



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de
LICENCIADO EN QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA SIMBIOSIS *MESORHIZOBIUM LOTI- LOTUS*
GLABER COMO HERRAMIENTA DE LA EXPANSIÓN DE LA
FRONTERA AGROPECUARIA.**

Autor: Paula Andrea Ferreyra
Director: Dra Alicia Ester Grassano

ARGENTINA

SANTA ROSA (LA PAMPA)

2007

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de La Pampa y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por darme la posibilidad de realizar dicho trabajo.

A todo el departamento de química por su excelente predisposición hacia para facilitar recursos humanos y materiales para realizar el trabajo.

A investigadores del IIB – INTECH-Chascomús, por facilitarme material para poder llevar a cabo mi proyecto de tesis.

A la Lic. Valeria Belmonte por el asesoramiento en el análisis estadístico

A el Geol. Hugo Martínez por la ayuda brindada para ubicar zonas con condiciones edáficas limitantes

A la Dra. Alicia Grassano por su constante apoyo y estímulo, por su gran paciencia, y por toda la ayuda brindada tanto académica como humana a los largo de éstos años.

A la Dra Mónica Bellozas y a la Lic Patricia García por la ayuda y la predisposición en el aporte de materiales e información que estuvieran a su alcance.

A toda mi familia por darme la posibilidad de realizar mis estudios, especialmente a mi tía porque me ayudo muchísimo durante todos estos años.

A mis amigas, por “aguantarme” y porque las quiero mucho.

Y a todas aquellas personas que directa o indirectamente influyeron en la realización de éste trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del nitrógeno	1
1.2. Aspectos generales de la promoción del crecimiento vegetal	4
1.2.1. Fijación biológica de nitrógeno	5
1.2.1.1. El microorganismo	5
1.2.1.2. La Planta	6
1.2.1.3. Aspectos generales de la simbiosis <i>Rhizobium</i> – Leguminosa	11
1.2.1.4. Reacciones y mecanismo de la fijación biológica de nitrógeno	15
1.2.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo	17
1.2.3. Microorganismos que sintetizan sideróforos	20
1.2.4. Condiciones límites de la acción de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR)	22
1.2.4.1. Suelos salinos y sódicos	23
1.2.4.2. Anegamiento	24
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Microorganismos	27

3.1.1. Fijadores de Nitrógeno	27
3.1.2. Solubilizadores de Fósforo	27
3.2. Metodologías de aislamiento de microorganismos	27
3.2.1. Metodología de aislamiento de rizobios nativos	27
3.2.2. Metodología de aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo	30
3.3. Mantenimiento de las cepas aisladas	30
3.4. Elección del aislamiento de cepas nativas de rizobios a utilizar en el ensayo de efectividad e infectividad por medio de la técnica electroforésis de isoenzimas (M.L.E.E)	30
3.5. Desarrollo en medio líquido de cepas patrones y nativas de rizobios y solubilizadoras de fósforo	32
3.6. Ensayo en cámara climatizada con <i>Lotus Glaber</i>	32
3.6.1. Parámetros evaluados	34
3.6.1.1. Peso seco	34
3.6.1.2. Contenido de nitrógeno total. Método de KJELDHAL.	34
3.6.1.3. Índice de eficiencia relativa	34
3.7. Parámetro metabólicos de las cepas de rizobios nativos	35
3.7.1. Crecimiento de cepas de rizobios con control de pH	35
3.7.2. Evaluación del carácter solubilizador de los rizobios	36
3.8. Experiencias de caracterización de la bacteria solubilizadora de fósforo nativa	36

3.8.1. Cuantificación de la propiedad de solubilizar fósforo	36
3.8.2. Capacidad de fijar nitrógeno	37
3.8.3. Capacidad sideróforo	37
3.8.4. Crecimiento en medio selectivo para <i>Pseudomonas</i>	38
3.9. Tinción de gram	38
3.10. Medios de cultivo utilizados	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Aislamiento de microorganismos	42
4.1.1. Aislamiento de rizobios nativos	42
4.1.2. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo	42
4.2. Elección del aislamiento de cepas nativas de rizobios a utilizar en el ensayo de efectividad e infectividad por medio de la técnica electroforésis de isoenzimas (M.L.E.E.)	43
4.3. Ensayo en cámara climatizada de <i>Lotus Glaber</i>	44
4.3.1. Parámetros evaluados	44
4.3.1.1. Peso seco	44
4.3.1.2. Contenido de nitrógeno total	48
4.3.1.3. Índice de eficiencia relativa (IER)	50
4.4. Parámetros metabólicos de las cepas de rizobios nativos	50

4.4.1. Crecimiento de cepas de rizobios con control de pH	50
4.4.1.1 Calculo de las velocidades específicas y de los tiempos de generación	51
4.4.2. Evaluación del carácter solubilizador de los rizobios	53
4.5. Experiencias de caracterización de la bacteria solubilizadora de fósforo nativa	53
4.5.1. Cuantificación de la propiedad de solubilizar fósforo	53
4.5.2. Capacidad de fijar nitrógeno	55
4.5.3. Capacidad sideróforo	55
4.5.4. Crecimiento en medio selectivo para <i>Pseudomonas</i>	56
4.6. Tinción de gram	57
5. CONCLUSIONES	58
6. BIBLIOGRAFÍA	60

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del nitrógeno

Para los suelos de la Región Pampeana el nutriente que en mayor medida condiciona el crecimiento y rendimiento de los cultivos es el nitrógeno (N) (Echeverría. H.E; García F.O , 2005).

Suponiendo las necesidades de agua cubiertas, el nitrógeno es el factor limitante más importante para el desarrollo de las plantas y su disponibilidad condiciona en gran medida la productividad de los cultivos. Es indispensable para el crecimiento de todo organismo vivo. Forma parte de moléculas esenciales para la vida de las plantas, condicionando la calidad de las estructuras y los procesos en los que éstas intervienen. Está presente en los ácidos nucleicos (ADN y ARN), las vitaminas y en las moléculas de almacenaje de energía. Forma parte de los aminoácidos, base de las proteínas, las que son parte constitutiva de todas las células vivas y además, forma parte de la clorofila e interviene en su síntesis, por lo que está involucrado en la fotosíntesis. Sin N y clorofila, el cultivo no utilizará la luz del sol como fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones esenciales para la planta como la absorción de nutrientes (Fernández Canigia M. V, 2003).

La gran reserva natural de N es la atmósfera, donde representa el 78% de los gases que componen el aire. No obstante, la triple ligadura (N=N) de la molécula de dinitrógeno (N₂) es una de las más fuertes conocidas y se requiere mucha energía para romperla. Por esto, el N₂ atmosférico no es utilizado directamente por las plantas o los animales superiores y se requiere de procesos industriales o biológicos para su transformación en formas asimilables.

La síntesis industrial de amoníaco (proceso de Haber Bosch) requiere hidrógeno (derivado del gas de petróleo), altas temperaturas (300 a 600 °C) y altas presiones (200 a 800 atm), sumando aproximadamente 6 barriles de petróleo por tonelada de NH_3 sintetizado. Además del costo energético de la transformación química, el uso de fertilizantes nitrogenados requiere de su transporte desde las fábricas y la aplicación en el campo. Por lo tanto, el precio de los fertilizantes nitrogenados está afectado por el costo del petróleo.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la transformación del N_2 atmosférico en amonio a partir de procesos en los que intervienen microorganismos de vida libre o en simbiosis con plantas superiores. La FBN contribuye globalmente con cerca de la mitad del nitrógeno utilizado en el cultivo de las plantas, la otra mitad procede casi en su totalidad del amonio sintetizado vía Haber Bosch (Fernández Canigia M. V, 2003).

En consecuencia, el N ingresa al suelo a través de las lluvias, de los abonos orgánicos e inorgánicos (fertilizantes) y de la FBN. Los compuestos orgánicos (excreciones animales, rastrojos, o abonos orgánicos) son degradados por los organismos del suelo produciendo la mineralización del N que los compone (conversión del N orgánico en N mineral) formando amonio (amonificación), nitritos y nitratos (nitrificación). Parte de los compuestos de N inorgánico del suelo se inmovilizan en células bacterianas y fúngicas (conversión del N mineral en N orgánico) o son utilizados por bacterias como fuente de oxígeno (desnitrificación) reduciéndose los nitratos a N_2 que se pierde hacia la atmósfera. Las plantas también absorben formas minerales de nitrógeno, que luego de ser incorporadas en su composición, son exportadas en los productos de cosecha o forrajeros. Los excesos hídricos favorecen a otros procesos de pérdida del N del suelo: lavado hacia capas profundas fuera del alcance de las

raíces de las plantas y escurrimiento superficial. Todos los procesos del ciclo representados en la figura 1, actúan de forma que en condiciones normales las diferentes actividades microbianas están equilibradas y las pérdidas son compensadas por las ganancias (Fernández Canigia M. V 2003).

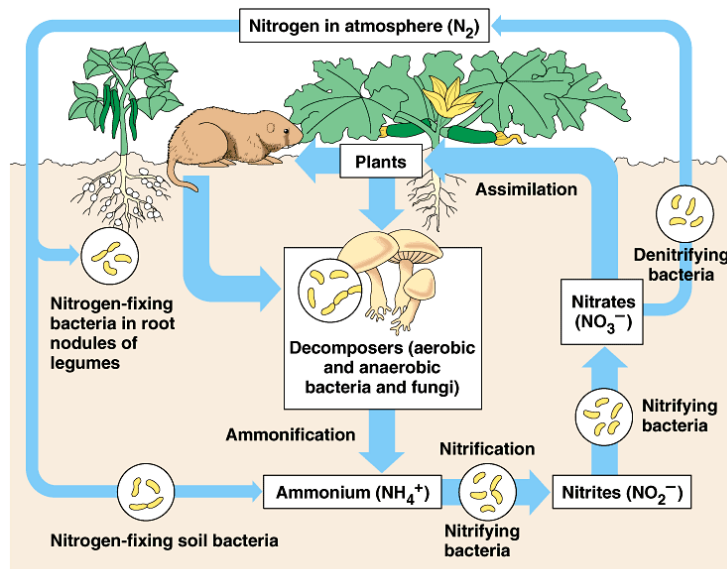


Fig 1: Ciclo del Nitrógeno (Zannazzaro. A 2007, conferencia dictada)

La FBN presenta un gran interés que ha determinado que sea considerada objeto de intensa investigación desde que en 1888 fue descubierta, aunque empíricamente era aprovechada ya por los romanos cuando observaron el efecto beneficioso de la rotación de los cultivos (Olivares Pascual .J, 2006).

Hoy día la FBN cobra más valor, si cabe, dentro del contexto de la agricultura sostenible, ya que puede evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio. En el mundo desarrollado la agricultura depende en gran medida del uso de fertilizantes químicos y pesticidas para mantener sus altas producciones agrícolas, sin tener en cuenta los terribles daños

que estos pueden ocasionar, ya sea, afectando el ciclo global del nitrógeno, contaminando las aguas subterráneas y superficiales (por lixiviación de nitratos), incrementando los riesgos de intoxicaciones químicas y aumentando los niveles de óxido nitroso (N_2O) atmosférico el cual es un potente gas invernadero (Olivares Pascual .J. 2006).

1.2. Aspectos generales de la promoción del crecimiento vegetal

En 1904 se utilizó por primera vez el termino “rizosfera”, definiendo a la misma como la región del suelo expuesta a la influencia de las raíces y donde tiene lugar una intensa actividad microbiana. El suelo rizosférico tiene características bien diferenciables del suelo distante de las raíces, donde el aporte de nutrientes orgánicos por el sistema radical favorece ampliamente el crecimiento de los microorganismos.

Las rizobacterias pueden tener efectos deletéreos, neutros o beneficiosos. Las rizobacterias benéficas que promueven el desarrollo vegetal se designaron como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Frioni.L, 1999).

La acción PGPR se manifiesta por mecanismos que se clasifican en:

Directos: cuando la bacteria produce metabolitos que directamente promueven el crecimiento sin interactuar con la microflora nativa, tales como **fijación de nitrógeno atmosférico**, síntesis de sideróforos que solubilizan y secuestran el hierro desde el suelo y lo proveen a las células de las plantas; síntesis de diferentes fitohormonas que pueden actuar para mejorar varios estadios de crecimiento de la planta; mecanismos para movilizar y solubilizar minerales tales como fósforo, azufre y disponerlos para el crecimiento vegetal, síntesis de enzimas que contribuyen en el crecimiento y desarrollo de la planta.

Indirectos: cuando su acción se traduce en la reducción o el control de organismos deletéreos como son la producción de cianidas, de antibióticos y la inducción de resistencia sistémica contra patógenos (Chabot et al, 1996; Antoun et al, 1998; Nieto and Frakerberger, 1989; Keel et al, 1992).

1.2.1. Fijación biológica de nitrógeno

Para introducirnos en éste tema tan complejo, se mencionará primero los participantes que juegan un papel principal en el proceso de FBN, éstos son, el microorganismo (bacteria) y la planta (leguminosa).

1.2.1.1. El microorganismo

Todos los rizobios son organismos procariotas miembros del reino *Bacteria* y división *Proteobacteria* pero con diferentes clases y ordenes, atenderemos a los rizobios que pertenecen a la familia de *Alfaproteobacteria* del orden *Rhizobiales* dentro de la cual haremos especial mención a la familia *Phyllobacteriaceae* y al género *Mesorhizobium* debido a que, *Mesorhizobium loti* es el microorganismo específico que nodula *Lotus glaber* (figura 2).

