azospirillum* con rizobio puede estimular o inhibir la formación y el crecimiento del nódulo en algunos sistemas simbióticos, dependiendo de la concentración, la cepa utilizada y el tiempo de la inoculación. Recientemente, Juge *et al.* (2012), indicaron que la presencia de *Azospirillum*, produjo una reducción de la nodulación, en respuesta a la co-inoculación con *Azospirillum* en comparación con *Bradyrhizobium* solo.



**Figura 4.10:** Número de nódulos totales por planta, de los distintos tratamientos, en plantas de soja. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES,  $n=8$ . Diferentes letras en cada columna, indican diferencia significativa ( $p<0,05$ ), según el test de DSM.

En resumen, respecto a las condiciones estudiadas, los resultados obtenidos en estos ensayos, mostraron por un lado, que la presencia de esta cepa de *A.brasilense*, no incide sobre la capacidad de nodulación de *B. japonicum*, considerando que no se ven diferencias significativas en el número de nódulos totales por planta entre los diferentes tratamientos; y por el otro, que este comportamiento es independiente de la forma de cultivo de los microorganismos. Estas evaluaciones resultan de gran importancia, dado que reafirman la posibilidad del cultivo conjunto como una propuesta válida para el desarrollo de estas suspensiones de bacterias promotoras de crecimiento de plantas.

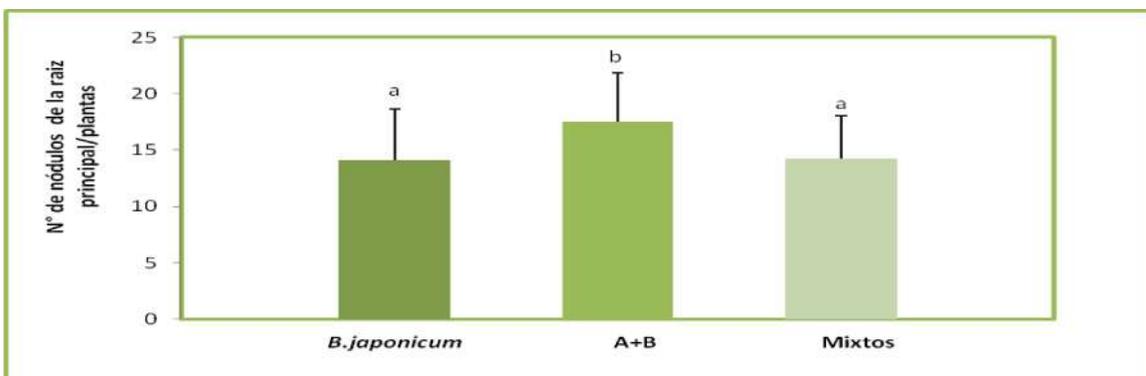
En la fotografía 4.4 se puede visualizar los nódulos encontrados en las plantas de soja después de 45 días como se indicó en materiales y métodos. También es interesante observar en la fotografía del corte transversal que se le realizó a los nódulos, que mostraron coloración rojiza debido a la presencia de leghemoglobina, lo que estaría indicando la funcionalidad del mismo.



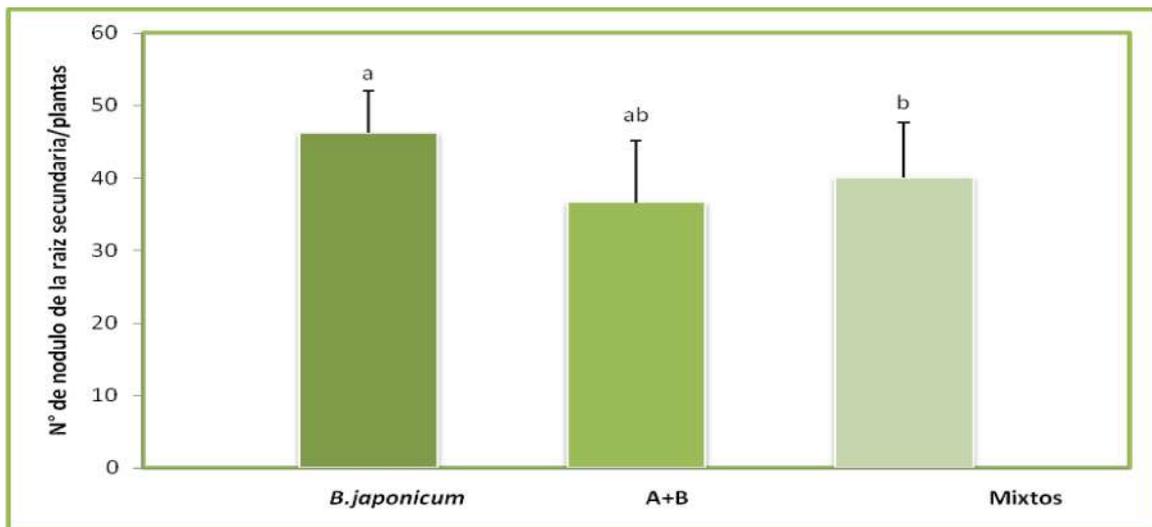
**Fotografía 4.4:** Fotografía de los nódulos formados en la raíz de *Glycine max* a) Nódulos b) Corte transversal de un nódulo donde se observa la coloración roja debida a la leghemoglobina.

#### 4.6.1.1.1 Infectividad de *Bradyrhizobium*

Conjuntamente con estas determinaciones del número de nódulos totales establecidos por planta, se evaluó la infectividad de la bacteria simbiote crecida en las condiciones indicadas. La infectividad rizobiana, se define como la capacidad de una cepa de rizobio de nodular la raíz de la leguminosa específica. Ésta, a su vez, depende de su capacidad de colonización, sobrevivencia y competitividad cuando se encuentre formando parte de la comunidad microbiana de la rizósfera. Por ello se considera que los nódulos ubicados en la raíz principal son inducidos por rizobios más infectivos que los que se ubican en las raíces secundarias. En base a estas consideraciones, y con la finalidad de determinar la infectividad de la cepa cultivada bajo diferentes condiciones, se determinó el número de nódulos en raíz principal y en raíz secundaria, para los diferentes tratamientos, tal como se indica en las Figuras 4.11 y 4.12.



