



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de
LICENCIADO EN QUIMICA

**“ESTUDIOS DE RIZOBACTERIAS
PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO (PGPR)
COMO ALTERNATIVA DE APLICACIÓN A
SUELOS CON LIMITANTES ABIÓTICAS”**

Autor: Romina Noel Echevarría

Director: Dra. Alicia Ester Grassano

Co- Director: Lic. Patricia García

Argentina

Santa Rosa (La Pampa)

2011

“Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química, durante el período comprendido entre Noviembre de 2010 y Noviembre de 2011, bajo la dirección de la Dra. Alicia Grassano y la co-dirección de la Lic. Patricia García.”

Romina Noel Echevarría

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de La Pampa

Agradecimientos

A todo el Departamento de Química por su excelente predisposición para facilitar recursos humanos y materiales para realizar el trabajo.

A la Dra. Alicia E. Grassano por su constante apoyo, estímulo, por su carisma, paciencia y por toda la ayuda brindada tanto académica como humana a lo largo de estos años.

A la Lic. Patricia García y a la Dra. Ana Lía Ronchi por su gran asesoramiento y predisposición en la realización de dicho trabajo, sobre todo en este último tiempo.

A investigadores del Dpto. de Microbiología y Biología Molecular de la UNRC y IIB-INTECH (Chascomús) por facilitarme material para llevar a cabo el proyecto de tesina.

A toda mi Familia por darme la posibilidad de realizar mis estudios, todo el apoyo, cariño y esfuerzo constante durante todos estos años.

A Carlos N. por su gran cariño, comprensión, ayuda y predisposición constante, en todo momento, durante todos estos años.

A Pedro y Daniela, por su gran amistad, colaboración, apoyo y cariño, durante todo el tiempo de la realización de este trabajo y sobre todo en este último tiempo.

A las chicas: Caro, Ely, Pao, Mary, Jime, Sofi, por brindarme su gran amistad, cariño y apoyo constante durante todos estos años; y a los chicos.

Resumen

El mal uso agrícola de los suelos, que desafortunadamente ocurre en distintas zonas cultivables, ha ido intensificándose a lo largo del tiempo.

En relación con los manejos sostenibles en agricultura, una de las estrategias más comunes para incrementar la producción agrícola en la Región Pampeana es mejorar la fertilidad de los suelos. Mantener alto nivel de nitrógeno y fósforo disponible continúa siendo el desafío más importante para ecologistas y productores agropecuarios, dentro del contexto de una agricultura sustentable.

En el marco de la necesidad del desarrollo del incremento de la producción agrícola junto con la preservación del ambiente, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) y el estudio de otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPBs), por ejemplo solubilizadores o movilizadores de fósforo, cobran más valor, ya que puede evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados y fosforados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio.

En este trabajo se enfatiza el estudio de la simbiosis *Mesorhizobium loti*- *Lotus glaber* y la acción promotora de crecimiento vegetal de bacterias en relación a condiciones limitantes de salinidad, como alternativa de aplicación a suelos de la región que han adquirido esa limitación por anegamientos temporarios.

Abstract

The poor agricultural soils, which unfortunately happens in various arable areas has been intensified over time.

In relation to sustainable management in agriculture, one of the most common strategies to increase agricultural production in the Pampas is to improve soil fertility. To maintain a high level of nitrogen and phosphorus availability remains the major challenge for ecologists and agricultural producers in the context of sustainable agriculture.

In the context of the need for development of increased agricultural production with environmental conservation, biological nitrogen fixation (BNF) and the study of other plant growth promoting microorganisms (PGPBs), for example phosphorus solubilizing and mobilizing, take on more value, because it can prevent the abusive use of nitrogen and phosphorus fertilizers thus saving on energy consumption and reducing environmental degradation.

This thesis emphasizes the study of symbiosis *Mesorhizobium loti-Lotus glaber* and plant growth- promoting action of bacteria in relation to limiting conditions of salinity, as an alternative application to soils of the region who have acquired such limitation temporary flooding.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal	2
1.1.1 Ecología de las PGPR	2
1.1.2 Modos de acción de los PGPBs	3
1.1.2.1 Mecanismos PGPB	4
1.1.2.1.1 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	4
1.1.2.1.2 Producción de Fitohormonas	7
1.1.2.1.3 Solubilización de fósforo	9
1.1.2.1.4 Producción de Exopolisacaridos	10
1.1.2.1.5 Hidrólisis de Almidón	10
1.1.2.2 Mecanismos Biocontrol-PGPB	12
1.1.2.2.1 Producción de Antibióticos	12
1.1.2.2.2 Producción de Sideróforos	12
1.1.2.2.3 Producción de Ácido Cianhídrico	14
1.2 Estrés Abiótico	14
1.2.1 Suelos Salinos y Sódicos	15
1.2.2 Efectos del estrés abiótico en la relación microorganismo-planta	16
1.3 Leguminosa: <i>Lotus glaber</i>	17
1.3.1 Morfofisiología	18
1.3.2 Adaptabilidad en suelos	19
1.3.3 Ciclo y Calidad del Forraje	19
2. Hipótesis y Objetivo.....	21
2.1 Hipótesis	21
2.2 Objetivo	21

3. Materiales y Métodos.....	22
3.1 Microorganismos con propiedades PGPBs	22
3.1.1 Aislamiento de rizobios nativos	22
3.1.2 Bacterias Fijadoras de Nitrógeno	23
3.1.3 Solubilizadora de Fósforo	23
3.2 Semillas	23
3.3 Mantenimiento de las bacterias aisladas	24
3.4 Caracterización de las bacterias aisladas	24
3.4.1 Observación microscópica	25
3.4.2 Caracterización morfológica	25
3.4.3 Tinción de Gram	25
3.4.4 Electroforesis de Isoenzimas: α y β esterasas (M.L.E.E)	25
3.5 Parámetros Cinéticos	28
3.5.1 Parámetros Evaluados de Crecimiento Celular	28
3.6 Ensayos de caracterización de propiedades PGPBs de las bacterias aisladas	29
3.6.1 Producción de Antibióticos	29
3.6.2 Producción de Exopolisacáridos	30
3.6.3 Hidrólisis se Almidón	30
3.6.4 Producción de Sideróforos	30
3.6.5 Producción de Ácido Cianhídrico	31
3.6.6 Cuantificación de Ácido 3-Indol-Acético (AIA)	32
3.7 Ensayo en Cámara Climatizada e Invernadero	32
3.7.1 Cámara Climatizada	32
3.7.2 Invernadero	34
3.7.3 Parámetros Evaluados para ambos Ensayos	34
3.7.3.1 Peso Seco	34
3.7.3.2 Contenido de N total por el Método de Kjeldhal	35
3.7.3.3 Índices de Eficiencia a la Inoculación	36

4. Resultados y Discusión	37
4.1 Aislamiento de rizobios nativos	37
4.2 Caracterización de las bacterias aisladas	37
4.2.1 Observación microscópica y caracterización morfológica	37
4.2.2 Tinción de Gram	38
4.2.3 Electroforesis de Isoenzimas: α y β esterasas (M.L.E.E)	38
4.3 Parámetros Cinéticos	40
4.3.1 Velocidad de Crecimiento y Tiempo de Generación Celular	40
4.4 Ensayos de caracterización de propiedades PGPBs de las bacterias aisladas	42
4.4.1 Producción de Antibióticos	42
4.4.2 Producción de Exopolisacáridos	43
4.4.3 Hidrólisis se Almidón	44
4.4.4 Producción de Sideróforos	45
4.4.5 Producción de Ácido Cianhídrico	45
4.4.6 Producción y cuantificación de Ácido 3-Indol-Acético (AIA)	45
4.5 Ensayo en Cámara Climatizada e Invernadero	47
4.5.1 Cámara Climatizada	47
4.5.1.1 Parámetros Evaluados	49
• Peso seco	49
• Contenido de N total	51
• Índices de Eficiencia a la Inoculación	52
4.5.2 Invernadero	53
4.5.2.1 Parámetros Evaluados	54
• Peso seco	54
• Contenido de N total	55
• Índices de Eficiencia a la Inoculación	57
5. Conclusiones	58
6. Bibliografía	61

Mejorar la fertilidad de los suelos es una de las estrategias más comunes para incrementar la producción agrícola en la Región Pampeana (Mäder *et al.* 2002; Von Lützow *et al.*, 2002). Mantener alto nivel de nitrógeno (N) y fósforo (P) disponible, es el desafío más importante para ecologistas y productores agropecuarios (Hatch D, *et al.*,2002; Leinweber *et al.*, 2002), dentro del contexto de una agricultura sustentable. Estos nutrientes, condicionan el crecimiento y rendimiento de los cultivos.

En el mundo, la agricultura depende en gran medida del uso de fertilizantes químicos y pesticidas para mantener sus altas producciones agrícolas, sin tener en cuenta los daños que pueden llegar a ocasionar, afectando los ciclos globales de estos nutrientes, contaminando las aguas subterráneas y superficiales, incrementando los riesgos de intoxicaciones químicas y aumentando los niveles de gases productores de efecto invernadero (Olivares Pascual. J. 2006). En la actualidad la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) y el estudio de otros microorganismos promotores del crecimiento de los cultivos, por ejemplo solubilizadores o movilizadores de fósforo (entre otros), cobran más valor, ya que pueden evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados y fosforados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio (Richardson *et al.*, 2005).

En el marco de la necesidad del desarrollo de sistema agrícolas sostenibles, es decir, dando especial importancia al incremento de la producción agrícola junto con la preservación del ambiente, la FBN y los microorganismos PGPR (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) son vistos como una fuente esencial y potencial de nutrientes para los cultivos, 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 (McInnes and Haq, 2007). 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).

1.1 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

En el suelo se encuentran comúnmente un gran número de microorganismos como bacterias, hongos, actinomicetes, protozoos y algas (Johansson *et al.*, 2004). Se utiliza el termino “rizósfera” para describir la parte del suelo en la que se induce la proliferación de microorganismos por la presencia del sistema radicular de las plantas (Gárate and Bonilla, 2000).

En la rizósfera hay expresión de relaciones simbióticas mutualistas entre microorganismos y plantas, debido a la exudados orgánicos útiles para el metabolismo microbiano ya que la raíz proporciona un nicho ecológico. Los microorganismos, a la vez, brindan numerosos beneficios, como pueden ser: influencia en el crecimiento radical, regulación de la actividad metabólica de la raíz e influencia en las propiedades físicas y químicas del suelo (González-Chávez, 2005).

Entre estos microorganismos benéficos para las plantas se encuentran las Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR). Las PGPRs favorecen el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos entre los que se destacan la FBN; la solubilización de fósforo, la síntesis de fitohormonas como las auxinas, particularmente el ácido indol acético; la producción de exopolisacáridos; la hidrólisis de almidón y la producción de sideróforos, promoviendo no solo el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales para una mayor absorción de agua y minerales del suelo, sino que un mayor desarrollo de la planta (Caballero-Mellado, 2006).

Se ha encontrado además que las PGPRs pueden suprimir enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos a través de la producción de sideróforos, síntesis de antibióticos, enzimas y/o compuestos fungicidas (Lugtenberg and Kamilova, 2009).

1.1.1 Ecología de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las plantas

Se encuentran dos tipos de bacterias del suelo que producen beneficios a plantas, aquellas que establecen una relación simbiótica y las que no, también denominadas de “vida libre”. Estas últimas a menudo se encuentran cerca, sobre las raíces o aún dentro de las mismas (endófitas) (Kloepper *et al.*, 1989; Frommel *et al.*, 1991). Las bacterias

simbióticas, especialmente los rizobios (*Rhizobium* spp), han sido estudiadas extensamente, con mayor atención a la asociación rizobio- leguminosa (Bohlool, 1990). Por otro lado, las bacterias no simbióticas del suelo que son benéficas para las plantas generalmente son conocidas como “rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal”, denominadas PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al*, 1989). Las PGPRs deben cumplir tres características intrínsecas: (i) ser capaces de colonizar la raíz y/o su zona de influencia; (ii) sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, al menos el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad promotora del crecimiento y (iii) estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994).

Bashan y Holguin (1998) propusieron un nuevo concepto para definir científicamente las PGPRs: por un lado las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal por Biocontrol (Biocontrol-PGPB), que incluye las bacterias que suprimen el desarrollo de patógenos, ya sea por producción de sustancias inhibitorias o por incremento de la resistencia natural de la planta, y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), aplicable a las bacterias que afectan a las plantas por medio de otros mecanismos diferentes al Biocontrol, tales como: solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, biofijación de N₂, etc. Con estos términos se incluyen todos los grupos bacterianos que son beneficiosas para las plantas. Bashan y Levanony (1990) defienden la actuación conjunta de diversos mecanismos (directos e indirectos), siendo los mecanismos individuales menos importantes que si operan de manera conjunta.

El numero de especies de bacterias identificadas como PGPB ha aumentado recientemente como consecuencia de los numerosos estudios que abarcan una gama más amplia de especies de plantas y debido a los avances en la taxonomía bacteriana y en el progreso en la comprensión de los diferentes mecanismos de acción de las PGPBs (Ochoa *et al*, 2010). Dentro de este grupo encontramos bacterias pertenecientes a un gran número de géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Kloepper *et al*, 1989).

1.1.2 Modos de acción de las PGPBs

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden actuar sobre la planta de dos maneras diferentes.

De manera directa (PGPB), las bacterias le proporcionan a la planta compuestos sintetizados por ellas mismas, y le producen así un beneficio a la planta. Estos compuestos pueden ser: nitrógeno (N), hormonas del crecimiento y ciertos nutrientes como hierro (Fe) o fósforo (P), provenientes de la naturaleza ó actividades antropogénicas.

Por el contrario, en el mecanismo Biocontrol-PGPB, las bacterias protegen a las plantas de microorganismos fitopatógenos. Estos métodos suponen una alternativa potencial porque es un método de control biológico y su utilización como herramienta biotecnológica parece una esperanzadora realidad que reducirá los impactos adversos de agroquímicos, y permitirá una gestión más razonable y sostenible del suelo (Antoun and Prévost, 2006).

1.1.2.1 Mecanismos PGPBs

Son aquellos en los que el metabolito producido por la bacteria es en sí capaz de estimular el crecimiento vegetal, y por lo tanto, ocurre independientemente del resto de la población microbiana edáfica (Kloepper *et al*, 1992), e incluso independientemente del soporte edáfico, es decir, no ejerce su efecto por modificación del sustrato.

1.1.2.1.1 Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es un constituyente mayoritario de los vegetales. Es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, encontrándose distribuido en tres principales reservorios: el atmosférico, donde se presenta alrededor del 78%; en el suelo, en donde se encuentra en cantidades variables y el nitrógeno contenido en la biomasa que varía entre el 8% y 10% (Azcón, J- Bieto, M.T; 2000).

El nitrógeno libre gaseoso tan solo constituye una fuente para un número restringido de especies vegetales simbióticas y microorganismos libres fijadores de nitrógeno atmosférico. Todos los demás vegetales, utilizan para su nutrición formas combinadas de nitrógeno, principalmente las sales amoniacales, los nitritos o los nitratos, y excepcionalmente el nitrógeno orgánico. Como el nitrógeno es un elemento raro en las rocas terrestres, los compuestos nitrogenados que constituyen la fuente principal del nitrógeno para las plantas, provienen en su mayoría del nitrógeno atmosférico fijado biológicamente (Mazliak, P; 1976). Se establece así un ciclo del

Nitrógeno entre la atmósfera y el suelo (la biósfera), ciclo en donde los microorganismos juegan un papel determinante (Fig. 1).

