UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesina presentada para obtener el grado académico de Licenciada en Química

ESTUDIO DEL EFECTO DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO EN CULTIVOS DE SOJA INOCULADOS CON *B. JAPONICUM*, EN DISTINTOS ESTADÍOS DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA

Autor: Nanci Soledad KLOSTER

Director: Dra. Alicia GRASSANO

SANTA ROSA (LA PAMPA) ARGENTINA

- 2007 -

Agradecimientos

Al departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UNLPam, donde realice mis estudios de grado y llevé a cabo el desarrollo de mi tesina.

A todo el personal docente y no docente por la excelente predisposición durante el desarrollo de la carrera.

Al licenciado Carlos Glusko y a la Dra. Mónica Bellozas, por la desinteresada colaboración durante la ejecución de las técnicas analíticas implicadas en la tesina. A la Dra. Jorgelina Montoya por su colaboración en el análisis del tratamiento estadístico de los resultados.

A la Dra. Alicia Grassano por su permanente predisposición durante el desarrollo de la tesina y el valioso aporte realizado tanto a nivel profesional como personal.

A quienes estuvieron siempre.

Índice

Carátula---------- 1

Agradecimientos---------- 2

Indice---------- 3

Resumen---------- 5

1. Introducción---------- 8

    1.1. Aspectos generales de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)---------- 8

    1.2. La planta---------- 9

    1.3. La bacteria---------- 13

    1.4. Tipo de nódulos---------- 13

    1.5. Enzimas involucradas en la FBN---------- 14

    1.6. Medida de la actividad nitrogenasa---------- 15

    1.7. Limitaciones para la FBN---------- 17

    1.8. Influencia del fósforo---------- 17

    1.9. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y antecedentes de coinoculación 18

2. Hipótesis---------- 20

3. Objetivo---------- 20

4. Materiales y métodos---------- 21

    4.1. Microorganismos---------- 21

        4.1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno---------- 21

        4.1.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo---------- 21

    4.2. Material vegetal---------- 21

    4.3. Soporte para el cultivo de plantas: suelo---------- 21

        4.3.1. Metodología de toma de muestra---------- 21

        4.3.2. Análisis físico químico---------- 21

    4.4. Medios y condiciones de cultivo para microorganismos---------- 23

        4.4.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno---------- 23

        4.4.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo---------- 23

        4.4.3. Condiciones de cultivo---------- 23

    4.5. Cultivo de plantas---------- 24

        4.5.1. Desinfección de semillas y germinación---------- 24

        4.5.2. Condiciones de cultivo---------- 24

        4.5.3. Siembra y raleo---------- 25

4.5.4. Tratamientos: inoculación y fertilización de plántulas---------- 25
4.6. Experiencias realizadas---------- 25
4.6.1. Evaluación del crecimiento y nodulación---------- 25
4.6.2. Determinaciones analíticas---------- 25
4.6.3. Actividades enzimáticas en nódulos---------- 25
4.7. Metodología---------- 26
4.7.1. Determinaciones analíticas---------- 27
4.7.1.1. Cuantificación de nitrógeno en planta o semilla---------- 27
4.7.1.2. Contenido de proteínas solubles en nódulos---------- 27
4.7.2. Actividades enzimáticas en nódulos---------- 28
4.7.2.1. GOGAT---------- 28
4.7.2.2. GS---------- 29
4.8. Análisis estadístico---------- 31
5. Resultados y discusión---------- 32
5.1. Microorganismos---------- 32
5.1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno---------- 32
5.1.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo---------- 32
5.2. Análisis físico químico de suelo---------- 32
5.3. Ensayo en cámara climatizada---------- 33
5.4. Experiencias realizadas---------- 34
5.4.1. Evaluación del crecimiento ---------- 34
5.4.2. Determinaciones analíticas---------- 36
5.4.2.1. Cuantificación de nitrógeno en planta o semilla ---------- 36
5.4.2.1. Contenido de proteínas solubles en nódulos---------- 38
5.4.3. Actividades enzimáticas en nódulos---------- 39
5.4.3.1.GOGAT ---------- 39
5.4.3.2.GS---------- 40
5.5. Consideración del K como factor limitante adicional---------- 41
6. Conclusiones---------- 44
7. Referencias bibliográficas---------- 45

Resumen

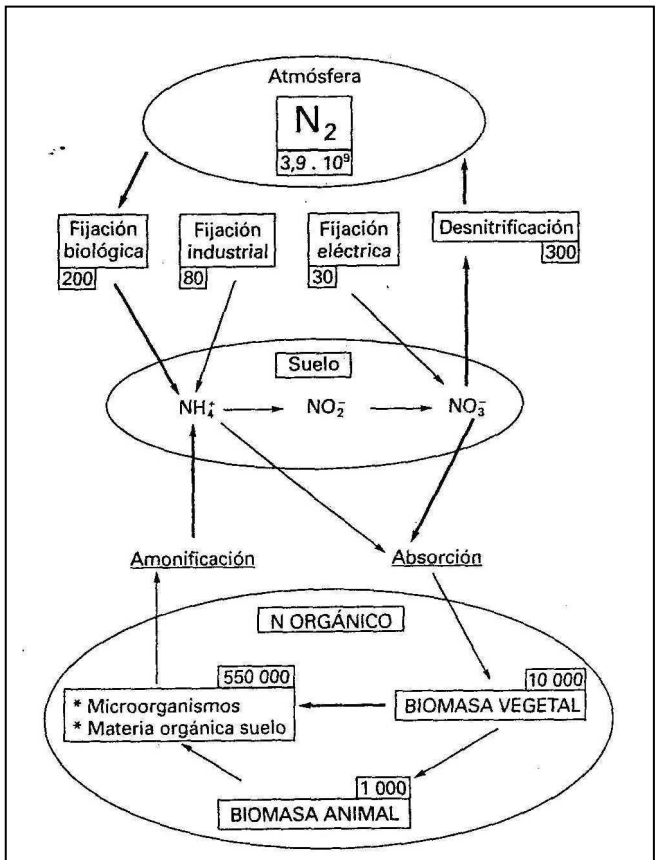
En el marco de la necesidad de desarrollar sistemas agrícolas sostenibles, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es vista como una fuente esencial y potencial de nitrógeno. La FBN es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa. El primer producto estable de la fijación es el amonio, el cual es asimilado por la actuación conjunta de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), que constituyen el denominado ciclo GS-GOGAT. Dada la estrecha relación entre el nitrógeno fijado y su posterior asimilación en el ciclo GS-GOGAT, la presencia de dichas enzimas puede ser usada como una medida directa de la fijación de nitrógeno. Después del nitrógeno, el fósforo es el elemento más importante para el desarrollo de los cultivos. En la región semiárida pampeana, el contenido de fósforo disponible se esta reduciendo lenta pero continuamente. Estudios sobre la influencia del fósforo inorgánico en la FBN han recibido considerable atención en leguminosas, en razón de su alto requerimiento durante las fases de desarrollo de los nódulos radiculares. En plantas de soja con supresión de fósforo, la actividad de enzimas GS y GOGAT no se detectó en estadíos vegetativos ni reproductivos. En la literatura se mencionan bacterias del género *Pseudomonas* como solubilizadoras de fósforo. La inoculación con mezcla de bacterias provee un mejor balance nutricional para las plantas; cuando se coinoculó *B. japonicum* y *P. putida* sobre raíces de soja, se registró mayor número de nódulos y peso seco. En este trabajo se cuantificó la actividad de las enzimas del ciclo GS-GOGAT, empleando la técnica propuesta en la Tesis de Maestría de Gonnet, con el fin de determinar la influencia de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivos de soja inoculados con *B. japonicum*, en distintos estadíos de crecimiento de la planta. Las curvas de actividad GS y GOGAT en nódulos siguen el patrón de actividad nitrogenasa en los distintos estadíos de desarrollo, aunque los valores obtenidos son inferiores a los que se indican en bibliografía y no se observan diferencias entre tratamientos. Debido a ello se procedió a evaluar la concentración de potasio en el suelo, como posible factor limitante para el desarrollo, obteniéndose concentraciones críticas del mismo. Debido al rol importante del potasio en la FBN, deberá considerarse su posible deficiencia al evaluar sintomatologías del cultivo, en regiones que han sido de reciente incorporación al área agrícola argentina. Para cumplir con el objetivo del ensayo, este debería repetirse, asegurando que el único factor limitante en el suelo, para el desarrollo del cultivo, sea el fósforo.

Introducción

1.1 Aspectos generales de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, encontrándose distribuido en tres reservorios principales: la atmósfera, donde representa alrededor del 78 %, el suelo, y la biomasa. Las complejas relaciones de intercambio entre estos constituyen el denominado ciclo del nitrógeno (figura 1).

Figura 1. Ciclo del Nitrógeno. (Fuente: Azcon-Bieto y Talon, 2000, pag 248)



Las cifras indicadas corresponden a millones de toneladas de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento muy importante para las plantas, ya que tan solo el carbono, el hidrógeno y el oxígeno son más abundantes que él en los tejidos vegetales. Forma parte de numerosas biomoléculas de las plantas, como proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides.

El dinitrógeno atmosférico es relativamente inerte, pero puede reaccionar con otros compuestos y convertirse en nitrógeno asimilable por las plantas y otros organismos. La cantidad de nitrógeno fijado en la naturaleza es de unas 2.3×10^8 tn por año, la que puede derivar de diferentes procesos:

*FBN, la cual se lleva a cabo a temperatura y presión ambientales, aporta alrededor del 65 % del total.

*Procesos no biológicos en la atmósfera, tales como:

Ozonización del N_2	$N_2 + O_3 \longrightarrow N_2O + O_2$
Fotólisis del N_2O	$N_2O \longrightarrow NO + N$
Ozonización del NO	$NO + O_3 \longrightarrow NO_2 + O_2$
Hidratación del NO_2	$3NO_2 + H_2O \longrightarrow 2HNO_3 + NO$
Oxidación del NH_3	$NH_3 + O_2 \longrightarrow NO_3^-$

Son de importancia cuantitativa menor y aportan aproximadamente 10 %.

*Procesos industriales, como el de Haber-Bosch, mediante el cual el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio a temperaturas y presiones muy elevadas (500 ºC y 350 atm), que representan aproximadamente el 25%.

En el marco de la necesidad del desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles, es decir dando especial importancia al incremento de la producción agrícola junto con la preservación del ambiente, la FBN es vista como una fuente esencial y potencial de nitrógeno, especialmente en las áreas de producción agrícola de bajos insumos que caracterizan las inmensas superficies que suman los pequeños productores de los países en desarrollo. Esto también se aplica a las grandes áreas de suelos fértiles de la pampa argentina, donde la agricultura es todavía en gran parte extractiva, como lo demuestra el bajo consumo de fertilizantes (Urquiaga *et al*, 2004).

Debido a que la utilización de fertilizantes nitrogenados conlleva un costo económico considerable, al ser dependiente de la energía derivada de los compuestos fósiles, y constituye además un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas dulces por lixiviación del nitrato de los suelos, la FBN constituye una alternativa ecológica y económicamente limpia frente a la fijación industrial, desempeñando un papel muy importante en la práctica agrícola.

La FBN es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa, convierten el nitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado, a temperatura ambiente y presión atmosférica. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales se lleva a cabo la fijación (Wang *et al*, s/f). Debido a que tienen la particularidad de promover el crecimiento vegetal, se denominan PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper and Schroth, 1978; Kloepper *et al*, 1991).

Un ejemplo de simbiosis establecida por FBN es entre soja y *Bradyrhizobium japonicum*.

1.2 La planta

El nombre científico de la soja es *Glycine max*, pertenece a la familia de las *Fabáceas*, subfamilia *Papilionoidae*.

El cultivo de soja está adaptado a un amplio rango de texturas de suelo. Se pueden producir altos rendimientos tanto en suelos arenosos como arcillosos, si el agua y los nutrientes no son limitantes (Shyam and Gite, 1990). Consecuentemente, es un cultivo muy difundido.

El grano contiene dos componentes importantes, las proteínas y el aceite, que tienen una gran demanda por los diversos usos que poseen, tanto a nivel industrial como para la alimentación animal y humana. Las proteínas tienen un excelente balance de aminoácidos en comparación con otras proteínas vegetales, pero son de menor calidad que las proteínas animales, puesto que contienen menor cantidad de aminoácidos azufrados esenciales. El aceite es rico en ácidos grasos esenciales, conteniendo alrededor del 85% de ácidos grasos insaturados. Los principales son: oleico, linoleico y linolénico. Debido a esto es el cultivo de mayor importancia económica en el mundo, especialmente en Estados Unidos, donde se obtiene alrededor del 50 % de la producción total (Panzieri *et al*, 2000). Actualmente se ha difundido en la Argentina en forma extraordinaria, convirtiendo al sector sojero en el más relevante de la agroindustria.