Mesorhizobium: las bacterias de este género miden 0.40-0.9 x 1.2-3.0 micrómetros. Generalmente son pleomórficas en condiciones adversas de crecimiento, tales como alta concentración de sales. Se han reportado flagelos peritricales o un flagelo polar o subpolar. Son bacterias quimio-organotróficas que utilizan una gran variedad de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de energía. No utilizan ni celulosa ni almidón. Todas las cepas producen ácido en el medio manitol-agar-extracto de levadura (YMA) (Martinez Romero J. and Lopez Lara I., 2005). Las colonias en medios de cultivo YMA son circulares convexas, semitraslúcidas y mucilaginosas.

Son bacterias que poseen una velocidad de crecimiento intermedio, entre aquellas del género *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*.

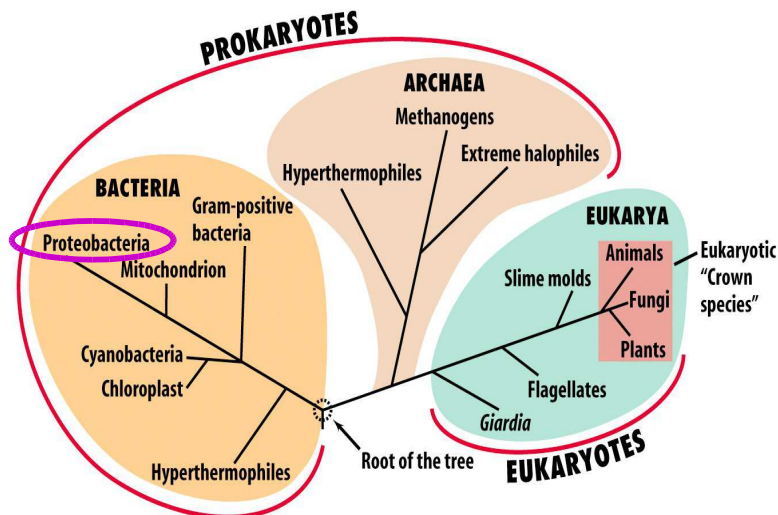


Figure 2-7 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Fig 2 : Taxonomía (Zannazzaro. A 2007, conferencia dictada)

1.2.1.2. La Planta

Las leguminosas constituyen, a nivel mundial, la tercera familia de angiospermas en cuanto a especies. Comprenden 650 géneros y más de 18.000 especies, pertenecen a:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Es la segunda familia en importancia para los humanos, solo superada por la familia de las gramíneas.

Las leguminosas son esenciales en el programa de rotación de cultivos, son muy valiosas en cuanto a que, protegen a los suelos de la erosión, dan

sombra a la tierra casi todo el año, ventaja importante en climas tropicales y dan a la tierra grandes cantidades de nitrógeno al ser incorporadas al suelo como abonos verdes.

Existe gran demanda de leguminosas para la alimentación del hombre y de los animales ya que contienen cantidades adecuadas de minerales, para la formación de huesos y de vitaminas. Además, las leguminosas acumulan en sus hojas y semillas una cantidad abundante de proteínas, sustancias que constituyen la base del protoplasma de todas las plantas y animales. (Hughes et al 1972).

El género *Lotus* comprende alrededor de doscientas especies (anuales, bianuales o perennes), ampliamente distribuidas en todo el mundo (Lagler J.C.). Se han considerado más de 100 especies pertenecientes a este género. Cuatro especies, tres perennes y una anual, son utilizadas como forrajeras en Sudamérica templada: *Lotus glaber*, *Lotus corniculatus*, *Lotus uliginosus*, *Lotus subbiflorus* (De Battista .J., 2001).

Lotus glaber

➤ Origen y distribución

Hace alrededor de 70 años llegaron a las orillas del río Salado las semillas de esta planta leguminosa originaria de la costa mediterránea europea. Allí se adaptó por selección natural a los suelos inundables, con alto contenido de sodio y pobres en nutrientes, invadiendo las zonas inapropiadas para las especies nativas. Los ganaderos locales encontraron que la planta daba lugar a una buena pastura y la llamaron “la alfalfa de los pobres” (figura 3) (Ruíz O., 2004).



Fig 3: *Lotus glaber*

➤ **Morfología**

Tallo principal: Forma a partir del primer año de crecimiento una corona que posee numerosas yemas capaces de producir ramas de crecimiento indefinido. Estos ejes primarios ramifican a partir de yemas ubicadas en las axilas de las hojas dando origen a ramas secundarias y terciarias. Al finalizar el periodo reproductivo, las ramas mueren total o parcialmente, remplazadas en el próximo ciclo a partir de yemas de la corona. Presenta un hábito de crecimiento postrado.

La corona: Se continúa en una raíz pivotante que se ramifica en raíces laterales.

Las hojas: Dispuestas en forma alternada, se componen de cinco folíolos (tres en la porción terminal del pecíolo y dos en su base) (figura 5).

La inflorescencia: en umbela se desarrolla a partir de una yema axilar y está constituida por cuatro a ocho flores unidas mediante un pedicelo corto a un pedúnculo largo (figura 4). La floración es indeterminada y se extiende desde noviembre a marzo. Las flores son amarillas y pueden presentar pintas naranjas o rojas.



Fig 4: Inflorescencia de *Lotus glaber*



Fig 5 : Hoja de *Lotus glaber*

Las semillas: son pequeñas (1.3 x 1 mm) y livianas. El color varía desde un verde oliva o marrón hasta casi negro (figura 6).



Fig 6: Semilla de *Lotus glaber*

➤ **Requerimientos ecológicos**

El *Lotus glaber (tenuis)* o lotera de hoja angosta (Barrietos L. et al, 2002), crece en ambientes diversos aunque las poblaciones más abundantes se encuentran en posiciones intermedias de relieve, asociadas con menta (*Mentha pulegium*), pasto miel (*Paspalum dilatatum*) y pasto colchón

(*Stenotnplirm secundatum*); se adapta mejor que otros *Lotus* a drenaje pobre, alcalinidad (hasta pH =10) y salinidad (Lagler J.C.).

Se ha observado que *Lotus glaber* posee una dependencia significativa por las micorrizas arbusculares para la absorción de fósforo (Mendoza R.E. et al, 2000). Esta propiedad sería de gran importancia en razón que la gran mayoría de los suelos de la depresión en donde *L. glaber* crece espontáneamente, son deficientes en fósforo (Darwich N.A., 1983). Además *L. glaber* es una especie adaptada a condiciones de baja disponibilidad de fósforo (Seany R.R and Henson P.R, 1970), y que posee una gran plasticidad para crecer en suelos de distintas condiciones edáficas (Mazzanti A. et al. 1988). Se ha observado que *L. glaber* ocupa suelos que difieren ampliamente en las características físicas y químicas (Montes L. 1988, et al 1995) y también que el aumento de fertilidad fosforada del suelo aumenta su cobertura dentro del pastizal (Ginzo H.D. et al 1982).

➤ **Fijación biológica**

Lotus al igual que muchas otras leguminosas, es capaz de fijar nitrógeno en relación con bacterias del género *Rhizobium*, más específicamente como ya se ha dicho antes el género que nodula *Lotus glaber* es *Mesorhizobium loti*.

➤ **Otras características**

Además de servir como pastura la especie tiene la propiedad de beneficiar al ecosistema, aporta materia orgánica al terreno, disminuye la salinidad y aumenta el contenido de nitrógeno y fósforo disponible en el suelo,

favoreciendo el crecimiento de otros vegetales. Como complemento de sus virtudes debe destacarse que es antagonista del cardo (Ruíz O., 2004).

Otra ventaja de esta especie constituye la abundante producción de semillas, donde un 90 % posee cubierta dura y no germina inmediatamente. Éstas constituyen el reservorio o banco de semillas del suelo donde hasta un 30 % de las semillas germinan anualmente, con lo que se puede mantener o incrementar la densidad de plantas en la pastura.

1.2.1.3. Aspectos generales de la simbiosis *Rhizobium* – Leguminosa

Para llevar a cabo el proceso de FBN estas bacterias han de encontrarse en las inmediaciones de plantas de la familia de las *Fabaceae* e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios, para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación (Redondo-Nieto. M, et al).

Antes de llegar a la formación del nódulo, tanto la planta como la bacteria han de seguir un protocolo, de tal manera que, si cualquiera de ellos no cumple con alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo abortará. Dicho protocolo se puede resumir en:

- 1) Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo.
- 2) Activación del ciclo celular en células del córtex e iniciación del nuevo órgano en la planta.
- 3) Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección.
- 4) Diferenciación de la bacteria a forma especializada.

1) Señalización entre la planta y el *Rhizobium*

Las características físico-químicas de la rizosfera hacen de ella un lugar muy adecuado para el crecimiento de microorganismos (Naninperi et al, 2003), de los cuales los más abundantes son las bacterias, en gran parte propiciado por la presencia de los exudados de la planta ricos, entre otros, en compuestos carbonados. Entre el 10% y el 30% de los fotosintatos de la planta son secretados en los exudados radiculares abarcando carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos. Entre dichos compuestos se encuentran los flavonoides (derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona) cuya composición va a variar dependiendo de la especie, y que además de ser metabolizados, desencadenan una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes apropiados. Así, algunos de estos flavonoides (figura 7) a concentraciones nanomolar, provocan la quimiotaxis activa de los rizobios hacia la superficie radical (Lodeiro, A. R. (2003).

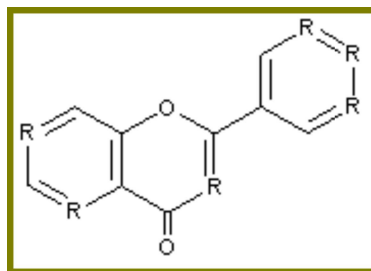


Fig 7: Estructura de un flavonoide

2) Iniciación del nuevo órgano en la planta.

Los rizobios secretan polisacáridos que se unen a ciertas proteínas de la planta (lectinas), encontradas en los extremos de los pelos radicales sobre los que se adhieren.

Los flavonoides a concentración micromolar, activan en los *Rhizobium* a los genes responsables de la nodulación (genes *nod*). Los genes *nod* codifican todo un paquete de enzimas encargadas de la producción de los factores Nod. Los factores Nod están compuestos por un esqueleto de N-acetil-D-glucosamina (figura 8) unidos por enlaces α -1,4 sintetizado por NodA, NodB y NodC, que presenta una serie de modificaciones dependiendo de la estirpe de *Rhizobium* y que van a otorgar cierta especificidad al proceso de nodulación (Spaink H.P., 2000).

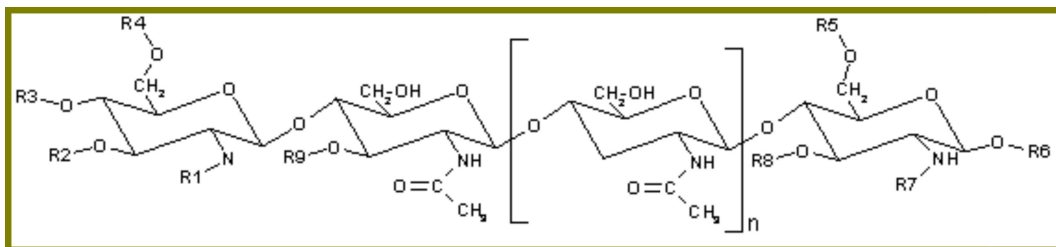


Fig 8: N-acetil-D-glucosamina

La mera presencia de los factores Nod en concentraciones del orden 10^{-12} M es suficiente para que en la planta se produzca la deformación de los pelos radiculares (Hirsch. Et al 2001) pero se necesitan niveles mayores, del orden de 10^{-7} a 10^{-9} M para provocar la formación de los pre-canales de infección, la división de las células corticales y la inducción de genes implicados en las fases previas a la nodulación, las nodulinas tempranas (Downie and Walter, 1999).

3) Infección y formación del canal de infección

En paralelo con la diferenciación y desarrollo del nódulo, debe producirse la infección de la raíz por parte de los rizobios. En primer lugar, ocurre una curiosa deformación de los pelos radiculares, llamada enrulado del pelo radicular. Los

rizobios quedan atrapados en la curvatura interior del pelo radicular y posteriormente penetran al mismo formando un hilo de infección longitudinal en dirección a las células subcorticales de la raíz donde se está formando el nódulo. El hilo de infección se forma por una invaginación de la pared celular del pelo radicular, que da origen a un canal a través del cual migran los rizobios hacia la mencionada zona subcortical (Stougaard, 2000).

4) Diferenciación de la bacteria a forma especializada

La última etapa de la infección es la invasión de los nódulos en formación por parte de los rizobios que provienen del hilo de infección y la diferenciación de éstos en bacteroides capaces de fijar N_2 . Los rizobios que se descargaron del hilo de infección invaden el citoplasma de ciertas células del nódulo, que se conocen como células infectadas. En estas células se observa que el citoplasma adquiere una posición central, gracias a una reorganización de los microtúbulos y el citoesqueleto. A medida que los rizobios ingresan al citoplasma de las células infectadas son envueltos por una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal. Una vez dentro, los rizobios pueden dividirse algunas veces y luego inician el proceso de diferenciación en bacteroides, que consiste en general en un incremento del tamaño de las bacterias, que puede llegar a ser de diez veces el tamaño original; además, los bacteroides pueden adquirir formas redondeadas o de Y , y es en este momento cuando se reprime la expresión de los genes de nodulación y se estimula la de los genes relacionados a la fijación de N_2 . Los grupos de bacteroides así diferenciados y envueltos en una membrana peribacteroidal forman cuerpos distinguibles en el citoplasma de las células infectadas. Dichos cuerpos reciben el nombre de simbiosomas y es en ellos

donde se va a producir la fijación de N₂ hasta que finalmente se inicie su degradación y senescencia.