**Figura 4.11:** Número de nódulos en la raíz principal, de los tratamientos en plantas de soja. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES, n=8. Diferentes letras en cada columna, indican diferencia significativas ( $p < 0,05$ ), según el test de DSM.



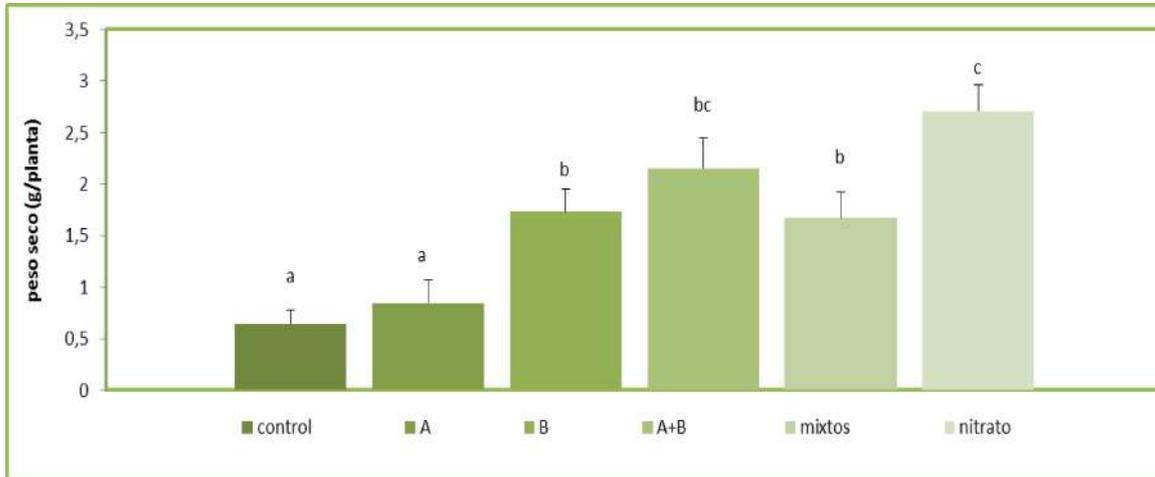
**Figura 4.12:** Número de nódulos de la raíz secundaria, de los tratamientos, en plantas de soja. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES,  $n=8$ . Diferentes letras en cada columna, indican diferencia significativas ( $p<0,05$ ), según el test de DSM.

Si se compara la distribución de nódulos en la raíz principal, en base al análisis estadístico de los datos obtenidos, se observa que el tratamiento que se inoculó con cultivos que habían sido co-producidos es el que tiene mayor número de nódulos en la raíz principal y, además difiere significativamente de los demás. Esto muestra que la infectividad en estas condiciones se ve positivamente afectada. De modo que la inoculación con suspensiones bacterianas de *B.japonicum* obtenidas en co-cultivo con *A.brasilense*, produciría un aumento de la infectividad, indicada por la mayor concentración de nódulos en raíz principal que en los inoculados con células de *B.japonicum* cultivadas en forma individual. Estos resultados permiten inferir respecto de interacciones entre las células en cultivo, mediadas por moléculas producidas por las cepas bacterianas analizadas, que al ser cultivadas en forma conjunta, inducirían comportamientos diferenciados respecto de células cultivadas en forma individual.

Asimismo, Hamaoul *et al.*(2001) ha reportado que con la co-inoculación de *A.brasilense*, los nódulos se formaron en su mayoría en las raíces principales, mientras que en los controles sin *Azospirillum*, fueron más comunes los nódulos pequeños en las raíces laterales.

#### 4.6.1.2 Peso seco de la parte aérea de la planta

Luego, se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas de soja, los resultados se muestran en la figura 4.13.



**Figura 4.13:** Peso seco de la parte aérea de plantas de soja, para los distintos tratamientos y testigos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES,  $n=8$ . Diferentes letras en cada columna, indican diferencia significativas ( $p<0,05$ ), según el test de DSM.

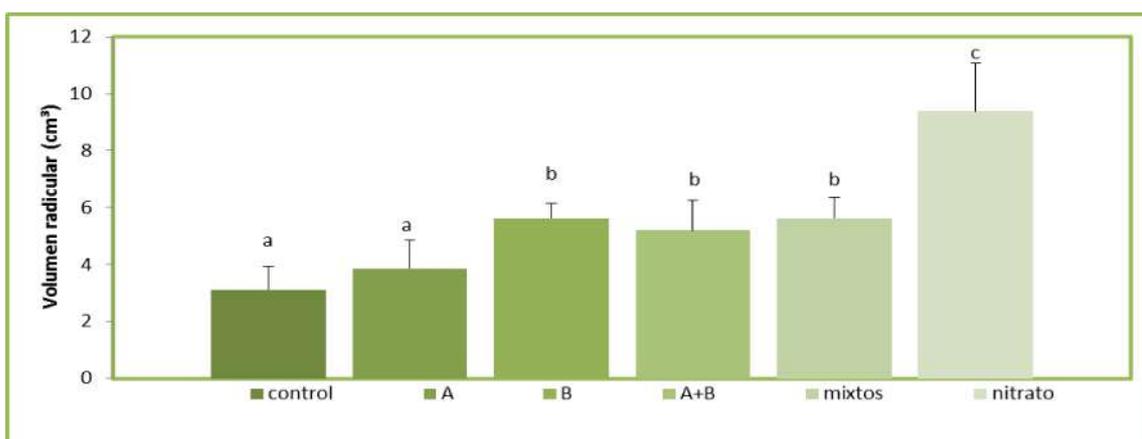
Como se observa en la figura 4.13, los menores valores se registraron en los tratamientos de control y el inoculado solo con células de *A.brasilense* (A), como sería esperable, dado que las plantas no tuvieron aporte de nitrógeno desde ninguna fuente. Si bien se alcanzaron mayores valores de peso seco en los demás tratamientos inoculados, no se encontraron diferencia significativa entre los tratamientos inoculados solo con *B.japonicum* (B), y las inoculaciones mixtas, ya sea desde cultivos individuales (Mixtos) o co-productivos (A+B). Este resultado no está de acuerdo con lo observado generalmente, respecto de la estimulación del crecimiento de leguminosas co-inoculadas con *Azospirillum* y *Rhizobium* (Volpin and kapulnik, 1994; Burdman, 1998), en los que se señalan diversos efectos positivos, tales como, aumento la producción de materia seca, rendimiento en grano y contenido de nitrógeno, en comparación con inoculaciones con rizobios solamente.