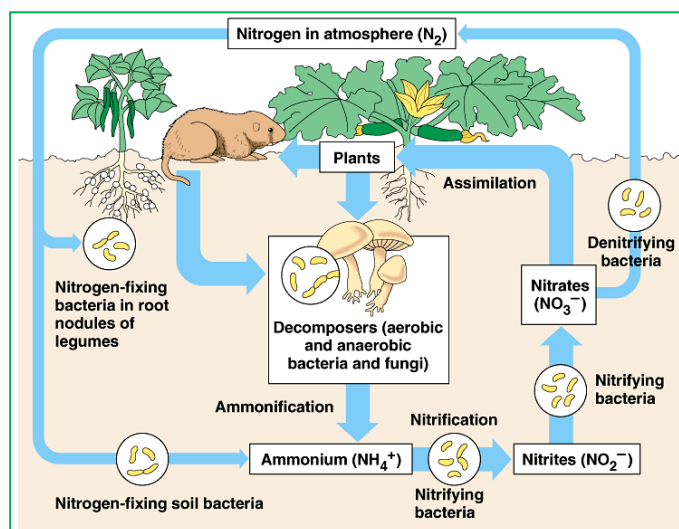
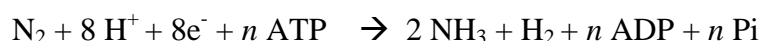


Figura 1: Ciclo del Nitrógeno. www2.epm.com.co/bibliotecaepm info.

Teniendo en cuenta la gran importancia de este elemento, la FBN (Fijación Biológica de Nitrógeno) presenta un gran interés que ha determinado que sea considerada objeto de intensa investigación desde que fue descubierta en 1888 (Olivares Pascual. J, 2006).

La fijación de nitrógeno consiste en la reacción biológica de reducción de N_2 en amoníaco:



Siendo Pi, fosfato inorgánico y $n \geq 16$, dependiendo de las condiciones del flujo de protones; si estas son limitantes se requiere un mayor consumo de ATP (Halbleib and Ludden, 2000). Esta reacción está catalizada por una enzima denominada nitrogenasa (Fig.2). La misma es, en realidad un complejo multienzimático que cataliza varias etapas de la reacción (Shaw and Brill, 1977), la cual es irreversiblemente inactivada por el oxígeno.

Por lo tanto, la planta genera una hemina (proteína) denominada leghemoglobina, que protege a la nitrogenasa del oxígeno, indispensable para la respiración celular pero que prácticamente debe estar ausente en este paso bioquímico (Urzua, 2000; Olivares Pascual. J, 2006).

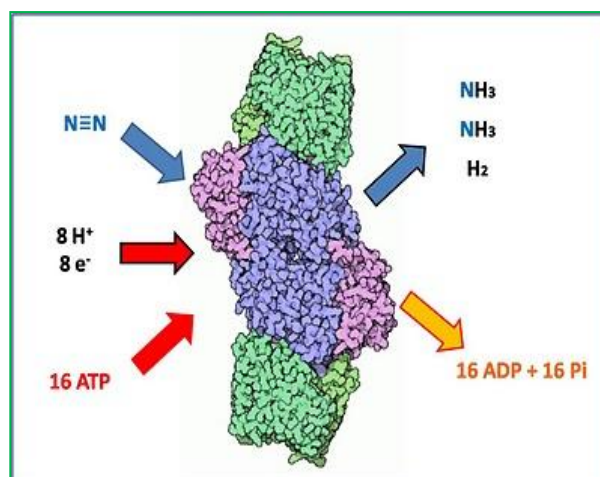


Figura 2: Enzima Nitrogenasa www.curiosidadesdelamicrobiologia.info

La fijación biológica de nitrógeno es catalizada por este complejo multienzimático, que se encuentra exclusivamente en microorganismos procariotas. El espectro de organismos fijadores de nitrógeno es muy amplio, hasta el punto de que estos pueden encontrarse en casi cualquier hábitat (Azcón-Bieto F. and Talón M., 2000). Dentro de estos microorganismos se encuentran dos tipos de bacterias: de vida libre, las cuales fijan el nitrógeno en el suelo; o simbióticas (Wang, T. and Romero Martínez, 2005). Esta simbiosis implica el intercambio de señales entre la planta y las bacterias (rizobios) (Azcón-Bieto F. and Talón M., 2000). El grupo de bacterias al que se conoce como rizobios (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*.) inducen en las raíces de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, nódulos (Fig. 3), dentro de los cuales se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Sprent, 2001).



Figura 3: Estructuras especializadas (nódulos). Uno de ellos cortado transversalmente. El color rojo se debe a la presencia de leghemoglobina, una forma de hemoglobina necesaria para capturar el oxígeno antes de que contacte con el complejo nitrogenasa, ya que esto bloquearía la fijación de nitrógeno.

Dependiendo del sistema simbiótico podemos encontrar dos tipos de nódulos: determinados e indeterminados. Esto es consecuencia del mecanismo que induce las divisiones mitóticas en la raíz. Así, si se originan en el córtex interno forman nódulos indeterminados y si lo hacen en el córtex externo nódulos determinados. Ambos tipos de nódulos, además de presentar una estructura anatómica distinta (Fig. 4), también difieren en la forma en que se comporta la bacteria dentro del nódulo en formación. A pesar de ello, la inducción del ciclo celular en ambos sistemas sigue la misma regulación.

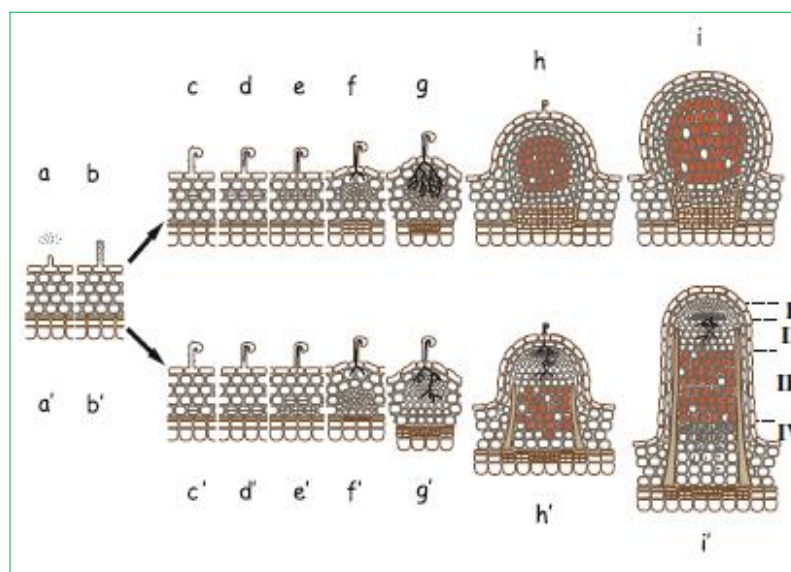


Figura 4: Formación de nódulos determinados (forma esférica) e indeterminados (forma cilíndrica), en el tejido de la planta (Saeki, K., 2011).

1.1.2.1.2 Producción de Fitohormonas

El mecanismo de acción directo de las PGPBs por excelencia, es la producción de fitohormonas. Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquinas en la rizosfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento, especialmente marcado cuando éstas están en estado de plántulas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

La auxina típica es el ácido indol-acético (AIA) (Fig. 5a), hormona de la cual aun se conoce poco sobre los mecanismos de su expresión, metabolismo, transporte y

distribución final. Su efecto en las células es controlar los tropismos que se manifiestan como inclinaciones, giros o curvaturas del tallo y desarrollo del sistema radical. Se conoce que esta hormona vegetal otorga beneficios a la planta puesto que se incrementa la división, lo cual se traduce en un aumento de tamaño de los frutos y números de hojas (Uggla *et al.*, 1996; Garcia Breijo, 2006).

La promoción del desarrollo del sistema radical característico de este tipo de reguladores de crecimiento vegetal, es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de determinadas bacterias rizoféricas (Fett *et al.*, 1987; Torres-Rubio *et al.*, 2000). El rápido establecimiento de raíces, ya sea por elongación de la raíz primaria o por surgimiento de raíces laterales secundarias, permite a las semillas jóvenes tener pronto un acceso a nutrientes y agua provenientes de su medio ambiente (Patten & Glick, 2002).

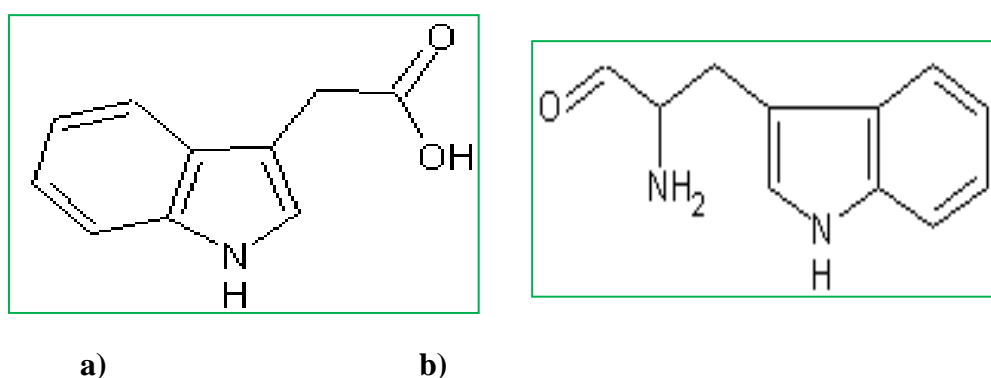


Figura 5: a) Estructura química del Ácido 3- Indol Acético; b) Estructura química del Triptofano. Tomadas de www.plant-hormone.info

El AIA es similar en estructura al aminoácido triptofano (Fig. 5 b), y probablemente es éste el precursor del AIA formado en la planta; aunque se conocen cuatro vías de formación de dicha auxina, cada una de ellas con un intermediario distinto (García Breijo, 2006). Diferentes grupos de plantas emplean diversas rutas para producir AIA a partir del triptófano por medio de la indol-acetamida que se encuentra implicada en la generación de tumores en la planta; existe una ruta alternativa tomada por otras bacterias que involucra la utilización del ácido 3 indol pirúvico como intermediario (Fett *et al.*, 1987; Patten & Glick, 2002).

1.1.2.1.3 Solubilización de fósforo

Otro elemento de gran importancia para la planta es el Fósforo (P), siendo uno de los seis macronutrientes esenciales (N, P, K, Ca, Mg y S) requerido para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En cuanto a producción de cultivos es el segundo nutriente limitante, debido a su participación en variados procesos relacionados con el desarrollo y rendimiento de los mismos.

La simbiosis ribio-leguminosa es altamente sensible a la carencia de fósforo, debido a que 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 distintos procesos de reconocimiento genético (señales entre la planta y el rizobio). Por lo tanto, para que sea posible la nodulación y fijación de N₂, es necesario un aporte adecuado de fósforo (Richardson A.E, 2001).

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 (Buschiazzo *et al*, 1994).

La concentración de P asimilable es muy baja (entre 5 y 30 mg /Kg); esto se debe a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no pueden ser aprovechados por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas, 2002).

Los agentes de origen biológico son posibles de manejar y prácticamente tienden a mantener el fósforo en sus estados de mayor disponibilidad, incrementando y manteniendo altas tasas de mineralización y movilización. Por lo tanto, los microorganismos son fundamentales para asegurar un mejor y mayor uso del fósforo en el suelo (Azcón & Barea, 1997; Atlas, 2002; Nautiyal *et al.*, 2000).

El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosfato es optimizar la disponibilidad para las plantas de dicho elemento en el suelo, lo que genera un incremento en el rendimiento de cosechas ya que cambian las formas insolubles del P en el suelo en formas solubles (Chen *et al.*, 2006).

1.1.2.1.4 Producción de Exopolisacaridos

Los Exopolisacaridos (EPS) son abundantes productos extracelulares acumulados en la superficie celular y secretados en los alrededores de la célula (Frayse *et al.*, 2003). Los EPS se componen, al menos en parte, de la repetición de unidades de los heteropolímeros. Los componentes de carbohidrato que se encuentran en los rizobios son principalmente monosacáridos comunes, como la D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-ramnosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico. Las unidades de repetición son muy variables a nivel de especie, como se ejemplifica en la aparición de unidades de repetición diferente dentro del mismo biovar. de *R. leguminosarum* (Spaink, 2000).

Debido a su abundancia, su naturaleza y una ubicación en la matriz de la superficie extracelular, se espera que los EPS funcionen en la protección contra el estrés ambiental, en la adhesión a las superficies y en la osmorregulación por su efecto sobre el potencial Donan, ya que influyen en el transporte de iones. También, parecen desempeñar un papel activo en la simbiosis fijadora de nitrógeno que ocurre dentro de los nódulos de las raíces de las leguminosas (Spaink, 2000).

1.1.2.1.5 Hidrólisis de Almidón

El almidón es el material de reserva que predomina en las plantas y comúnmente se presenta en gránulos con una típica estructura en capas. Está compuesto de dos polímeros: amilosa y amilopectina. La amilosa es soluble en agua caliente y se tiñe de azul con una solución acuosa de yodo, consiste de una cadena helicoidal no ramificada de unas 200 - 500 unidades de D-glucosa con enlaces 1,4- α -glicosídicos. La amilopectina se hincha en agua caliente formando una pasta y toma un color pardo violáceo con yodo. Es también un polímero 1,4- α -D-glucosa que, como el glucógeno, está ramificado por enlaces 1,6- α -glicosídicos aproximadamente cada 25 unidades de glucosa (Muller; 1988). Los almidones de distinto origen difieren mucho en sus ramificaciones, el número de unidades por cadena y en los residuos fosfato e iones calcio y magnesio que los acompañan.

Hay tres tipos de descomposición enzimática de los glucanos: fosforólisis, hidrólisis y transglicosilación. La fosforólisis por la α -1,4-glucanfosforilasa sólo ocurre

intracelularmente. La transglucosilación es la formación de ciclodextrinas con 6-8 unidades de glucosa a partir del almidón, por acción de *Bacillus macerans* y otros (Schelgel; 1993). El ataque extracelular del almidón es debido a la acción hidrolítica de las amilasas, según se observa en el esquema de la figura 7. La α -amilasa ataca los enlaces 1,4- α -glucosídicos aún en el centro de la cadena, por lo que se la conoce como endoamilasa, produciendo glucosa, maltosa y oligómeros de 3 a 7 unidades. Está presente en plantas, animales y microorganismos. La viscosidad de la solución de almidón y el color de su reacción con yodo se reducen rápidamente durante la hidrólisis. Muchos hongos del suelo producen amilasas así como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* entre otras.

La β -amilasa, presente en plantas y bacterias, también degrada los enlaces 1,4- α -glucosídicos pero comienza su acción por el extremo libre no reductor del almidón, liberando maltosa, mientras continúa el color frente al yodo. La hidrólisis se detiene en los puntos de ramificación de la amilopectina y el residuo se conoce como dextrina límite (Madigan *et al*; 2003). La pululanasa o isoamilasa hidroliza los enlaces 1,6- α -glucosídicos quitando las ramas de la amilopectina o las dextrinas. La maltasa hidroliza la maltosa a glucosa (Alexander; 1980).

El almidón es demasiado largo para ser transportados al interior de la célula. Por ende, los microorganismos excretan estas enzimas que permiten hidrolizarlo hasta oligo o monosacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer (Frioni, 1990).

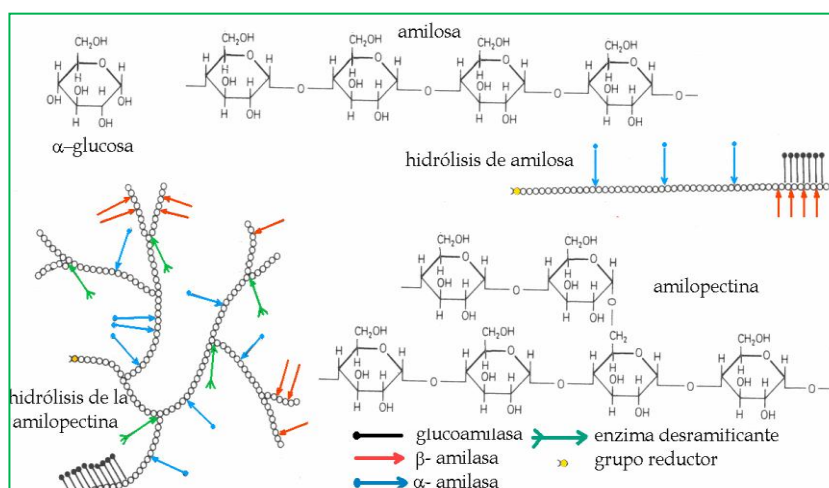


Figura 7: Estructura de la amilosa y amilopectinas y sus correspondientes hidrólisis.