Estos procesos ocurren de maneras diferentes según los nódulos sean de crecimiento indeterminado o determinado. Los nódulos indeterminados, como los de arvejas, trébol y alfalfa, tienen un aspecto alargado. En cambio los nódulos determinados, como los de soja, poroto y *Lotus*, tienen forma redondeada

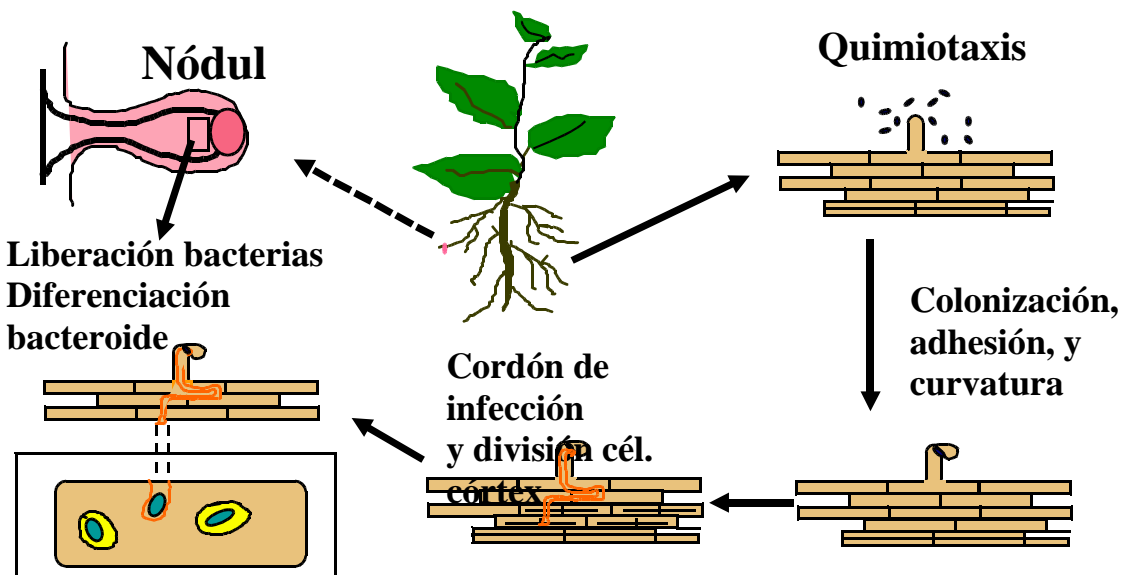
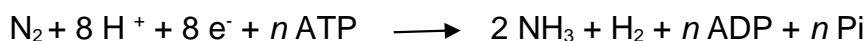


Fig 9: Formación del nódulo (Sanjuán 2005, conferencia dictada)

1.2.1.4. Reacciones y mecanismo de la fijación biológica de nitrógeno

La reacción biológica de reducción de N₂ en amoníaco es:



donde Pi significa fosfato inorgánico y $n \geq 16$, dependiendo de las condiciones del flujo de protones; si éstas son limitantes se requiere un mayor consumo de ATP (Halbleib and Ludden, 2000).

Esta reacción está catalizada por una enzima conocida como nitrogenasa. La misma es, en realidad, un complejo multienzimático que cataliza varias etapas de la reacción, la dinitrogenasa es irreversiblemente inactivada (desnaturalizada) por el oxígeno (Shaw and Brill, 1977). Por lo tanto, la fijación de N_2 requiere igualmente de sistemas de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno. Por el lado de la planta, esta protección la confiere una capa peribacteroidal que actúa como barrera de protección a la difusión del oxígeno. Además, la planta suministra al nódulo una proteína muy similar a la hemoglobina de nuestra sangre, llamada leghemoglobina, que es capaz de unir y transportar oxígeno con gran afinidad, lo que resulta en concentraciones de oxígeno extremadamente bajas en el nódulo, del orden de 3 a 30 nM, unas $10^4 - 10^5$ veces menores que las concentraciones de oxígeno encontradas habitualmente en los fluidos de los tejidos aeróbicos. La leghemoglobina ha sido catalogada como una nodulina, debido a que el gen que codifica dicha proteína en las plantas sólo se expresa en los nódulos fijadores de N_2 . Así, dado que la leghemoglobina es roja, la actividad fijadora de N_2 en los nódulos es fácilmente detectable visualmente por una coloración rosada del interior de dichos órganos, a diferencia de la coloración blanca de los nódulos inefectivos o la marrón-verdosa de los nódulos senescentes (Frazzon, et. al, 1997)

El amoníaco producido durante la reducción del N_2 se libera al espacio peribacteroidal, donde predominan condiciones de acidez que desplazan el equilibrio $NH_3 + H^+ \longrightarrow NH_4^+$ hacia la formación de amonio, el cual a diferencia del amoníaco, no puede atravesar las membranas del bacteroide debido a su carga. Dado que el transportador de amonio hacia el interior del bacteroide está ausente porque su síntesis fue inhibida como parte del programa de diferenciación del bacteroide, la única ruta posible para dicho amonio es

transformarse en aminoácidos o ureídos en las células del nódulo para luego continuar hacia el xilema de la planta. La enorme mayoría de los diazótrofos utiliza el producto de la fijación de N_2 para satisfacer sus propias necesidades de N, pero el hecho distintivo de los rizobios es que dicho producto en vez de ser utilizado por el bacteroide es transferido a la planta, que a su vez, suministra las fuentes de C (ácidos dicarboxílicos) y de N (aminoácidos) necesarias para la nutrición del bacteroide.

Para obtener beneficios en la fijación biológica de nitrógeno es fundamental que la leguminosa presente una nodulación eficiente, originada por la inoculación con microorganismos de elevada infectividad, eficiencia fijadora, alta capacidad competitiva y buena sobrevivencia en el suelo (Sadowsky and Graham, 1998).

1.2.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo

El fósforo es uno de los seis macronutrientes esenciales (N, P, K, Ca, Mg y S) requerido para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Éste participa en biomoléculas a través de enlaces fosfodiésteres como en los fosfolípidos, ácidos nucleicos y en enlaces anhídrido de alta energía como ATP. Una fracción importante del fosfato de la planta permanece libre ubicándose en vacuolas, en el citoplasma y demás orgánulos. Además participa en la fotosíntesis, respiración y metabolismos energéticos en general (Azcón – Bieto y Talón, 2000)

La simbiosis rizobio-leguminosa es altamente sensible a la carencia de fósforo. Debido a que como ya se ha mencionado la fijación biológica de nitrógeno es un proceso que insume una gran cantidad de energía. El fósforo es indispensable para la formación de las moléculas de ATP necesarias, a lo que se debe sumar el consumo para la formación de los tejidos de los nódulos y para los

procesos de reconocimiento genético (señales entre la planta y el rizobio). Por lo tanto para que sea posible la nodulación y fijación de N_2 , es necesario un aporte adecuado de fósforo. Cuando la concentración de P en la planta es inferior al 0.2% la nodulación y la fijación de N_2 son casi despreciables. Por debajo de 0.1% no se formarán nódulos. Las concentraciones de fósforo en los nódulos son en general, mayores que las concentraciones en el tallo o en el resto de la raíz.

Los suelos son generalmente pobres en el contenido de fósforo disponible para las plantas. Para el caso de la provincia de La Pampa se consigna que en los últimos años, debido al incremento de áreas sembradas con cultivos muy extractivos la disponibilidad de éste elemento está disminuyendo marcadamente.

El contenido de fósforo promedio en los suelos es alrededor de 0.05 % pero solo el 0.1 % del total esta disponible para la planta (Zou et al., 1992). La poca disponibilidad de este elemento en muchos suelos se debe no solo a encontrarse en bajas concentraciones, sino también por su asociación con cationes y compuestos orgánicos creando complejos insolubles (Omar 1998). La deficiencia de fósforo en los suelos es uno de los factores químicos más importantes que restringen el crecimiento de las plantas; debido a esto la fertilización con grandes cantidades de compuestos solubles de fósforo es una forma que poseen los productores de incrementar la productividad de los cultivos, sin embargo ésta fertilización no es eficiente ya que éstas formas solubles son rápidamente fijadas y precipitadas quedando en forma no disponible para las plantas ($CaHPO_4$, $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$ y $AlPO_4$). La fijación y precipitación del P depende generalmente del pH y tipo de suelo. En suelos ácidos el P es fijado por óxidos e hidróxidos libres de Al y Fe, mientras que en suelos alcalinos es fijado por Ca.

El fósforo en el suelo no solo se encuentra como fósforo inorgánico sino que también encontramos formas orgánicas de fósforo tales como fosfatos de inositol, ácidos nucleicos, fosfolípidos, ácidos carboxílicos, ácidos teicoicos, ácidos urónicos.

En varios trabajos se ha examinado la habilidad de diferentes especies bacterianas de solubilizar fosfatos inorgánicos y orgánicos insolubles y dejarlos de esta forma disponible para la planta (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Estos microorganismos no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales.

Entre las bacterias que solubilizan el P inorgánico se encuentran aquellas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Rhiccocus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia*. (Rodríguez H. and Fraga R.; 1999)

La solubilización de fosfatos minerales por microorganismos ha sido estudiada por décadas y es de interés en diferentes campos incluyendo la agricultura y la biorremediación. Aunque hay controversia acerca del mecanismo por el cual el P es liberado a partir de fuentes minerales, es ampliamente aceptado que entre estos mecanismos se encuentran la acidificación, la liberación de ácidos orgánicos, liberación de ligandos orgánicos y la producción de polímeros extracelulares (Richardson. A. E., 1994).

La producción de ácidos orgánicos produce la acidificación de la célula microbiana y sus alrededores. Consecuentemente, el fósforo es liberado a partir de fosfatos minerales por sustitución de protones por Ca^{+2} . (Schachtman D. P, et al, 1998)

La producción de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fósforo ha sido bien documentada. Entre ellos, el ácido glucónico parece ser el agente más frecuente de la solubilización de fosfatos. Se lo cita como el principal ácido orgánico producido por *Pseudomonas* sp. (Illmer P. and Schinner F.; 1995).

Otros ácidos orgánicos identificados en bacterias solubilizadoras de fósforo son el ácido 2- cetoglucónico, identificado en *Rhizobium leguminosarum* y *Bacillus firmus* (Richardson A.E, 1994).

Se ha informado que, cepas de *Bacillus liqueniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* han sido reportadas como productoras de mezclas de diferentes ácidos, entre los que se encuentran láctico, isovalérico, isobutírico y acético. Otros ácidos orgánicos tales como glicólico, oxálico, masónico y succínico han sido identificados entre diferentes solubilizadores de fósforo. (Schachtman D. P, et al, 1998).

Entre las bacterias capaces de solubilizar el P orgánico tenemos preferentemente las del género *Bacillus*, las cuales mineralizan el fósforo orgánico mediante la liberación de enzimas fosfatasas.

La mayoría de la bibliografía consultada responde a trabajos de solubilización o movilización de fosfatos mediadas por bacterias del género *Pseudomonas*.

1.2.3. Microorganismos que sintetizan sideróforos

El hierro es uno de los elementos más abundantes en el suelo, se lo encuentra en mayor proporción en forma de óxidos e hidróxidos, como partículas discretas o adsorbidas sobre los minerales (Echeverría. H.E; García F.O, 2005).

Éste es esencial para el desarrollo vegetal dado que actúa como cofactor en muchas reacciones enzimáticas redox, juega un papel fundamental en la

respiración celular, siendo un componente clave de los citocromos y de las proteínas que contienen hierro y azufre implicadas en el transporte de electrones. En el proceso de fijación biológica intervienen sustancias químicas (enzimas, proteínas y otros compuestos) que tienen en su constitución micronutrientes, como el hierro, el cual es requerido entre otras para establecer la protección respiratoria a la nitrogenasa, así como para proteger a la bacteria contra productos tóxicos derivados del oxígeno, generados por una respiración muy activa. Su carencia genera por lo tanto fallas en el proceso de fijación (Espín, G Castañeda. M).

A pesar de que éste es abundante en los suelos, no está muchas veces disponible para plantas y microorganismos ya que su solubilidad es muy baja a pH neutro y alcalino.

Muchos microorganismos, sobre todo especies de *Pseudomonas* producen sustancias orgánicas quelantes, de bajo peso molecular con tres grupos funcionales que poseen elevada afinidad por ión férrico, denominados **sideróforos** (figura 10), los cuales son inducidos por bajas concentraciones de Fe y reprimidos por altas. Son compuestos derivados, preferentemente, de los catecolatos, en el caso de las bacterias y del ácido hidroxámico, en el caso de los hongos. Los pigmentos fluorescentes que permiten identificar a estas *Pseudomonas* constituyen muchas veces sideróforos, como la pioverdina, seudobactina.