Existen 18 elementos que se consideran esenciales para la soja, los que pueden clasificarse en:

*Nutrientes esenciales no minerales: carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O). Son los principales componentes de la materia seca de la planta, representado aproximadamente el 92% de la misma. Se obtienen o absorben como dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O) y oxígeno atmosférico (O_2) (Mengel *et al*, 1987)

*Nutrientes esenciales minerales: son obtenidos del suelo, y en el caso del nitrógeno, también del aire por el proceso de fijación biológica. Representan aproximadamente el 8% de la materia seca de la planta y pueden subdividirse en:

- Primarios: nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), que alcanzan al 6% de la materia seca.

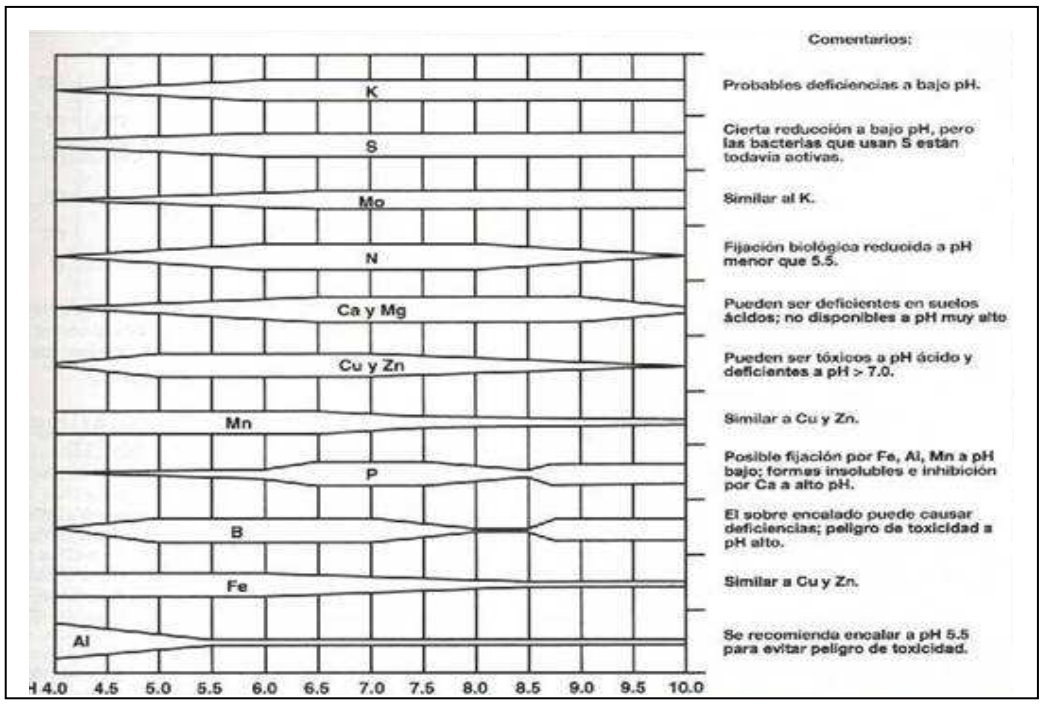
- Secundarios: calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), que representan el 1,7% de la materia seca.
- Micronutrientes: hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), cobre (Cu), boro (B), zinc (Zn) y cloro (Cl), que reúnen el 0,3% de la materia seca.

A esta lista se agrega el cobalto (Co), que es beneficioso para la fijación de nitrógeno. El elemento esencial más recientemente descubierto para la soja es el níquel (Ni), requerido únicamente cuando la soja fija nitrógeno simbióticamente (Schrader and Briskin, 1989).

El nivel crítico de un nutriente en el suelo, es decir, la cantidad por debajo de la cual comienzan a producirse respuestas a la fertilización, depende del cultivo, del cultivar, del pH y del contenido relativo de los demás nutrientes. La soja presenta un nivel crítico de 10 ppm para fósforo y de 130 ppm para potasio. El contenido de potasio de los suelos de la región pampeana es muy alto, en cambio, el contenido de fósforo disponible se esta reduciendo lenta pero continuamente, si bien el contenido total no es limitante.

El pH del suelo óptimo para soja se encuentra en suelos neutros o ligeramente ácidos, obteniéndose con un pH de 6 hasta la neutralidad buenos rendimientos. Este no influye tanto sobre la planta como sobre la bacteria fijadora de nitrógeno, que es más eficiente en ambientes levemente ácidos. La mayor influencia del pH del suelo es ejercida sobre la disponibilidad de los elementos nutritivos (figura 2).

Figura 2. Influencia del pH en la disponibilidad de nutrientes. (Fuente: C. de Edafología, F.Agron-UNLPam)



Las temperaturas óptimas para el desarrollo del cultivo se hallan comprendidas entre 20 y 30 ºC, ya que en proximidades a los 10 ºC su crecimiento disminuye, y temperaturas por encima de los 40 ºC provocan un efecto indeseado sobre la velocidad de crecimiento.

Respecto a la humedad, durante su cultivo la soja requiere al menos 300 mm de agua, ya sea en forma de riego o de lluvia.

Para obtener altos rendimientos del cultivo es necesario un adecuado conocimiento de la influencia de los factores edafoclimáticos sobre los distintos estados de desarrollo. Existen varias clasificaciones de los estados de desarrollo en soja, la más difundida es la propuesta por Fehr y Caviness (1977), que emplea dos escalas: una para los estados vegetativos, identificados con la letra V, y otra para los reproductivos, identificados con la letra R (tabla 1).

Tabla 1. Estados de desarrollo del cultivo de soja. (Fuente: Fehr y Caviness, 1977)

Estados vegetativos	**Días promedio desde la siembra**	**Estados reproductivos**	**Días promedio desde la siembra**
VE Emergencia	10	R1 Inicio de la floración	40
VC Cotiledonar	15	R2 Plenitud de floración	43
V1 Primer nudo	20	R3 Inicio de formación de vainas	53
V2 Segundo nudo	25	R4 Plenitud de formación de vainas	62
V3 Tercer nudo	30	R5 Inicio del llenado de granos	71
V(n) (N) nudo		R6 Plenitud del llenado de granos	86
		R7 Inicio de madurez	102
		R8 Plenitud de madurez	111

Debe prestarse especial atención al estado R5, donde ocurren varios eventos importantes: la planta alcanza su máxima altura, número de nudos e índice de área foliar; se producen las mayores tasas de FBN, que luego empiezan a caer abruptamente; las semillas inician un período rápido de acumulación de materia seca y nutrientes.

1.3 La bacteria

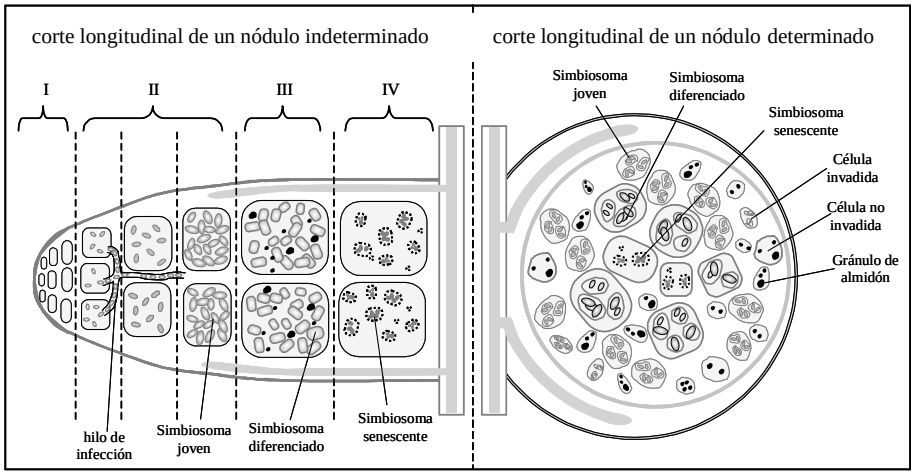
En referencia a los microorganismos que forman parte de la simbiosis, ellos pertenecen al género *Bradyrhizobium*, dentro de la familia *Rhizobiaceae.* Dicho género

incluye bacterias de crecimiento lento, productoras de álcali. Las colonias son circulares, rara vez traslúcidas, blancas, con un diámetro menor a 1mm luego de 7 días de incubación. Las tres especies definidas en este género, *B. japonicum*, *B. elkanii y B. liaoningense* pueden nodular soja. *B. elkanii* se distingue de *B. japonicum* por diferencias en sus secuencias de ADN, en patrones de enzimas metabólicas de exopolisacáridos, en su contenido de ácidos grasos y hemoproteínas al igual que por diferencias en sus patrones de resistencia a antibióticos. Se desconoce la posición filogenética exacta de *B. liaoningense* porque no se dispone de una secuencia completa del gen 16S rRNA de esta especie (Wang *et al*, s/f). *B. japonicum*, la especie tipo dentro del género, es una bacteria gram negativa, con forma de bastón, aunque pleomórfica en condiciones adversas de crecimiento (Jordan 1984). Presenta movilidad debido a la presencia de flagelos. Habita en el suelo como saprófita usando compuestos orgánicos simples y amonio o nitrato como fuente nitrogenada. A pesar de que puede fijar el nitrógeno del aire, solo lo hace en simbiosis con la planta; aún cuando la disponibilidad de nitrógeno del suelo sea baja; es decir es un microorganismo que ha evolucionado hacia una existencia en simbiosis.

1.4 Tipo de nódulos

El desarrollo nodular sigue dos patrones básicos dependiendo de la planta huésped: nódulos determinados, de forma redondeada, donde las células del centro son más activas en fijación de nitrógeno que las de la periferia, o nódulos indeterminados, de estructura alargada cilíndrica con cuatro zonas: meristemática, simbiosomas en diferenciación, simbiosomas fijadores y simbiosomas senescentes (figura 3). Los primeros se dan en soja, lotus y poroto, mientras que los segundos se presentan en alfalfa, arvejas y trébol (Lodeiro *et al*, 2003).

Figura 3. Patrones de desarrollo nodular. (Fuente: Lodeiro *et al*, 2003)



1.5 Enzimas involucradas en la FBN

La FBN es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, el cual consta de dos ferrosulfoproteínas: la Fe-proteína o dinitrogenasa reductasa, un dímero de masa molecular aproximada 62 kD, que contiene un centro [4Fe – 4S], y la FeMo-proteína o dinitrogenasa, un tetrámero de masa molecular 220 kD, que contiene alrededor de 30 átomos de Fe, 30 átomos de S y 2 de Mo. (Azcon-Bieto y Talon, 2000). La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno y se inactiva de forma irreversible cuando se expone al aire.

La reacción de fijación de nitrógeno puede expresarse:

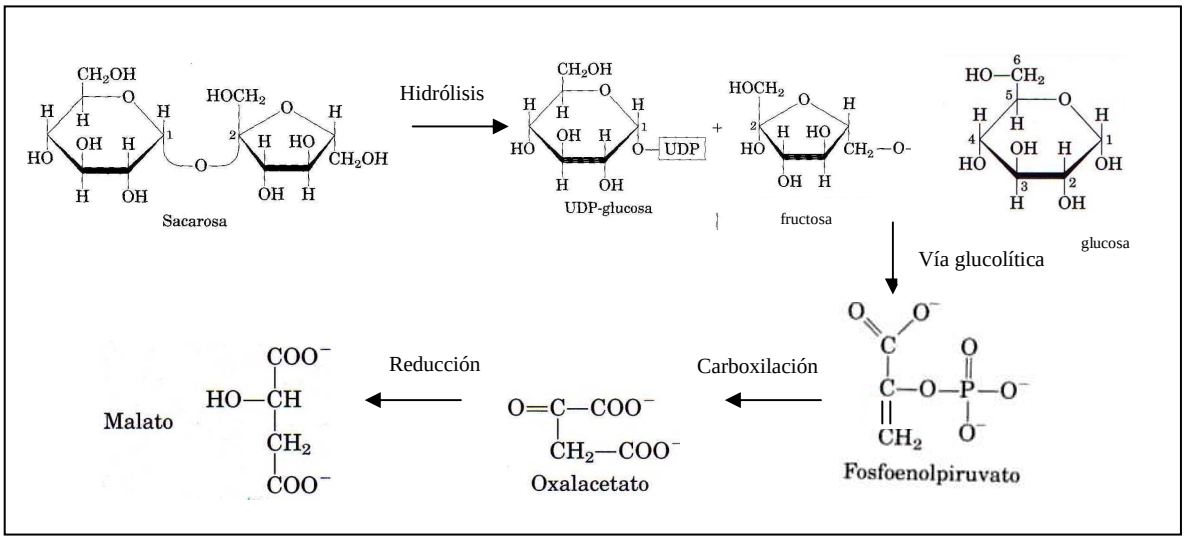
$$N_2 + 16\ ATP + 10\ H^+ + 8\ e^- \longrightarrow 2\ NH_4^+ + H_2 + 16\ ADP + 16\ P_i$$

Dicha reacción requiere: un donador de e^-, ATP-Mg^{2+} y una concentración extremadamente baja de oxígeno.