Al mismo tiempo, es importante destacar que los mayores niveles de peso seco de la parte aérea de la planta alcanzados se observaron en respuesta al tratamiento testigo seguido con solución de riego con nitrato, el que no presenta diferencias significativas con las plantas inoculadas con A+B co-productivos.

Dado que sólo en el tratamiento proveniente de la co-producción de cultivos igualó el peso seco de plantas fertilizadas con nitrógeno inorgánico, que sería la condición de máxima, es posible sugerir que este resultado se vincularía con la forma de cultivo de los microorganismos, a través de interacciones que se producen entre las células implicadas. Este resultado es de gran relevancia, ya que son resultados que respaldan la estrategia de coproducción de células. Por ende, se plantea la necesidad de realizar estudios particularmente sobre los mecanismos moleculares y posibles señales del género *Azospirillum*, que favorecen a la planta y a los rizobios; así como, también estudios ecológicos para determinar la dinámica de la relación que existe entre diversas poblaciones de rizobios y *Azospirillum* en la rizosfera (Albareda *et al.*, 2006; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007).

#### 4.6.1.3 Volumen radicular

En la figura 4.14 se muestra el volumen radicular de las plantas para los diferentes tratamientos estudiados



**Figura 4.14:** Volumen radicular de plantas de soja para los distintos tratamientos y testigos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES,  $n=8$ . Diferentes letras en cada columna, indican diferencia significativas ( $p<0,05$ ), según el test de DSM.

Se observa en la figura 4.14, que los menores valores sobre el volumen radicular que se obtienen corresponden, como era de esperar, y en concordancia con los demás parámetros evaluados en las plantas, en los tratamiento control y en las inoculaciones con *A.brasilense* solo, entre los que no se encuentran diferencias significativas. El mayor rendimiento de raíces, se obtuvo en el testigo fertilizado con nitrógeno, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos inoculados, si bien está documentado el efecto de *Azospirillum* en las legumbres (Volpin y Kapulnik, 1994) y en la soja en particular, (Molla *et al.*, 2001), donde se han

reportado estímulos de la longitud de la raíz, del crecimiento de las raíces laterales y pelos radicales.

En la fotografía 4.5 se muestra la diferencia del volumen radicular en los diferentes tratamientos, en cual se destaca el tratamiento con nitrato por tener un mayor volumen de pelos radiculares.



**Fotografía 4.5:** Volumen radicular de los tratamientos: a) Control b) A+B co-productas c) nitrato d) *A.brasilense* e) mixtos f) *B.japonicum*.

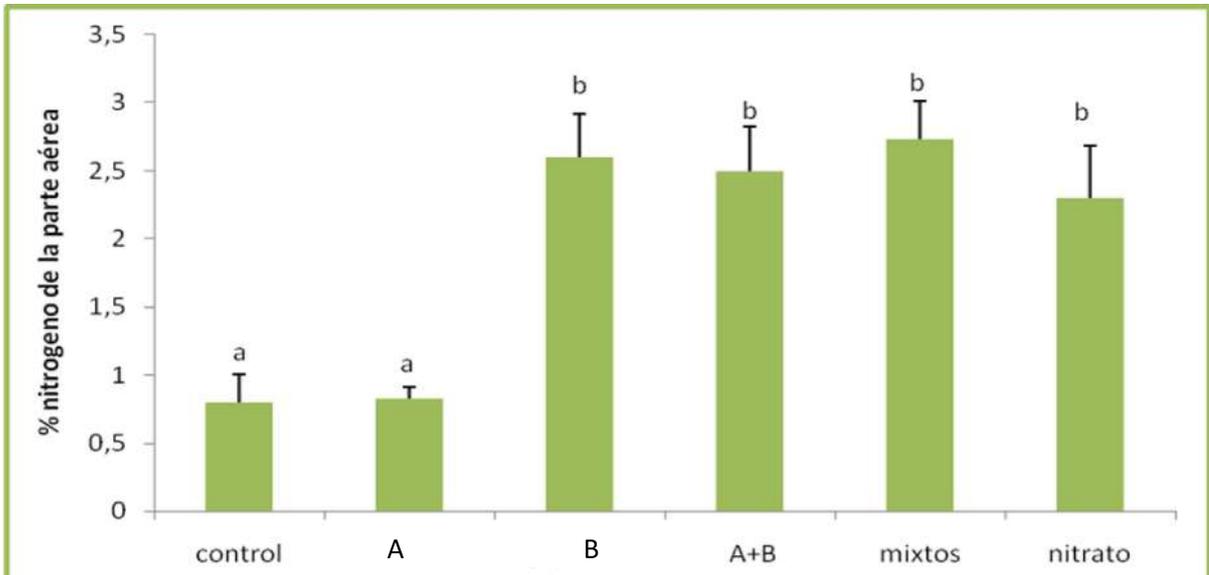
En diferentes reportes bibliográficos (Bashan *et al.*, 1990; Schnak *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1984 y Ruiz –Sainz *et al.*, 2002) se ha conseguido frecuentemente un mayor desarrollo del sistema radical con la inoculación de *Azospirillum*, el cual se traduce en mayor superficie de absorción de nutrientes, esto difiere de los resultados obtenidos en la figura 4.14 donde *Azospirillum* no se diferencia significativamente del tratamiento control. Aunque trabajos realizados por Hernandez *et al.* (1997) han reportado que una sobredosis de bacteria podría provocar un efecto inhibitorio en la planta, ya que en suelo estéril no se encuentran otros microorganismos que interactúen con *Azospirillum* lo que permite que la producción de hormonas se acumule, provocando un efecto depresivo en la plántula.