Estas sustancias favorecen las posibilidades de asimilación de éste ión por la bacteria productora en ambientes de baja disponibilidad, una vez quelado el hierro, una proteína de membrana específica (permeasa) transporta el complejo órgano-metálico al citoplasma donde sistemas ferrisiderófo-reductasa reducen el hierro y el sideróforo queda disponible para reiniciar el ciclo

Muchos microorganismos deletéreos producen HCN que inhibe el metabolismo energético del cultivo. Los microorganismos productores de sideróforos compiten con estos organismos por el hierro, inhibiendo el efecto deletéreo en el cultivo (Frioni. L, 1999).

A pH inferiores a 6 el Fe disponible (Fe^{+2}) aumenta y los sideróforos son menos efectivos.

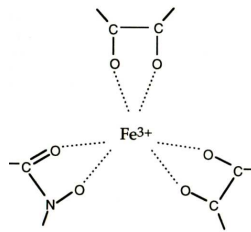


Fig 10: Sideroforo (Cassan, conferencia dictada,2007)

1.2.4. Condiciones límites de la acción de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR)

La acción de los microorganismos PGPR está condicionada por factores bióticos y abióticos.

Dentro de los primeros se pueden mencionar cierto número de bacterias, hongos y sobre todo actinomicetes, que se muestran antagonísticos frente al rizobio in vitro. Este antagonismo puede deberse a competencia por los nutrientes, acidificación, producción de antibióticos u otras sustancias, y aun la predación por protozoos o la infección por fagos líticos.

En relación a los factores abióticos interesa particularmente la salinidad, sodicidad y condiciones de anegamiento

1.2.4.1. Suelos salinos y sódicos

Para que se produzca la salinización de un suelo deben cumplirse dos condiciones:

- Zonas áridas o semiáridas
- Capas freáticas cercanas

Estas condiciones hacen que el balance hídrico sea negativo, es decir altas temperaturas y baja precipitación lleva a una alta evapotranspiración con el consecuente ascenso de sales hacia la superficie del suelos. El proceso de ascenso capilar está muy relacionado con el relieve, la presencia de una napa freática cercana sumada a condiciones ambientales áridas hace que el agua ascienda y produzca salinización en los bajos.

La salinización de los suelos también se puede producir por el uso de agua de riego de mala calidad.

Las sales generalmente son SO_4^{-2} y Cl^- de Na^+ y Ca^{+2} , aunque en algunos casos también puede haber cantidades significativas de NO_3^- y Mg^{+2} . El mayor riesgo lo implican las sales sódicas, no solo por su alta solubilidad sino por la incorporación al suelo del catión Na^+ , que dominará el complejo de intercambio del suelo (principalmente arcillas) originando un suelo sódico o salino sódico.

Es necesario aclarar las diferencias entre un suelo salino y un suelo sódico, el primero posee un exceso de sales solubles, presentando una conductividad eléctrica (CE) mayor a 4 mmho/cm, un pH que varía entre 7 y 8 y un porcentaje de sodio intercambiable (PSI) (porcentaje de sodio en el complejo de intercambio) menor al 15 %, en cambio en el segundo el PSI supera al 15 %, siendo su CE menor a 4 mmho/cm y su pH aproximadamente 11. Los suelos salinos sódicos presentan una CE mayor a 4 mmho/cm, un PSI mayor a 15 % y un pH entre 7 y 8.5

Aumentos en la salinidad de los suelos o en las aguas usadas para irrigación resulta en un decrecimiento en la productividad de la mayoría de cultivos de plantas y conduce a un marcado cambio en el patrón de crecimiento de las plantas. Incrementos en las concentraciones salinas pueden tener un efecto nocivo en la población microbiana del suelo como resultado de una toxicidad directa así como a través del estrés osmótico. La infertilidad del suelo en zonas áridas es a menudo debido a la presencia de una gran cantidad de sal, y la introducción de las plantas capaces de sobrevivir bajo estas condiciones (plantas tolerantes) es digno de ser investigado (Fassbender H.W; Bornemisza E, 1987).

La simbiosis *Rhizobium* – leguminosa y la formación de nódulos en las leguminosas son más sensibles a la sal o al estrés osmótico de lo que lo son los rizobios. Los efectos del estrés salino en la nodulación y la fijación de nitrógeno en leguminosas han sido examinados en varios estudios. El estrés salino inhibe los pasos iniciales de la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa. La reducción en la actividad de la fijación de nitrógeno por el estrés salino es atribuida usualmente a la reducción en la respiración de los nódulos y a la reducción en la producción de proteína citosólica, específicamente leghemoglobina, por nódulos.

1.2.4.2. Anegamiento

Durante el anegamiento más o menos prolongado, se determina en primera instancia el reemplazo del aire contenido en el suelo por agua. Esta falta de aire tiene efecto sobre la vegetación presente y sobre las propiedades del suelo.

Si el agua contiene concentraciones importantes de sales, (por contaminación o aportes del agua freática o de lagunas saladas), puede determinar cierto grado de salinización en los suelos. Este será tanto mayor, cuanto más importante resulte el aporte de agua salobre (Krüger. H. R 1992).

El exceso de agua también afecta a los dos socios de esta simbiosis, rizobio y leguminosa, al generar anaerobiosis en el suelo. El oxígeno es indispensable para la vida del rizobio libre en el suelo y para la raíz de la planta. El encharcamiento llevará a la muerte de las bacterias del suelo, y a un detrimento de las condiciones de crecimiento para la planta, que impedirá la nodulación y la fijación biológica, hasta la eliminación de los nódulos ya establecidos (Fernández Canigia M. V, 2003).

Por todo lo dicho anteriormente, el aislamiento y la caracterización de cepas tolerantes a condiciones de estrés puede predecir el comportamiento de dichas comunidades en suelos y su interacción con la planta, para su posterior introducción en áreas desfavorables.

1. OBJETIVO

En base a lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta que además de conocer las limitaciones en cuanto a nutrientes (N y P), existieron y pueden existir otras tales como salinidad, sodicidad, que atentarían contra la probable expansión de frontera agropecuaria, creando un serio problema que impactaría tanto en el productor, como en cadena productiva esencial de la Provincia, se ha pensado como:

Objetivo del presente trabajo “analizar la simbiosis *Mesorhizobium loti-Lotus glaber* y la acción de otras bacterias PGPR con el fin de su aplicación como cultivo alternativo para regiones agropecuarias con condiciones límites”.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

3.1.1. Fijadores de Nitrógeno

Se utilizaron cepas patrones de *Mesorhizobium loti* (LL-32 y LL-30) recomendadas por IMYZA-INTA, y cepas nativas de suelos correspondientes a la región de la pampa deprimida del Salado, enviados por investigadores del IIB – INTECH-Chascomús.

3.1.2. Solubilizadores de Fósforo

Se utilizó una cepa patrón de *pseudomonas pútida* (SP21) y una cepa nativa aislada de suelos de la localidad de Trenel.

3.2. Metodologías de aislamiento de microorganismos

3.2.1. Metodología de aislamiento de rizobios nativos

El aislamiento de rizobios se realizó a partir de los suelos rizosféricos correspondientes a la región citada en el apartado 3.1.1 (tabla 1); a partir del método de la planta trampa.

Se escarificaron las semillas de *Lotus glaber* por un proceso mecánico de abrasión de la testa con papel de lija. Luego se realizó la esterilización de las mismas, para ello se lavaron sucesivamente con etanol 95 % durante 3 minutos, 5 minutos con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ y con agua estéril (5 veces), por último se colocaron para germinar en cajas de Petri con discos con papel de filtro humedecidos (previamente esterilizadas).

Cuando las semillas habían desarrollado aproximadamente 5 mm de radícula, con ayuda de ansa y en condiciones de esterilidad, se sembraron de

modo que el extremo de la radícula quedara debajo de la superficie del agar, dos semillas por tubo conteniendo medio Jensen (tabla 7).

Tabla 1: Suelos rizosféricos provenientes la región de la pampa deprimida del Salado

Suelo	pH
1	8.92
2	7.92
3	7.35
4	8.01
5	7.05
6	9.71
7	7.62
8	8.08
9	7.87
10	9.50

Se agruparon los suelos con pH similares (aquellos identificados en la tabla 1 con el mismo color), y de cada grupo se eligió aquel cuya muestra presentaba mejor aspecto. Con los suelos indicado en la tabla 2 se realizaron diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , en tubos con 9 ml de agua estéril. Se inocularon las plantas luego de 4 días de la siembra, cuando se observó un desarrollo uniforme de las mismas, con 1 ml de las diluciones: 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} .

Tabla 2: Suelos rizosféricos seleccionados para el aislamiento de rizobios

Suelo	pH
1	8.92
3	7.35
5	7.05
8	8.08
9	7.87
10	9.50

Los tubos se colocaron en soportes de madera de modo que la superficie del agar coincidiera con el borde del soporte, para proteger a las raíces de la luz. La disposición de los mismos fue al azar. Se usó iluminación lateral empleando doble hilera de tubos Grolux por sus emisiones de λ entre 600 -700 nm (favorecen fotosíntesis) y λ entre 400-500 nm (favorecen síntesis de clorofila). El fotoperíodo se controló con reloj automático de modo de tener 16 hs diarias de luz. La temperatura se mantuvo controlada en el rango de 22-25°C para las horas de luz y en el rango de 16–19°C para las horas de oscuridad.

Luego de aproximadamente 4 semanas se levantó el ensayo y se extrajeron los nódulos de las plantas. Estos se esterilizaron, para ello, se lavaron sucesivamente con etanol 95 % durante 30 segundos, 3 minutos con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ y con agua estéril (5 veces).

Posteriormente se aplastaron los nódulos con una pinza estéril en cajas de Petri con medio crecimiento (tabla 4) y se estrió el macerado del nódulo.

Se incubaron las placas a 28 °C por un periodo de aproximadamente 9 días.



Fig 11: Nódulos de *Lotus glaber*

3.2.2. Metodología de aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo

El aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo se realizó a partir de la rizosfera de *Melilotus* utilizado en la recuperación de campos anegados próximos a la localidad de Trenel, La Pampa.

Se realizaron diluciones del suelo rizosférico de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , en tubos con 9 ml de agua estéril y se sembró 1 ml de las siguientes diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} , en placas de Petri con el medio descrito en la tabla 5.

Se incubaron las placas a 28°C por un periodo de aproximadamente 2 días.

Principio del método: La detección visual y la estimación de la capacidad solubilizadora de las bacterias se determina observando zonas traslúcidas (halos) alrededor de aquellas colonias de bacterias solubilizadoras de fósforo crecidas en medio conteniendo fosfato insoluble como única fuente de fósforo.

3.3. Mantenimiento de las cepas aisladas

Los microorganismos se conservaron en tubos pico de flauta, con el medio mantenimiento de tabla 4 para rizobios y el medio de tabla 6 para solubilizadores de fósforo, en heladera a una temperatura de 5°C.

3.4. Elección del aislamiento de cepas nativas de rizobios a utilizar en el ensayo de efectividad e infectividad por medio de la técnica electroforésis de isoenzimas (M.L.E.E)

Las bacterias se hicieron crecer en medio TY (tabla 8) en erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio durante 48 hs a 28°C con agitación.

Luego se realizó el tratamiento de la muestra, para ello, se centrifugó a 10.000 rpm (centrifuga Rolco CR5150) durante 30 minutos a 4°C. Se volcó el

sobrenadante y el precipitado se lavó y resuspendió con 1 ml de solución de NaCl (0.85 %). Se recogió en tubos eppendorff y se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 rpm en centrifuga 5414. Se volcó nuevamente el sobrenadante y se recogió en 0.5 ml de tampón de extracción (Tris – HCl 0.1 M y pH 7.2; MgCl₂ ; glicerol 15 % y mercaptoetanol 0.1 %), se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió con el mismo tampón con lisozima en concentración 1 mg/ml, después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 10 minutos a 1.500 rpm y se resuspendió en tampón de sonicación (Tris – HCl 0.1 M, pH 8.8, y glicerol 15 %). Se sonicó (Sonicador KONTES microultrasonic cell disrupter) durante seis ciclos de 30 segundos. Por último, se centrifugó durante 10 minutos y el sobrenadante se reservó para la corrida electroforética. Esta se realizó usando gel de poliacrilamida al 5 % para el gel concentrador y 10 % para el separador. Se coloreó para α y β - esterasas, con Fast Blue RR y α y β naftil acetato como sustrato (Grassano A., et al; 1996).



Fig 12: Cuba de Electroforesis

3.5. Desarrollo en medio líquido de cepas patrones y nativas de rizobios y solubilizadoras de fósforo

Se sembraron con ansa, partiendo de tubos con agar inclinado, erlemeyers de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio base para inóculo (tabla 4) en el caso de rizobios y medios para bacterias solubilizadoras de fósforo (tabla 9 y 10). Se usa esta relación de 1/5 de volumen, para conseguir así una correcta aeración de los cultivos. Una vez sembrados los erlemeyers se colocan en agitador rotatorio (figura 13) en cuarto estufa a 28 °C a 250 rpm y 2.5 cm de excentricidad.



Fig 13: Agitador mecánico

3.6. Ensayo en cámara climatizada con *Lotus Glaber*

Semillas de *Lotus glaber*, esterilizadas y pregerminadas se colocaron en tubos con medio Jensen (tabla 7), cuando las plantas habían desarrollado se coinocularon con 1 ml de los inóculos de rizobios y bacterias solubilizadoras de fósforo mencionados en el punto anterior.

El ensayo (figura 14) se mantuvo en las mismas condiciones de luz y temperatura, mencionadas anteriormente.