El reductor in vivo de la nitrogenasa es una proteína de potencial redox muy negativo, tipo ferredoxina, en bacteroides de *B. japonicum*. Las ferredoxinas son proteínas SFe, cuyo potencial redox de -0.43 voltios puede variar en un determinado rango según los componentes de la proteína. En los organismos fotosintéticos la fuente de poder reductor proviene del flujo electrónico derivado de la clorofila (Frioni, 1999).

La energía necesaria para la fijación de nitrógeno proviene originariamente de la fotosíntesis. El compuesto carbonado más importante transportado desde la parte aérea a los nódulos, vía floema, es la sacarosa. En las células del nódulo la sacarosa es hidrolizada por la actividad de las enzimas invertasa alcalina (que produce glucosa y fructosa) y sacarosa sintasa (que produce reversiblemente fructosa y UDP-glucosa). Los monosacáridos son hidrolizados a través de la ruta glucolítica hasta la obtención de fosfoenolpiruvato, este último produce oxalacetato, tras incorporar CO_2 por acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, una enzima citosólica muy abundante en los nódulos. El oxalacetato, inestable, es reducido rápidamente a malato por la malato deshidrogenada. Este puede ser utilizado como fuente de carbono y energía en los bacteroides, luego de ser oxidado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos; o bien puede ser reducido a succinato, otro ácido dicarboxílico que puede ingresar al bacteroide (Azcon-Bieto y Talon, 2000) (figura 4).

Figura 4. Síntesis de malato por una vía reductiva microaeróbica



Para lograr bajas concentraciones de oxígeno, la planta suministra al nódulo una proteína, la leghemoglobina, que es capaz de complejar y transportar O_2 con gran afinidad, lo que resulta en muy bajas concentraciones de oxígeno en el nódulo. Dado que la leghemoglobina es roja, la actividad fijadora de nitrógeno en los nódulos es fácilmente detectable por observación de coloración rosada, a diferencia de la coloración blanca de los nódulos inefectivos (Lodeiro *et al*, 2003).

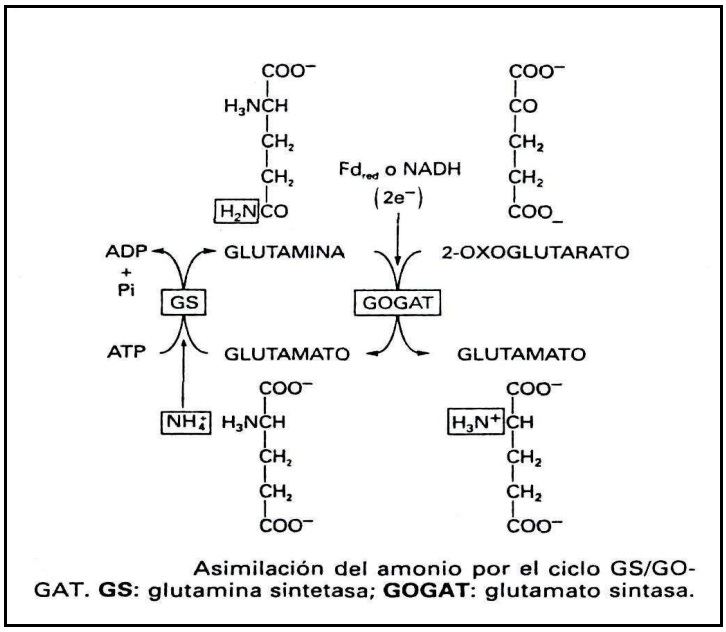
Una reacción secundaria del proceso de fijación de nitrógeno es la formación de hidrógeno; si bien este proceso emplea energía fotosintética, se ha comprobado que el posterior reciclaje de hidrógeno por la hidrogenasa puede aumentar la eficiencia de fijación (Albrecht *et al*, 1979).

El primer producto estable de la fijación de nitrógeno es el amonio. Dado que los bacteroides expresan muy poca actividad asimiladora de amonio, éste es excretado hacia el citoplasma de la célula infectada, donde es incorporado en compuestos carbonados. El amonio es asimilado por la actuación conjunta de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), que constituyen el denominado ciclo GS-GOGAT (Temple *et al*, 1998). En plantas superiores existen dos tipos de GOGAT: la Fd-GOGAT, que es la forma más abundante en tejidos verdes y se localiza en los cloroplastos, y la NADH-GOGAT, más abundante en tejidos no fotosintéticos (raíces, nódulos).

En una primera etapa, el amonio es incorporado en una molécula del aminoácido glutamato, reacción catalizada por GS, para producir otro aminoácido con mayor contenido de nitrógeno, la glutamina. Ésta puede ser exportada al xilema o bien puede reaccionar con

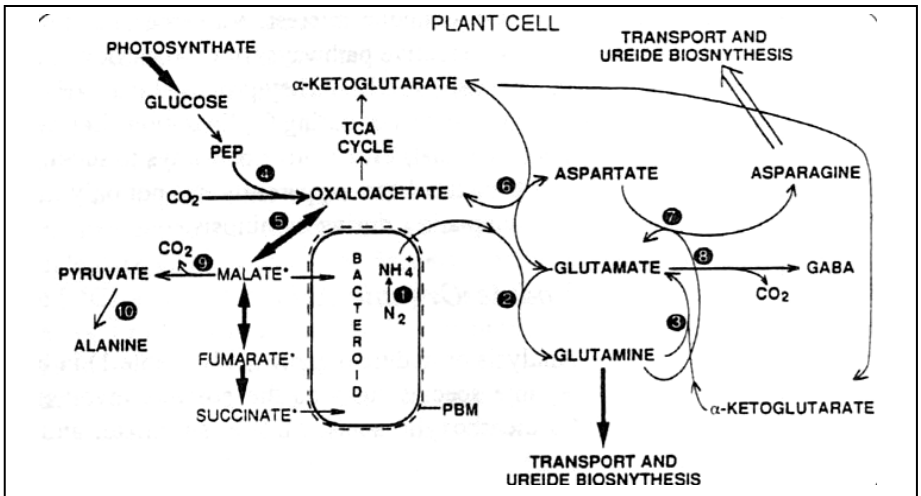
el α-cetoglutarato para dar como producto dos moléculas de glutamato, reacción catalizada por GOGAT (figura 5).

Figura 5. Ciclo GS-GOGAT. (Fuente: Azcón y Talón; 2000, pag 239)



Además, la glutamina puede donar su grupo amida al aspartato para formar asparagina, dicha reacción es catalizada por la asparagina sintetasa (AS) y requiere hidrólisis de ATP (Azcón-Bieto y Talon, 2000). En la figura 6 puede observarse el flujo de carbono y de nitrógeno, y las enzimas involucradas en la síntesis de compuestos carbonados y aminoácidos en nódulos de raíces de leguminosas.

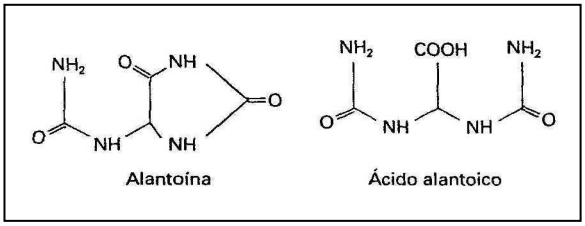
Figura 6. Flujo de carbono y nitrógeno en nódulos. (Fuente: Vance and Heichel, 1991)



1- Nitrogenasa, 2- Glutamina sintetasa, 3- Glutamato sintasa, 4- PEP carboxilasa, 5- Malato deshidrogenada, 6- Aspartato amidotransferasa, 7- Asparagina sintetasa, 8- Glu descarboxilasa. 9- Enzima malica. 10- Alanina amidotransferasa

El amonio asimilado puede ser exportado desde los nódulos a la parte aérea de la planta por el xilema, en forma de amidas o ureidos. Las leguminosas de origen templado, como alfalfa y trébol, exportan el nitrógeno en forma de amidas, como la glutamina y asparagina, mientras que las leguminosas de origen tropical, como soja y poroto, exportan el nitrógeno en forma de ureidos, como la alantoína y el ácido alantoico (figura 7). Dichos ureidos se sintetizan a partir de glutamina y asparagina e implican la síntesis de novo de purinas y su posterior oxidación.

Figura 7. Estructura de ureidos. (Fuente: Azcón y Talón; 2000, pag 256)



La utilización de ureidos para el transporte de nitrógeno conlleva un ahorro de carbono, ya que la alantoína y el ácido alantoico poseen una relación C:N de 4:4 frente a una 5:2 de la glutamina o una 4:2 de la asparagina. Sin embargo los ureidos son considerablemente menos solubles que las amidas, lo que podría explicar por qué son mayoritariamente exportados en las leguminosas tropicales, que presentan nódulos de crecimiento determinado: se sugiere que el sistema vascular cerrado y sin ramificaciones de estos puede tolerar un mayor flujo de agua, suficiente para “arrastrar” durante la transpiración de la planta los ureidos producidos en los nódulos (Azcón-Bieto y Talon, 2000).

1.6 Medida de la actividad nitrogenasa

Existe gran interés en medir apropiadamente la actividad nitrogenasa, tanto para el mejoramiento de cepas de rizobios e inoculantes, como para el mejoramiento de las leguminosas (Unkovich and Pate, 2000; Herridge and Rose, 2000).

Tanto la inspección ocular del color interno de los nódulos como el análisis de la composición de los fluidos xilemáticos, sirven como estimaciones indirectas de la actividad nitrogenasa (Lodeiro *et al*, 2003). Más aún, dada la estrecha relación entre el nitrógeno fijado y su posterior asimilación en el ciclo GS-GOGAT, la presencia de dichas

enzimas puede ser usada como una medida directa de la fijación de nitrógeno, y por tanto, de la actividad nitrogenasa (Reynolds *et al*, 1982).

La nitrogenasa, además de catalizar la reducción de nitrógeno a amonio, cataliza otras reducciones, como la de acetileno a etileno. Esta última se emplea como medida directa de la actividad nitrogenasa, gracias a la facilidad con que puede medirse la cantidad de etileno producido, mediante el uso de un cromatógrafo de gases. Sin embargo, debido a que el acetileno, luego de un corto tiempo de exposición puede actuar como inhibidor (Minchin. *et al,* 1994), se ha desarrollado un método alternativo que consiste en medir la evolución de hidrógeno, que siempre acompaña la reducción de nitrógeno (Lodeiro *et al,* 2003).

Otros métodos consisten en medir el nitrógeno incorporado por las plantas. Estos no representan medidas de la actividad enzimática, sino la acumulación del producto de dicha actividad. Tal es el caso de la medida del contenido total de nitrógeno en relación a un testigo sin inocular, ya sea en la parte aérea, los granos, o la planta entera, determinación llevada a cabo empleando el método Kjeldahl. Aún más indirecta resulta la medida del peso seco acumulado, siempre y cuando se asegure que el nitrógeno ha sido el nutriente limitante (Lodeiro *et al,* 2003).

1.7 Limitaciones para la FBN

El sistema simbiótico *B. japonicum*-soja requiere que no haya condicionantes por exceso o por defecto para el desarrollo normal del cultivo.

Uno de los factores que limitan la FBN en soja es la presencia de formas combinadas de nitrógeno en el suelo. Los suelos fértiles, con moderada o alta disponibilidad de formas inorgánicas de nitrógeno en el momento de la siembra y/o importantes tasas de mineralización durante el ciclo del cultivo afectan al establecimiento de la simbiosis ya que retardan el inicio de la nodulación y/o inhiben el funcionamiento del sistema fijador (Lett *et al*, 1998). Las carencias de fósforo, potasio, calcio, azufre y micronutrientes también disminuyen la formación de nódulos y por consiguiente la FBN (Rivero *et al*, 1995).

En cuanto al clima, los factores más importantes son la disponibilidad hídrica y la temperatura. La simbiosis es sensible a condiciones de anegamiento: con sólo 2 o 3 días de inundación se puede provocar una alta mortandad de nódulos; por su parte, los efectos del estrés hídrico por sequía en este cultivo afectan tanto la nodulación como la fijación de nitrógeno. Con temperaturas cercanas a los 15ºC se retrasa el proceso de infección y la

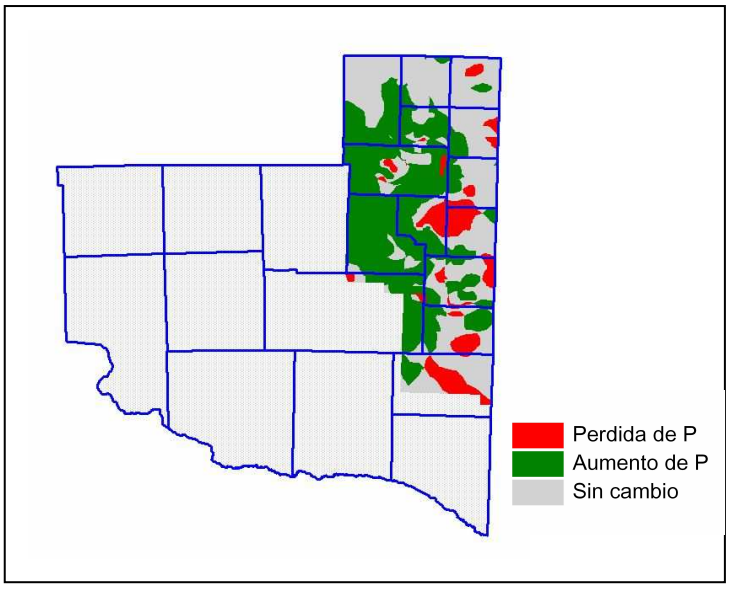
nodulación; no todas las cepas noduladoras de soja toleran temperaturas superiores a los 40ºC.