1.1.2.2 Mecanismos Biocontrol-PGPB

Cuando la estimulación del crecimiento es Biocontrol-PGPB, la bacteria libera algún metabolito, que afecta a otros factores rizoféricos que conducen a una mejora o estimulación del crecimiento de la planta (Kloepper, 1994).

1.1.2.2.1 Producción de antibióticos

En las últimas décadas, una gran diversidad de microorganismos rizoféricos han sido descritos, caracterizados, y - en muchos casos - realizado la prueba de la actividad como agentes de biocontrol contra los patógenos. Estos microorganismos pueden producir sustancias que pueden limitar los daños causados por los fitopatógenos, por ejemplo, mediante la producción de antibióticos, sideróforos, y una variedad de enzimas. Estos microorganismos también pueden funcionar como competidores de los agentes patógenos para los sitios de colonización y nutrientes. Sin embargo, el control biológico todavía no ha llegado a ser ampliamente aplicado (Timmusk, 2003).

En muchos de los sistemas de biocontrol, se ha demostrado que uno o más antibióticos juegan un papel en la supresión de la enfermedad. El grupo más estudiado de bacterias rizoféricas con respecto a la producción de antibióticos es el de *Pseudomonas fluorescens*, cuyas primeras sustancias implicadas en el control biológico fueron derivadas de la fenazina (Weller and Cook, 1983). Los genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis de los metabolitos han sido aislados y se ha estudiado su regulación (Bangera and Thomashow, 1996; Pierson *et al.*, 1995).

La presencia de otras poblaciones bacterianas pueden influir en la producción de fenazina por *Pseudomonas fluorescens*, ya que los mutantes de las mismas carecen de la capacidad para producir una señal necesaria para la inducción de la síntesis de antibióticos (Pierson and Pierson, 1996; Wood and Pierson, 1996).

1.1.2.2.2 Producción de Sideróforos

Los sideróforos son compuestos producidos por diferentes microorganismos en el suelo, que basan su actividad en fenómenos de quelación, un fenómeno rutinario en los sistemas biológicos (Neilands, 1995; Sánchez, 2006). La gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógenos producen sideróforos para obtener el hierro

(Fe), elemento necesario para llevar a cabo la FBN, ya que la enzima nitrogenasa, que esta compuesta de varias unidades proteicas, requiere 36 átomos de Fe para su correcto funcionamiento (Sylvia, 2005).

Teniendo en cuenta la importancia del hierro en las funciones vitales de los microorganismos en general, se entiende la eficiencia de los mecanismos de captación generados por estos. Las bacterias aerobias y las aerobias facultativas tienen una alta afinidad por los sistemas transportadores de hierro, razón por la cual se excretan sideróforos que auxilian la toma eficiente de este elemento (Jurkevitch *et al.*, 1992).

Diversos estudios han demostrado que entre las diferentes clases de sideróforos existentes, los primeros identificados son los de tipo catecol (Fig. 6 a) e hidroxamato (Fig. 6 b) (Neilands, 1995). Recientemente se han descrito ciertos α -cetoácidos con características y actividad similar a la de los sideróforos.

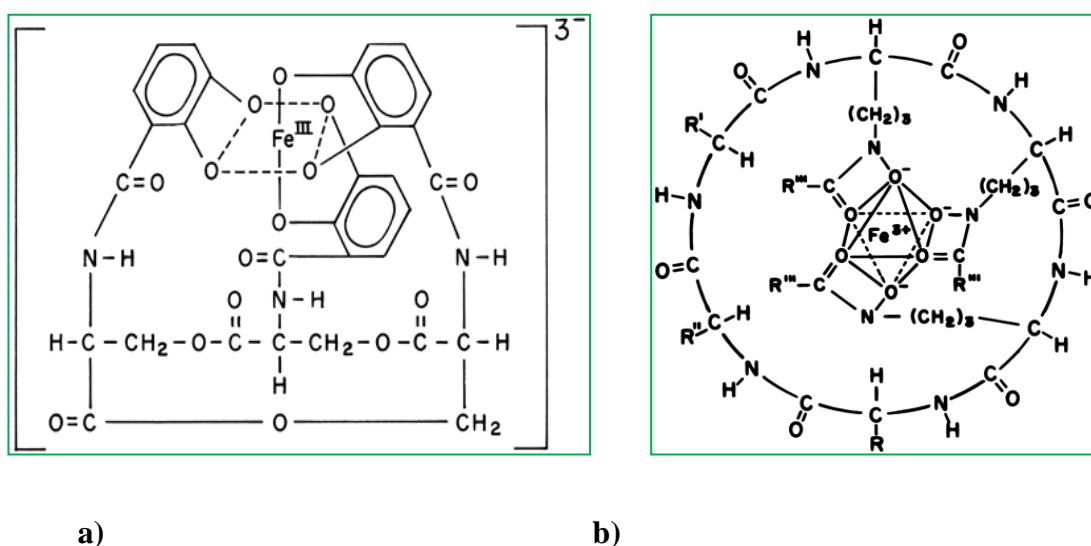


Figura 6: Estructura química de sideróforos, a) Estructura general de enterobactina férrica, tipo catecol; b) Estructura general de ferricromo, tipo hidroxamato (Neilands, 1995).

Se ha sugerido que las Biocontrol-PGPB pueden prevenir la proliferación de fitopatógenos y así facilitar el crecimiento de plantas, sintetizando sideróforos que ligan la mayoría del Fe^{+3} presente en la rizósfera de la planta hospedante (Dowling *et al.*, 1996). Estas bacterias de control biológico evitan efectivamente que los patógenos fúngicos, los cuales producen sideróforos que tienen una menor afinidad por el hierro que los sideróforos sintetizados por las bacterias (Schippers *et al.*, 1987), proliferen en la rizósfera de la planta hospedante debido a la carencia de hierro (O'Sullivan y O'Gara, 1992). Las células bacterianas, que originalmente sintetizan los sideróforos con una alta afinidad por el hierro, toman el complejo hierro-sideróforo usando un receptor de

membrana celular exterior específico para el complejo (O'Sullivan and O'Gara, 1992). En este modelo, las Biocontrol-PGPB compiten exitosamente frente a los fitopatógenos fúngicos por el hierro disponible.

1.1.2.2.3 Producción de Ácido Cianhídrico

En adición a los antibióticos y sideróforos, las Biocontrol-PGPB producen una amplia variedad de metabolitos de bajo peso molecular con actividad antifúngica (Dowling y O'Gara, 1994). Por ejemplo, algunas *Pseudomonas* pueden sintetizar cianuro de hidrógeno (al cual ellas mismas son resistentes), metabolito que se ha relacionado con la capacidad de esas cepas para inhibir algunos hongos patógenos y bacterias deletéreas (Voisard C *et al.*, 1989). Este ácido afecta la respiración, inhibiendo la citocromo oxidasa (Salomonson L. P, 1981). Los efectos inmediatos son una reducción de las actividades metabólicas de los microorganismos patógenos.

Voisard *et al.* (1989), sugieren que este metabolito puede actuar de dos maneras en el control biológico: 1) por antagonismo directo con el patógeno; esto estaría limitado a la superficie de la raíz que es donde habitan y 2) que alternativamente el HCN podría actuar induciendo mecanismos de defensa en la planta.

1.2 Estrés Abiótico

La producción de alimentos a nivel mundial necesitaría incrementarse en un 38% antes de 2025 y un 57% antes de 2050 (Wild, 2003); sin embargo, la mayor parte de la tierra cultivable está ya en uso y la implementación de nuevas áreas de cultivo para aumentar la producción es difícil. Apuntes de la FAO (2008) estiman que cerca del 15% del área de tierra total del mundo esta afectada por la erosión del suelo, la degradación física y química y la salinización, que implica a más de 800 millones de hectáreas en el mundo. El valor umbral relativo de los efectos negativos provocados por la salinidad puede variar dependiendo de varios factores como el tipo de planta, régimen de riego y la textura y calidad del suelo (Kutuk *et al.*, 2004). El problema de la salinidad en los suelos agrícolas se conoce desde tiempos remotos, en la actualidad incluye más de 100 países y se ve agravada cada día más por el uso de aguas de riego con alto contenido salino (Munns and Tester, 2008).

1.2.1 Suelos salinos y sódicos

El principal origen de la salinidad en los suelos está relacionado con la acumulación de sales durante largos períodos en zonas áridas y semiáridas, sin embargo otras causas naturales como la erosión de la roca que libera sales, principalmente cloruros de sodio, calcio y magnesio y en menor medida sulfatos y carbonatos, también contribuyen a elevar la salinidad en el suelo (Odeh and Onus, 2008). 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 (Fig. 8).

A parte de estos procesos naturales, la salinidad también puede ser provocada por la excesiva fertilización y la utilización de agua de riego de mala calidad, las sales introducidas por el agua de riego se acumulan en las raíces especialmente cuando la lixiviación es escasa (Rengasamy, 2006).

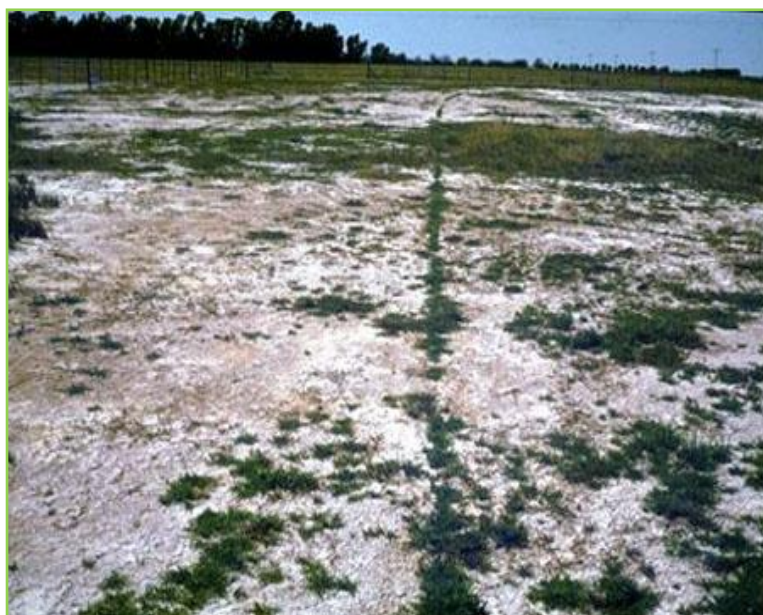


Figura 8: Suelos salinos y sódicos. Tomada de inta.gov.ar info

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 $\text{m}\Omega/\text{cm}$, un pH que varía entre 7 y 8 y un porcentaje de sodio intercambiable (PSI) menor al 15%; en cambio, en el segundo el PSI supera el 15%,

siendo su CE menor a 4 mΩ/cm y su pH aproximadamente 11. Los suelos salinos sódicos presentan una CE mayor a 4 mΩ/cm, un PSI mayor al 15% y un pH entre 7 y 8,5.

1.2.2 Efectos del estrés abiótico en la relación microorganismo-planta

El principal efecto fisiológico de la salinidad sobre las plantas y las bacterias es la reducción del crecimiento debido a : un **efecto osmótico** inducido por la disminución del potencial osmótico del medio; una **toxicidad específica**, normalmente asociada con la absorción excesiva de iones sodio y cloruros; un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales; y la combinación de los efectos antes indicados. Como consecuencia de estos efectos primarios también se produce un **daño oxidativo** (Zhu, 2001).

Los efectos del estrés salino en la nodulación y la FBN en leguminosas han sido examinados en varios estudios. El estrés salino inhibe los pasos iniciales de la simbiosis rizobio-leguminosa. La reducción en la actividad de la FBN 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 por nódulos.

El exceso de agua también afecta a los dos socios de esta simbiosis, 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 suelo y su interacción con la planta, para su posterior introducción en áreas desfavorables.

1.3 Leguminosa: *Lotus glaber*

Lotus glaber (Fig. 9) es una leguminosa perenne de origen europeo de gran valor por su contribución a la oferta de forraje y su influencia en el crecimiento de las especies asociadas (Montes 1988; Díaz *et al.* 2005). Esta leguminosa se ha propagado naturalmente en la Pampa Deprimida. Los aportes de nitrógeno de *Lotus glaber* al sistema (Refi and Escuder, 1998; Ruz *et al.*, 1999) y su capacidad de establecimiento en diferentes comunidades vegetales (Kade y Mendoza, 2003; Mendoza *et al.*, 2005; Miñon *et al.*, 1990) la destacan como una especie promisoras para la actividad ganadera de la región, dado que es la principal actividad de la misma.

Su gran tolerancia a la salinidad y a los suelos pobres, hace a esta planta muy útil para repoblar terrenos marginales. 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).



Figura 9: Leguminosa *Lotus glaber*.

Lotus glaber al igual que muchas otras leguminosas, es capaz de fijar nitrógeno en relación con bacterias del género *Rhizobium*, más específicamente con *Mesorhizobium loti* (Balatti, 1996).

Se ha observado que *Lotus glaber* posee una dependencia significativa con las micorrizas arbusculares o de mecanismos alternativos como uso de microorganismos solubilizadores para la absorción de fósforo (Mendoza R.E. *et al.*, 2000).

Además de servir como pastura, la especie tiene la propiedad de beneficiar al ecosistema, aportar materia orgánica al terreno, disminuir la salinidad y aumentar el contenido de nitrógeno y fósforo disponible en el suelo, favoreciendo el crecimiento de otros vegetales.

1.3.1 Morfofisiología

Lotus glaber es una especie herbácea policárpica, perenne, sin órganos de propagación vegetativa. Sin competencia por luz, su crecimiento es postrado. En cambio, sus tallos adquieren porte erecto cuando esta asociada a pastizales altos (Beuslink and McGraw, 1986; Miñon *et al*, 1990).

Las hojas están formadas por cinco folíolos lanceolados, dos en la base del peciolo y tres en la parte terminal (Fig. 10).



Figura 10: Fotografía de hojas de *Lotus glaber*.

Posee una raíz larga, pivotante y con muchas ramificaciones laterales (Miñon *et al*, 1990), conformando un sistema radical abundante y fibroso, debido a esto manifiesta una gran adaptación a suelos profundos y mal drenados. Como aspecto destacable se halla su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico con una gran eficacia, aunque algo menor que la alfalfa.

En cuanto a las semillas (Fig. 11), estas son pequeñas, duras, lisas y de color marrón. Las dimensiones de las semillas son de 1,22-1,65 mm de longitud y 1,00-1,06 mm de ancho (Arambarri, 1983).



Figura 11: Fotografía de semilla *Lotus glaber*.

1.3.2 Adaptabilidad en Suelos

Lotus glaber, tiene un mejor comportamiento frente a suelos salinos y/o alcalinos, en estados de germinación, plántula y planta (Rogers *et al.*, 1997; Vignolio and Fernandez, 1999) tolerando inundaciones periódicas y de hecho empleándolas para propagarse. En los pastizales de la Pampa Deprimida, puede crecer en suelos bajos, anegables, alcalinos, típicos de comunidades vegetales dominadas por *Distichis spicata* (Mendoza *et al.*, 2005; Montes, 1998).