Fig 14: Ensayo en cámara

Se realizaron 11 tratamientos (tabla 3) utilizando dos cepas de rizobios nativas (S83 y S38) y una patrón (LL-32), una cepa de solubilizadora de fósforo nativa (Spp) y una patrón (SP21); se prepararon dos testigos, uno con agregado de una solución al 0.05 % de KNO_3 (TN) y el otro sin agregado de nitrógeno (T); por cada tratamiento se hicieron diez repeticiones, con dos plantas por tubo. En los tratamientos coinoculados el medio Jensen se preparó solo con fosfato insoluble.

Para comprobar si había diferencias entre los tratamientos se utilizó un análisis de la varianza (ANAVA). Para comparar los tratamientos se realizó una Prueba de Tukey.

Tabla 3: Tratamientos

S83	S83 y Spp	S83 y SP21
S38	S38 y Spp	S38 y SP21
LL-32	LL-32 y Spp	LL-32 y SP21
TN		
T (sin inocular)		

3.6.1. Parámetros evaluados

3.6.1.1. Peso seco

A las cuatro semanas de implantado el ensayo, se cosecharon las plantas y se secó la parte aérea de éstas en estufa con circulación de aire a 65 ° C hasta peso constante.

3.6.1.2. Contenido de nitrógeno total. Método de KJELDHAL

Para la determinación del porcentaje de nitrógeno se peso 0.1 g de muestra de parte aérea molida sobre papel y se agregó 1.25 g de catalizador (óxido mercuríco) y un elevador de la temperatura de ebullición (sulfato de potasio), posteriormente con el agregado de ácido sulfúrico se logró que el nitrógeno se mineralice a sulfato de amonio. Para ello se digestaron las muestras durante una hora. Luego se realizó la destilación y titulación en equipo automático TECATOR KJELTEC Auto 1030 Analyzer, utilizando ácido bórico 1 % y HCl 0.10774 N.

3.6.1.3. Índice de eficiencia relativa

Este es un parámetro agronómicamente importante cuando se realiza la selección de aislamientos de rizobios para determinar en una primera etapa si los mismos pueden considerarse potencialmente como futuros productos biotecnológicos.

El mismo se calcula en función del porcentaje de eficiencia del tratamiento inoculado en relación al parámetro considerado (peso seco o % de nitrógeno) obtenido del tratamiento fertilizado con nitrógeno y el tratamiento sin inocular.

$$\text{IER} = \left(\frac{\text{Trat inoc} - \text{Trat sin inoc}}{\text{Trat con N} - \text{Trat sin inoc}} \right) \times 100$$

Si el valor obtenido supera el 70 % se considera ese aislamiento como promisorio.

3.7. Parámetros metabólicos de las cepas de rizobios nativos

3.7.1. Crecimiento de cepas de rizobios con control de pH

Se realizaron curvas de crecimiento tanto para la cepa patrón y las nativas de rizobios utilizadas, se desarrollaron éstas en medio líquido.

Para asegurar que la medición de la evolución de los microorganismos evaluados parte de valores comparables se procedió a desarrollar en erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio inóculo, durante 48 hs en cuarto estufa a 28°C y con agitación, las cepas LL-32, S83, S38. Al cabo de ese tiempo se trasvasó a erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio desarrollo (tabla 4) la cantidad necesaria de inóculo de manera de obtener inicialmente una concentración de aproximadamente 10⁸ células viables/ml., lo que corresponde a volúmenes de inóculo de orden del 10%.

Se midió la concentración celular cada 3 hs durante un periodo de 51 hs, por el método turbidimétrico; para ello se utilizó un espectrofotómetro UV – visible Metrolab VD-40, se realizaron las medidas a 600 nm, con diluciones adecuadas de las muestras a fin de que los valores de absorbancia leídos estuvieran comprendido entre 0.2 y 0.8. Estos valores corregidos por dilución se expresaron como unidades de densidad óptica (U.D.O).

Al mismo tiempo se determinó el pH del medio y se realizaron curvas de pH tanto para la cepa patrón como para las nativas de rizobio utilizadas, durante el mismo periodo de tiempo e intervalos según lo descrito precedentemente.

3.7.2. Evaluación del carácter solubilizador de los rizobios

Las diluciones de los suelos nombradas en el apartado 3.2.1 (10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}), se sembraron en placas de Petri conteniendo medio para bacterias solubilizadoras de fósforo, y se observó el carácter solubilizador, del mismo modo que fue explicado anteriormente.

3.8. Experiencias para determinar otras propiedades PGPB de la bacteria solubilizadora de fósforo nativa

3.8.1. Cuantificación de la propiedad de solubilizar fósforo

Para la determinación de fósforo se utilizó el método de Fiske y Subbarow modificado. Mediante este método colorimétrico se determina el fósforo como ortofosfato soluble (asimilable).

Principio del método: el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio potásico reaccionan en medio ácido con ortofosfato para formar un heteropoliácido fosfomolibdico (o molibdofosfórico) que se reduce a azul de molibdeno, de color azul intenso por acción del ácido ascórbico.

Según la bibliografía consultada, el compuesto reducido y coloreado presenta dos picos de máxima absorción a 660 y 880 nm. Pero se observa una mejor correlación entre ppm vs Abs cuando se lee a una longitud de onda de 660 nm, por lo cual las determinaciones se realizan a esta longitud de onda.

La biomasa bacteriana se desarrolló en erlenmeyer según la metodología puesta a punto en nuestro laboratorio, citada en el punto 3.5, en cuarto estufa a 28°C y en agitador rotatorio de 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad.

La concentración de fósforo solubilizado fue determinada a distintos tiempos (0, 24, 32, 48, 56, 72, 88 y 96 hs), permitiendo esto observar la cinética de solubilización de la bacteria aislada en los dos medios ensayados y su comportamiento respecto del de la cepa patrón. Al mismo tiempo se determinó el pH del medio para tratar de establecer la relación entre este parámetro y la cantidad de fósforo soluble y verificar si el mecanismo de acidificación es el que posibilita la disponibilidad del fósforo

3.8.2. Capacidad de fijar nitrógeno

Se realizó un ensayo en cámara climatizada en las condiciones nombradas anteriormente, éste constó de diez tubos con dos plantas por tubo.

Se inocularon, con cultivo líquido de la bacteria, plantas de alfalfa y *Lotus* y se observó al cabo de tres semanas y media si las plantas se encontraban noduladas.

3.8.3. Capacidad sideróforo

Se analizó la capacidad sideróforo, sembrado la bacteria en placas de Petri con el medio citado en la tabla 11.

Principio del método: es un método colorimétrico que se basa en la utilización de un complejo cromóforo CAS -Fe de color azul. Cuando los sideróforos secuestran y complejan el Fe en el medio de cultivo agarificado, el colorante se libera y esto determina un cambio de coloración en forma de halo anaranjado en torno a la colonia del microorganismo productor de sideróforo.

3.8.4. Crecimiento en medio selectivo para *Pseudomonas*

Se probó si pertenecía al género *Pseudomonas* sembrado la bacteria en placas de Petri con los medios citados en las tablas 12 y 13. Se observó crecimiento y/o fluorescencia.

3.9. Tinción de gram

Se realizó tinción de gram para elucidar el posible carácter gram positivo o negativo de las bacterias fijadoras de nitrógeno ensayadas, se utilizó el kit para gram, marca BRITANIA.

3.10. Medios de cultivo utilizados

Tabla 4: Medios de cultivo para *Mesorhizobium loti*. (Balatti and 1992)

Componentes	Medio mantenimiento	Medio inóculo	Medio desarrollo
K ₂ HPO ₄	0.5 g	0.5 g	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g	0.5 g	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20 g	0.20 g	0.20 g
NaCl	0.10 g	0.10 g	0.10 g
KNO ₃	1.00 g	1.00 g	1.00 g
MnSO ₄ 4H ₂ O sol 10%	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml
FeCl ₃ 6H ₂ O sol 10%	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml
Extr. Levadura	2 g	2 g	4 g
Manitol	5 g	5 g	10 g
Agar	15 g	-	-
Agua destilada	1000 ml	1000 ml	1000 ml

pH= 6.8

Tabla 5: Medio utilizado para aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo (implementado en nuestro laboratorio)

Componentes	Cantidad
Caldo nutritivo	8 g
Extracto de levadura	2g
Glucosa	20 g
CaHPO ₄	4 g
Agar	22 g
Agua destilada	1000 ml

pH= 7

Tabla 6: Medio LB (Luria Bertani), utilizado para mantenimiento de bacterias solubilizadoras de fósforo. (Sambroock et al, 1989)

Componentes	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

pH=7

Tabla 7: Medio Jensen, utilizado para desarrollo de cultivo de plántulas en cámara climatizada. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1988)

Componentes	Cantidad
CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃	0.1 g
Agar	12 g
Aguas destilada	1000 ml

pH = 7.0

Tabla 8: Medio TY, para caracterización por el método M.L.E.E (electroforesis de multilocus enzimática) Beringer, J.E.R. (1974).

Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂	0.87 g
Agua destilada	1000 ml

pH=7

Tabla 9: Medio líquido NBRIP, para caracterizar el grado de solubilización de fósforo. Nautiyal, C.S. (1999)

Componentes	Cantidad
Glucosa	10 g
CaHPO ₄	5 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g

KCl	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
Agua destilada	1000 ml

pH=7

Tabla 10: Medio líquido para caracterizar el grado de solubilización de fósforo

Componentes	Cantidad
Caldo nutritivo	8 g
Extracto de levadura	2g
Glucosa	20 g
CaHPO ₄	4 g
Agua destilada	1000 ml

pH= 7

Tabla 11: Medio CAS (Agar Cromo Azurol) para caracterización de sideróforos (Cassan. F, 2006)

Componentes	Cantidad												
PIPES (Buffer free acid pH 6.8)	6.1 g												
Bacto agar	3.0 g												
Sol Stock Triptofano 1 %	0.6 ml												
Triptona	0.032 g												
Medio MM9 10 X	20 ml												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Componentes</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>0.3 g</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>0.5 g</td> </tr> <tr> <td>NH₄Cl</td> <td>1 g</td> </tr> <tr> <td>Agua destilada</td> <td>100 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Componentes		KH ₂ PO ₄	0.3 g	NaCl	0.5 g	NH ₄ Cl	1 g	Agua destilada	100 ml			
Componentes													
KH ₂ PO ₄	0.3 g												
NaCl	0.5 g												
NH ₄ Cl	1 g												
Agua destilada	100 ml												
Sol CAS stock 10 X	20 ml												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Componentes</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CAS</td> <td>60.5 mg en 50 ml de agua destilada</td> </tr> <tr> <td>FeCl₃ 6 H₂O 1mM</td> <td>10 ml en HCl 10 mM</td> </tr> <tr> <td>HDTMA (Hexadecyl trimethyl amonium bromide)</td> <td>72.9 en 40 ml de agua destilada</td> </tr> </tbody> </table>	Componentes		CAS	60.5 mg en 50 ml de agua destilada	FeCl ₃ 6 H ₂ O 1mM	10 ml en HCl 10 mM	HDTMA (Hexadecyl trimethyl amonium bromide)	72.9 en 40 ml de agua destilada					
Componentes													
CAS	60.5 mg en 50 ml de agua destilada												
FeCl ₃ 6 H ₂ O 1mM	10 ml en HCl 10 mM												
HDTMA (Hexadecyl trimethyl amonium bromide)	72.9 en 40 ml de agua destilada												
Manitol 1 M	2 ml												
MgSO ₄ 1 M	0.1 ml												
CaCl 50 mM	0.2 ml												
Sol stock de vitaminas	0.1 ml												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Componetes</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Riboflavina</td> <td>20.0 mg</td> </tr> <tr> <td>Ácido <i>p</i>-aminobenzóico</td> <td>20.0 mg</td> </tr> <tr> <td>Ácido nicotínico</td> <td>20.0 mg</td> </tr> <tr> <td>D-Biotina</td> <td>20.0 mg</td> </tr> <tr> <td>D-pantotenato de calcio</td> <td>20.0 mg</td> </tr> </tbody> </table>	Componetes		Riboflavina	20.0 mg	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	20.0 mg	Ácido nicotínico	20.0 mg	D-Biotina	20.0 mg	D-pantotenato de calcio	20.0 mg	
Componetes													
Riboflavina	20.0 mg												
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	20.0 mg												
Ácido nicotínico	20.0 mg												
D-Biotina	20.0 mg												
D-pantotenato de calcio	20.0 mg												

Piridoxal hidrocloreto	200.0 mg	
Agua destilada	100 ml	

pH=6.8

Tabla 12: Medio KING A para *Pseudomonas*. Laboratorios BRITANIA

Componentes	Cantidad
Peptona de gelatina	20 g
K ₂ SO ₄	10 g
MgCl ₂	1.4 g
Agar	15 g
Glicerol	10 ml
Agua destilada	1000 ml

pH=7.2

Tabla 13: Medio KING B para *Pseudomonas*. Laboratorios BRITANIA

Componentes	Cantidad
Tripteina	10 g
Peptona de carne	10 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄	1.5 g
Glicerol	10 ml
Agar	15
Agua destilada	1000 ml

pH= 7.2

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de microorganismos

4.1.1. Aislamiento de rizobios nativos

A partir de los suelos rizosféricos correspondientes a la región citada en el apartado 3.1.1, (tabla 1) de Materiales y Métodos, se obtuvieron ocho aislamientos, especificados en la tabla 14. Es de destacar que no se pudieron aislar rizobios de los suelos de pH más elevados, la mayoría de ellos corresponde a los suelos salinos o salinos levemente sódicos.