1.8 Influencia del fósforo

La principal causa de deficiencia de fósforo es que las plantas pueden absorberlo solo como iones HPO_4^{2-} y $H_2PO_4^-$ (Schachtman *et al*, 1998). Estos aniones son muy reactivos y en el suelo forman parte de compuestos como sales precipitadas, ésteres de fósforo inorgánico, compuestos orgánicos como fitato. La presencia de cada forma no asimilable de fósforo depende del pH del suelo: en suelos ácidos, el fósforo forma compuestos poco solubles con aluminio y hierro, mientras que en suelos alcalinos precipita como sales de calcio y magnesio (López-Bucio *et al*., 2000).

Los fosfatos más abundantes en la región semiárida pampeana están ligados a calcio (Buschiazzo *et al*, 1994). La agricultura continua durante más de veinte años causó una disminución considerable en el fósforo soluble y en menor grado en el fósforo inorgánico total (Urioste *et al*, 1996). Los niveles de fósforo para el período 1996-2006 (Romano y Roberto, 2007) indican que si bien existen zonas que no mostraron cambios, debido a un incremento de la fertilización fosforada en las áreas más productivas, otras zonas presentan niveles críticos de contenidos de fósforo como consecuencia de la menor adopción de tecnología de fertilización (figura 8).

Figura 8. Cambio en los niveles de fósforo en el período 1996-2006. (Fuente: Romano y Roberto, 2007)



Estudios sobre la influencia del fósforo inorgánico en la FBN han recibido considerable atención en leguminosas (Gomes *et al*, 2001), en razón del alto requerimiento de este elemento durante las fases de iniciación, crecimiento y funcionamiento de los nódulos radiculares (Al-Niemi *et al*, 1997). En soja cuyos nódulos presentan crecimiento determinado y transportan principalmente ureidos, la deficiencia de fósforo inorgánico disminuye la concentración de nitrógeno tanto en la parte aérea como en los nódulos, al mismo tiempo, el suplemento del mismo resulta en aumento de la nodulación, tanto en número como en masa nodular (Ribet and Drevon, 1995). Además, en plantas de soja con supresión de fósforo, la actividad de las enzimas GS y NADH-GOGAT no se detectó en estadíos vegetativos ni reproductivos. La supresión de fósforo provoca reducción en los valores de ureidos, lo que permite la inferencia de que hubo reducción de la actividad nitrogenasa y del sistema GS-GOGAT (Silva, 1998).

1.9 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y antecedentes de coinoculación

Numerosos microorganismos, especialmente aquellos asociados con raíces, tienen la habilidad de aumentar el crecimiento de las plantas y su productividad. Desde las primeras observaciones de un mejor crecimiento de las plantas inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosforo, diferentes resultados han marcado la habilidad de las bacterias del suelo de solubilizar fósforo desde la roca fosfórica, ya sea en cultivos con medio nutritivo o en asociación con plantas (Azcon *et al*, 1976), debido a la producción de ácidos.

En la literatura se menciona que las principales cepas activas en la solubilización de fósforo pertenecen a los géneros *Pseudomonas, Mycobacterium, Micrococcus, Bacillus, Flavobacterium, Rhizobium, Mesorhizobium y Sinorhizobium* (Asea *et al*, 1988; Salih *et al*, 1989; Rodríguez y Fraga, 1999).

La inoculación con mezcla de bacterias provee un mejor balance nutricional para las plantas, y la mejora en la absorción radicular de nitrógeno y fósforo es el mecanismo principal de interacción entre plantas y bacterias (Belimov *et al*, 1995). Los efectos benéficos de bacterias del genero *Azospirillum* fueron observados cuando se coinoculó con microorganismos solubilizadores de fósforo, tal como lo muestra El-Komy (1995) tras coinocular *Azospirillum lipoferum y Bacillus megaterium*, lo cual proveyó una nutrición nitrogenada y fosforada balanceada. Hay evidencia de que ciertas especies de *Pseudomonas* aumentan la absorción de nutrientes, actúan como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos y producen fitohormonas en la rizósfera, lo cual promueve el

crecimiento vegetal (O'Sullivan and O'Gara, 1992). Cepas de *Pseudomonas putida* han sido citadas como solubilizadoras de fósforo (Kumar and Sing, 2001; Villegas and Fortín, 2002; Rosas *et al*, 2006).

Cuando se coinoculó *B. japonicum* y *P. putida* sobre raíces de soja, se registró mayor número de nódulos y peso seco. Los efectos benéficos de dicha coinoculación se asociaron a la pobre solubilización de fósforo y producción de sideróforos por parte de *B. japonicum* en comparación con *P. putida* (Rosas *et al*, 2006).

2. Hipótesis

A los efectos de lograr una mejora en los rendimientos del cultivo, disminuir la necesidad de aplicación de fertilizantes químicos y mantener la estructura y materia orgánica de los suelos; se requiere la inoculación biológica de los cultivos a desarrollar, con cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal -PGPR-, tales como *B. japonicum* y bacterias solubilizadoras de fósforo.

3. Objetivo

El objetivo del trabajo es “determinar la influencia de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivos de soja inoculados con *B. japonicum*, en distintos estadíos de crecimiento de la planta, por medio de la cuantificación de la actividad enzimática del ciclo GS-GOGAT”.

4. Materiales y métodos

4.1. Microorganismos

4.1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno

Se emplean las siguientes cepas de *Bradyrhizobium*, procedentes del cepario del departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNLPam: E 109, Semia 5080, Semia 5079, E 5014, Semia 938, Semia 928, Semia 5019 y Semia 587.

4.1.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo

Se utilizan dos cepas bacterianas: SP21, una cepa patrón de la especie *Pseudomona putida*, y SP8W, una cepa aislada de rizósfera de alfalfa en suelos de la zona este de La Pampa. Para definir la cepa a utilizar en el ensayo se realiza la observación microscópica de los inóculos respectivos, considerando pureza y morfología del cultivo y movimiento bacteriano, y se determina la disminución del pH del medio como medida de la capacidad solubilizadora de fósforo.

4.2. Material vegetal

Se usan semillas de soja NIDERA, cultivar A-3550-RG, proporcionadas por la Cátedra Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía – UNLPam.

4.3. Soporte para el cultivo de las plantas: suelo

4.3.1. Metodología de toma de muestra

Para la selección del suelo, se busca que éste sea pobre en nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, y que no sea de textura muy fina para evitar compactación en las macetas. El suelo se extrae hasta una profundidad de 20 cm aproximadamente, luego se procede a su secado y tamizado.

4.3.2. Análisis físico químico

Se realizan las siguientes determinaciones:

- ***Humedad a capacidad de campo:*** se determina el peso inicial del suelo en el cilindro, se satura con agua y luego de 24 horas se pesa nuevamente. Por

diferencia de pesada se calcula el volumen de agua requerido para mantener el suelo a capacidad de campo.

- ***Punto de marchitez permanente:*** se satura el suelo con agua, se deja lixiviar durante 24 horas y se determina su peso húmedo; luego se calcula el contenido de agua remanente por diferencia con su peso seco. A partir de una ecuación empírica se calcula el punto de marchitez permanente.
- ***pH actual:*** se realiza la medida por método potenciométrico, empleando una suspensión de suelo y determinando pH en el sobrenadante, previa agitación durante treinta minutos.
- ***Carbono total****:* se emplea el método de Walkley & Black (1934), mediante el cual el carbono total (orgánico e inorgánico) se oxida con dicromato de potasio (en medio ácido) agregado en exceso y en cantidad conocida, valorándose la cantidad de carbono presente indirectamente, por titulación del dicromato no reducido. El punto final de la titulación se observa por viraje de color de la solución de pardo amarillento a verde intenso.
- ***Fósforo disponible:*** se emplea el método de Bray-Kurtz 1 (1945), empleando una solución extractiva constituida por fluoruro de amonio 0.03 N en ácido clorhídrico 0.025 N. El fluoruro tiene la propiedad de formar compuestos con los iones de aluminio y de hierro, con la consecuente liberación del fósforo retenido en los suelos por estos cationes trivalentes. La presencia del ácido conduce a la liberación de los fosfatos de calcio más activos, impidiéndose la refijación durante la extracción del fósforo por la acción del fluoruro. La cuantificación es por colorimetría, el molibdato de amonio y el tartrato de amonio y potasio reaccionan en medio ácido con ortofosfato para formar un ácido molibdofosfórico, que se reduce a azul de molibdeno, de color azul intenso, por acción del ácido ascórbico. El compuesto reducido y coloreado presenta dos picos de máxima absorción: 660 nm y 882 nm, empleándose el segundo para medidas con espectrofotómetro.
- ***Calcio y Magnesio:*** la extracción del calcio (Ca) y magnesio (Mg) adsorbidos se realiza con una solución saturante de acetato de amonio 1 N, pH 7. Para la cuantificación se emplea un método volumétrico por titulación complejométrica con EDTA disódico, el reactivo EDTA reacciona con los iones Ca y Mg, formando complejos, se determina primero Ca y Mg y luego Ca, utilizando

indicadores negro de eriocromo T y murexida respectivamente, con viraje de rojo vinoso a azul. El Mg se obtiene por diferencia.

4.4. Medios y condiciones de cultivo para microorganismos

4.4.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno

En la tabla 2 se indica la composición del medio de cultivo empleado para *B. japonicum.*

Tabla 2: Composición del medio de cultivo para *B. japonicum.* (Fuente: Balatti, 1992)

Componente g/l	Inóculo	Mantenimiento	Crecimiento
K_2HPO_4	0.50	0.50	0.50
KH_2PO_4	0.50	0.50	0.50
$(NH_4)_2HPO_4$	0.30	0.30	0.30
$MgSO_47H_2O$	0.20	0.20	0.20
NaCl	0.10	0.10	0.10
KNO_3	0.80	0.80	0.80
$MnSO_44H_2O$	0.06	0.06	0.06
$FeCl_36H_2O$	0.06	0.06	0.06
Ext. Levadura	2.00	2.00	4.00
Glicerol	5.00	5.00	10.00
pH	6.8	6.8	6.8

4.4.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo

En la tabla 3 se indica la composición del medio de cultivo empleado para bacterias solubilizadoras de fósforo.

Tabla 3: Composición del medio de cultivo para solubilizadoras de fósforo. (Fuente: Comunicación personal)

Componente	Concentración (g/l)
Caldo nutritivo	8
Extracto de levadura	2
Glucosa	20
$CaHPO_4$	4
Agar	22

4.4.3. Condiciones de cultivo

Los microorganismos se desarrollan en medio líquido, el cual se utiliza en relación 1:5 con el volumen del erlenmeyer, a fin de asegurar la correcta aereación del cultivo, para lo cual se colocan en agitador rotatorio a 250 rpm y 2.5 cm de excentricidad. La temperatura óptima para el crecimiento se logra colocando los medios en cuarto estufa a 28 ºC. El tiempo de desarrollo de los cultivos de microorganismos es de 48 horas para *Bradyrhizobium* y de 24 horas para bacterias solubilizadoras de fósforo.

4.5. Cultivo de plantas

4.5.1. Desinfección de las semillas y germinación

En principio se colocan las semillas en una cestilla estéril. Para iniciar la esterilización, se sumergen las semillas durante tres minutos en etanol al 95%, luego se traslada la cestilla a una solución desinfectante de $HgCl_2$ al 1% y se agita otros tres minutos, finalmente se realizan cuatro o cinco lavados de aproximadamente un minuto con agua destilada estéril, el agua del último lavado se emplea para trasladar asépticamente las semillas hacia una caja de petri con doble capa de papel de filtro, previamente esterilizada. Las semillas se dejan a germinar durante 48 horas en cuarto estufa a 28 ºC.

4.5.2. Condiciones de cultivo

Se emplea suelo sin historia sojera. Con el propósito de asegurar la ausencia de *B. japonicum*, se realiza un ensayo previo en cámara climatizada, utilizando medio Jensen, e inoculando plántulas con diluciones seriadas de dicho suelo.