Lotus glaber puede crecer en un rango de pH entre 5,5 y 9,8 (Mendoza *et al.*, 2000; Montes, 1998) y en tales condiciones establecer asociaciones simbióticas con cepas de *Rhizobium loti*, *Mesorhizobium loti* y *Mesorhizobium huakuii* (Correa and Barneix, 1997; Rickert *et al.*, 2000). El pH por si mismo no sería el factor limitante para el crecimiento de *Lotus glaber*, sino que este puede determinar la concentración y solubilidad de elementos que pueden ser tóxicos para la planta como es el caso del aluminio en suelos ácidos (Wood *et al.*, 1988).

1.3.3 Ciclo y Calidad del Forraje

Hay mucha variación dentro de la especie, pero en términos generales, poseen un fuerte pico de producción primaveral, que dependiendo del tipo y su grado de reposo se puede extender y aún concentrarse más en el verano. La floración (Fig. 12) es indeterminada, se da a partir de mediados o fines de octubre, pudiendo continuar en ese estado y tener un segundo pico de floración hacia febrero. Las plantas viven alrededor de 2 a 3 años, pudiendo perdurar “in eternum” en el campo a través de la resiembra natural.



Figura 12: Fotografía de Floración de *Lotus glaber*.

Lotus glaber es excelente por varias razones. En primer lugar, el alto nivel de digestibilidad del forraje producido, que ronda el 70% durante etapas de activo crecimiento vegetativo (salida del invierno – principios de primavera). En segundo lugar, posee niveles de taninos condensados en tallos y hojas (0,9 mg TC/g MS), los cuales, una vez ingeridos, reducen al mínimo los riesgos de empaste, factor a tener muy presente en pastoreos de alfalfa o tréboles. Por último, el aporte de proteínas que hace a la dieta es realmente significativo, alcanzando valores que oscilan entre el 15 al 24 % (Kirkbride, J.H.; 1999).

2.1 Hipótesis

Se plantea como **hipótesis** que la simbiosis *Mesorhizobium loti-Lotus glaber* y la acción de bacterias PGPR (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal), pueden constituir una alternativa para ser aplicada a suelos de la región pampeana, con condiciones límites de salinización producidas por anegamientos temporarios.

2.2 Objetivo

En base a lo expuesto anteriormente, **el objetivo** es:

- 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 de salinización.

3.1 Microorganismos con propiedades PGPBs

3.1.1 Aislamiento de rizobios nativos

El aislamiento de rizobios se realizó a partir de los suelos rizosféricos correspondientes a la región de la Pampa Deprimida del Salado (tabla 1), enviados por investigadores del IIB – INTECH-Chascomús; 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 NaClO 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) en oscuridad.

Cuando las semillas habían desarrollado aproximadamente 5 mm de radícula, con ayuda de ansa y en condiciones de esterilidad, se sembraron dos semillas por tubo conteniendo medio Jensen (tabla 13) de modo que el extremo de la radícula quedara debajo de la superficie del agar.

Tabla 1: Suelos rizosféricos provenientes de la región de la Pampa Deprimida del Salado.

<i>Suelos</i>	<i>pH</i>
3	7,35
5	7,05
9	7,87

Con los suelos indicados en la tabla 1 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} .

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 (Fig.13). Éstos se esterilizaron, para ello, se lavaron sucesivamente con etanol 95 % durante 30 segundos, 3 minutos con NaClO y con agua estéril (5 veces). Posteriormente se aplastaron los nódulos con una pinza estéril en cajas de Petri con medio de cultivo (tabla 2) y se estrió el macerado del nódulo. Se incubaron las placas a 28 °C por un periodo de aproximadamente 9 días.



Figura 13: Nódulos de *Lotus glaber*.

3.1.2 Bacterias Fijadoras de Nitrógeno.

Se utilizaron cepas patrones: *Mesorhizobium loti* (LL-32; LL-30 y LL-38); las cuales fueron recomendadas por IMYZA-INTA.

3.1.3 Solubilizadora de Fósforo

Se utilizó una *Pseudomona* (SP 8W) nativa aislada por el grupo de Investigación, en rizósfera de alfalfa de la zona de la localidad de Winifreda (La Pampa).

3.2 Semillas

Se utilizaron semillas de la leguminosa *Lotus glaber*, para el ensayo en cámara climatizada e Invernadero. Estas fueron enviadas por IIB-INTECH, perteneciente a la población de PAMPA-INTA y conservadas a una temperatura de 4°C.

3.3 Mantenimiento de los aislamientos

Los microorganismos se conservaron en tubos de agar inclinado, con el medio mantenimiento *Mesorhizobium loti* (tabla 2) para rizobios, en heladera a 5°C.

Para la conservación prolongada de los mismos se congelaron utilizando glicerol como criopreservador. Se desarrollaron los microorganismos en medio para rizobios sin agar (tabla 2); luego se determinó la pureza de los mismos con observación microscópica y control de pH. Se toman los tubos de ensayo con tapa a rosca con un cuarto de solución de glicerol, previamente esterilizados, y se coloca el cultivo de las bacterias en los mismos; completando la unidad de los tubos de ensayo. Se lleva a freezer a una temperatura de -18°C.

Tabla 2: Medio de mantenimiento y desarrollo de *Mesorhizobium loti*.

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
K ₂ HPO ₄	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
KNO ₃	1 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O sol 10%	0,06 ml
FeCl ₃ ·6H ₂ O sol 10%	0,06 ml
Extracto de Levadura	2 g
Manitol	5 g
Agar*	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 6,8 * Ausencia de Agar para medio desarrollo.

3.4 Caracterización de las bacterias aisladas

Para la caracterización de los aislamientos en este trabajo se realizaron las siguientes experiencias.

3.4.1 Observación microscópica:

Se utilizó microscopio binocular modelo Janamed 2 Carl Zeiss Jena óptica planométrica (Fig. 14) para la observación de los aislamientos por contraste de fases, con aumento de 100 x, con luz a tonos de color verde y blanco.

Figura 14: Microscopio binocular modelo Janamed 2 Carl Zeiss Jena.



3.4.2 Caracterización morfológica:

Se realiza un estriado en medio para rizobios (Tabla 2); luego del crecimiento se evalúa la forma, textura, apariencia de las colonias, absorción del colorante Rojo Congo y cantidad de goma producida, según metodología propuesta por CIAT (1988).

3.4.3 Tinción de Gram:

Se realiza tinción de Gram para determinar el carácter gram positivo- negativo de las bacterias nativas aisladas. Se utilizó el kit para gram, marca BRITANIA, siguiéndose la metodología indicada en el mismo.

3.4.4 Electroforesis de Isoenzimas: α y β esterasas (M.L.E.E)

Cada aislamiento fue desarrollado durante 48 hs a 28°C con agitación, en erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio TY (Tabla 3).

Tabla 3: Medio TY.

Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂	0,87 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7

Las muestras primeramente fueron centrifugadas a 10.000 rpm (Centrifura Rolco CR5150) durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó. Se resuspendió con 1 ml de solución de NaCl al 0,85%, recogiénose en tubos eppendorff. Se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 rpm, se descartó nuevamente el sobrenadante y se recogió en 0,5 ml de Tampón de Extracción (tabla 4). Se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos y se volvió a descartar el sobrenadante y el precipitado nuevamente se resuspendió en el mismo tampón de extracción con lizozima en concentración de 1 mg/ml. Después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó 10 minutos a 15.000 rpm y se resuspendió el precipitado en Tampón de Sonicación (tabla 5), previamente se descarta el sobrenadante. Cada uno de los tratamientos se sonicó (Sonicador KONTES microultrasonic cell disrupter) en seis ciclos de 30 segundos. Por último, se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 rpm reservándose el sobrenadante para la corrida electroforética.

Tabla 4: Tampón de Extracción.

Componentes	Cantidad
TRIS	1,21 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,101 g
Glicerol	15 g
Mercaptoetanol	100 µl
Agua destilada	c.n*

pH: 7,2 (se lleva con HCl concentrado)

Tabla 5: Tampón de Sonicación

Componentes	Cantidad
TRIS	1.21 g
Glicerol	15 g
Agua destilada	c.n*

pH: 8,8 (se lleva con HCl concentrado)

*Siendo c.n; cantidad necesaria de agua para alcanzar 100 ml de volumen final.

La electroforesis se realizó en placa vertical (Fig. 15) a voltaje constante (200 V), usando gel de poliacrilamida al 5% para el gel concentrador y 10 % para el separador (tabla 6) y utilizando el buffer de corrida (tabla 7).

Tabla 6: Composición de geles para las placas electroforéticas.

Componentes	Gel concentrador 5%	Gel separador 10%
TRIS-HCl 2,25 M ph: 8,8	200 ml	4,35 ml
Acrilamida- Bis Acrilamida (30:0,8 %)	1,33 ml	8,7 ml
Agua destilada	4,62 ml	12,71 ml
Temed	20 μ l	25 μ l
Persulfato de amonio	100 μ l	200 μ l

**Figura15:** Cuba Electroforética (placa vertical).**Tabla 7:** Buffer de corrida.

Componentes	Cantidad
TRIS	1,5 g/L
Glicina	7,1 g/L

pH: 8,2

Una vez finalizada la corrida electroforética, se lleva a cabo el revelado con Fast Blue RR en tampón de fosfatos (tabla 8). A la solución filtrada se le agregan los sustratos: α -naftilacetato y β -naftilacetato, para determinar α y β esterasas. Luego se descarta la solución de tampón de fosfato y se decolora el gel utilizando la solución de la Tabla 9, para visualizar nítidamente las bandas.

Tabla 8: Tampón de fosfatos.

Componentes	Cantidad
K ₂ HPO ₄	1,57 g/L
KH ₂ PO ₄	12,38 g/L

pH: 6,2

Tabla 9: Solución decolorante.

Componentes	Cantidad
Etanol	150 ml
Ácido Acético	25 ml
Agua destilada	325 ml

3.5 Parámetros Cinéticos

Se realizaron curvas de crecimiento para las bacterias estudiadas, desarrollándose éstas en medio líquido (tabla 2).

Para asegurar una buena medición y evolución de la biomasa de los microorganismos, se procedió al desarrollo de los mismos en erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio inoculo, durante 48 hs en cuarto estufa a 28° C y con agitación. Al cabo de ese tiempo, se trasvasó a erlenmeyers de 500 ml con 100ml de medio desarrollo, la cantidad necesaria de inoculo de manera de obtener inicialmente una concentración de aproximadamente 10⁸ UFC/ml., lo que corresponde a volúmenes de inoculo de orden del 10% de transferencia.

Se midió la concentración celular cada 2 hs durante un período de 50 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 comprendidos 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 de la suspensión y se realizaron las curvas correspondientes, durante el mismo período de tiempo e intervalos.

3.5.1 Parámetros Evaluados de Crecimiento celular

Se cuantifican los siguientes parámetros del crecimiento celular para cada aislamiento:

- **Velocidad específica de Crecimiento (μ)**, la cual está dada por la siguiente expresión matemática:

$$\mu = \frac{\ln x / x_0}{t}$$

Siendo X: concentración celular en el tiempo final.

X₀: concentración celular en el tiempo inicial.

t: tiempo que tardó en llegar de X₀ a X.

- **Tiempo de Generación (θ)**, es el tiempo que le lleva a una célula dividirse, la cual, depende de muchos factores entre ellos la genética del microorganismo, las condiciones de operación, condiciones físico-químicas, etc. Dicha expresión se deriva de la velocidad específica de crecimiento ($\theta = \ln 2 / \mu$).

3.6 Ensayos de Caracterización de propiedades PGPBs de las bacterias aisladas

3.6.1 Producción de Antibióticos

Se estrían las placas un tercio del total con el microorganismo aislado, que contienen medio PDA. En el otro extremo de la placa se le adhiere a la superficie un taco de *Macrophomina phaseolina* (hongo) (Fig. 16).

Macrophomina phaseolina se encontraba desarrollado en medio PDA. De tal manera, se prosigue con la realización de los tacones con un diámetro aproximado de 1,5 cm. Para ello se toma el molde (equivalente a la boca de un tubo de ensayo), se lo esteriliza con alcohol y se flamea a llama directa. Se enfría y luego se presiona en la superficie de la placa donde se halla el hongo. Posteriormente, se saca el taco con un ansa, previamente esterilizada, y se lo adhiere a la placa estriada con la bacteria aislada.



Figura 16: Realización de tacones en *Macrophomina phaseolina*.

Se deja crecer la bacteria aislada y el hongo, durante 48 hs, a una temperatura entre los 27°C y 30 ° C; para poder determinar el halo de inhibición que se genera.

3.6.2 Producción de Exopolisacáridos

Se preparan cajas de Petri con Agar nutritivo adicionado con calcofluor en una concentración final de 0,005% donde se cultivan los diferentes aislamientos. Se incuban durante 5-7 días a una temperatura de 28°C. Posteriormente se observó la emisión de fluorescencia bajo luz U.V a 350 nm. Se utilizó la Técnica del calcofluor (Fluorescent Brightener 28-Sigma).

3.6.3 Hidrólisis de Almidón

Los microorganismos que poseen la capacidad de producir enzimas degradantes del almidón (amilasas) forman un halo claro alrededor de la colonia cuando se cubre la placa con una solución de lugol, el resto de la placa se observa de un color pardo debido a que el almidón reacciona con esta solución.

Las cepas se sembrarán mediante una estría central en las placas de Petri con medio para hidrólisis de almidón (tabla 10). Se incubarán a 28°C durante 48 hs.

Tabla10: Medio para hidrólisis de almidón

Componentes	Cantidades
Extracto de Carne	3 g
Peptona	5 g
Almidón soluble	2 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH:7,2

3.6.4 Producción de Sideróforos

Para evaluar la producción de quelantes de hierro se utiliza el método de Cromo Azul S (Neilands, 1995).

La siembra del microorganismo se realizó con palillos estériles sobre placa de petri, conteniendo medio de cultivo para sideróforos (tabla 11). Las placas se incubaron a 28°C por 5 días. Los microorganismos capaces de realizar la quelación del hierro presentan un halo naranja en torno a la colonia.

Tabla 11: Medio de cultivo para la detección de microorganismos Sideróforos.

Componentes		Cantidad
PIPES (Buffer free acid pH 6,8)		6,1 g
Bacto agar		3,0 g
Sol.Sotck Triptofano 1 %		0,6 ml
Triptona		0,032 g
Medio MM9 10X		20 ml
Componentes	Cantidad	
KH ₂ PO ₄	0,3 g	
NaCl	0,5 g	
NH ₄ Cl	1 g	
Agua (d)	100 ml	
Sol. CAS stock 10 X		20 ml
Componentes	Cantidad	
CAS	60,5 mg en 50 ml de agua destilada	
FeCl ₃ 6H ₂ O 1mM	10 ml en HCl 10 mM	
HDTMA	72,9 mg en 40 ml de agua destilada	
Manitol 1 M		2 ml
MgSO ₄ 1 M		0,1 ml
CaCl 50 mM		0,2 ml

3.6.5 Producción de Ácido Cianhídrico

Para evaluar la producción de HCN se siguió la técnica de Bric *et al* 1991.

Se sembró el microorganismo por la técnica de estrías por agotamiento, en placas de Petri conteniendo Agar trip casa soya (TSA) 10%; suplementado con 4,4 g/l de glicina y conteniendo en la tapa una pieza de papel de filtro impregnada con Ácido Pítrico 0,5% y Na₂CO₃ 2%. Luego se selló la caja de Petri con Parafilm y se incubó a 28°C durante 3 a 5 días.

Un cambio de color amarillo a naranja-marrón en el papel de filtro indica producción de ácido cianhídrico (HCN).

3.6.6 Cuantificación de Ácido 3-Indol-Acético (AIA)

Los aislamientos se desarrollaron en medio para *Mesorhizobium loti* (tabla 2), suplementado con L-triptofano 0,5 mM, durante 72 hs. Una alícuota de 3 ml de la suspensión bacteriana se transfirió a un tubo de centrifuga. A continuación, las células bacterianas se removieron del medio de cultivo mediante centrifugación a 1000 rpm durante 27 min. Una alícuota de 1 ml del sobrenadante se mezcló con 4 ml del reactivo de Salkowsky (tabla 12) y se dejó estacionar a temperatura ambiente durante 30 min, en oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 535 nm mediante el espectrofotómetro UV-visible Metrolab VD-40. La concentración de AIA, producido por los aislamientos en medios de cultivo, se determinó mediante una curva estándar, cuyo r^2 : 0,9942.