Tabla 14: Aislamientos

Suelos	Aislamientos
1	-
3	S38, S35, S36
5	S54
8	S83
9	S95, S96, S92
10	-

4.1.2. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo

Los aislamientos obtenidos de la rizosfera de *Melilotus*, fueron dos (Spp, ML1); como se observa en la figura 15 ambos presentaban un marcado halo de solubilización; de ellos se eligió trabajar en primera instancia con el designado Spp, debido a que el halo correspondiente poseía un mayor diámetro, con lo cual se podría suponer que ésta bacteria in vitro, demuestra mayor carácter solubilizador, aunque sería necesario comprobar esto, con algún otro estudio.

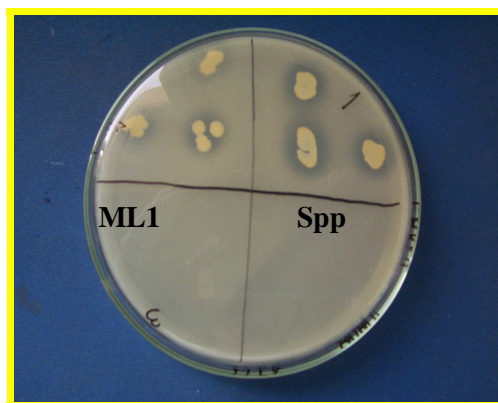


Fig 15: Aislamientos de bacterias solubilizadoras de fósforo

4.2. Elección del aislamiento de cepas nativas de rizobios a utilizar en el ensayo de efectividad e infectividad por medio de la técnica electroforésis de isoenzimas (M.L.E.E)

La elección de los aislamientos de cepas nativas y patrones se realizó luego de analizar los resultados de la aplicación de la técnica de caracterización por isoenzimas en geles de poliacrilamida (M.L.E.E), metodología explicada en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. Mediante esta técnica se pudo distinguir si las cepas aisladas eran diferentes entre sí y respecto de los patrones (LL-30 y LL-32), y a su vez seleccionar uno de éstos para utilizar en el ensayo en cámara.

Se eligió trabajar con las cepas nativas S83 y S38 y con la cepa patrón LL-32., aunque en un futuro trabajo se analizarán los demás aislamientos debido a que pueden llegar a tener aplicación tecnológica.

El criterio que se siguió para la elección de las cepas fue el de elegir aquellas que presentaban una mayor actividad α y β esterásica; si bien la mayoría de los aislamientos presentaban un buen perfil de bandas, se observa que las cepas elegidas poseen un gran polimorfismo y de alta intensidad lo que es deseable para su caracterización y seguimiento (fig 16). Además se tuvo en cuenta de elegir en función del pH y tipo de suelo (pH=7.35 para S38, suelo

salino; y pH= 8.08 para S83, suelo salino y levemente sódico), con el fin de poder a futuro formularse como inoculantes para ser utilizados en *Lotus Glaber*, leguminosa utilizada en la recuperación de regiones que se encuentren en condiciones límites, como lo plantea el objetivo de este trabajo.

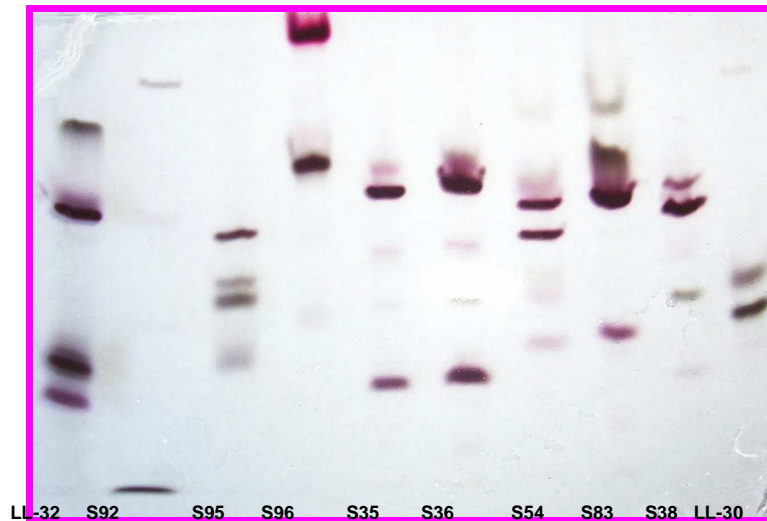


Fig 16: Corrida electroforética de cepas nativas y patrones

4.3. Ensayo en cámara climatizada con *Lotus Glaber*

4.3.1. Parámetros evaluados

4.3.1.1. Peso seco

El análisis de la varianza realizado condujo a que existen diferencias entre los tratamientos. Esto se pudo observar tanto cuantitativamente (figura 17), como cualitativamente (figura 18).

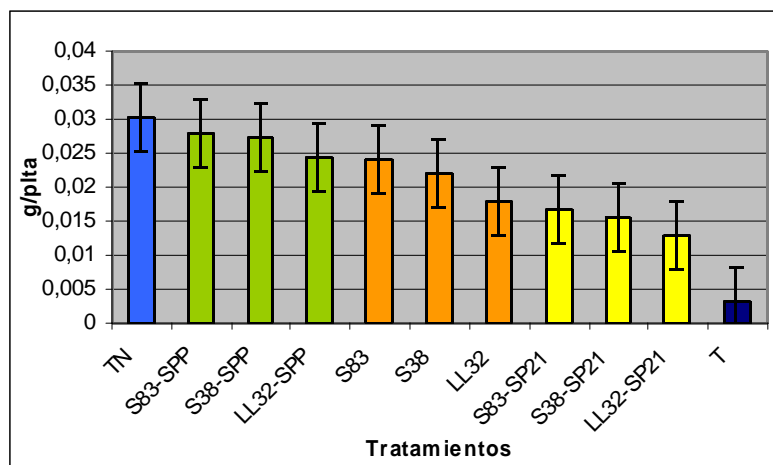


Fig 17: Peso seco por planta

Por medio del test estadístico Tukey ($p < 0.01$) se analizaron las diferencias, con las siguientes consideraciones:

Existen diferencias significativas entre los valores medios PS por planta de los tratamientos inoculados (S83, S38, LL-32, S83 Spp, S38 Spp, LL-32 Spp, S83 Sp21, S38 Sp21 LL-32 SP21) y el testigo sin inocular (T), siendo los valores de peso seco obtenidos con las plantas inoculadas significativamente mayores que los obtenidos con éste, queda clara entonces, la necesidad de inoculación, con el fin de obtener altos valores de producción.



Fig 18: Tratamientos comparados

No existieron diferencias significativas entre el valor medio PS/planta de los tratamientos (S83, S38, TN); resultado muy importante si se piensa en lo ya dicho, la gran importancia que tienen el evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio que estos traen aparejados. Es de resaltar que estos resultados corresponden a los dos aislamientos de rizobios nativos considerados, si se considera que la cepa utilizada como patrón LL-32 tiene rendimientos significativamente menores que el tratamiento nitrogenado.



Fig 19: Comparación de tratamientos inoculados

Por otro lado si bien no existen diferencias significativas entre el valor medio PS/plta de los tratamientos (S83, S38, S83 Spp, S38 Spp, LL-32 Spp), en el gráfico (figura 17) se puede observar que existen beneficios con la coinoculación, aunque no son significativamente diferentes al nivel estadístico al que se trabajó, debido a que se observa un aumento del peso seco en los tratamientos coinoculados (S83 Spp, S38 Spp, L-32 Spp), aumento que podría quedar de manifiesto en el tratamiento estadístico, si se utilizara un $p < 0.05$; este beneficio se acentúa si tenemos en cuenta a la cepa LL-32 donde el valor medio PS/planta del tratamiento con LL-32 difiere (es menor) que el peso medio de PS/planta del tratamiento TN, diferencia que no se observa en el tratamiento coinoculado (LL-32 Spp). Observando las figuras 20, 21, 22, 23, 24 y 25 también

se puede diferenciar un mejor desarrollo de las plantas coinoculas con la bacteria Spp a diferencia de las inoculadas.

El valor medio de PS/planta del tratamiento L32-SP21 difiere del peso medio de PS/planta de los tratamientos S83;L32-Spp; S38-Spp; S83-Spp y TN.

El valor medio de PS/planta del tratamiento S38-SP21 difiere del peso medio de PS/planta de los tratamientos S38-Spp; S83-Spp y TN.

El valor medio PS/planta del tratamiento S83-SP21 difiere del peso medio de PS/planta de los tratamientos S38-Spp, S83-Spp y TN.

Analizando los datos anteriores y el gráfico (figura 17) con respecto a la coinoculación con la cepa patrón SP21, se observa que los valores de peso seco obtenidos con ésta son mucho menores que los obtenidos coinoculando con la cepa nativa Spp, no se observan diferencias significativas entre valor medio PS/planta del tratamiento inoculado y coinoculado correspondiente a la misma cepa de rizobio, diferencia que se haría notoria, si se utilizara un $p < 0.05$ como ya se dijo anteriormente; todo esto puede deberse a que la bacteria SP21 ejerce un efecto deletéreo en todos los tratamientos sobre las plantas de *Lotus glaber*, efecto que se puede observar en las figuras 21, 23 y 25, razón por la cual no se recomienda, en este caso, su utilización .

Fig 20: Tratamiento inoculado



Fig 21: Tratamientos coinoculados





Fig 22: Tratamiento inoculado



Fig 23: Tratamientos coinoculados

S38



Fig 24: Tratamiento inoculado



Fig 25: Tratamientos coinoculados

4.3.1.2. Contenido de nitrógeno total

S38

LL-32

En el gráfico (figura 26) se observa que el contenido de nitrógeno es mayor en las plantas inoculadas que en el testigo sin inocular lo que destaca nuevamente la necesidad de inoculación.

Si se compara el rendimiento en porcentaje de nitrógeno de parte aérea se observa que la coinoculación con la bacteria solubilizadora de fósforo Spp incrementa marcadamente los porcentajes respecto de los tratamientos solamente inoculados con el rizobio para el caso de los nativos, no resultado apreciable en relación al de la inoculación con LL-32.

Nuevamente se observa en el análisis de este parámetro el efecto negativo de la coinoculación con la cepa solubilizadora de referencia utilizada (SP21).

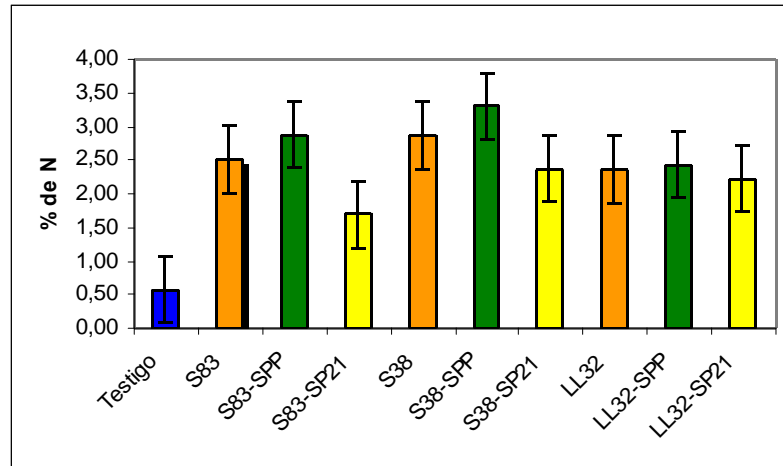


Fig 26: Porcentaje de Nitrógeno

Luego del análisis de los dos parámetros considerados, se decidió realizar un gráfico de correlación de los mismos (figura 27) se concluye que existe una correlación significativa entre el contenido de nitrógeno y los valores de peso seco obtenidos.

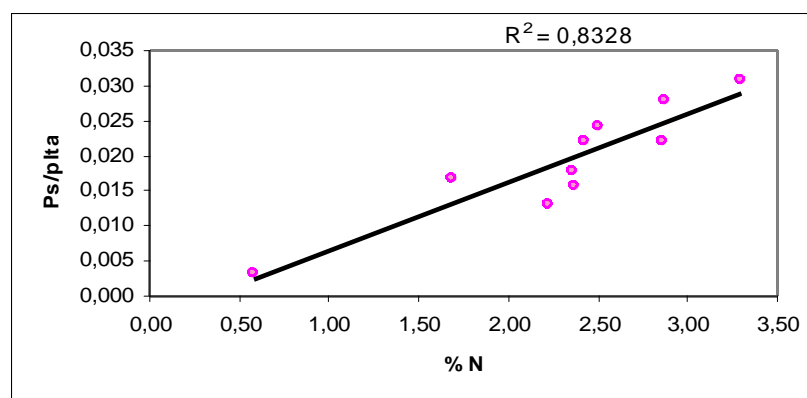


Fig 27: Correlación entre los valores de porcentaje de nitrógeno y peso seco.

4.3.1.3. Índice de eficiencia relativa (IER)

Los valores de IER de la tabla 15 refuerzan el análisis de los parámetros analizados anteriormente.

Los IER correspondientes a los tratamientos inoculados con rizobios nativos (S83, S38) alcanzan el valor límite considerado (70 %). Resultando no efectiva la inoculación con la cepa patrón LL-32.

Se confirma el efecto sinérgico de la solubilizadora de fósforo nativa (Spp) en todos los casos de la inoculación, siendo muy evidente en las combinaciones con los aislamientos nativos.