Las plantas se cultivan en macetas de 16 cm de diámetro y 45 cm de alto, con una capacidad de 7.5 kg de suelo aproximadamente. Las macetas se colocan en invernáculo (figura 9), van rotándose periódicamente durante el período estudiado para permitir igualdad de condiciones entre las plantas. Las condiciones de temperatura y humedad se controlan a fin de que no resulten limitantes para el desarrollo del ensayo.

Figura 9. Sistema de cultivo en invernáculo

4.5.3. Siembra y raleo

En cada maceta, que contiene 7.5 kg de suelo, se establecen dos plantas. Inicialmente se siembra el doble de semillas pregerminadas (cuatro) en el suelo húmedo, y después de una semana, cuando empieza a abrir la primera hoja trifoliada, se ralean las plántulas menos vigorosas, dejando dos de tamaño uniforme. Para no romper las raíces de estas últimas, las plantas raleadas se arrancan cuidadosamente o se cortan a nivel del suelo.

4.5.4. Tratamientos: inoculación y fertilización de plántulas

Los tratamientos elegidos para realizar el ensayo son:

a. Testigo sin inocular (T)

b. Testigo fertilizado con nitrógeno (N)

c. Testigo fertilizado con nitrógeno y fósforo (N+P)

d. Inoculación con *B. japonicum* (B.j)

e. Inoculación con *B. japonicum* y bacterias solubilizadoras de fósforo (B.j+SP)

Se adopta un diseño al azar, con tres repeticiones de cada tratamiento, en cada cosecha, es decir que se preparan 45 macetas.

Para proceder a la inoculación de los tratamientos que lo requieren se procede de la siguiente manera: se siembran en forma aséptica dos erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio inóculo cada uno, con tres ansadas de cultivo de *B. japonicum* conservado en heladera a 5ºC, posteriormente se colocan en un agitador rotatorio a 250 rpm durante 48 hs, a una temperatura de 28ºC. Se procede de la misma manera en la siembra del medio inóculo para bacterias solubilizadoras de fósforo, pero a diferencia del anterior, se realiza a partir de cepas conservadas en freezer, en medio líquido con glicerol.

Se realiza un recuento, empleando la técnica del número más probable (NMP) de microorganismos, al momento de la inoculación con *B. japonicum,* para determinar el número de células viables ml^{-1}. Para ello se utiliza el método de dilución y plaqueo, que considera que cada célula viable forma una colonia. Partiendo del inóculo se realizan diluciones sucesivas hasta obtener una dilución con una concentración entre 10^2-10^3 células ml^{-1}, estas se siembran en placas de Petri con medio agarizado, se colocan en estufa a 29 ºC y se incuban durante 7 días, finalmente se cuentan aquellas cuyo número de colonias está entre 30 y 300.

Para la fertilización química con nitrógeno y fósforo se emplean soluciones de urea y fosfato monoácido de potasio respectivamente. La dosis de fertilizante es de 150 kg/ha

de nitrógeno, a aplicar en tres etapas, una por mes; y de 100 kg/ha de fósforo, a aplicar en dos etapas, durante los dos primeros meses de ensayo.

4.6. Experiencias realizadas

Para determinar la influencia de bacterias solubilizadoras de fósforo en soja inoculada con *B. japonicum* en distintos estadíos de crecimiento del cultivo, se procede a realizar tres cosechas de plantas enteras de cada tratamiento, a los 44, 74 y 99 días después de la siembra, que corresponden a los estadíos R2 (plenitud de floración), R5 (inicio del llenado de granos) y R7 (inicio de la madurez) respectivamente, sobre las cuales se realizan las siguientes determinaciones:

4.6.1. Evaluación del crecimiento

- Peso seco de parte aérea

4.6.2. Determinaciones analíticas

- Nitrógeno acumulado en planta a los 44 y 74 días.
- Nitrógeno en semillas a los 99 días desde la siembra
- Contenido de proteínas solubles en nódulos

4.6.3. Actividades enzimáticas en nódulos

- GS
- GOGAT

4.7.Metodología

Para la recolección del material, cada día de recolección, se apartan al azar tres macetas (es decir seis plantas) de cada tratamiento. Se separan parte aérea para determinación de peso seco, a 70 ºC durante 48 hs, y nitrógeno acumulado en planta; y raíces, las cuales se colocan en agua para eliminar la arena y se secan con papel, para posterior recolección de nódulos y determinación de actividad enzimática.

4.7.1. Determinaciones analíticas

4.7.1.1. Cuantificación de nitrógeno acumulado en planta o semilla

La cantidad de nitrógeno acumulado en planta o semilla (dependiendo del grado de madurez al momento de la cosecha) se determina sobre materia seca. Se cuantifica por el método de Kjeldahl (Bremmer, 1960) en equipo automatizado, Tecator-Kjelltec 1030. En dicho método el nitrógeno de la muestra es convertido a amonio por digestión con ácido sulfúrico concentrado (oxidación húmeda) y catalizadores que facilitan esta conversión; el amonio se determina en el digesto por titulación del amoníaco liberado en la destilación del digesto tratado con álcali y recogido en ácido bórico.

4.7.1.2. Contenido de proteínas solubles en nódulos

Las proteínas solubles en nódulos se determinan por el método de Bradford (1976) que se basa en la medida espectrofotométrica a 595 nm de coloración desarrollada por unión del azul de Coomassie a las proteínas. Para ello se agregan 5 ml del reactivo de Bradford a 0.05 ml de extracto enzimático (procedente de la cuantificación de enzimas); luego de agitar se mide la absorbancia entre los 2 y los 60 minutos luego de iniciada la reacción. Se utiliza un blanco con tampón de extracción y la concentración de proteína se calcula a partir de una curva de calibración preparada con seroalbúmina bovina

4.7.2. Actividades enzimáticas en nódulos

Para determinar las actividades enzimáticas se utilizarán las técnicas desarrolladas en la Tesis de Maestría de Gonnet (1994). Esta técnica utiliza un mismo extracto enzimático para determinar las actividades de GS y GOGAT, empleando el buffer de extracción que se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Buffer de extracción. (Fuente: Gonnet, 1994)

Componente	Sol. madre	Concentración final	V en 30 ml
Buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7.5)	0.5 M	50mM	hasta enrase
EDTA	0.5 M	5 mM	0.3 ml
KCl	1 M	100 mM	3 ml
Sacarosa	(sólido)	14.6 mM (5%)	1.5 g
β-mercaptoetanol	(sólido)	0.2%	0.06 g

El β-mercaptoetanol se agrega el mismo día de ensayo.

En mortero y pilón fríos se macera la mezcla nódulos/buffer de extracción/polivinilpirrolidona (PVP) en relación 0.5g/5ml/0.25g. El homogenado se filtra

a través de gasas frías, embebidas en tampón, y el filtrado se centrifuga a máxima revolución a 4ºC. En el sobrenadante, con proteínas solubles del interior del nódulo, se realiza primero la determinación de actividad GOGAT, debido a la gran inestabilidad de la misma; las actividades de ambas enzimas son medidas siempre dentro de las 3 horas siguientes a la extracción.

4.7.2.1. Medida de la actividad GOGAT

La actividad GOGAT se mide siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm por oxidación del NADH, propuesta por Gonnet (1994). La disminución de la concentración de NADH se debe a que la enzima lo utiliza como sustrato en la transaminación reductiva que cataliza, al transferir un grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, como lo indica la siguiente reacción:

$$\beta\text{-NADH} + \text{Glutamina} + \text{2-oxoglutarato} \longrightarrow 2\ \text{Glutamato} + NAD^{+}$$

Para llevar a cabo la determinación se preparan soluciones de los reactivos en buffer de extracción y se mantienen a temperatura de 30ºC en baño termostatizado, salvo el NADH que se mantiene a temperatura de refrigeración. Una vez listas, las soluciones se agregan a la cubeta de medida en el orden que indica la tabla 5, la reacción se inicia con el agregado de glutamina.

Tabla 5. Mezcla de reacción. (Fuente: Gonnet, 1994)

Reactivos	**Sol. madre**	**Concentración final**	**Volumen (µl)**
Buffer de extracción			200
2-cetoglutarato	0.01854g/10ml	12.5 mM	200
Aminooxoacetato	0.01093g/10ml	5 mM	200
β-NADH	6mg/2ml	15 mM	20
Extracto enzimático			200
Glutamina	0.03654g/10ml	25 mM	200

Una vez homogeneizada la mezcla, se coloca la cubeta en el espectrofotómetro y se mide la absorbancia a 340 nm en el modo cinético (disminución de absorbancia a 30 ºC cada 60 seg durante 8 min).

Antes de realizar la medida de la muestra se preparan y miden dos blancos, uno sin α-cetoglutarato y otro sin glutamina, para corrección de la posible oxidación endógena del NADH. Además se corrobora que la solución de NADH presente una absorbancia

comprendida entre 0.2-0.8, para ello se mezclan 1ml de agua destilada y 20µl de solución de NADH.

La actividad se calcula empleando la siguiente expresión:

Actividad GOGAT específica = (ΔAbs/min - ΔAbs blanco/min) V / ε 10^{-6} d v (V/ng proteína)

Unidades: µmol NADH ox min^{-1} ng proteína^{-1}. ΔAbs/min: variación media de la absorbancia por minuto, min^{-1}; V: volumen de buffer empleado para realizar el extracto, ml; v: volumen de extracto usado en la medida, ml; ε: coeficiente de extinción molar del NADH, 6.22 10^{-6} cm^2 mol^{-1}; d: ancho de la cubeta, cm; ng proteína: proteínas solubles en el extracto, ng/ml.

4.7.2.2. Medida de la actividad GS

La actividad enzimática se mide por el ensayo semibiosintético también llamado sintetasa. En la reacción enzimática se produce γ-glutamilhidroxamato, este al entrar en contacto con una solución ácida de hierro desarrolla una coloración rojo-marrón que permite realizar medidas espectrofotométricas a 540 nm.

La reacción enzimática es la siguiente:

$$\text{ATP + L-glutamato + hidroxilamina} \longrightarrow \gamma\text{-glutamil hidroxamato + ADP + } P_i$$

En las tablas 6 y 7 se indican la mezcla de reacción y la solución de corte empleadas para la determinación colorimétrica.

Tabla 6: Mezcla de reacción

Reactivo	Concentración final	Sol. final
Tris-HCl (pH: 7.8)	100 mM	10 ml
hidroxilamina	5 mM	0.00347 g
L-glutamato	50 mM	0.07856 g
$MgSO_4$	50 mM	0.50000 g
ATP	20 mM	0.11022 g

Tabla 7: Solución de corte

Reactivo	Concentración	Volumen (ml)
$FeCl_3$	10 % (HCl 2 N)	33
Ácido tricloroacético	24 %	33
HCl	50 %	33

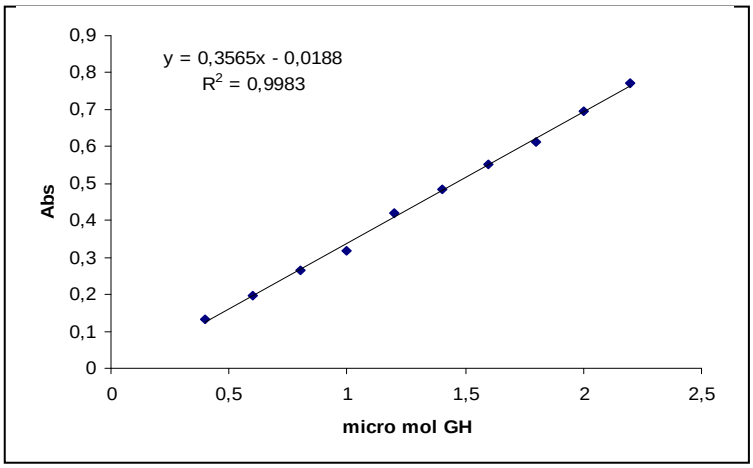
Para realizar la determinación, a 500 µl de mezcla de reacción (tabla 6) se le adiciona 200 µl de extracto enzimático y se incuba a 30 ºC durante 60 minutos. La reacción se detiene al añadir 700 µl de solución de corte (tabla 7). La mezcla se centrifuga a máxima velocidad durante 5-10 min y se mide absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro.

Para determinar la actividad GS se construye una curva de calibrado (figura 10) con patrón de γ-glutamilhidroxamato preparado en solución de extracción a concentración de 10 mM (8.1 mg/ 5 mL de buffer de extracción). Para realizar la curva se preparan diez patrones (tabla 8) utilizando 500 µl de mezcla de reacción sin ATP ya que previamente se determinó por barrido espectral que la absorbancia de mezclas de reacción con y sin ATP es la misma. A este volumen se le adiciona 200 µl que se obtienen por mezcla de cantidades crecientes de patrón más solución de extracción. Luego de la incubación se le adiciona 700 µl de solución de corte y se lee la absorbancia a 540 nm utilizando como blanco una mezcla en las mismas proporciones de solución de reacción, solución extracción y corte.