Tabla 12: Reactivo de Salkowsky.

Componentes	Cantidades
H ₂ SO ₄ ©	300 ml
FeCl ₃ (0,5 M)	15 ml
Agua	500 ml

3.7 Ensayo en Cámara Climatizada e Invernadero

Previamente en ambos ensayos, se esterilizaron las semillas de *Lotus glaber*, por sucesivos lavados con etanol 95% durante 3 minutos, 2 o 3 minutos con hipoclorito de sodio al 10% y con agua estéril (varias veces). Por último, se colocaron en cajas de Petri con discos de papel de filtro humedecidos (previamente esterilizadas) para su germinación a una temperatura de 28°C y oscuridad.

3.7.1 Cámara Climatizada

Cuando las semillas habían desarrollado aproximadamente unos 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.

Se sembraron 2 semillas por tubo con medio Jensen (tabla 13).

Tabla 13: Medio Jensen

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
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
Agua Destilada	1000 ml

Los tubos con medio Jensen 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. De esta manera, se asegura un buen desarrollo radicular.

Cuando las plantas habían desarrollado, se inocularon con 1 ml de la suspensión bacteriana de rizobios (S35; S54; S96; S92; LI-32) desarrollada en medio para *Mesorhizobium loti* (tabla 2).

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 y 8 hs de oscuridad.

El ensayo se llevó a cabo durante 62 días, con los siguientes tratamientos:

- Inoculación con cepa nativa: S 35
- Inoculación con cepa nativa: S 54
- Inoculación con cepa nativa: S 96
- Inoculación con cepa nativa: S 92
- Inoculación con cepa patrón: LL-32
- Testigo (sin inocular)



Por cada tratamiento se hicieron 10 repeticiones.

3.7.2 Invernadero

Cuando las semillas habían desarrollado aproximadamente unos 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 de la perlita.

Se sembraron 5 semillas por vaso con medio de soporte, perlita; de esta manera nos aseguramos el desarrollo de por lo menos 3 plantas.

Luego de la emergencia de los cotiledones en las plantas, se inocularon con 1 ml de la suspensión bacteriana de rizobios y 1 ml de suspensión de la cepa solubilizadora (SP 8W; SP 8W + S35; SP 8W + S54; SP 8W + S92).

El ensayo se llevó a cabo durante 65 días, con los siguientes tratamientos:

- SP 8W
- SP 8W + S35
- SP 8W+ S54
- SP 8W+ S92
- Testigo (sin inocular)



Por cada tratamiento se hicieron 5 repeticiones; en los tratamientos inoculados con la SP 8W se colocó fosfato insoluble en el medio de soporte (perlita). El fotoperíodo fue de 13 hs de luz natural y 11 hs de oscuridad. Dichos tratamientos fueron regados con 5 ml de Solución de Norris (CIAT, 1988) cada dos días.

3.7.3 Parámetros Evaluados para ambos Ensayos

3.7.3.1 Peso Seco

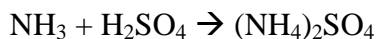
Al cabo de los días transcurrido en los ensayos correspondientes, se levantaron los tratamientos. Para ello, se cosecharon las leguminosas *Lotus glaber* y se secó la parte aérea de las mismas (teniendo en cuenta las repeticiones de cada tratamiento) en estufa durante 24 hs a una temperatura de 65°C, hasta un peso constante.

Para comprobar la existencia de diferencias entre los tratamientos se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Para comparar los tratamientos se aplicó la prueba del Método de Tukey.

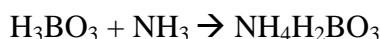
3.7.3.2 Contenido de Nitrógeno Total por el Método de Kjeldhal

Las muestras correspondientes a la materia seca de parte aérea se molieron para dicha determinación, utilizando un equipo Tekator Kjeltec Auto 1030 Analyzer.

La primer etapa del método de Kjeldahl, consiste en la digestión ácida, para ello se colocaron 100 mg de la muestra molida y 1,25 g de catalizador (24 g de Sulfato de potasio anhidro y 1 g de Óxido mercúrico) en un sobre de papel de celulosa, el cual se introduce en un tubo de cuello largo para evitar perdida de muestra por salpicadura. Se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado al tubo y luego se calienta. De esta manera, el sólido se digiere (se descompone y disuelve) en el ácido sulfúrico a ebullición, que convierte el nitrógeno presente en la muestra en ión amonio y oxida a los demás elementos presentes.



En la segunda etapa, se llevó a cabo la destilación y titulación, las cuales se realizaron automáticamente por el equipo Tekator. Se alcalinizó el producto de digestión con una solución de hidróxido de sodio al 40% y 60 g de tiosulfato de sodio por litro de álcali. Luego el amoniaco producido es arrastrado por una corriente de vapor y reacciona con ácido bórico al 1%, produciéndose metaborato, el cual se tituló con ácido clorhídrico utilizando un indicador mixto formado por Verde de Bromocresol y Rojo de Metilo.



A partir del volumen de ácido clorhídrico gastado (que lo proporciona el equipo), se calcula el porcentaje de nitrógeno y proteína de la muestra.

$$\text{meq HCl} = \text{meq B}_3\text{OH}_2^- = \text{meq NH}_3 = \text{meq N}$$

$$V \text{ valorante} \times N \text{ valorante} = \text{meq H}^+ = \text{meq N} = \text{g N} / \text{meq g N}$$

$$\text{g Proteína} = \text{g N} \times f$$

Siendo f un factor que depende del tipo u origen de la muestra, en este caso ese factor es: 6,25.

Para comprobar la existencia de diferencias entre los tratamientos se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y se aplicó la prueba del Método de Tukey para comparar los tratamientos.

3.7.3.3 Índices de Eficiencia a la Inoculación

Este es un parámetro 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 porcentaje de N), obtenido del tratamiento fertilizado con N y el tratamiento sin inocular.

$$\text{IER} = \frac{\text{Tratamiento inoculado} - \text{Tratamiento sin inocular}}{\text{Tratamiento con N} - \text{Tratamiento sin inocular}} \times 100$$

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

Además, en el ensayo de cámara climatizada, se calculó el índice de eficiencia en función del tratamiento con la cepa patrón LL-32 quedando la formula expresada de la siguiente manera:

$$\text{IEIc} = \frac{\text{Tratamiento inoculado} - \text{Tratamiento sin inocular}}{\text{Tratamiento con LL-32} - \text{Tratamiento sin inocular}} \times 100$$

4.1 Aislamientos de rizobios nativos

A partir de los suelos rizosféricos correspondientes a la región de la Pampa Deprimida, citada en 3.1.1 (tabla 1), se obtuvieron siete aislamientos, de los cuales se estudiaron los indicados en color rojo en la Tabla 14.

Tabla 14: Aislamientos de bacterias

<i>Suelos</i>	<i>Aislamientos</i>
3	S38, S35 , S36
5	S54
9	S95, S96 , S92

4.2 Caracterización de las bacterias aisladas

4.2.1 Observación microscópica y características morfológicas

Los microorganismos estudiados, presentan morfología bacilar, característica de bacterias de *Mesorhizobium loti*. Generan abundantes exudados de gomas, de textura cremosa, coloraciones rosadas y opacas, como se observa en la figura 18. Las colonias aisladas, poseen forma circular y de coloración blanca o rosada debido al colorante rojo congo. Dichas características coinciden con lo descrito en CIAT (1988).

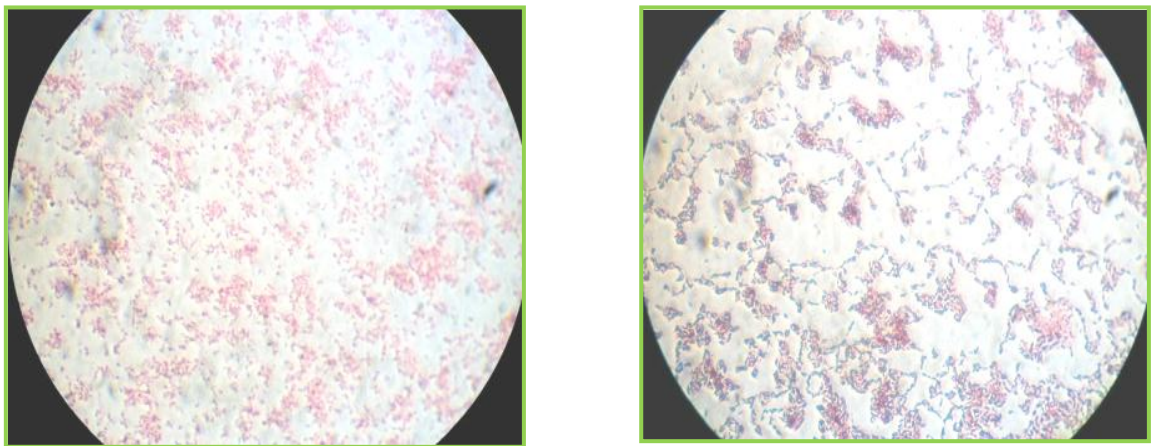


Figura18: Crecimiento en medio sólido del aislamiento S54.

4.2.2 Tinción de Gram

Se pudo comprobar, mediante la tinción de Gram que los aislamientos S92, S54 y S35, dan coloración rosada, indicando su carácter Gram negativo (Fig. 19 a).

En cuanto al aislamiento S96, se comprobó que es Gram positivo (Fig. 19 b), debido a la coloración azul.



a)

b)

Figura 19:a) Aislamiento S92: Gram negativo; b) Aislamiento S96: Gram positivo.

4.2.3 Electroforesis de Isoenzimas: α y β esterasas (M.L.E.E)

La elección de los aislamientos se realizó luego de analizar los resultados de la aplicación de la técnica de caracterización izoenzimática, esta nos permitió observar las diferencias existentes entre los aislamientos (S35; S54; S92 y S96) y las cepas patrones (LL-32; LL-30; LL-38 y U510).

Del análisis de los perfiles izoenzimáticos (Fig. 20) se infiere que todos los aislamientos son diferentes entre sí y respecto de los patrones. También se puede observar que poseen un gran polimorfismo y alta actividad esterásica, lo cual es deseable para su caracterización y seguimiento en estudios posteriores. Además, el modelo izoenzimático amplifica la caracterización microbiana que permite la detección de diferencias a nivel de aislamiento (Grassano *et al.*, 2009).

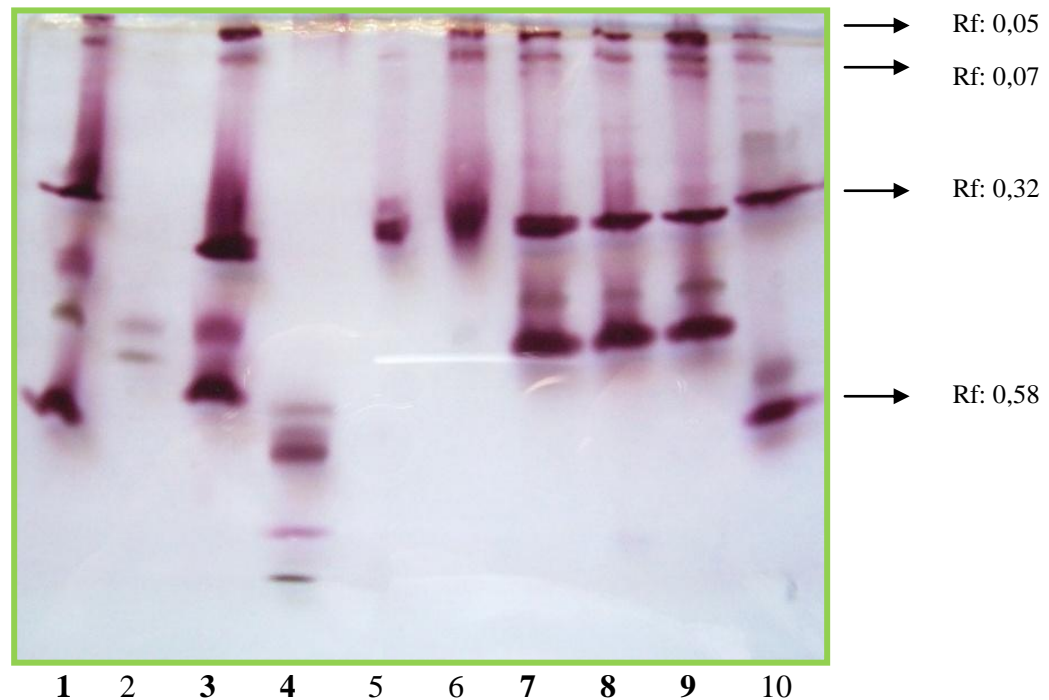


Figura 20: Análisis izoenzimático de α -esterasa y β -esterasa de las bacterias en estudio.
1) S35; 2) *Mesorhizobium loti* LL-30; **3) S54;** **4) S96;** 5) *M. loti* LL-38; 6) *M. loti* U510; **7) S92 t;**
8) S92; **9) S92 (Nodulo 3)** y 10) *M. loti* LL-32.

Del análisis de los perfiles de todos los aislamientos en estudio, se puede observar que presentan similitudes con las cepas patrones LL-38, U510 y LL-32, excepto para el aislamiento S96.

Para un Rf igual a 0,05 y 0,07, se observa coincidencia de los aislamientos S35, S54 y S92 con los patrones U510 y LL-32.

A un Rf de 0,32 se pueden visualizar que existen perfiles similares entre los aislamientos S35 y S92 y los patrones LL-38, U510 y LL-32. Mientras, que a un Rf de 0,58 existe similitud entre la cepa patrón LL-32 y el aislamiento S35.

Estas observaciones indican que existen analogías entre los aislamientos S35, S54 y S92 con las cepas patrones (LL-38, U510 y LL-32), infiriendo que podrían pertenecer a un mismo género (*Mesorhizobium*). En cuanto al aislamiento S96 (calle 4), se puede observar que el perfil izoenzimático difiere de los de las cepas patrones, indicando que no pertenece al género *Mesorhizobium*, corroborándose con la tinción de Gram.

4.3 Parámetros Cinéticos

4.3.1 Velocidad de Crecimiento y Tiempo de Generación Celular

La finalidad de este ensayo fue observar si los aislamientos poseen aptitudes biotecnológicas adecuadas para una transferencia futura, en cuanto a la velocidad de crecimiento celular (μ) y tiempo de generación (θ).