Además se confirma la deplección en el índice obtenido de todos los tratamientos coinoculados con la cepa patrón SP21

Tabla 15: Valores de Índice de eficiencia relativa

Tratamientos	IER (%)
S83	76,9
S38	69,9
LL-32	53,7
S83-SPP	90,6
S83-SP21	49,7
S38-SPP	101,1
S38-SP21	45,5
LL-32 Spp	69,6
LL-32-SP21	36,4

4.4. Parámetros metabólicos de las cepas de rizobios nativos

4.4.1. Crecimiento de cepas de rizobios con control de pH

La finalidad de este ensayo fue observar si los aislamientos poseen aptitudes biotecnológicas adecuadas, si se piensa en una transferencia futura, en función de la velocidad específica de crecimiento (μ) y del tiempo de generación (θ_g).

Al analizar cualitativamente las curvas de crecimiento logarítmicas (figura 28), se puede observar que la de la cepa patrón posee una mayor pendiente en la fase de crecimiento exponencial que la de las cepas nativas, por lo cual tendrá una mayor μ y en consecuencia un menor (θ_g) que éstas, por otro lado comparando las pendientes de la fase de crecimiento en las curvas de las cepas nativas, la cepa S83 presenta una pendiente un poco mayor que la cepa S38, con lo cual tendrá una mayor μ y en un θ_g menor.

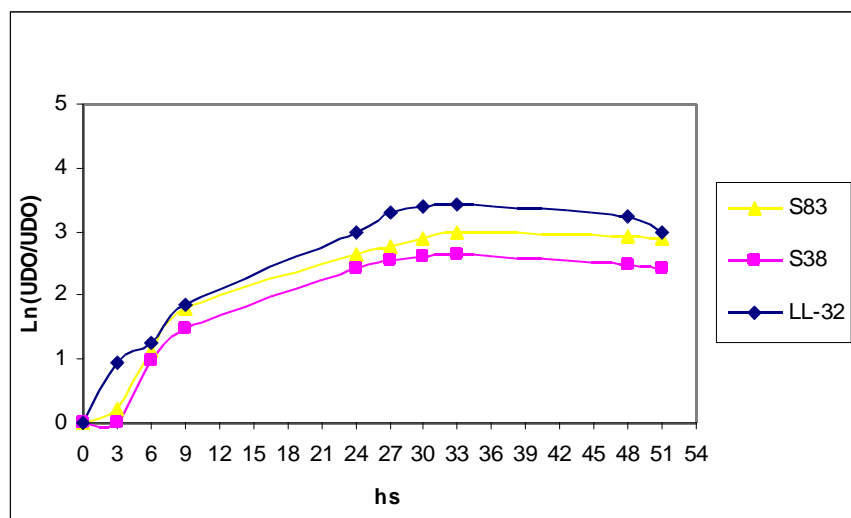


Fig 28: Curva de crecimiento logarítmica

4.4.1.1. Cálculo de las velocidades específicas y de los tiempos de generación

Lo dicho anteriormente se puede comprobar mediante el cálculo de μ y θ_g

$$\mu = (\text{Ln } X/X_0) / t$$

$$\theta_g = \text{Ln } 2 / \mu$$

Nota : $\text{Ln } (X/X_0) = \text{Ln } (\text{UDO}/\text{UDO}_0)$

Tabla 16: Valores de velocidad de crecimiento y tiempo de generación

	LL-32	S83	S38
Resultados	$\mu = 0.214 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0.187 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0.154 \text{ h}^{-1}$
	$\theta = 3 \text{ h } 24 \text{ min}$	$\theta = 4 \text{ h } 10 \text{ min}$	$\theta = 4 \text{ h } 57 \text{ min}$

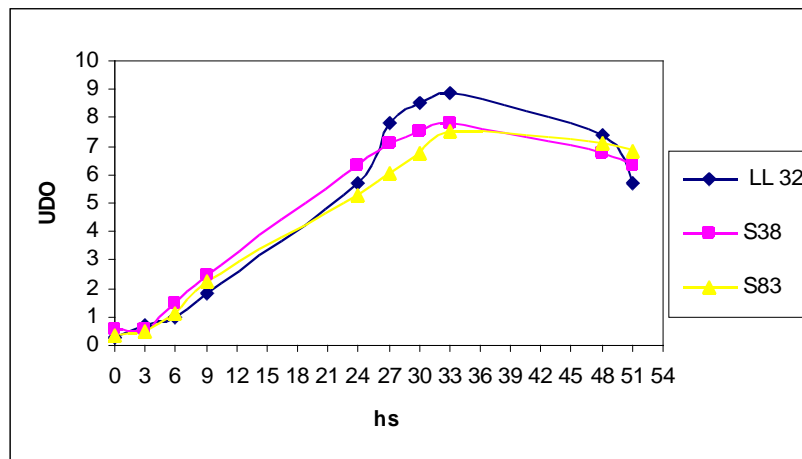


Fig 29: Curva de crecimiento

En el grafico (figura 29) se observa que todos los aislamientos presentan valores altos de producción (UDO mayores a 7) lo cual se correspondería con una concentración celular de 10^9 - 10^{10} células viables/ml, valores adecuados si se piensa en una transferencia futura.

Con respecto a las curvas de pH (figura 30) se observa un aumento de éste en todas las cepas lo que está acorde con el crecimiento de las mismas y congruentes con los que se obtienen en la fase estacionaria de desarrollo de este tipo de microorganismos.

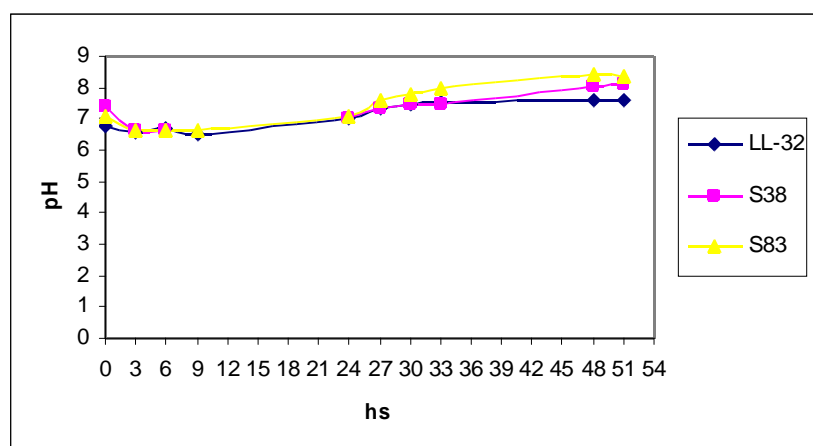


Fig 30: Curvas de pH

4.4.2. Evaluación del carácter solubilizador de los rizobios

Al evaluar el carácter solubilizador de fósforo de los rizobios aislados de los suelos correspondientes a la región de la pampa deprimida del Salado, no se observó halo de solubilización al sembrarlos en el medio especificado en la tabla 5 de Materiales y Métodos, con lo cual se podría concluir en que éstos, no tienen la capacidad de solubilizar fósforo.

4.5. Experiencias de caracterización de la bacteria solubilizadora de fósforo nativa

4.5.1. Cuantificación de la propiedad de solubilizar fósforo

Analizando las curvas de solubilización de fósforo mostradas en las figuras 31 y 32, se observa que la bacteria solubilizadora de fósforo nativa solubiliza mayor cantidad de fósforo que la patrón, además se observa que esta solubilización se optimiza si el medio de cultivo utilizado para su crecimiento es el medio NBRIP, el cual es un medio definido donde se suprime el uso de Extracto de Levadura (Nautiyal. S,1999)

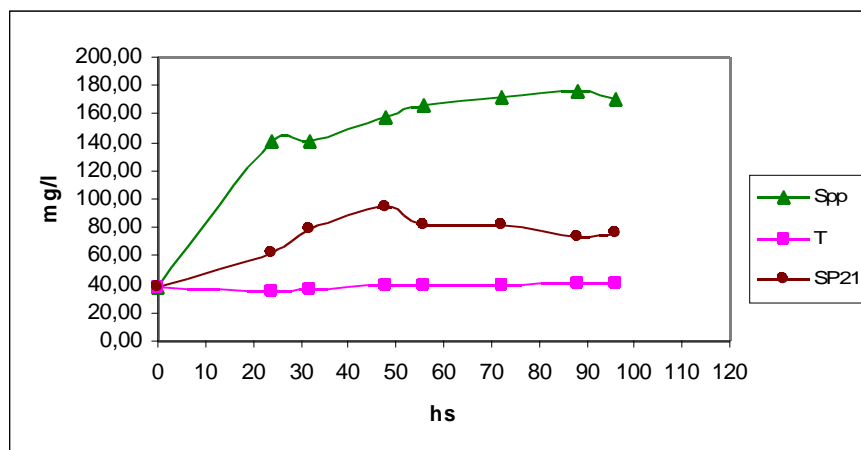


Fig 31: Curva de solubilización de fósforo en medio NBRIP.

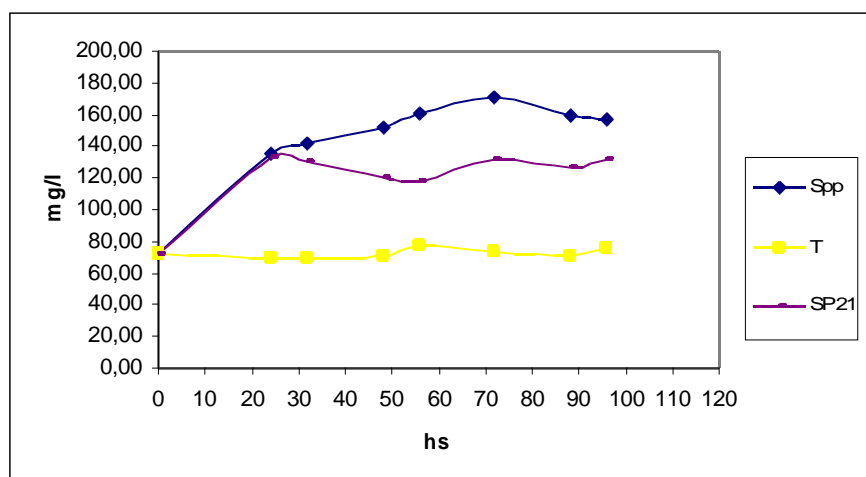


Fig 32: Curva de solubilización de fósforo en el medio adaptado en nuestro laboratorio.

Con respecto a las curvas de pH (figura 33) de las bacteria nativas se observa que ambas bacterias disminuyeron el pH del medio en las primeras horas de su crecimiento lo cual indicaría que el mecanismo utilizado para solubilizar fósforo sería el de liberación de ácidos (Nautiyal. S, et.al, 2000), sin embargo comparando con datos bibliográficos, el pH encontrado no fue tan bajo como el que se esperaría si el mecanismo utilizado fuese éste, por lo tanto se podría pensar que la bacteria utiliza además otro mecanismo para solubilizar

fósforo (Nautiyal. S, et. al, 2000). Por otro lado, la disminución del pH fue mayor en el medio NBRIP lo cual se relaciona con lo dicho anteriormente.

Teniendo en cuenta a la cepa patrón se observa que el pH del medio disminuyo pero en menor medida que el de la bacteria nativa, en concordancia con la menor cantidad de fósforo solubilizado (fig 31 y 32), además no se observan diferencia de pH en los distintos medios, del mismo modo que no se observa diferencias en la solubilización de fósforo.

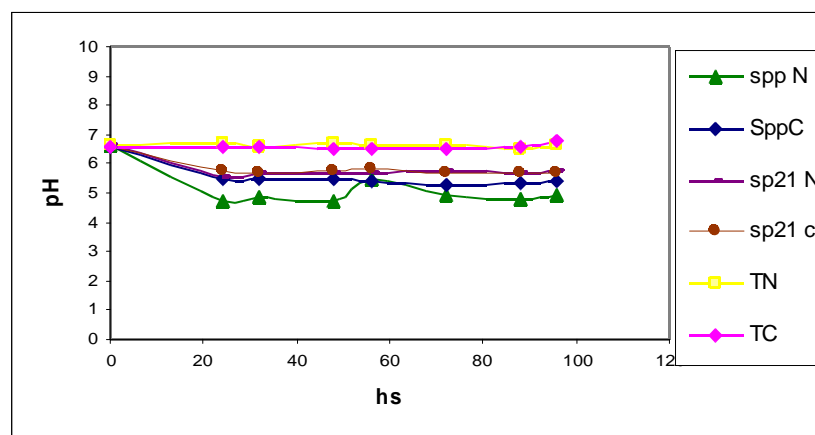


Fig 33: Curva de pH en los distintos medios. N (NBRIP), A (Adaptado)

4.5.2. Capacidad de fijar nitrógeno

Luego de pasadas las tres semanas de inoculación, no se observó nodulación en las plantas de alfalfa y *Lotus* inoculadas con la bacteria solubilizadora de fósforo (Spp), con lo cual se podría concluir que ésta no posee capacidad para fijar nitrógeno.