Tabla 8. Patrones GS

micro mol GH	Abs
0,40	0,133
0,60	0,195
0,80	0,264
1,00	0,318
1,20	0,419
1,40	0,484
1,60	0,553
1,80	0,614
2,00	0,694
2,20	0,772

Figura 10. Curva de calibración GS



La actividad total GS se expresa empleando las siguientes expresiones:

Actividad GS específica = Δμmol γ-GH V / t 0.2 ml extracto ng proteína

Unidades: μmol de γ-GH min^{-1} ng $proteína^{-1}$. Δμmol γ-GH: variación en micromoles de γ-glutamilhidroxamato; t: tiempo de incubación, min; 0.2 ml extracto: volumen empleado en el desarrollo de la reacción; V: volumen de buffer empleado para realizar el extracto; ng proteína: proteínas solubles en el extracto, ng/ml.

4.8.Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se emplea el software SAS (1999). Los resultados son comparados por análisis de varianza (ANOVA). Además se realizó un test Duncan para evaluar diferencia de medias entre dos tratamientos.

5. Resultados y discusión

5.1. Microorganismos

5.1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno

Se logró purificar las cepas: E109, Semia 938, Semia 587 y Semia 5019. Luego se procedió a su conservación en heladera en tubos pico de flauta. Debido a que E109, es la cepa patrón recomendada para soja a nivel nacional, se optó por ella para la inoculación en el ensayo a realizar. Para ello se sembraron dos inóculos de *B. japonicum* E109, denominados 1 y 2, luego del período de incubación estos presentaron valores de pH de 7.52 y 6.70 respectivamente. Ambos inóculos se observaron al microscopio como cultivos puros, con bacterias en movimiento y típica forma de bastón, con la diferencia de que el inóculo 1 presentó un mayor crecimiento, a esto último podría atribuirse el mayor aumento del pH de éste, esta diferencia podría explicarse por un arrastre de mayor masa microbiana con el ansa al momento de la siembra. Para realizar la inoculación de las plantas se mezclaron previamente ambos inóculos obteniéndose un pH final de 7.05. La aplicación de la técnica del NMP, arrojó un número de microorganismos viables, al momento de la inoculación, de 2.35×10^{10} UFC ml^{-1}. Se inoculó cada plántula con 1 ml de cultivo.

5.1.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo

Tanto el inóculo de SP21 como el de SP8W se observaron como cultivos puros, con bacterias en movimiento, con la diferencia de que el inóculo de SP8W presentó microorganismos de menor tamaño. La disminución del pH del medio para SP21 y SP8W, alcanzó valores de 3.88 y 3.79 respectivamente, luego de 24 horas de incubación. Si bien ambas cepas presentan similares cualidades de solubilización de fósforo, debido a que el empleo de la cepa SP21 en ensayos previos de coinoculación con E109 arrojó un incremento en los rendimientos (Rosas *et al*, 2006), se optó por esta para inocular los tratamientos del ensayo que así lo requieran.

5.2. Análisis físico químico de suelo

En la tabla 9 se detallan los resultados del análisis físico químico del suelo empleado como soporte en el ensayo

Tabla 9. Análisis físico químico de suelo

Determinación	Resultado
Humedad a capacidad de campo	23.1 %
Punto de marchitez permanente	4.49 %
pH actual	6.90
Materia orgánica	1.11 %
Fósforo disponible	7.44 ppm
Calcio	7.50 meq/100 g suelo
Magnesio	1.50 meq/100 g suelo

El suelo empleado para el ensayo se caracterizó por presentar niveles muy bajos de fósforo disponible, inferiores al nivel crítico de 10 ppm, es por ello que hay probabilidad de obtener respuesta a la fertilización fosforada, ya sea química o biológica. El suelo tiene bajo contenido de nitrógeno total (Comunicación personal), ello puede deducirse considerando la baja proporción de materia orgánica. Además, esta última puede relacionarse indirectamente con el contenido de nitrato proveniente de mineralización, indicando deficiencia del mismo en dicho suelo.

5.3. Ensayo en cámara climatizada

No se observó desarrollo nodular en un período de 30 días, en las raíces de plantas inoculadas con solución de suelo (figura 11). Por lo tanto se procede a su empleo para el desarrollo del ensayo en invernáculo.

Figura 11. Ensayo en cámara climatizada.

3.2. Experiencia realizadas

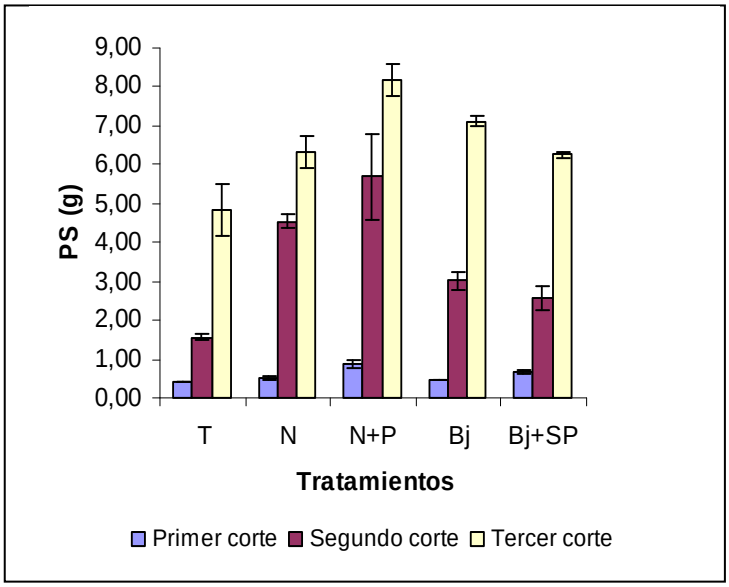
3.2.1. Evaluación del crecimiento

En la tabla 10 pueden observarse los resultados de peso seco de parte aérea para cada tratamiento, en cada una de las etapas de desarrollo analizadas (letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos). En la figura 12 se muestra un gráfico de barras con la distribución de dichos resultados.

Tabla 10. Peso seco de parte aérea

Nº corte	Tratamiento	Peso seco de parte aérea
1	T	0.42 ± 0.01 **c**
	N	0.50 ± 0.09 **c**
	N + P	0.86 ± 0.14 **a**
	B.j	0.48 ± 0.01 **c**
	B.j + SP	0.67 ± 0.15 **b**
2	T	1.55 ± 0.10 **d**
	N	4.53 ± 0.24 **b**
	N + P	5.69 ± 1.10 **a**
	B.j	3.08 ± 0.30 **c**
	B.j + SP	3.10 ± 0.33 **c**
3	T	4.85 ± 0.67 **d**
	N	6.32 ± 0.56 **c**
	N + P	8.17 ± 0.40 **a**
	B.j	5.99 ± 0.19 **c**
	B.j + SP	7.11 ± 0.49 **b**

Figura 12. Distribución de PS por tratamiento y por corte



El análisis estadístico ANOVA arrojó diferencias significativas en el peso seco entre los tratamientos de cada cosecha. Luego se procedió a realizar un test Duncan para diferencia de medias entre dos tratamientos. En el primer corte se observaron diferencias significativas entre los tratamientos coinoculado y testigo fertilizado con nitrógeno y fósforo, siendo este último el que arrojó mejores resultados. Los tratamientos testigo sin inocular, testigo fertilizado con nitrógeno e inoculado con *B. japonicum* no presentaron diferencias significativas entre si, y fueron menores a los primeros. Si bien los valores obtenidos son inferiores a los citados por Rosas *et al.* (2006), debería considerarse que dicho ensayo se realizó empleando como soporte perlita-arena estéril, y por lo tanto sin competitividad con microorganismos externos a los evaluados. En el segundo corte se observó una diferencia significativa de los tratamientos fertilizados químicamente respecto de los inoculados, estos últimos fueron superiores al testigo. Finalmente en el tercer corte se obtuvo una acumulación de materia seca similar en los tratamientos testigo fertilizado con nitrógeno e inoculado con *B. japonicum*, que difieren significativamente del testigo sin inocular; el testigo fertilizado con nitrógeno y fósforo siguió arrojando resultados elevados, superiores al tratamiento coinoculado.

En las siguientes fotografías se indica el estado de desarrollo de las plantas en cada cosecha.

Figura 13. Primer corte. Tratamientos B.j+SP; B.j; N+P; N y T respectivamente.

Figura 14. Segundo corte. Tratamientos B.j+SP; B.j; N+P; N y T respectivamente.

Figura 15. Tercer corte. Tratamientos B.j+SP; B.j; N+P; N y T respectivamente.

3.2.2. Determinaciones analíticas

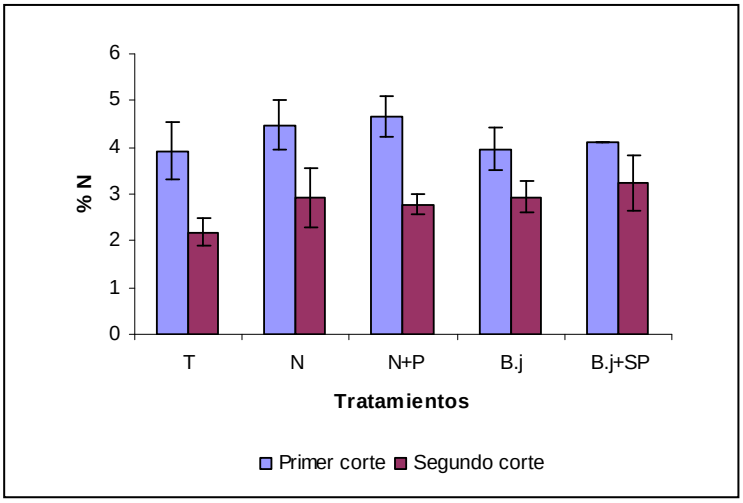
3.2.2.1.Porcentaje de Nitrógeno total y Nitrógeno proteico

En la tabla 11 se indican los porcentajes de nitrógeno total en parte aérea para cada cosecha, y el porcentaje de nitrógeno proteico en semillas para el tercer corte.

Tabla 11. Porcentaje de nitrógeno y nitrógeno total

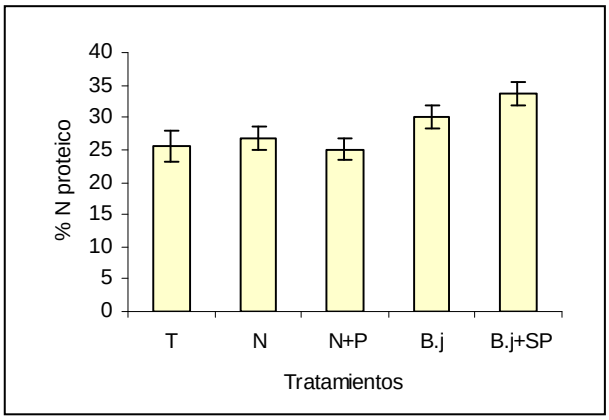
Nº corte	Tratamiento	% N	% N proteico (factor 5.71)	N total
1	T	3.91 ± 0.25 **a**		0.02
	N	4.48 ± 0.53 **a**		0.02
	N + P	4.66 ± 0.44 **a**		0.04
	B.j	3.96 ± 0.46 **a**		0.02
	B.j + SP	4.11 ± 0.01 **a**		0.03
2	T	2.19 ± 0.31 **b**		0.03
	N	2.92 ± 0.62 **ab**		0.13
	N + P	2.78 ± 0.22 **ab**		0.16
	B.j	2.93 ± 0.33 **ab**		0.09
	B.j + SP	3.23 ± 0.59 **a**		0.10
3	T	4.49 ± 0.41 **ab**	25.64 ± 2.46	0.22
	N	4.68 ± 0.38 **ab**	26.72 ± 1.81	0.30
	N + P	4.38 ± 0.16 **b**	25.01 ± 1.64	0.36
	B.j	5.26 ± 0.34 **ab**	30.03 ± 1.79	0.32
	B.j + SP	5.91 ± 0.17 **a**	33.75 ± 1.77	0.42

Figura 16. Distribución de % N por tratamiento, cosechas 1 y 2



No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a los 44 y 74 días después de la siembra. Los bajos %N registrados en el segundo corte, inferiores al primero, estarían asociados a las altas tasas de traslocación de nitrógeno en el estadío R5, en el cual las semillas inician un período rápido de acumulación de materia seca y nutrientes.

Figura 17. Distribución de % N proteico en semillas



En el tercer corte, solo se observó diferencia significativa en el %N proteico entre los tratamientos coinoculado y fertilizado con nitrógeno y fósforo. Sin embargo considerando los resultados de nitrógeno total puede indicarse que no existieron diferencias entre los tratamientos inoculados y sus respectivos testigos positivos. El aporte de nitrógeno y fósforo, ya sea mediante fertilización química o biológica, arrojó los mejores resultados.

3.2.2.2.Contenido de proteínas solubles en nódulos

En la tabla 12 se indican los resultados de absorbancia de los patrones de concentración conocida, empleados para construir la curva de calibrado (figura 18). En la tabla 13 se muestran los resultados de contenido de proteínas en extracto de nódulos, que se requieren para el cálculo de actividades específicas de GS y GOGAT.