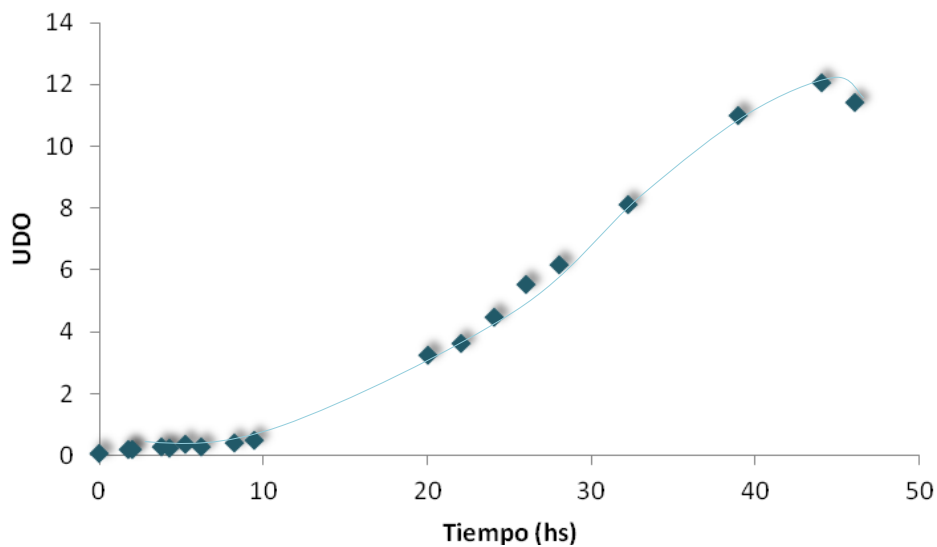


Figura 21: Curva de Crecimiento S54

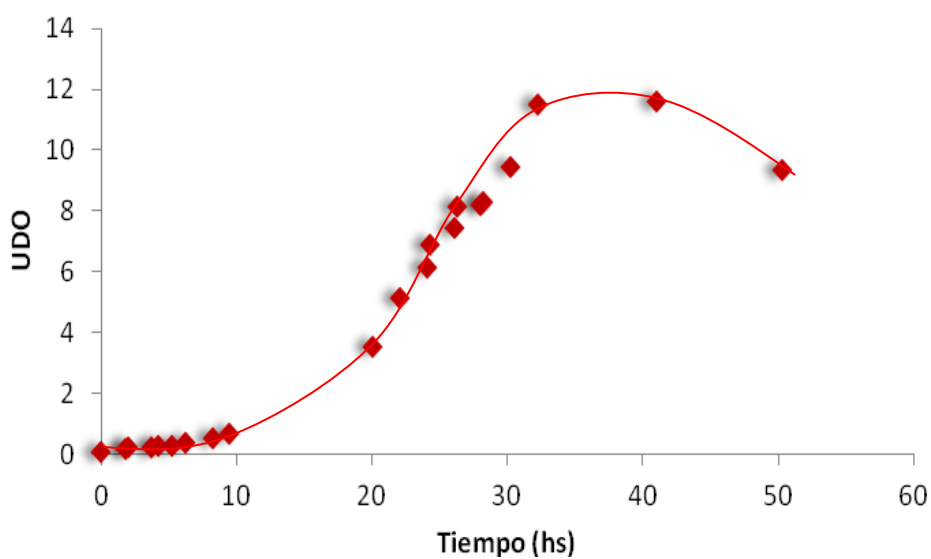


Figura 22: Curva de Crecimiento S92

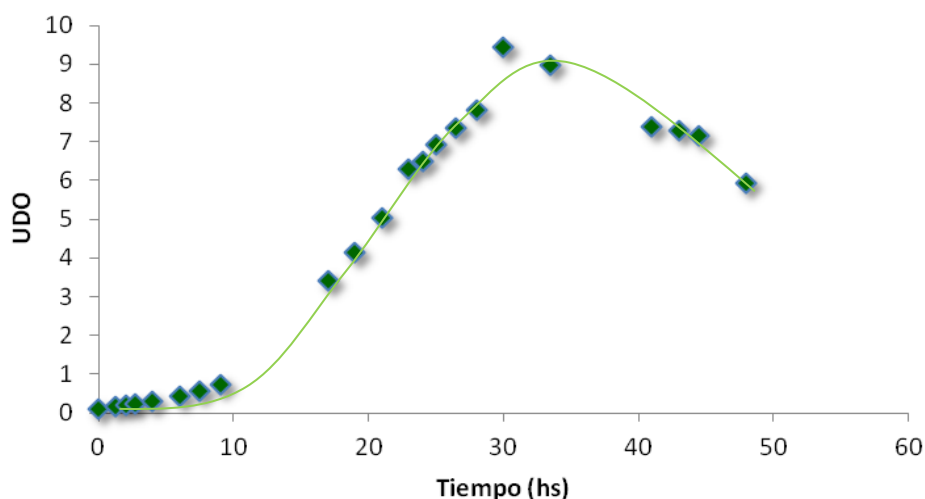


Figura 23: Curva de Crecimiento S35

Del análisis de las curvas se infiere que entre las 30 y 50 hs se llega a valores de biomasa compatibles con una futura aplicación biotecnológica (Balatti y Freire, 1996).

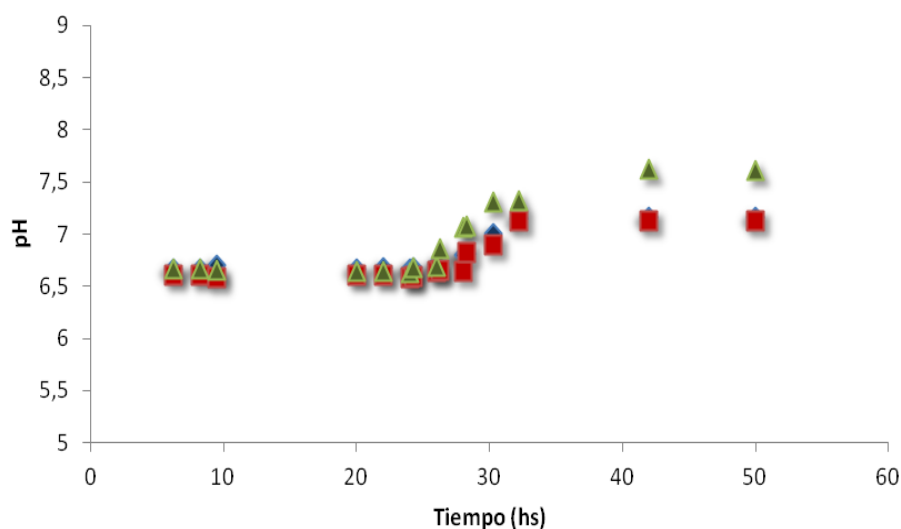


Figura 24: Curvas de pH; siendo S54 (azul); S92 (rojo) y S35 (verde).

Con respecto a las curvas de pH de los aislamientos (Fig. 24) se observó un aumento de éste en todas, lo que está acorde con el crecimiento de las bacterias y con los que se obtienen en la fase estacionaria de desarrollo de este tipo de microorganismo (Balatti y Freire, 1996).

Según la velocidad de crecimiento y los requerimientos nutricionales y enzimáticos, los rizobios pueden dividirse en tres grupos: rizobios de crecimiento rápido, como por ejemplo los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, los rizobios de crecimiento lento como puede ser el género *Bradyrhizobium* y los de crecimiento intermedio: *Mesorhizobium* (Ben Rebah, 2007).

Según los estudios realizados por Grassano *et al* (2009), la velocidad de los rizobios de crecimiento rápido oscilan entre $\mu_{\text{máx.}}$ 0,24-0,28 h^{-1} , los de crecimiento lento $\mu_{\text{máx.}}$ 0,08-0,12 h^{-1} y los de crecimiento intermedio $\mu_{\text{máx.}}$ 0,13-0,22 h^{-1} . De tal manera, se podría afirmar, según los datos obtenidos de los aislamientos (tabla 15), que estamos en presencia de bacterias del género *Mesorhizobium*.

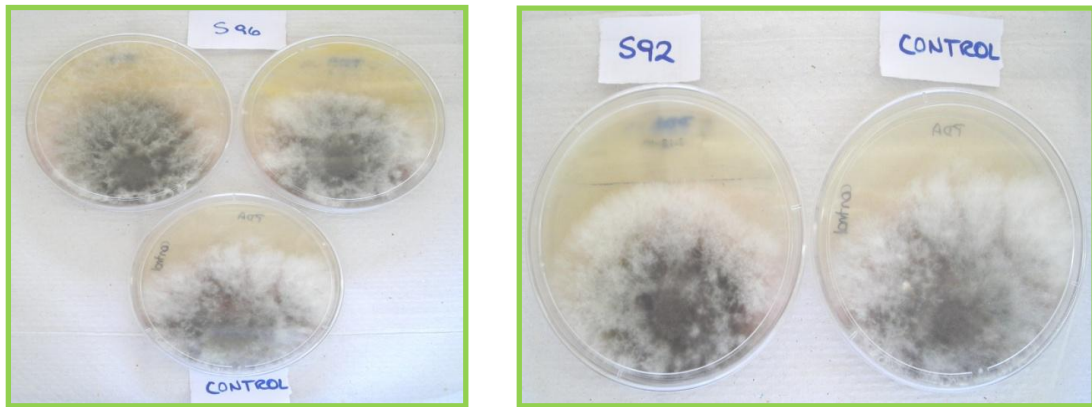
Tabla 15: Valores de velocidad de crecimiento y tiempo de generación.

S54	S92	S35
$\mu_{\text{máx}} = 0.147 \text{ h}^{-1}$	$\mu_{\text{máx}} = 0.151 \text{ h}^{-1}$	$\mu_{\text{máx}} = 0.162 \text{ h}^{-1}$
$\theta = 4 \text{ h } 41 \text{ min.}$	$\theta = 4 \text{ h } 36 \text{ min.}$	$\theta = 4 \text{ h } 16 \text{ min.}$

4.4 Ensayos de caracterización de propiedades PGPBs de las bacterias aisladas

4.4.1 Producción de Antibióticos

En este ensayo, los resultados fueron negativos (Fig. 25) para todos los aislamientos con respecto al control (*Macrophomina phaseolina*); indicando la deficiente capacidad en producción de sustancias inhibitorias ó antibióticas para este patógeno. Sin embargo, la eficiencia de estas bacterias pueden verse afectadas por varias condiciones ambientales: pH, temperatura, contenido de agua, etc. (Timmusk, 2003).



a)

b)

Figura 25: Ensayo de Biocontrol con *Macrophomina phaseolina*. a) Aislamiento S96 en comparación con el control ; b) Aislamiento S92 en comparación con el control.

4.4.2 Producción de Exopolisacáridos

De la observación realizada del ensayo correspondiente, se determinó que los aislamientos S96, S92 y S54, liberan EPS al medio (Fig. 26). De tal manera, se espera que en ensayos futuros funcionen en la protección contra el estrés ambiental, la osmoregulación y sobre todo que desempeñen un papel activo en la FBN que ocurre en la interacción rizobio-leguminosa (Spaink, 2000).

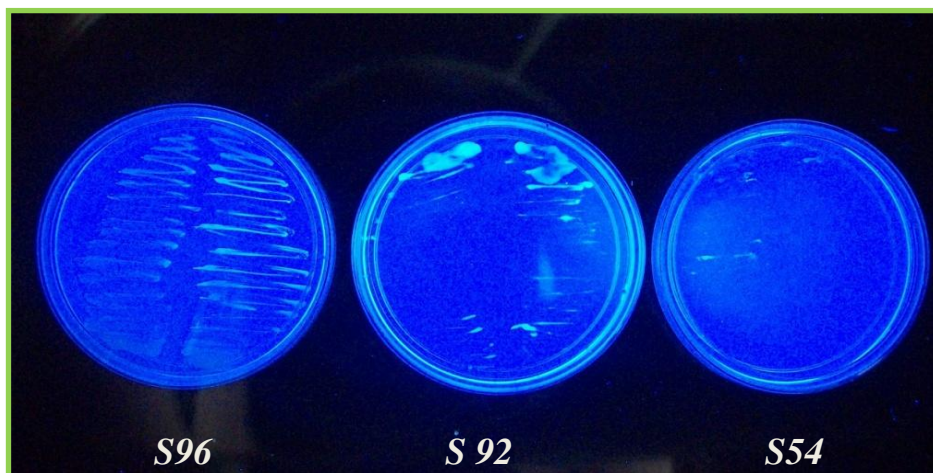


Figura 26: Visualización de la producción de EPS bajo la emisión de fluorescencia en U.V a 350 nm.

4.4.3 Hidrólisis de Almidón

En esta experiencia, se pudo observar mediante el agregado de yodo al medio, un halo de clarificación alrededor del crecimiento de los aislamientos S35 y S92 (Fig. 27), indicando que poseen ciertas enzimas (α -amilasa, entre otras), capaces de degradar el almidón, y por consiguiente tomar los monosacáridos como fuente de carbono para su nutrición (Frioni, 1990).

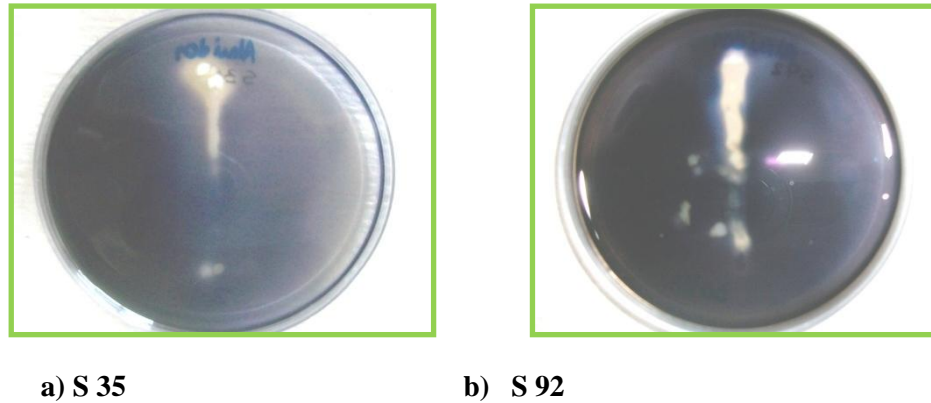


Figura 27: Resultados positivos para hidrólisis de almidón de: a) S35 y b) S92.

Por el contrario, los aislamientos S96 y S54, no generan enzimas hidrolíticas del almidón. Esto puede afirmarse por la falta de clarificación alrededor del sembrado (Fig. 28).

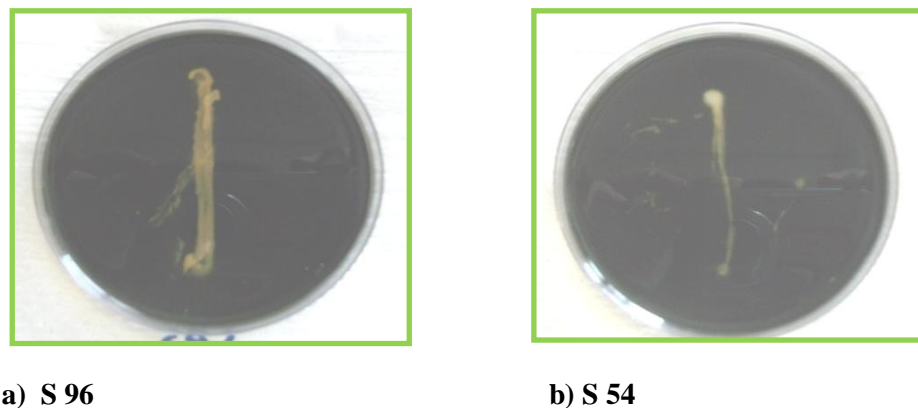


Figura 28: Resultados negativos para hidrólisis de almidón de : a) S96 y b) S54.

4.4.4 Producción de Sideróforos

Todos los aislamientos arrojaron resultados negativos respecto de la producción de sideróforos.

4.4.5 Producción de Ácido Cianhídrico

En cuanto a los resultados cualitativos obtenidos para este ensayo, se puede afirmar que los aislamientos no liberan o producen ácido cianhídrico (HCN); ya que no se pudo observar cambios en la coloración del papel de filtro impregnado con ácido pícrico (Fig. 29) (Bric *et al*, 1991).