#### 4.6.1.4 Contenido de nitrógeno y proteína en la parte aérea de la planta

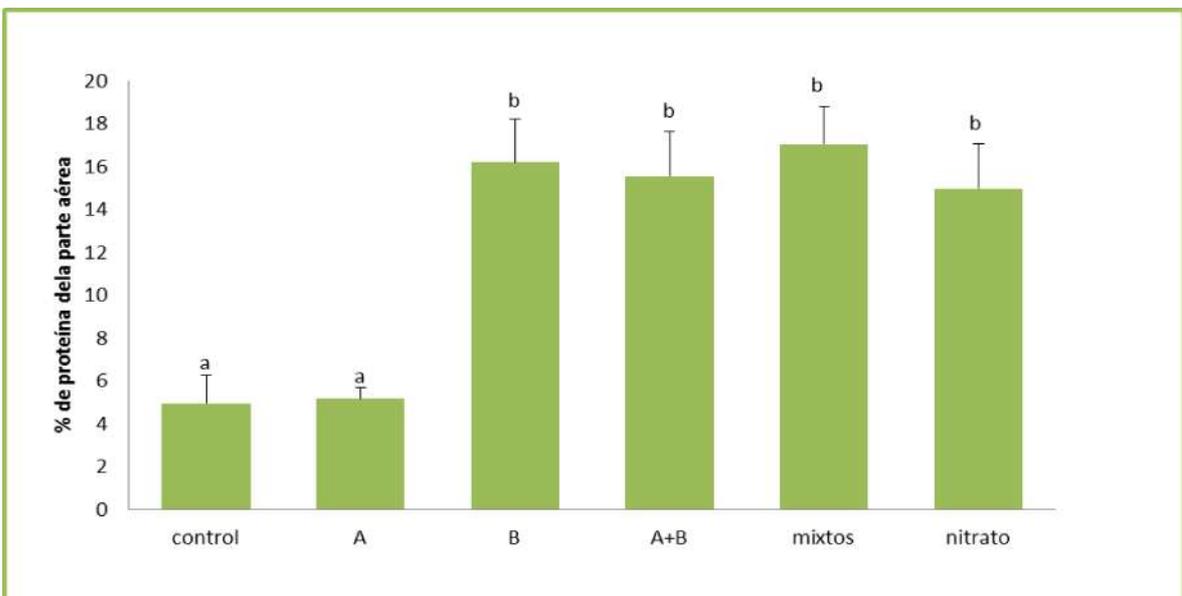
La determinación del contenido de nitrógeno en la parte aérea de las plantas de soja, permitió estimar la efectividad de la simbiosis, uno de los parámetros de gran importancia en la promoción del crecimiento de plantas a partir de bacterias simbiotes. Al mismo tiempo, la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes

tratamientos, permitió evaluar la eficiencia de las cepas cuando habían sido obtenidas en cultivos co-producidos.

Los resultados obtenidos de la determinación del porcentaje nitrógeno y porcentaje de proteína se muestran en la figura 4.15 y 4.16 correspondientemente.



**Figura 4.15:** Porcentaje de nitrógeno de la parte aérea de la planta de soja para los distintos tratamientos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES, n=8. Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa, según el test DSM.



**Figura 4.16:** Porcentaje de proteínas de la parte aérea de la planta de soja para los distintos tratamientos. Los se expresan como la media  $\pm$  ES n=8 Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa, según el test DSM.

Los menores valores obtenidos respecto del porcentaje de nitrógeno, al igual que el de proteína, como se puede ver en las figuras 4.15 y 4.16, corresponden a los tratamientos control e inoculado solo con *A.brasilense*. Los mayores niveles, tanto en porcentaje de nitrógeno como de proteína, se alcanzan cuando se inoculó con B, A+B y mixtos, entre los que a su vez, no presentan diferencias significativas.

Estos datos muestran, que no hay diferencias respecto de la estrategia de cultivo de las cepas bacterianas. Asimismo, estos resultados respaldan la coproducción de cepas como método válido para la producción de biofertilizantes.

## 5. Conclusiones

- ✓ El medio de cultivo Balatti resulta adecuado y favorable para el desarrollo de *A.brasilense* en medio líquido, de modo que puede ser usado para el desarrollo de ambos microorganismos, en un cultivo conjunto.
  
- ✓ Las colonias de *A.brasilense* desarrolladas en medio sólido *Bradyrhizobium* presentaron morfología diferente, respecto de su medio específico RC. Por otra parte, el número de colonias obtenidas fue igual en los dos medios, esto permitió utilizar el medio RC para obtener el dato del número de células de *A.brasilense* y el medio *Bradyrhizobium* sólido para el número de células total, de modo que por diferencia se pudo cuantificar *B.japonicum*.
  
- ✓ Las cepas *A. brasilense* AZ 39 y *B.japonicum* E 109, son compatibles y capaces de crecer al mismo tiempo en el medio Balatti, sin ningún tipo de inhibición en su crecimiento, alcanzando los mismos niveles celulares, velocidades de crecimiento y tiempos de generación que cuando se cultivan en forma individual. Los valores de pH alcanzados resultan más favorables en estos cultivos conjuntos, dado que se mantiene en valores cercanos a la neutralidad.
  
- ✓ Las formulaciones realizadas con las suspensiones celulares obtenidas mediante los procesos de desarrollo conjunto, mostraron una buena sobrevivencia en el tiempo, y una tendencia a estabilizarse en niveles celulares aceptables, con valores de pH cercanos a la neutralidad.
  