Tabla 12. Patrones

µg proteína	**Abs**
150	0,171
300	0,293
450	0,377
600	0,501
900	0,677
1200	0,795
1500	0,910

Figura 18. Curva de calibración para determinación de proteínas

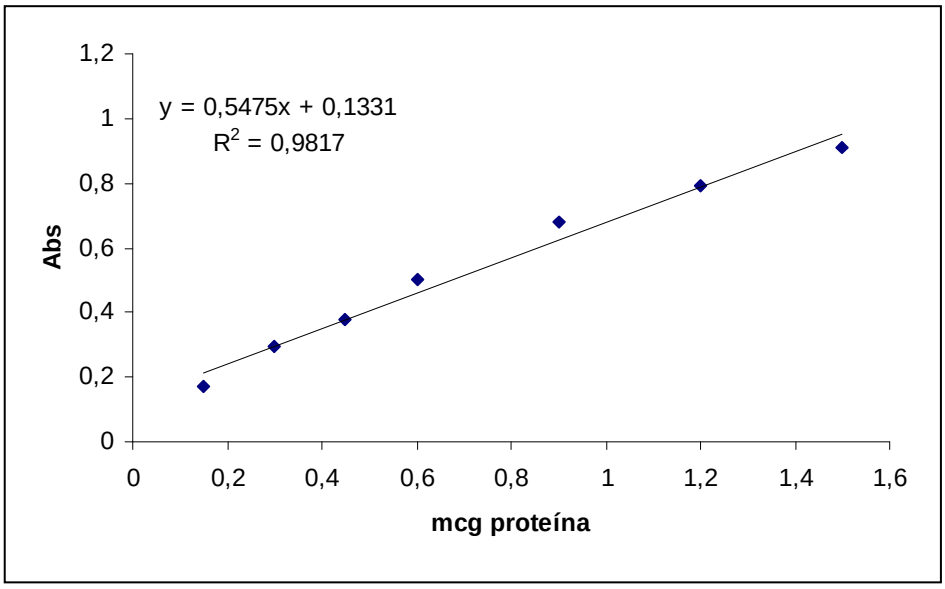


Tabla 13. Contenido de proteínas en extracto de nódulos

Cosecha	Muestra	Abs	µg proteína
1ra	B.j	0,421	575,8
	B.j + SP	0,430	593,8
2da	B.j	0,457	647.8
	B.j + SP	0.481	695.8
3ra	B.j	0.411	555.8
	B.j + SP	0.338	409.8

3.2.3. Actividades enzimáticas en nódulos

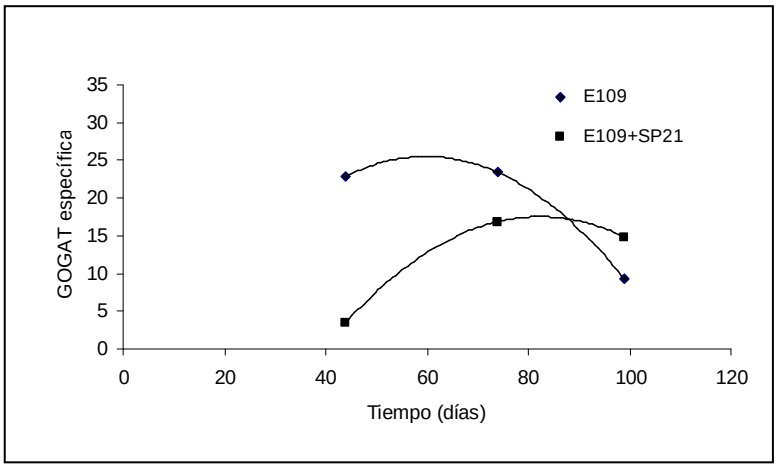
3.2.3.1.GOGAT

La tabla 14 indica los resultados de la actividad GOGAT específica, en cada tratamiento, la cual esta representada más abajo para cada etapa de desarrollo (figura 19).

Tabla 14. Actividad GOGAT

Nº corte	Tratamiento	GOGAT(nmol/minmgproteína)
1	E109	22.896
	E109 + SP21	3.520
2	E109	23.378
	E109 + SP21	16.893
3	E109	9.287
	E109 + SP21	14.855

Figura 19. Actividad GOGAT específica vs. tiempo



La actividad NADH-GOGAT en los nódulos de plantas coinoculadas fue menor que en los nódulos de plantas con inoculación simple en el primer corte. Esta diferenciación tan abrupta no es un resultado asociado directamente a la diferencia entre los tratamientos, sino que más bien se relacionó con una escasa recolección de nódulos para el tratamiento coinoculado en dicho período, lo que conllevó al empleo de una menor proporción de estos para la cuantificación, en comparación con los requeridos por la metodología enzimática. En el segundo corte se observó nuevamente el comportamiento mencionado. Finalmente en el tercer corte se vio que la actividad GOGAT en el tratamiento coinoculado superó al inoculado con *B. japonicum.*

En bibliografía se menciona que la actividad NADH-GOGAT en nódulos de alfalfa con supresión de fósforo inorgánico, fue significativamente menor que el tratamiento control en todos los estadíos de desarrollo (Gomez *et al*, 2001). Asimilando este comportamiento para nódulos de soja deberíamos esperar que la actividad en el tratamiento coinoculado fuese superior en todos los estadíos de desarrollo, lo cual no se observó en el ensayo.

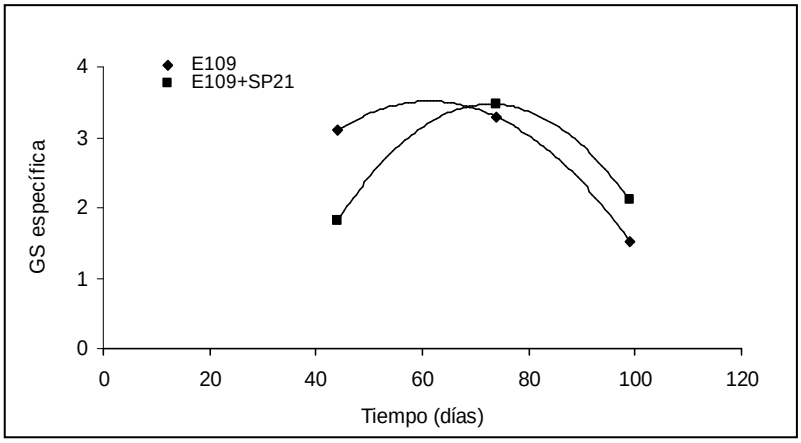
3.2.3.2.GS

En la tabla 16 se muestran los resultados de la actividad GS específica para cada tratamiento y en cada cosecha, los cuales se encuentran representados en la figura 20.

Tabla 16. Actividad GS

Nº corte	Tratamiento	GS esp. (nmol γ-GH / min mg π) *0.05
1	E109	3.095
	E109 + SP21	1.821
2	E109	3.290
	E109 + SP21	3.470
3	E109	1.525
	E109 + SP21	2.110

Figura 20. Actividad GS específica vs. tiempo



Se observó que la actividad GS específica en el tratamiento coinoculado fue menor al tratamiento con inoculación simple en el primer corte, lo cual como se mencionó anteriormente, puede atribuirse a una escasa recolección de nódulos en dicha etapa. En el segundo corte, asociado al período de mayor actividad enzimática (R5), pudo observarse que la actividad GS fue similar en ambos tratamientos. En el estadío R7 se observó una disminución de la actividad GS específica, lo que se asoció a una caída abrupta de la fijación de nitrógeno como consecuencia de la senescencia nodular.

Es interesante observar que los resultados de actividad GS obtenidos durante estadíos tempranos son aproximadamente un tercio de los señalados por Reynolds *et al* (1982), lo que lleva a suponer que existe algún factor limitante no considerado en el ensayo.

5.5.Consideración del potasio como factor limitante adicional

Ante la reducida actividad registrada para las enzimas GS y GOGAT, se procedió a evaluar posibles limitantes adicionales para el desarrollo óptimo del cultivo de soja. Con

dicho fin, se llevó a cabo la cuantificación de potasio en el suelo remanente de las macetas, teniendo en cuenta que este nutriente es el segundo en orden de importancia (después del nitrógeno) para el desarrollo de las plantas (Theodorou and Plaxton, 1993). Se obtuvo un valor de 0.2 meq potasio/100g suelo, es decir 78 ppm de potasio.

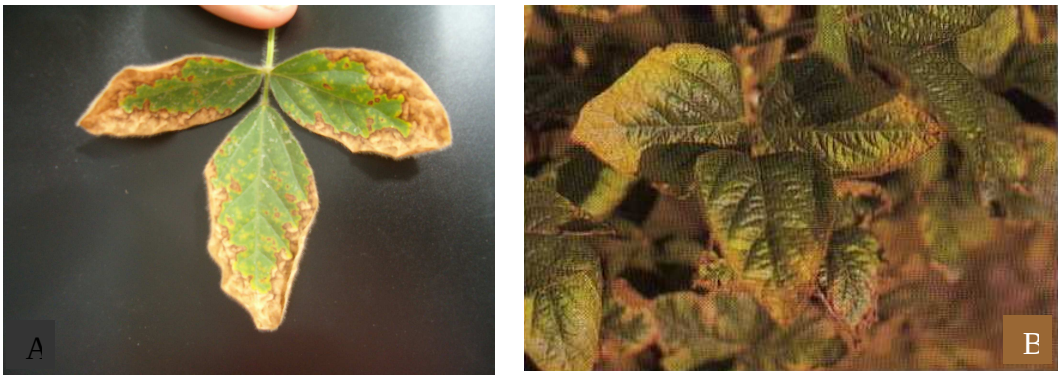
Los suelos de la región pampeana se consideran bien provistos de potasio (Rivero *et al*, 2006). Los lotes con mayor frecuencia de soja en la rotación serán los que demuestren mayor disminución de potasio disponible, por el alto requerimiento e índice de cosecha del mismo. En la región sojera de EE.UU., se indican niveles críticos de potasio extractable de 100 a 150 ppm (0.25-0.40 meq/100g) según la capacidad de intercambio catiónico del suelo (Vitosh *et al*, 1996); mientras que en el sur de Brasil, los niveles críticos indicados son de 80 a 120 ppm (0.2-0.3 meq/100g) (Comissao de Fertilidade do Solo RS/SC, 1994). Por su parte, en la región sojera argentina se propone un valor de 130 ppm como nivel crítico. Observando los resultados del análisis para dicho elemento, se evidenció que el suelo empleado para el ensayo no solo presentaba deficiencia de nitrógeno y fósforo, sino también de potasio.

Aunque el potasio no es constituyente de ninguna estructura o compuesto, esta involucrado en la mayoría de los procesos necesarios para el desarrollo de las plantas. En el interior de las células participa en la activación enzimática, fotosíntesis, transporte de azúcares, síntesis de proteínas y carbohidratos. Se sabe que ayuda a un mejor desarrollo ante condiciones de estrés por agua, a través de la regulación de la tasa de apertura y cierre estomáticos. Se conoce también su rol en la resistencia a enfermedades en las plantas. Además esta involucrado en muchas vías metabólicas que afectan la calidad de los granos, por lo que es frecuentemente llamado “el elemento calidad” (Tiwari *et al*, 2002).

Los síntomas de deficiencia de potasio en soja están bien definidos. Las plantas tienden a tener tallos débiles y son más susceptibles a algunas enfermedades. En estados tempranos de crecimiento, un moteado irregular amarillento aparece en los márgenes de las hojas. Las áreas amarillas se unen para formar un borde irregular, más o menos continuo. Este síntoma es frecuentemente seguido por necrosis de las áreas cloróticas y curvatura de los márgenes de las hojas. Ello puede implicar la caída de más de la mitad de las hojas (Sinclair and Backman, 1989). Estos síntomas se manifestaron en las plantas del ensayo lo cual puede observarse en las figuras 23 y 24.

Figura 23. Necrosis de las áreas cloróticas en hojas de las plantas del ensayo (A) y hojas que demuestran deficiencia de K (Fuente: Sinclair and Backman, 1989) (B)

Figura 24. Hoja trifoliada del ensayo (A) y hoja trifoliada que indica deficiencia de K (Fuente: Sinclair and Backman, 1989) (B)



La deficiencia de potasio en leguminosas puede alterar los procesos de fijación de nitrógeno (Abolhassan, 2006). Se ha publicado que dicho elemento puede mejorar el peso nodular y la actividad nitrogenasa específica de *Trifolium vesiculosum* (Lynd *et al*, 1984; citado por Abolhassan, 2006). La mejora de la nutrición potásica incrementa el número de nódulos y la actividad nitrogenasa, medida como reducción de acetileno, en alfalfa (Collins *et al*, 1986; citado por Abolhassan, 2006), también mejora el número de nódulos por planta en soja (Tiwari *et al*, 2002). Aunque ha sido bien reportado que hay una diferencia genotípica en la capacidad y eficiencia de las plantas de absorber, transportar y utilizar nutrientes minerales (Yin and Vyn, 2003), la respuesta de las plantas de soja a la deficiencia de potasio podría asimilarse a la mencionada en literatura para otros cultivos. En función de ello, y tal como se obtuvo en el trabajo realizado, es de esperar una disminución abrupta en la actividad de las enzimas GS y GOGAT, debido a su estrecha relación con la actividad nitrogenasa.