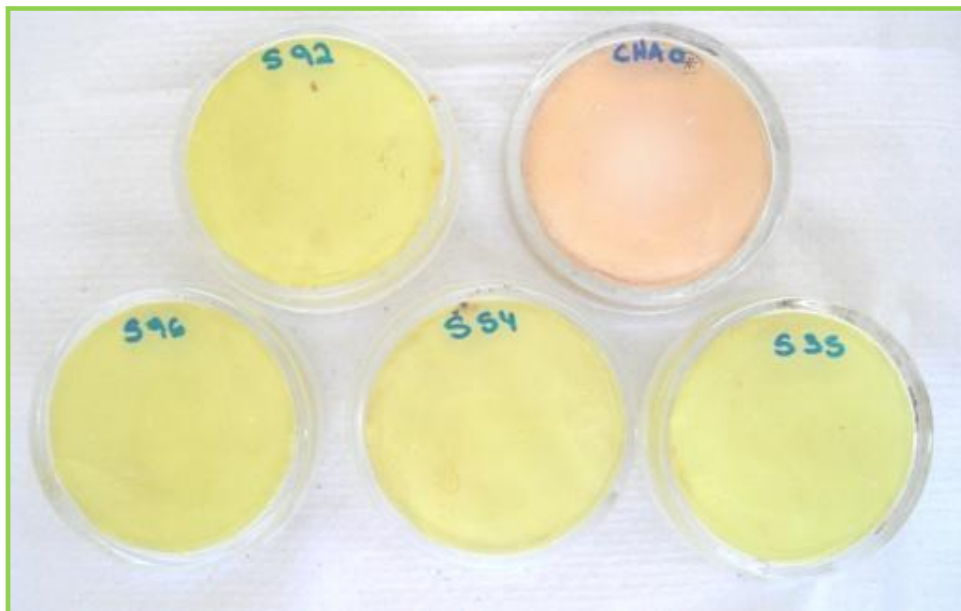


Figura 29: Resultados negativos de los aislamientos, en cuanto a la liberación de HCN, en comparación con el control.

4.4.6 Producción y cuantificación de Ácido 3-Indol-Ácético (AIA)

En ausencia de suplementación de triptofano al medio, no se obtuvo producción de AIA en los aislamientos estudiados. Se observó que uno de los aislamientos, el S92, liberó AIA cuando se suplementó el medio con 0,5 mM de triptofano.

Estos resultados pueden corroborarse cualitativamente mediante la coloración rosada, indicando la presencia de AIA. Para los aislamientos S35, S54 y S96, la coloración permaneció amarilla-amarronada, indicando ausencia de AIA (Fig. 30), en el caso del aislamiento S92, se observó un cambio de coloración. Se realizó la cuantificación, obteniéndose 55,635 $\mu\text{g/ml}$ a las 72 hs de crecimiento.

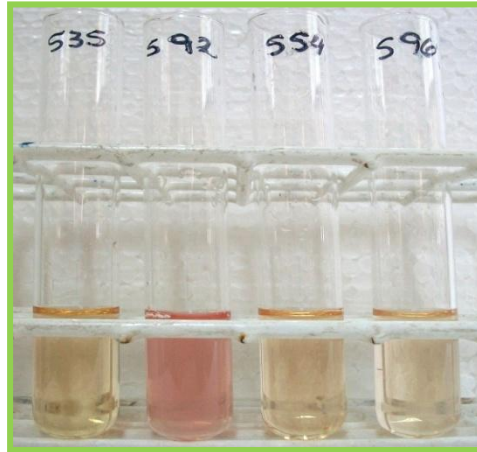


Figura 30: Fotografía del ensayo realizado para la determinación de AIA, con suplementación de triptofano 0,5 mM.

Este resultado señala que la cantidad de AIA que la bacteria produce puede afectar el crecimiento de plantas tratadas por alteración del balance hormonal (Costacurta *et al.*1995; Patten and Glick, 1996). Además, se sabe que AIA está implicado en el incremento en longitud y desarrollo de raíz, resultando un aumento en la superficie de la misma, con una mayor capacidad para acceder a los nutrientes del suelo (Príncipe *et al;* 2007).

Estudios realizados por Zakharova (1999), determinaron que en adición de triptofano, *Azospirillum brasilense* produce 15 mg/l de AIA. Según Bastian *et al.* (1998), *Acetobacter diazotrophicus* produce entre 21 y 32 mg/l de AIA. Patten and Glick (2002), demostraron que la producción de AIA en *Pseudomonas putida* oscila entre 30 y 34 mg/l.

En resumen, en cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de propiedades PGPBs, se observa que los aislamientos estudiados poseen distintos efectos de promoción de crecimiento. En la tabla 16, se muestra un resumen de estas propiedades.

Tabla 16: Cuadro resumen respecto de las propiedades PGPBs para los diferentes aislamientos estudiados.

<i>Propiedades PGPBs</i>	<i>S35</i>	<i>S54</i>	<i>S92</i>	<i>S96</i>
<i>Producción de antibióticos</i>	-	-	-	-
<i>Exopolisacáridos</i>	-	+	+	+
<i>Producción de HCN</i>	-	-	-	-
<i>Hidrólisis de Almidón</i>	+	-	+	-
<i>Sideróforos</i>	-	-	-	-
<i>AIA</i>	-	-	+	-

Hay que enfatizar la importancia del aislamiento S92 no solo por la capacidad de producir AIA, sino por las otras propiedades PGPBs que presenta y por haber sido aislado de un suelo con pH = 7,87 (considerado salino y levemente alcalino), lo cual genera perspectivas positivas en el crecimiento y desarrollo de plantas forrajeras en zonas donde es necesario mejorar la sustentabilidad de un sistema agrícola.

4.5 Ensayo en Cámara Climatizada e Invernadero

4.5.1 Cámara Climatizada

Se pudo observar cualitativamente el crecimiento de las plantas de *Lotus glaber*, inoculadas con las bacterias aisladas (S35, S54, S92 y S96) durante el período de 62 días en cámara climatizada. En los primeros 14 días, las bacterias caracterizadas como S35, S54 y S92 nodularon la leguminosa *Lotus glaber*. El desarrollo de la misma fue satisfactorio en tallo, coloración, raíz y formación de hojas, durante el correspondiente período (Fig. 31).

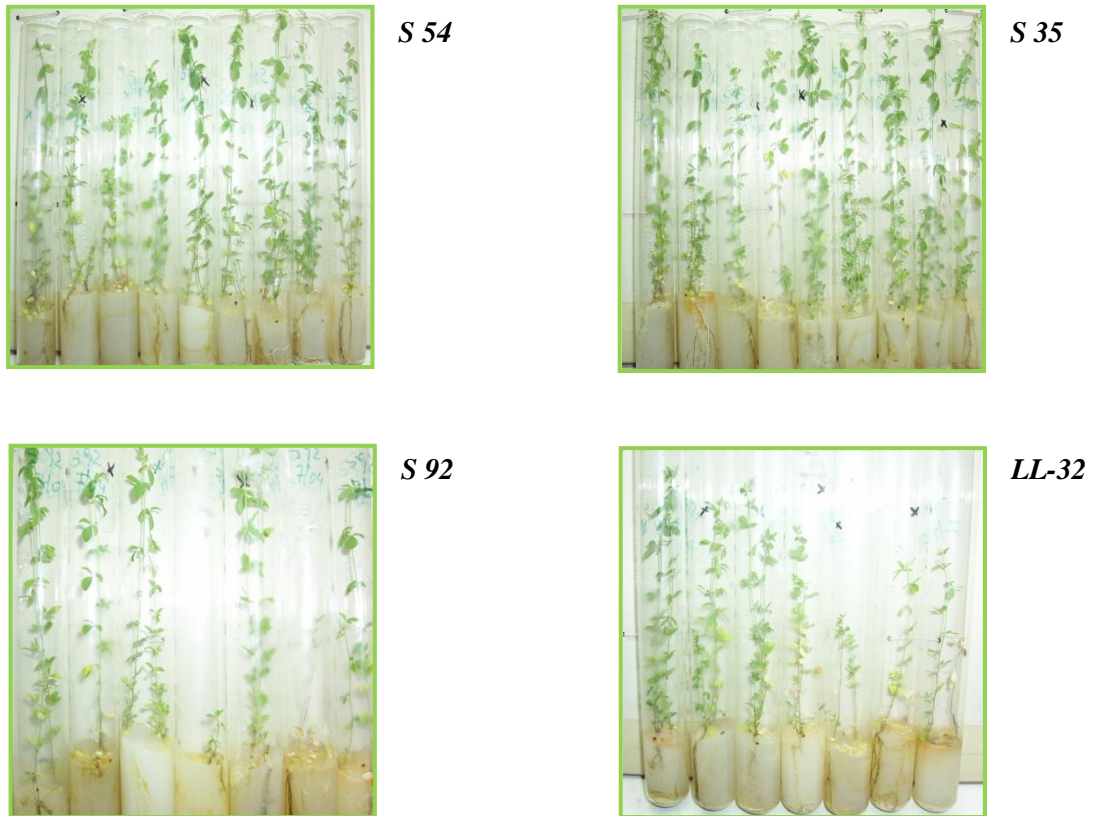


Figura 31: Visualización cualitativa de las plantas desarrolladas en cámara climatizada inoculadas con los distintos aislamientos (S35; S54; S92) y la cepa patrón LL-32; al final del ensayo.

El aislamiento S 96 (Fig. 32) en los primeros 30 días generó un crecimiento muy favorable en la leguminosa frente a los demás tratamientos inoculados. Fue muy significativo en la raíces (engrosamiento), como así también en el tallo y gran desarrollo de parte aérea. Esto puede deberse a la producción de otros compuestos promotores del crecimiento vegetal durante los primeros 30 días, los cuales no se han estudiado en este trabajo; como las citoquinas y giberelinas (Auxinas), las cuales estimulan el desarrollo radical para aumentar la absorción mineral. Kloepper (1994) sugirió que las PGPR estimulan el crecimiento vegetal facilitando la captación ó absorción de minerales, ya que poseen un sistema radical mejor desarrollado y así se incrementaría dicha absorción.

Debido a la falta de disponibilidad del nitrógeno, por ausencia de nódulos, en los días posteriores hubo una gran decadencia de las plantas, por lo que se generó marchitez en hojas y tallos, hasta muerte de los mismos.

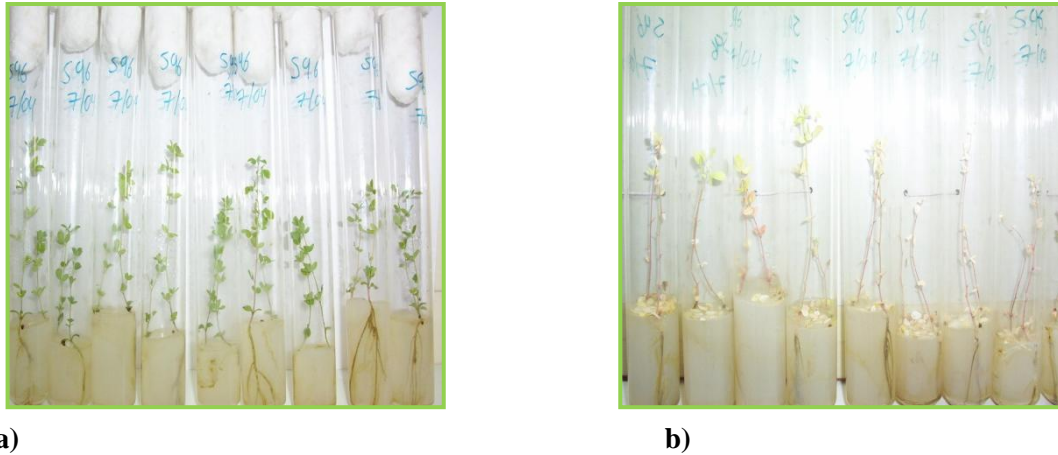


Figura 32: Desarrollo de *Lotus glaber* inoculado con el aislamiento S96; a) durante los primeros 30 días; b) a los 62 días.

4.5.1.1 Parámetros Evaluados

- **Peso Seco**

El análisis de varianza realizado mostró que existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Fig. 33).

Por medio del método Tukey ($p < 0,01$), se analizó que existen diferencias significativas entre los tratamientos inoculados (S35, S54 y S92) y el testigo.

Existen diferencias significativas entre las plantas inoculadas con el aislamiento S35 y las plantas inoculadas con la cepa patrón LL-32.

No existen diferencias significativas entre los tratamientos S54 y S92 respecto de las plantas inoculadas con la cepa patrón.

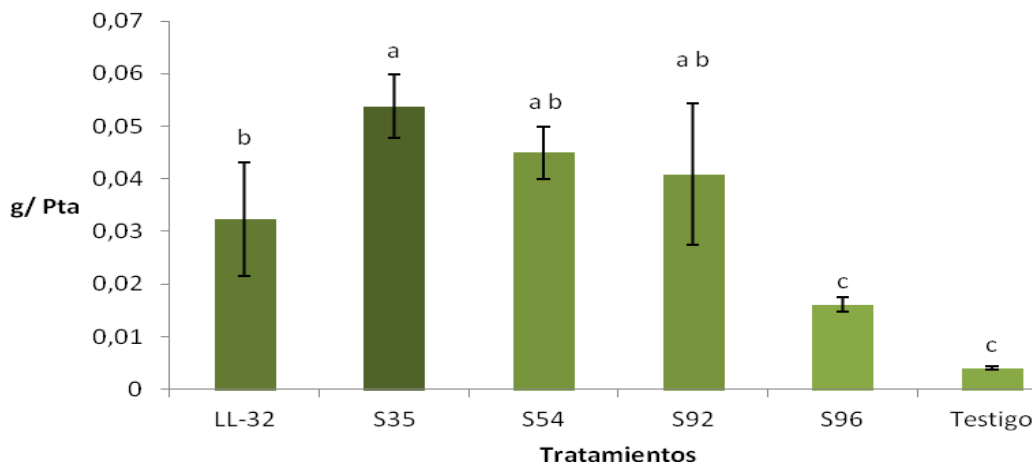


Figura 33: Peso Seco de parte aérea (g) por planta en los diferentes tratamientos estudiados, mostrando la variabilidad del ensayo. * Letras distintas indican diferencias significativas.

Del análisis estadístico podemos destacar que el tratamiento S96 difiere significativamente con todos los demás excepto con el testigo, tal como se pudo observar cualitativamente (Fig. 34).

En la figura 34 se observa en forma cualitativa lo expuesto en el análisis cuantitativo.



Testigo S35 S54 S92 S96 LL-32

Figura 34: Plantas de *Lotus glaber* inoculadas con los diferentes aislamientos en comparación con el Testigo y cepa patrón LL-32.

- **Contenido de N total**

En el gráfico (Fig. 35) se puede observar que el contenido de N es significativamente mayor en las plantas inoculadas con las bacterias aisladas (S92, S54 y S35) que el testigo sin inocular.

En comparación con la cepa patrón LL-32, se destaca el mayor contenido de N en los tratamientos inoculados con los aislamientos S35 y S54, sin ser estos significativamente distintos entre sí.

En cuanto al aislamiento S96, el contenido de N fue inferior al determinado en el testigo sin inocular, sin ser significativamente diferentes.

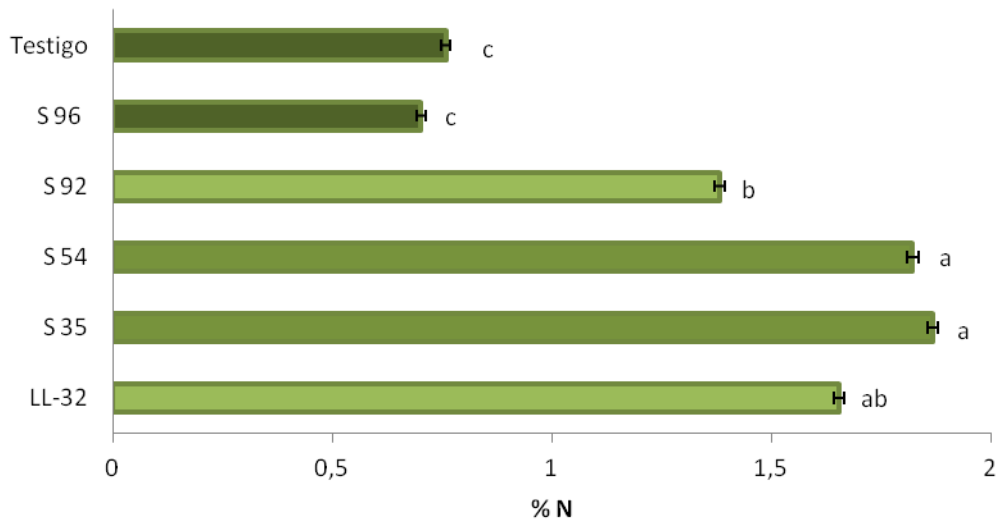


Figura 35: Porcentaje de N (parte aérea de las plantas) en los distintos tratamientos. * Letras distintas indican diferencias significativas.