- ✓ Las suspensiones celulares obtenidas mediante cultivo conjunto de las cepas, mostraron el mantenimiento de las capacidades promotoras del crecimiento de las plantas, respecto de inoculaciones a partir de los cultivos individuales de los microorganismos. Además la co-producción de las células, mejoró el comportamiento simbiótico de *B.japonicum*, aumentando la infectividad y los valores de peso seco. Puede inferirse que la producción de moléculas autoinductoras que se producirían durante el cultivo conjunto de los microorganismos, afectan positivamente el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno, por parte de la bacteria simbiote cultivada.

- ✓ La efectividad de la simbiosis, no se vio afectada con la inoculación de cultivos conjuntos, ya que el porcentaje de nitrógeno de la parte aérea de las plantas, no se diferenció del alcanzado en el tratamiento con la cepa simbiótica. Esto revalida la estrategia de la utilización de consorcios bacterianos para la producción de biofertilizantes.
  
- ✓ La mayor capacidad infectiva observada en cultivos co-producidos podría traducirse en una competitividad diferencial en la rizósfera cuando se los inocule a campo. Los inoculantes comerciales provienen de cultivos individuales, lo que podría determinar una menor competitividad frente a cepas naturalizadas preexistentes en la rizósfera, respecto de células preadaptadas a la coexistencia con otros géneros bacterianos.

El estudio de nuevos métodos, herramientas y potencialidades de los microorganismos en consorcios, abre un camino hacia un nuevo paradigma de bioprocesamiento para la formulación y el uso de consorcios microbianos sintéticos. El potencial de la biosíntesis de consorcios microbianos sintéticos representa a la vez oportunidades y retos interesantes donde los mismos pueden permitir complejos comportamientos a través de las características o propiedades combinadas de cada organismo individual.

## **6.Consideraciones generales**

Hasta no hace muchos años, las fábricas de inoculantes ofrecían al mercado un producto formulado en base a un microorganismo fijador de nitrógeno específico para cada leguminosa en particular, mientras que en la actualidad estos bioformulados, están constituidos por dos o tres géneros de microorganismos diferentes, cada uno de ellos con alguna característica especial que lo expone como promotor del crecimiento de plantas. Esto implica un cambio en las estrategias de producción de estas empresas, debido a la necesidad de destinar diferentes reactores para la producción individual y simultánea de los diferentes géneros de microorganismos que formarán parte del consorcio bacteriano del inoculante comercial.

Son muchos y muy variados los reportes que existen sobre co-inoculaciones, que implican la utilización de diversos géneros bacterianos sobre diferentes especies vegetales, o bien orientados a la dilucidación de posibles mecanismos bacterianos individuales para la promoción del crecimiento de la plantas. Este tipo de experimentos se plantean a partir de la mezcla de los diferentes cultivos microbianos, para generar el consorcio o la co-inoculación que se desea estudiar. Sin embargo, es poco lo que se conoce hasta el momento sobre los efectos producidos entre diferentes géneros rizobianos como consecuencia de las diferentes interacciones entre ellos. Existen diversas características y/o propiedades de los microorganismos individuales que podrían verse modificadas o potenciadas.

El desarrollo de estos estudios, mostraron la posibilidad de desarrollar en forma conjunta, esto es, en un mismo proceso fermentativo, dos géneros bacterianos implicados en la formulación de biofertilizantes para el mejoramiento de plantas, como una forma de potenciar sus características promotoras del crecimiento vegetal, asegurando la obtención de suspensiones celulares con un óptimo estado fisiológico, destinados a la preparación de estos consorcios microbianos. Son escasos los reportes referidos específicamente al proceso biotecnológico para la producción de las bacterias PGPR, la incidencia de los diferentes factores que pueden afectar la producción, los rendimientos y la productividad, así como el mantenimiento de las propiedades PGPR. Por ello, estos estudios se consideran una propuesta biotecnológica innovadora para la optimización del proceso de producción del bioformulado. Asimismo, esta forma de

cultivarlos, representa más acabadamente al ambiente natural, donde los microorganismos no se encuentran aislados, sino que permanentemente deben crecer y/o mantenerse en competencia con otros microorganismos, en el nicho biológico en el que habitan. Así, este sistema de producción se considera una forma de preadaptación de los microorganismos antes de ser aplicados a campo, lo que representa una clara ventaja en la competencia, en principio, para la supervivencia

## **7. Perspectivas futuras**

En base a los diferentes resultados y conclusiones obtenidas luego del desarrollo de este plan de trabajo, se plantean varias inquietudes para desarrollos futuros, tendientes a complementar y/o profundizar sobre el entendimiento de diferentes sucesos observados hasta aquí, como por ejemplo:

- ❖ Desarrollar en forma conjunta, en un mismo proceso fermentativo, tres géneros diferentes de bacterias PGPRs, por ejemplo *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*, como una forma de potenciar sus características promotoras del crecimiento vegetal, considerando que la generación de consorcios microbianos representa un desafío importante para el diseño de los mismos.
- ❖ Estudiar las interacciones celulares mediadas por moléculas autoinductoras del tipo AHL, entre microorganismos obtenidos en cultivos individuales y de desarrollo conjunto, a fin de evaluar la incidencia sobre diferentes parámetros tales como la concentración celular y la producción de metabolitos de importancia para el establecimiento de la simbiosis, tales como exopolisacáridos, lipopolisacáridos, entre otros.
- ❖ Reformular los ensayos para el estudio de la sobrevivencia de las suspensiones celulares obtenidas respecto de la utilización de recipientes de polietileno de baja densidad, atendiendo a datos bibliográficos, que reportan este hecho como condición favorable respecto de la transferencia del oxígeno, indicada como uno de los factores críticos para la supervivencia celular.
- ❖ Analizar las formulaciones así obtenidas frente a inoculantes comerciales, a fin de establecer si existen diferencias en cuanto a competitividad frente a cepas naturalizadas preexistentes en la rizósfera, partiendo de la consideración de que las células co- producidas ya habrían pasado por un proceso de preadaptación.
- ❖ Explorar diferencias en la motilidad de los microorganismos así cultivados, considerando que en estudios reportados por Hoang y col. (2008), indicaron que la misma estaría influenciada por la presencia de moléculas autoinductoras producidas por diferentes células.