6. Conclusiones

El testigo fertilizado con nitrógeno y fósforo arrojó los resultados más favorables, en cuanto a peso seco de parte aérea, en estados tempranos de desarrollo, no ocurrió así con el % de nitrógeno en parte aérea, el cual no se diferenció de los demás tratamientos. Al final del ciclo del cultivo, el peso seco en los tratamientos inoculados fue comparable al testigo fertilizado con nitrógeno, todos ellos inferiores al testigo fertilizado con nitrógeno y fósforo. Sin embargo considerando los resultados de nitrógeno total, no existieron diferencias entre los tratamientos inoculados y sus respectivos testigos positivos, resultando más favorable el aporte de nitrógeno y fósforo, ya sea mediante fertilización química o biológica.

Las curvas de actividad GS y GOGAT en nódulos siguieron el patrón de actividad nitrogenasa en los distintos estadíos de desarrollo, aunque los valores obtenidos fueron inferiores a los que se indican en bibliografía, y por otro lado no se observaron diferencias entre tratamientos.

A partir de la baja actividad de las enzimas GS y GOGAT, se procedió a evaluar la concentración de potasio en el suelo, como posible factor adicional, limitante para el desarrollo, obteniéndose concentraciones críticas del mismo. Debido al rol importante del potasio en la FBN, deberá considerarse su posible deficiencia al evaluar sintomatologías del cultivo, en regiones que han sido de reciente incorporación al área agrícola argentina.

Para poder determinar la influencia de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivos de soja inoculados con *B. japonicum*, en distintos estadíos de crecimiento de la planta, por medio de la cuantificación de la actividad enzimática del ciclo GS-GOGAT debería repetirse el ensayo, asegurando que el único factor limitante en el suelo, para el desarrollo del cultivo, es el fósforo.

7. Referencias bibliográficas

Abolhassan F. (2006). “Effects of different rates of potassium on nitrogen fixation and agronomic traits of three *Medicago sative* varieties”. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9(15):2881-2886.

Al-Niemi T.S, Kahn M.L, and McDermott T.R. (1997). “Metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* simbiosis”. Plant Physiology. 113:1233-1242.

Albrecht S.L., Maier R.J., Hanns F.J., Russell S.A., Emericyh D.W. and Evans H.J. (1979). “Hidrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans”. Science 203:1255-1257.

Anderson, M.P., Vance, C.P., Heichel, G.H. and Miller, SS. (1989). “Purification and characterization of NADH- glutamate synthase from alfalfa root nodules”. Plant Physiology. 90:351-358.

Asea P., Kucey R. and Stewart J. (1988). “Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture”. Soil Biology and Biochemistry. 20: 459-464.

Azcon R., Barea J. and Hayman D. (1976). “Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plant inoculated whit micorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria”. Soil Biology and Biochemistry. 8: 135-138.

Azcón-Bieto J. and Talón M. (2000). “Fundamentos de fisiología vegetal”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp: 253, 254-255.

Balatti A.P. (1992). Producción de inoculantes para leguminosas: tecnologías de la fermentación aplicada a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Ediciones Trabuco ed. Buenos Aires.

Belimov A., Kojemiakov A. and Chuvarliyeva C. (1995). “Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria”. Plant and Soil. 173: 29-37.

Bradford M.M. (1976). “A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quintities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding”. Anal Biochem. 72:248-254.

Bray R.H. and Kurtz L.T. (1945). “Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils”. Soil Sci. 59:39-45.

Bremmer J.M. (1960). “Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method”. J. Agr. Sci. 55:1-23.

Buschiazzo D., Hevia G., Urioste A. and Hepper E. (1994). “Phosphate forms and sorption in virgin and cultivated soils of the semiarid Argentinean Pampas”. In: XV International Congress of Soil Science. pp: 97-98.

Collins M., Lang D.S. and Kelling K.A. (1986). “Effects of phosphorus, potassium and sulfur on alfalfa nitrogen fixation under field conditions”. Agron. J. 78:959-963.

Comissao de Fertilidade do Solo RS/SC. (1994). Recomendacao de adubacao e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Nucleo Regional Sul, Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo. Santa María, RS, Brasil.

El-Komy H. (2005). “Coinmobilization of *A. lipoferum* and *B. megaterium* for plant nitrition”. Food Technology and Biotechnology. 43 (1): 19-27.

Fehr W.R. and Caviness C.E. (1977). “Stages of soybean development”. Lowa St. Univ. Special Report 80. 11 pp.

Frioni L. (1999). Procesos microbiológicos. Tomo 2. Editorial de la fundación Univesidad Nacional de Rio Cuarto. pp: 50-51.

Gomez F., Pereira G., Borges A., Mosquim P. e Fontes P. (2001). “Metabolismo do nitrógeno em alfalfa nodulada sob supressão e ressuprimento de fósforo”. Departamento de biología vegetal, Universidad Federal de Viscosa, Brasil. 13(3):342-356.

Gonnet S. (1994). Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

Herridge D. and Rose I. 2000. “Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes”. Field Crop Res. 65:229-248.

Jordan D.C. (1984). “Family 3 *Rizhobiaceae*”. In: Bergey Manual in Systematic Bacteriology. Ed. By N.R.Krieg and J.G.Holt. Williams and Wilkins. Baltimore. Vol. Nº1:234-256.

Kloepper, J.W, and Schroth. M.N. (1978). “Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes”. In: Proceedings of de Fourth International Conference on plant pathogenic bacteria. Vol 2. Station of pathologie vegetale et phytobacteriologie INRA, Angers (ed.) Gilbert-Clarey, Jours. pp. 879-882.

Kloepper J.W., Zablotowicz R.M., Tipping E. M. and Lifshitz R. (1991). “Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers”. In: the Rhizosphere and Plant Growth. Keister D.L. and Cregan P.B. (eds.) Kluwer Academic Publ. Dordrecht. pp. 315-326.

Kumar V. and Singh K. (2001). “Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria”. Bioresource Technology. 76: 173-175.

Lea Peter J. and Miflin B. (2003). “Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants”. Plant physiology and biochemistry. 41:555-564.

Lett L., Draghi W., Perticari A. y Pacheco Basurco J. (1998). “Tolerancia de la simbiosis *B. japonicum-Glycine max* (L) Merr bajo diferentes condiciones de fertilización nitrogenada en la zona centro de la provincia de Buenos Aires (Rep. Argentina)”. Memorias de la XIX Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Maturin Monagas, Venezuela. pp. 98-100.

Lodeiro A., López Garcia S., Mongiardini E., Quelas J. y Perticari A. (2003). “Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno”. En: Microbiologia Agrícola, Un aporte de la investigación argentina, UNSE. pp.159-177.

López-Bucio, J., Martínez-de la Vega O., Guevara-García A., and Herrera-Estrella L. (2000). “Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate”. Nature Biotech. 18: 450- 453.

Mengel D.B., Segar W., and Rehm G.W. (1987). “Soil fertility and liming”. pp. 461-496. In: Soybeans: improvement, production and uses. J.R. Wilcox. Ed. Am. Soc. Of Agron. Madison. Wisconsin. EEUU.

Minchin F., Witty J. and Mytton L. (1994). “Measurement of nitrogenase activity of legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay”. Plant Soil. 158: 163-167.

O’Sullivan D. and O’Gara D. (1992). “Trails of fluorescent Pseudomonas spp. Involved in suppression of plant root pathogens”. Microbiological Review. 56: 662-676.

Panzieri M., Marchettini N. and Hallam T. (2000). “Importance of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation”. Ecologycal Modelling. 135: 301-310.

Reynolds P, Boland M, Glevins D, Schubert K and Randall D. (1982). “Enzymes of amides and ureide biogenesis in developing soybean nodules”. Plant Physiology. 69:1334-1338.

Ribet J. and Drevon J.J. (1995). “Phosphorus deficiency increases the acetylene-induced decline in nitrogenase activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)”. Journal Experimental of Botany. 46:1479-1486.

Rivero E., Pacheco Basurco J.C. y Brutti L. (1995). Efectos de S, B, Mo, Cu, Fe, Zn y Mn sobre la nodulación en *Glycine max* (L) Merrill en condiciones controladas.

Rivero E., Mortola N. y Irurtia C. (2006). “Macronutrientes en soja y su disponibilidad en el suelo”. En Resúmenes XX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. AACS. pp 314.

Rodríguez H. and Fraga R. (1999). “Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion”. Biotechnology Advances. 17: 319-339.

Romano N y Roberto Z. (2007). “Contenido de fósforo extractable, pH y materia orgánica en los suelos del este de la provincia de La Pampa”. Informaciones agronómicas del cono sur. 33:1-6.

Rosas S., Andrés J., Rovera M., Correa N. (2006). “Phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis”. Soil Biology and Biochemistry.

Salih H., Yonka A., Abdul-Rahem A., Munam B. (1989). “Availability of phosphorous in calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate dissolving fungi”. Plant and Soil. 120:181-185.

SAS INSTITUTE INC. (1999). SAS online doc. Statistics. Version 8 (TS M0).SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Schachtman, D., Reid R. J., and Ayling S. M. (1998). “Phosphorus uptake by plants: from soil to cell”. Plant Physiol. 116: 447-453.

Schrader L.E. and Briskin D.P. (1989). “Mineral nutrition of soybean”. In: Proceedings of the World Soybean Research Conference lV. Pascale A.J. Ed. Orientación gráfica editora S.R.L. Buenos Aires. Argentina. pp. 217-224.

Shyam M. And Gite L. (1990). “Energy analysis of soybean-wheat crop rotation under rainfed conditions of dentral India”. Energy. 15 (10): 907-912.

Silva D.M. (1998). “Crescimento, fotossintese e metabolismo do nitrogenio em plantas de soja noduladas sob omissao e ressuprimento de fósforo”. Vicos, MG, Universidade Federal de Vicosa. 117p. Tese de Doutorado.

Sinclair J.B. and Backman P.A. ed. Compendium of soybean diseases. Third edition. APS PRESS. St Paul. Minnesota. USA.

Siquiera J.O. and Franco A.A. (1988). Biotecnología do solo. Fundamentos y perspectivas. EMBRAPA.

Temple S. J., Vance S.P. and Gantt J.S. (1998). “Glutamate synthase and nitrogen assimilation”. Trends Plants Sci. 3: 51-56.

Theodorou M.E. and Plaxton W.C. (1993). “Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation”. Plant Physiol. 101:339-344.

Tiwari S.P., Joshi O.P., Vyas A.K. and Billore S.D. (2002). “Potassium nutrition in yield and quality improvement of soybean”. In: Potassium for sustainable crop production. Ed. Pasricha and Bansal. 307-320.

Unkovich M.J. and Pate J.S. (2000). “An appraisal of recent field measurements of symbiotic nitrogen fixation by annual legumes”. Field Crop Res. 65:211-228.

Urioste A., Bono A., Buschiazzo D., Hevia G. and Hepper E. (1996). “Fracciones de fósforo en suelos agrícolas y pastoriles de la región semiárida pampeana central (Argentina)”. Ciencia del suelo. 14: 92-95.

Urquiaga S., Jantalia C., Alves B. y Boddey R. (2004). “Importancia de la FBN en el secuestro de carbono en el suelo y en la sustentabilidad agrícola”. En: Biología del suelo. Ed. FAUBA.

Vance C.P. and Heichel G.H. (1991). “Carbon in N2 fixation: Limitation or exquisite adaptation”. Annu.Rev. Plant Physiology. 42: 373-392.

Villegas J. and Fortín J. (2002). “Phosphorus solubilization and pH changes as result of the interactions between soil bacteria and arbuscular micorrhizal fungi on a medium containing NO_3^- as nitrogen source”. Canadian journal of Botany. 80: 571-576.

Vitosh M., Johnson J. and Mengel D. (ed.). (1996). Tri-state fertilizer recommendations for corn, soybeans, wheat and alfalfa. Extension Bulletin E-2567. Michigan State University. EE.UU.

Walkley, A. and Black, I.A. (1934). “An examination of the Degjareff method for determinig soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titation method”. J. Amer. Soc. Agron. 24: 256-275.

Wang T, Martinez Romero J y Lopez Lara I. “Rhizobium y su destacada simbiosis con las plantas”. http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/capitulo.html

Yin X.H. and Vyn T.J. (2003). “Potassium placement effects on yield and seed composition of No-till soybean seeded en Alternate Row widths”. Agron. Journal. 95:126-132.