4.5.3. Capacidad sideróforo

Al sembrar la bacteria solubilizadora de fósforo (Spp) en el medio nombrado de tabla 10 de Materiales y Métodos, se observó un cambio de coloración en forma de halo anaranjado entorno a las colonias del microorganismo (figura 34),

por lo cual se puede concluir que la bacteria, además de su caracter solubilizador puede sintetizar sideróforos

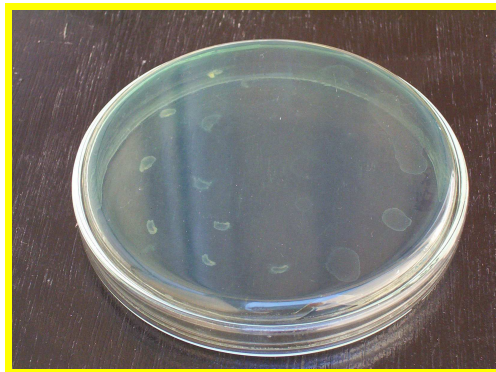


Fig 34: sideróforo

4.5.4. Crecimiento en medio selectivo para *Pseudomonas*

Se observo crecimiento de la bacteria en medio King A sin producción de piocianina (figuras 35 y 36); en medio King B se observo crecimiento pero no fluorescencia (figura 35), con lo cual debido a este crecimiento se podría concluir que la bacteria pertenece al género *Pseudomonas*, aunque quedan pendientes otros estudios de caracterización.

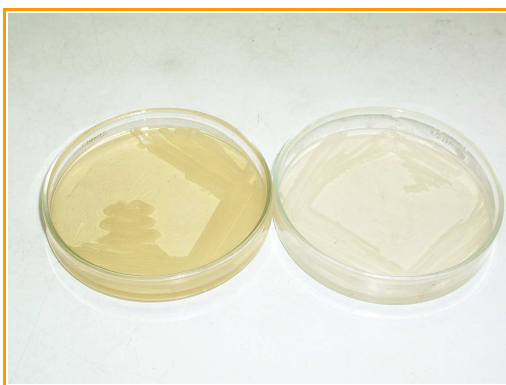


Fig 35: Crecimiento en medio KB y KA

Respectivamente

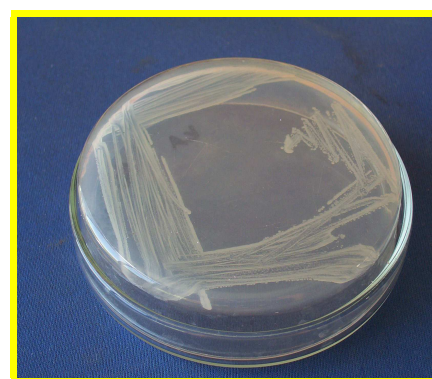


Fig 36: crecimiento en medio KA

4.6. Tinción de gram

Realizada la tinción de gram para las cepas de rizobios nativas se comprobó que las mismas daban coloración rosada, lo cual se comprueba que la cepas aisladas son bacterias gram negativas.

5. CONCLUSIONES

Se analizó la simbiosis *Mesorhizobium loti*-*Lotus glaber* y la acción de otras bacterias PGPR sobre *Lotus glaber* como se planteó en el objetivo de este trabajo y se arribó a las siguientes conclusiones:

- Los aislamientos de *Mesorhizobium loti* estudiados, indican que en relación a la fijación biológica de nitrógeno, sus propiedades de infección y efectividad se manifiestan como importantes por los valores obtenidos en los parámetros evaluados, ya que no se obtuvieron diferencias significativas respecto del tratamiento sin limitación de nitrógeno lo que se corrobora con los valores de IER calculados.
- En relación a los parámetros biotecnológicos en estudio de estos aislamientos, se concluye por los resultados obtenidos junto a sus propiedades de fijación biológica de nitrógeno, que son bacterias de alta aptitud biotecnológica y que se deberían realizar otros estudios agronómicos y biotecnológicos para una posible transferencia.
- El aislamiento de la bacteria solubilizadoras de fósforo obtenido de suelos en recuperación por anegamiento que poseen las condiciones limitantes que se postulan en el objetivo, muestra un eficiente poder solubilizador tanto en las cuantificaciones realizadas in vitro frente a la cepa patrón (SP21), como en el ensayo en cámara climatizada, donde se coinoculó con los aislamientos de *Mesorhizobium loti*, mostrando en este caso un incremento en los parámetros estudiados respecto de las inoculaciones simples.
- Respecto a otras propiedades PGPR ensayadas para los dos tipos de aislamientos se verifica que:

- Los aislamientos de *Mesorhizobium loti* solo muestran capacidad para realizar fijación biológica de nitrógeno.
 - El aislamiento de la bacteria solubilizadora de fósforo (Spp), además de su carácter solubilizador, exhibe propiedades de excreción de metabolitos secundarios que actúan como sideróforos.
- Las conclusiones que anteceden indican que se debe proseguir con el estudio de los dos tipos de aislamientos considerados, tanto desde el punto de vista de la aplicación en coinoculación, como en el posible uso de la bacteria solubilizadora de fósforo frente a otros cultivos no solo de leguminosas (altamente dependientes de fósforo) sino de otras gramíneas que también requieran este nutriente, que como se indica en la introducción es pobre en la mayoría de los suelos de la región Pampeana.

6. BIBLIOGRAFÍA

Antoun H. et al. (1998). " Plant and Soil".204:57-6 7

Azcón-Bieto J. y Talón M. (2000). "Fundamentos de Fisiología Vegetal". Edicions Universitat de Barcelona. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. Cap. 6. Pag. 87.

Balatti A.P. (1992). Producción de inoculantes para leguminosas. Tecnología de las fermentaciones aplicada a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa.

Barrietos. L, Higuera. M, Acuña. H, Guerreros. J, Ortega. F, Seguel. I .(2002) "Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium Sp (Lotus)* en plantas de tres especies del género *Lotus*" Agricultura Técnica. Vol. 62 .Nº 2: 226-236. <http://scielo.cl/scielo.php>

Beringer J.E.R. (1974). Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol., 84: 188-198.

Cassan F. (2006) Protocolo para el aislamiento de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal de *Lotus* sp. en base a su capacidad in-vitro de fijar N atmosférico en vida libre, producir fitohormonas, sideróforos o solubilizar formas insolubles de fosfato. Curso Interacción Microorganismos-Plantas. IIB – INTECh. Cahscomús, Septiembre 2006.

Chabot R. et al. (1996). "Plant Soil". 184:311-321

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1988). Simbiosis leguminosa-rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. Rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación selección y manejo de la simbiosis leguminosa rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Frijol (comp.). Cali, Colombia.

Ruiz O. Biotecnología: avances en la investigación Argentina "El Lotus, listo para la carrera". Clarín Rural 13-03-04

Conti M. (2000) "Principios de Edafología con énfasis en suelos argentinos." 2° Edición. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Darwich N.A. (1983). "Niveles de fósforo asimilables en suelos pampeanos". IDIA Cap. 1-5, Pag. 409-412

De Battista J. (2001). "Trébol de los cuernitos, Trébol de los cuernitos de hoja angosta" En el libro Maddaloni. J; Ferrari.I de Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. Cap 17 pag 128

Downie I. A., Walter S.A. (1999). "Plant responses to nodulation factors". Curr. Opin. Plant. Biol. 2:483-489

Echeverría H.E, Garcia. F.O. "Fertilidad de suelos y fertilización de cultivos". INTA 2005.

Espín G, Castañeda. M. "Estudio de la regulación de la síntesis del sideróforo azotobactina en *Azotobacter vinelandii*". Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, BUAP, Puebla, Puebla, México. Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos México.

Fassbender Hans W., Bornemisza Elemer. (1987). "Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina". Instituto Interamericano de cooperación para la Agricultura". San José, Costa Rica. Pag 187- 197.

Frazzon I., Spee I., Christiansen D. and Dean D.,(1997) "Nitrogenase: two decades of biochemical studies" In Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Edited by Legocky A; Bothe H and Pulhera Apringer-Verlag-Berlin .3-8

Fernández Canigia. M.V (2003). " Manual de nodulación".www.nitragin.com.ar

Frioni L. (1999) "Procesos microbianos promotores del crecimiento vegetal" en Procesos Microbianos tomo II. Cap. 7, Pag 175.

Grassano A., Ronchi A., Balatti A.P., (1996) "Respuesta de la alfalfa a la inoculación en áreas de la Provincia de La Pampa". RIA-INTA. Vol 2 N°2:1-14.

Ginzo H.D., Collantes, Caso O. (1982). "Fertilization of a native grassland in the "Depresión del Río Salado", province of Buenos Aires: Herbage dry matter

accumulation and botanical composition". Journal of Range Management Cap.1, Pag. 35-39.

Halbleib C.M. and Luden P.W. (2000). "Regulation of biological nitrogen fixation. J. Nutr". Cap. 130, Pag. 1081-1084.

Hirsch A.M, Lum M.R. and Downie A., (2001) "What makes the Rhizobia – Legume Symbiosis so special". Plant Physiology. 127:1484-1492.

Hughes, Heath y Metcalfe (1972) "La inoculación de las leguminosas" en Forrajes. Cap 11, Pag 143.

Illmer P. and Schinner F. (1995). "Solubilization of organic calcium phosphates solubilization mechanisms. Soil Biol.Biochem.27:257-263.

Keel C. et al. (1992)." Mol. Plant-Molecular Interact". Cap. 5, Pag .4-13.

Krüger H. R. (1992). "Manejo de suelos que sufrieron inundación temporaria efectos del anegamiento sobre los suelos". boletín divulgación nº 31. pro-suelos, Inta, EEA Bordenave. pag 28.

Lagler J.C. "LOTUS: Un género que no acaba en dos especies". En Revista Forrajes & Granos. Nº. 62. Pag. 72-76 . <http://www.inta.gov.ar>.

Lodeiro A. R., López García S. L., Mongiardini E., Quelas J. I. and Peticari A. (2003). "Los Rizobios y la inoculación de las Leguminosas para la Fijación

Simbiótica de Nitrógeno”. En Microbiología Agrícola. Un aporte de la Investigación Argentina. UNSE. Editor Ada Albanesi y otros. 159- 193

Martinez Romero and Lopez L.I. (2005). “RHizobium y su destacada simbiosis con la planta “.Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.

Mazzanti A., Montes L., Miñón D., Sarlague H., Cheppi C. (1988). “Utilización de *Lotus tenuis* en la Pampa Deprimida”: resultado de una encuestas. Revista Argentina de Producción Animal Cap. 8 ,Pag. 301-305.

Mendoza R.E, Pagani E., Pomar M.C. (2000). “Variabilidad poblacional de *Lotus glaber* en relación con la absorción de fósforo del suelo” en Ecología Austral Cap. 10, Pag. 3-14.

Montes L. (1988). “*Lotus tenuis*”. Revisión Bibliográfica. Revista Argentina de Producción Animal Cap.8, Pag. 367-376.

Nannipieri P., Asche J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara E., Renella G (2003). “Microbial diversity and soil functions “. European Journal of soil science. 54:655-670.

Nautiyal C.S.(1999).An efficient growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS Microbiology Letters 170: 265-270.

Nautiyal C.S., Shipra Bhadauria, Pradeep Kumar, Hind Lal, Rajesh Mondal, Dinesh Verma. (2000). "Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolates from alkaline soils". FEMS Microbiology Letters 182: 291-296

Nieto K. and Frakerberger W. (1989). "Soil Sci. Soc. Am. J". Cap .53, Pag.735-740.

Olivares Pascual J. (2006) "Fijación biológica de Nitrógeno". Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

Omar S.A. (1998). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World J.Microbiol.

Redondo Nieto M, Bonilla I., Bolaños. L. "Fijación biológica de Nitrógeno".
www.uam.es

Richardson A. E. (1994). Soil microorganisms and phosphorus availability. Soil Biota 50-62

Rodríguez H. and Fraga R.(1999). "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion". Biotechnology Advances. Cap 17,Pag. 319-339.

Sadowsky M. J., and Graham P. (1998). Soil biology of the *Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorosi y P. J. J. Hooykaas (eds.). In: The *Rhizobiaceae* molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academia Publishers. 155-172.

Satorre E. H., Arnold Benech R. L., Slafer G. A., De la Fuente E.B., Miralles D.J, Otegui M. E, Savin R. (2003) "Dinámica de los nutrientes en el sistema suelo-planta" en Producción de Granos. Cap.17, Pag.473-477.

Sambroock J., Fritsch E. F. and Maniatis. (1989) "Molecular cloning". Appendix A: Bacterial Media, Antibiotics, and Bacterial Strains.

Schachtman Daniel P., Robert j. R, and Ayling S. M. 1998. Phosphorus uptake by plant: from soil to cell. Plant Physiol., 116: 447-453.

Seany R.R. and Henson P.R. (1970). Birdsfoot trefoid. "Advances in Agronomy". Cap. 22, pag. 119-157.

Shaw V. K. and Brill W. J. (1977). "Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3249-3253.

Son H.J et al. (2006). "Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel SALT-and pH-tolerant *Pantoea* agglomerans R-42 isolated from soybean rhizosphere". Bioresource Technology . 97:204-210

Spaink A., Kondorosi y P. J. J. Hooykaas (eds.). In: The *Rhizobiaceae* molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academia Publishers. ,Pag . 155-172.

Spaink H. P. (2000). "Root nodulation and infection factors produced by rhizobial Bacteria". *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 257-288

Sprent J. I. (2001). *Nodulation in Legumes*. Royal Botanical Gardens, Kew, London
Vincent, J. M. (1970). "A manual for the practical study of the root nodule bacteria". IBP handbook no. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Stougaard J. (2000). "Regulators and regulation of legume root nodules development". *Plant Physiology*. 124:531-540

Zou K., Binkley D., Doxtader K.G. (1992). "Methods for estimating gross P mineralization and mobilization rates in soils". *Plant Soils*. Cap .147, Pag. 243-250.