- ❖ También se plantea como deseable, realizar estudios particularmente sobre los mecanismos moleculares y posibles señales del género *Azospirillum*, que favorecen a la planta y a los rizobios; así como también estudios ecológicos para determinar la dinámica de la relación que existe entre las poblaciones de rizobios y *Azospirillum* en la rizosfera.

## **8. Bibliografía**

- Alaiz, M.; Navarro, J.L.; Girón, J.; Vioque, E. Amino acid analysis by high performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography* 591,181-186.1992.
- Albareda, M.; Dardanelli, M.; Sousa, C.; Megias, M.; Temprano, F.; Rodriguez-Navarro, D.N. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to vean and soybean roots. *FEMS microbiology letters* 259:67-73. 2006.
- Alexander, M. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. AGT editores, México pp.234-362.1980.
- Aloni, R.; Alon, E.; Leghans, M.; y Ullrich, C.I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* 97:883-893.2006.
- Anamdaraj B and Leema Rose Delapierre. A. Studies on influence of bioinoculantes (*Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium* sp., *Bacillus megaterium*) in green GRAM.2010
- Badri, D.V.; Weir, T.L.; van der Lelie D.; Vivanco J.M. Rhizosphere chemical dialogues: plant microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642–650. 2009.
- Balatti, A.P. Producción de inoculantes para leguminosas: tecnologías de la fermentación aplicada a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Ediciones Trabuco ed. Buenos Aires. 1992.
- Barlow, P.W.; Brain, P.; Parker, J.S. Cellular growth in root soft a gibberellin deficient mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and its wild-type. *Exp Bot* 42:339–351. 1991.
- Bashan, Y.; Harrison, K.; Whitmoyer, R. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Applied and Environmental Microbiology* 56:769-775.1990.
- Bastarrachea, F.; Zamudio, M. and Rivas R. Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.* 34:24-29.1987.
- Benbrook, A. World food system challenges and opportunities: GMOS biodiversity and lessons from Americas Heartland. In: world food system challenges and opportunities. <http://www.pmac.net/IWFS.pdf>. 1999.
- Bottini, R.; Cassán, F.; Piccoli, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:497–503.2004.

- Brenner, K.; You, L.; Arnold, F. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 26: No.9.2008
- Broughton, JM.; and O'Connell J.F. On Evolutionary Ecology, Selections Archaeology and Behavioral Archaeology. *American Antiquity*64:153–165.1999.
- Brow, M.E. Seed and Root bacterization. *Annu Rev Phytopathol* 12:181-197.1974.
- Burdman, S.; Hamaoul, B. and Okon, Y. Improvement of legume crops yields by co-inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. The Hebrew University of Jerusalem, Israel, 64 pp. 2000.
- Burdman, S.; Jurkevitch, E.; Okonon, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: *Microbial interactions in agriculture and forestry*, pp.229-250.1998.
- Burdman, S.; Kigel J.; Okon, Y. Effects of *Azospirillumbrasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Soil Biology and Biochemistry* 29:923-929.1997.
- Burdman, S.; Vedder D.; German M.; Itzigshon R.; Kigel J.; Jurkevitch E.; and Okon Y. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st. Century Biosci tech vol 1 (2)*, 95-99. 2010.
- Burdman, S.; Volpin, H.;Kigel, J.; Kapulnik, Y; Okon , Y. .Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean. (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillumbrasilense* Cd. *Applied Environmental Microbiology* 62: 3030-3033.1996.
- Butler, M.T., Wang, O., Harshey, R. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 3776 – 3781.2010
- Cacciari, I.; Lippi, D.; Pietrosanti, T.; and Pietrosanti, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. *Plant Soil* 115:151–153 doi:10.1007/BF02220706.1989.
- Carson, K.C.; Holliday, S.; Glenn, A.R.; and Dilworth M.J. Siderophore and organic acid production in root bacteria. *Archives of Microbiology* 157:26.1992.
- Cassán, F.; Maiale, S.; Masciarelli, O.; Vidal, A.; Luna, V.; Ruiz, O. Cadaverine production by *Azospirillumbrasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur J Soil Biol* 45:12–19.2009.
- Cassán, F.; Perrig, D.; Sgroy, V.; Masciarelli, O.; Penna, C.; Luna, V. *Azospirillumbrasilense* Az39 and *Bradyrhizobiumjaponicum* E109, inoculated singly or in

combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) *European Journal of Soil Biology*.45: 28–35.2009.

- Chebotar, V.; Constancio, A.; Akao S. Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *BiolFertilSoils* 34:427–432. 2001.
- Cooper, J. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* 103 (5): 1355-1365.2007.
- Covelli, J.; Althabegoiti, M.; Lopez, M.; Lodeiro, A. Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*. *Research in Microbiology* 164: 136 – 144. 2013.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J. and Okon, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev.Plant Sci*.22:107-149.2003.
- Döbereiner, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag. New York.p.2236-2253.1992.
- Döbereiner, J.; Marriel; I.; Nery; M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 22:1464-1473. 1976.
- Ertola; R.; Yantorno, O.; Mignone, C. Monografía de programa regional de desarrollo científico y tecnológico de La Secretaria General de la Organización De Estados Americanos.2001
- Felici, C.; Vettori, L.; Giraldi, E.; Forino, L.; Toffanin, A.; Tagliasacchi, A.; Nuti, M. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*. 40:260–270.2008.
- Ferraris, G.; González Anta, G.; Díaz-Zorita, M. Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. *Merco soja 2006-31 Congreso de Soja del Mercosur. Soja Sudamericana Liderando el Provenir*. Rosario, SF, 27-30 Junio, 2006 Argentina. Conferencia Plenarias-foros-Workshops, pp 85-88.2006.
- Foster, R. Micro-environments of soil microorganisms. *Biol fertile soils* 6:189-203. 1988.
- Glick, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol*. 41:109-117.1995.

- Gómez, M.; Silva, N.; Hartmann, A.; Sagardoy, M.; Catroux, G. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. *World J Microbiol Biotechnol* 13: 167-73. 1997.
- González, N.; Peticari, A.; Stegman, B. y Rodríguez Cáceres, E. Nutrición nitrogenada. En: Giordano L.M. y Baigorri, H.E.J. (Eds.). *El cultivo de la soja en Argentina*. INTA, Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez- EEA Manfredi. Coordinación Subprograma Soja. pp. 187-198. 1997.
- Griffith, G.W.; Roughley, R. J and Brown, J.F. The effect of packaging films on growth and survival of Rhizobia in pear culture. *Letters Applied Microbiology* 14:241-243. 1992
- Gutiérrez-Mañero, F.J.; Ramos-Solano, B.; Probanza, A.; Mehrouachi, J.; Tadeo, F.R. y Talon, M. The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiology Plantarum* 111:206–211. 2001.
- Hadelman, J. and Stabb, E.V. Biocontrol of soil borne plant pathogens. *Plant cell*, 8 1855-1869. 1996.
- Hamaoul, B. Improvement of legume crops yields by co-inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. The Hebrew University of Jerusalem, Israel. 64pp. 2001.
- Halder, A.K. and Chakbartty, P.K. Solubilization inorganic phosphates by *Rhizobium*. *Folia Microbiol* 38:325-330. 1993.
- Hayat, R.; Ali, S.; Amara, U.; Khalid, R.; Ahmed, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598. 2010.
- Hernández, L.E.; Gárate A.; Carpena-Ruiz R. Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. *Plant Soil*, 189: 97–106. 1997.
- Hoang H.; Gurich, N; González, J. Regulation of Motility by the ExpR/Sin Quorum-Sensing System in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*; 190(3): 861–871. 2008.
- Illmer, P. and Schinner F. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 24(4), 389-395. 1992.
- Itzigsohn, R.; Kapulnik, Y.; Okon, Y.; Dovrat, A. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 610-615. 2003.

- Jofré, E.; Lagares, A.; Mori, G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett, 231: 267–275.2004.
- Juge, C.; Prévost, D.; Bertrand, A.; Bipfubusa, M.; Chalifour, F. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. Applied Soil Ecology 61 147– 157.2012.
- Kalpunik, Y.; Sarig, S.; Nur, I.; and Okon, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. Can. J. Microbiol. 29: 895-899.1983.
- Kampert, M.; Strzelczyk, E.; Pokojaska, A. Production of auxins by bacteria isolated from pine roots (*Pinus sylvestris* L.) Acta Microbiol. Poll. 7: 135-143.1975.
- Kapulnik, Y.; Sarig, S.; Nur, Y.; Okon, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield grown wheat.1985.
- Khan, M.S.; Zaidi, A.; Musarrat, J. Microbes for Legume Improvement. Springer Wien, New York, ISBN 978-3-211-99752-9.2010.
- Kloepper, J.W.; Lifshitz, R.; Zablutowicz, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7: 39-43. 1989.
- Kloepper, J.; Schippers, B. Proposed elimination of the term endorhizosphere. Phytopathology, 82: 726-727.1992.
- Koch, A.L. Growth measurement. In Manual of methods for general and Molecular Bacteriology. Gerhardt P ed. American Society for Microbiology. Washington D.C p: 248-277.1981.
- Kumar, V.; Rishi Kumar R.B.; and Narula, N. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. Microbiol Res 156:87-93.2001.
- Lemanceau, P.; Alabouvette, C. Suppression of *Fusarium* wilts by *fluorescent pseudomonads*: mechanisms and applications. Biocontrol Science and Technology, 3: 219-34.1993.
- Loh, J.; and Stacey G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. Appl. Environ. Microbiol 69:10-17pp.2003.
- Long, S. Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. Cell.56:203-214.1989.
- Lugtenberg, B.; Kamilova, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annu Rev. Microbiol. 63: 541-556.2009.

- Maurice, S.; Becaclair, P.; Girand, J.; Sommer, G.; Haetman, A. and Catroux, G. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L, Merrill) liquid inoculants after long-term storage. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17: 635-643.2001.
- Michiels, K.; Croes, C. and Vanderleyden, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J Gen Microbiol 137, 2241-2246.1991.
- Moens, S. and Vanderleyden, J. Functions of bacterial flagella. Crit. Rev. Microbiol. 22: 67–100.1996.
- Molla, A.H.; Shamsuddin, Z.H.; Halimi, M.S.; Morziah, M.; Puteh, A.B. Potential enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. Soil Biol. Biochem. 33, 457–463.2001.
- Nahas, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. World J. Microbiol Biotech. 12:567-572.1996.
- Okon, Y. Recent Progress in research on biological nitrogen fixation with non-leguminous crops. Phosphorus and Agriculture 82: 3-8.1982.
- Okon, Y.; Albrecht S. L.; Burris, R. H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 127:1248-1254.1976.
- Pantakar, A.V.; Gonzales, J. E. Orphan lux R regulators of quorum sensing. FEMS Microbiology Reviews. (334) 739-756 pp.2009.
- Perrig, D.; Boiero, M.L.; Masciarelli, O.A.; Penna, C.; Ruiz, O. A.; Cassán F.D.; Luna, M.V. ( Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomic ally important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. Apply Microbiol Biotechnol 75: 1143–1150.2007.
- PerselloCartieaux, F.; Nussaume, L. and Robaglia, C. Tales from the underground: Molecular plant rhizobacteria interactions. Plant Cell Environ. 26: 189 199.2003.
- Pilet, P.E. and Saugy, M. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA a critical re- examination plant physiology 83.33-38.1987.
- Plasinski, J and Rolfe, B.G: influence of *Azospirillum* strains on the nodulation clovers by Rhizobium strains. Applied and Environmental Microbiology. 49:984-989.1985.
- Raverkar, K. and Konde, B. Effect of Rhizobium and *Azospirillum lipoferum* inoculation on nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. Plant Soil. 106:249–252. 1998.

- Remans, R.; Beebe, S.; Blair, M.; Manrique, G.; Croonenborghs, A.; Torres Gutierrez, R.; Hernandez, G.; EL-Howeity, M.; Michiels, J.; Vanderleyden, J. Detection of quantitative trait (QTL) affecting root responsiveness to auxin producing plant growth promoting rhizobacteria in a common bean population. Rhizosphere 2's satellite international workshop: *Azospirillum* VII and related PGPR: genomics, molecular ecology, plant responses and agronomic significance. Montpellier, France. 2007.
- Remans, R.; Ramaekers, L.; Schelkens, S.; Hernandez, G.; Garcia, A.; Reyes, J.; Mendez, N.; Toscano, V.; Mulling, M.; Galvez, L.; Vanderleyden, J. Effect of Rhizobium-*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. Plant Soil 312: 25–37. 2008.
- Ribaudó, C.M.; Krumpholz, E.M.; Cassán, F.D.; Bottini, R.; Cantore, M.L.; Curá, J.A. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. J Plant Growth Regul 25:175–185. 2006.
- Riefler, M.; Novak, O.; Strnad, M., and Schmölling, T. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. Plant Cell 18:40–5. 2006.
- Rodríguez-Navarro, D.N.; Dardanelli, M.S.; Ruiz-Sainz, J.E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. FEMS Microbiology Letters 272:127-136. 2007.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol Adv 17:319-339. 1999.
- Rodríguez-Cáseres, E. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology, Oct. 990-991. 1982.
- Ruiz Sainz, J.E.; Zhou, J.C.; Rodríguez-Navarro, D.N.; Vinardell, J.M.; Thomas-Oates, J.E. Soybean cultivation and BNF in China. In: Werner D, Newton WE (eds) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer, Dordrecht, pp 67–87. 2002.
- Salamone, I.; Hynes, R.K. and Nelson, L.M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants, Canadian Journal of Microbiology 47: 404–411. 2001.

- Sanchez-Contreras, M.; Bauer W. D.; Gao, M.; Robinson, J.; Downie, A. Quorum sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Phil Trans R Soc B*. 363: 1149-1163 .2007.
- Sawada, H.; Kuykendall L. D. and Young J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Gen. Appl. Microbiol.* 49:155-179.2003.
- Schnak, S.; Weier, K. and MacroL. Plant yield and nitrogen content of a *Digitaria grass* in response to *Azospirillum* inoculation. *Applied and Environmental Microbiology*. 91:342-349. 1981.
- Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca (SAGyP). Resolución 310/94: Inscripción y normalización de fertilizantes biológicos, ensayos para productos nuevos, equipamiento para la elaboración de productos biológicos. Argentina, 1994.
- Silverman, F.P.; Assiamah A.A.; Bush, D.S. Membrane transport and cytokinin action in root hairs of *Medicago sativa*. *Planta* 205:23–31.1998.
- Smith, R.; Scahanak, S.; Milan, J. and Baltenspeger, A. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47:1331-1338.1984.
- Somasegaran, P. and Hoben, H.J. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlaginc. 450 .1994.
- Soto M. J.; Domínguez-Ferreras A.; Pérez-Mendoza D.; Sanjuán J. and Olivares J. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular Microbiology* 11(3), 381-388. 2009.
- Srinivasan, K. and Mathivanan, N. Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. *Biological Control*. 51:395–402.2009.
- Steehoudt, O. and Vanderleyden, J. *Azospirillum* a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:481-506.2000.
- Thuar, A.; Cassán, F.; Olmedo Y.C. De la biología del suelo a la agricultura. Primera ed. Universidad Nacional de Rio Cuarto. 320 pp.2007.
- Thuler, D.S.; Floh, E.; Handro W.; Barbosa, H.R. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. *LettApplMicrobiol* 37:174–178. 2003.

- Tilak, K.; Ranganayakin, N.; Manoharachari, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeon pea (*Cajanuscajan*) European Journal of Soil Science. 57: 67–71.2006.
- Timmusk, S.; Nicander, B.; Granhall, U.; Tillberg, E. Cytokinin production by *Paenibacilluspolymyxa*. Soil BiolBiochem 31:1847–1852 doi:10.1016/S0038-0717(99)00113-3.1999.
- Van Loon, L.C.; Bakker P.; and Pieterse, C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., 36: 453-483. 1998.
- Van Rhijn, J.; Vanderleyden, J. The *Rhizobium*- plant symbiosis. Microbiological Reviews 59: 124-142.1995.
- Volpin, H and Kapulnik, Y. Interaction of *Azospirillum*withbeneficial soil micro-organisms. In: *Azospirillum/F/aii( Associations*. Boca Raton FL: CRC Press,111-118.1994.
- Wang, T. andMartinez, J. Taxonomía de los rizobios. ([http://www.microbilogá.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_12/capitulo12.pdf](http://www.microbilogá.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/capitulo12.pdf)).2007.
- Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52: 487-511.2001.
- Yahalom, E.; Okon Y.;Dovrat, A. *Azospirillum*effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. Can J.Microbiol. 33: 510-514.1991.
- Yaxley, J.R.; Ross, J.J.; Sherriff, L. J.; Reid, J.B. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. Plant Physiol 125:627–633 doi:10.1104/pp.125.2.627.2001.

Sitios web visitados:

- [www.fyo.com](http://www.fyo.com)
- [www.minagri.gob.ar](http://www.minagri.gob.ar)
- [www.usda.com](http://www.usda.com)