Luego del análisis de los dos parámetros considerados, se decidió realizar un gráfico de correlación de los mismos (Fig. 36).

Se determinó que existe una correlación entre el contenido de N y los valores de peso seco obtenidos. Dando un coeficiente de correlación de $r^2: 0,852$, lo cual es muy satisfactorio para ensayos posteriores.

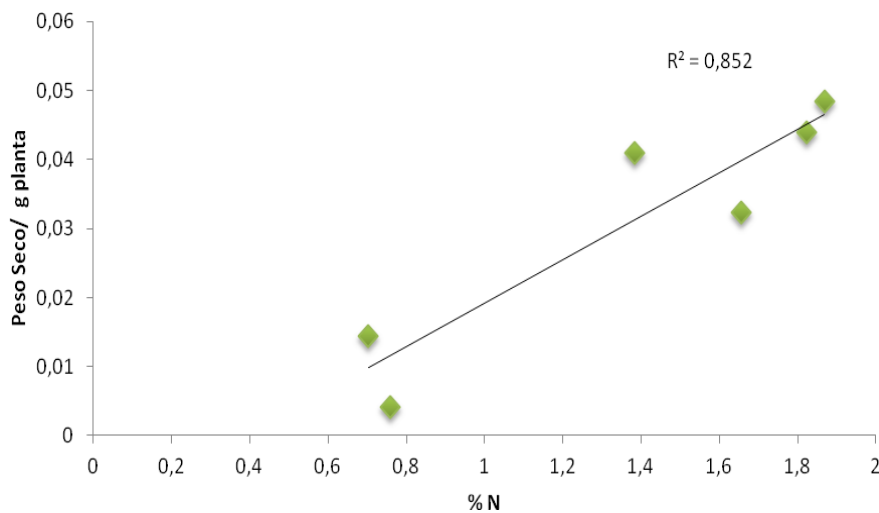


Figura 36: Correlación entre % N y Peso Seco por gramo de planta de parte aérea.

- **Índices de Eficiencia a la Inoculación**

Si se observan los valores de la tabla 17 en todos los casos, excepto en el tratamiento inoculado con S96, los porcentajes exceden al valor de 70%, considerado como aceptable para proseguir los estudios de eficiencia a otro nivel de ensayos (Grassano.*et al*, 1996). Además, es mayor la eficiencia respecto a la cepa patrón en las plantas inoculadas con S35, S54 y S92.

Tabla 17: Índices de Eficiencia a la Inoculación

<i>Cepas</i>	<i>IEI (respecto testigo sin inocular)</i>	<i>IEIc (respecto al patrón)</i>
S35	91,5%	57,1%
S54	90,6%	40,9%
S92	89,9%	30,4%
S96	25,2%	-36,6%
LL-32	87,2%	

4.5.2 Invernadero

Se observó el crecimiento de *Lotus glaber*, con el agregado de cada suspensión bacteriana (S35; S54; S92) más el agregado de la solubilizadora de fosforo SP 8W (*Pseudomona* aislada de suelos de la localidad de Winifreda) durante un período de 65 días.

A los 12 días, se procedió a eliminar algunas plantas para mantener 3 plantas por vaso. Se pudo visualizar en ese momento, la formación de los primeros nódulos en los tratamientos: SP 8W + S35; SP 8W + S54 y SP 8W + S92. Indicando la capacidad de nodulación de los aislamientos.

Durante los 65 días, las plantas crecieron de manera muy satisfactoria en cuanto a desarrollo y longitud, tanto en parte aérea como radicular.

Como puede visualizarse en las fotografías (Fig. 37), el desarrollo fue muy similar en los tratamientos SP 8W + S35 y SP 8W + S92. Por el contrario, se destacó el bajo crecimiento de SP 8W + S54, frente a los dos tratamientos anteriormente nombrados.

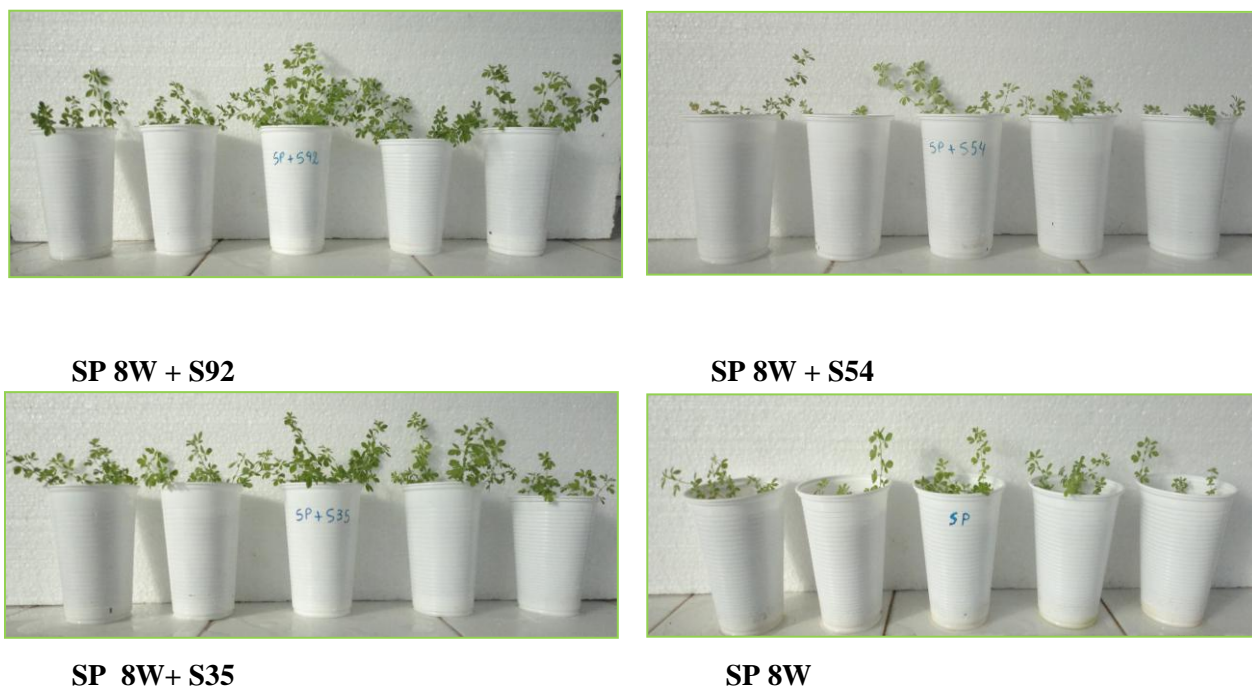


Figura 37: Visualización cualitativa de los tratamientos realizados.

En comparación de los tratamientos SP 8W +S54 y SP 8W, podemos observar que hay una leve diferencia entre los mismos; siendo el primero de mayor desarrollo aéreo que el segundo, debido a la disponibilidad de N que se le otorga a la planta.

4.5.2.1 Parámetros Evaluados

- **Peso seco**

Se realizaron análisis de varianzas según el método Tukey ($p < 0,01$), el cual nos permitió evaluar los datos obtenidos de los distintos tratamientos (Fig. 38).

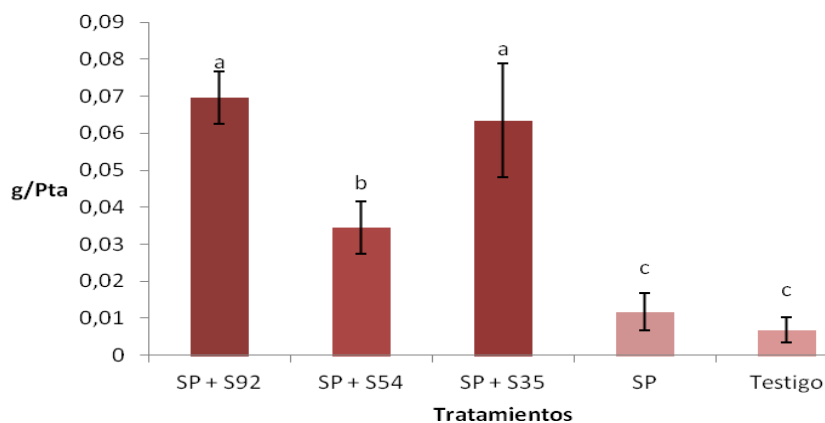


Figura 38: Peso Seco de parte aérea (g) por planta en los diferentes tratamientos estudiados, mostrando la variabilidad del ensayo. * Letras distintas indican diferencias significativas.

Del análisis estadístico, podemos afirmar que existe un efecto promotor significativo de todos los tratamientos respecto al testigo, debido a la mayor disponibilidad de N, P y a un incremento de la masa radicular (Fig. 39).

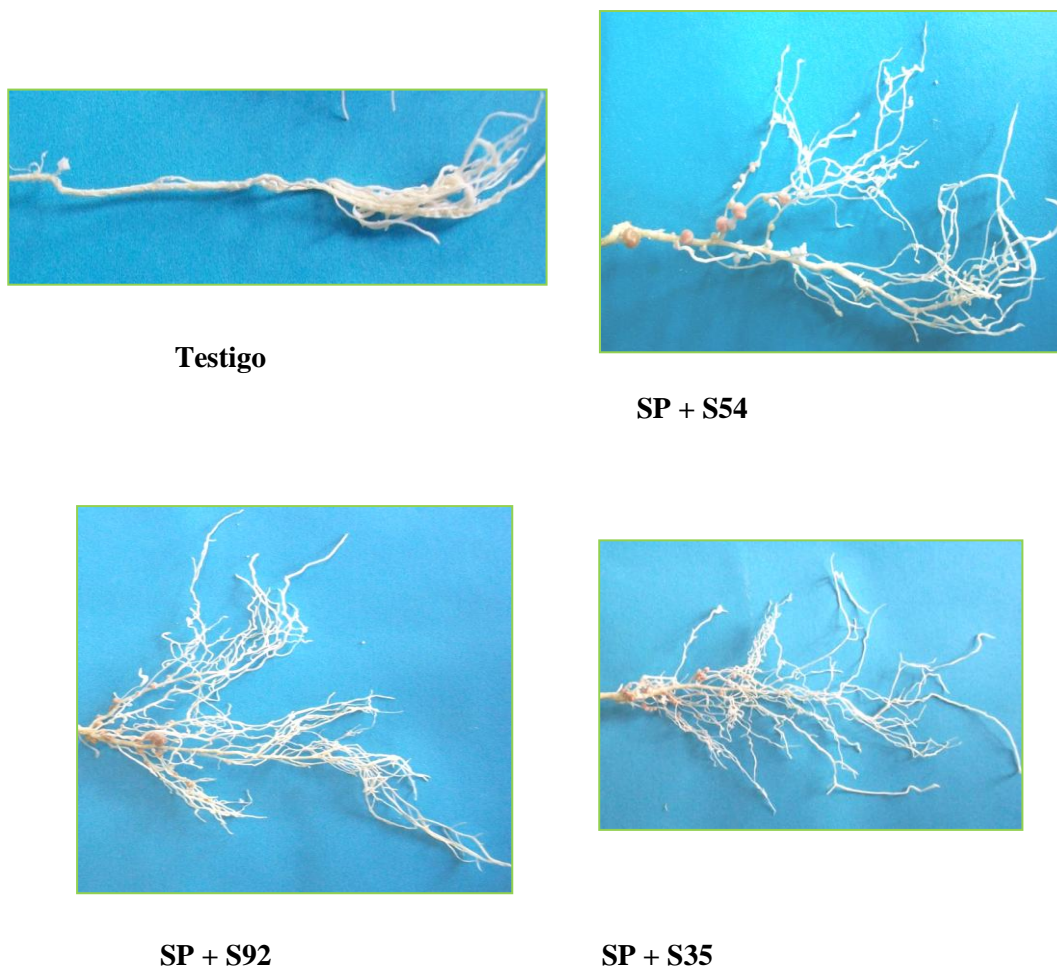


Figura 39: Comparación de raíces de los aislamientos estudiados y el testigo.

Los tratamientos coinoculados presentan diferencias significativas frente al testigo y frente al tratamiento inoculado únicamente con la solubilizadora de fósforo, debido al efecto de FBN más la disponibilidad de P.

También podemos inferir que existen diferencias significativas entre los tratamientos coinoculados con SP 8W+ S92 y SP 8W + S54, lo que se explicaría por la producción de AIA (55,635 $\mu\text{g/ml}$) de S92 y de las otras propiedades PGPBs informadas; ese mismo efecto promotor marca una tendencia sin llegar a ser significativa respecto a SP 8W + S35.

Se destaca que el aislamiento S92 debido a la producción de AIA más el efecto promotor de la solubilizadora de P, generó un mayor desarrollo radicular en las plantas, lo que explicaría su mayor rendimiento en comparación con los resultados obtenidos en el ensayo en cámara.

Esto coincide con estudios realizados por Barbieri *et. al* (1993), mostrando que la producción de AIA por *Azospirillum brasilense* puede estimular la formación de raíces laterales en plántulas de trigo. Según experiencias de Dubeikovesky *et al.* (1993), la producción de AIA por *Pseudomonas fluorescens* estimula el desarrollo radicular.

- **Contenido de N total**

En el grafico (Fig. 40) se puede observar que el contenido de N es mayor en las plantas inoculadas con SP 8W+S92 y SP 8W+S35, que los tratamientos inoculados únicamente con la cepa solubilizadora, sin ser significativos.

En comparación con el testigo, existen diferencias significativas con respecto a todos los tratamientos.

Existen diferencias significativas entre el tratamiento SP 8W+S54, con respecto a SP 8W+S92, SP 8W+S35 y SP 8W.

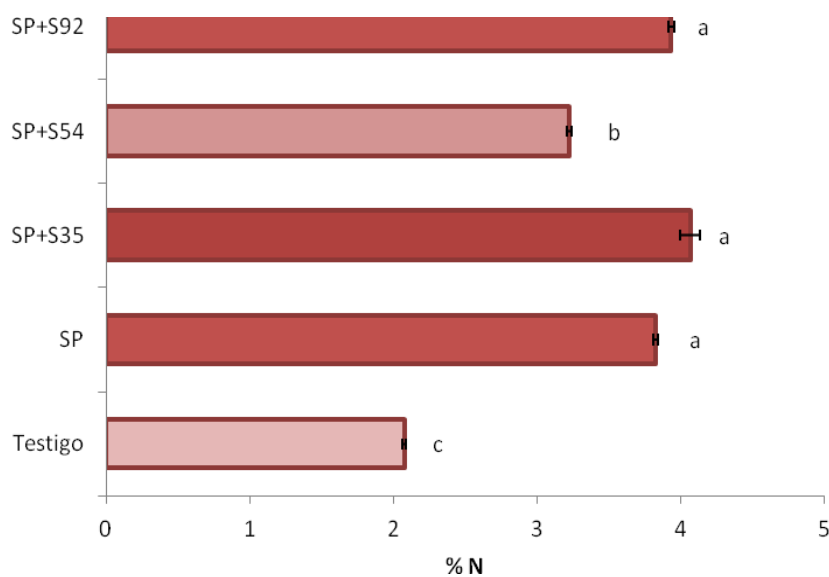


Figura 40: Contenido de N (parte aérea de las plantas) en los distintos tratamientos.

* Letras distintas indican diferencias significativas.

Se graficó (Fig. 41) la correlación entre peso seco y porcentaje de N.

Se pudo observar, que existe correlación entre dichos parámetros, pero inferior que la obtenida en cámara climatizada. Podemos inferir que la aplicación de bacterias solubilizadoras de fósforo afecta la correlación de estos dos parámetros.

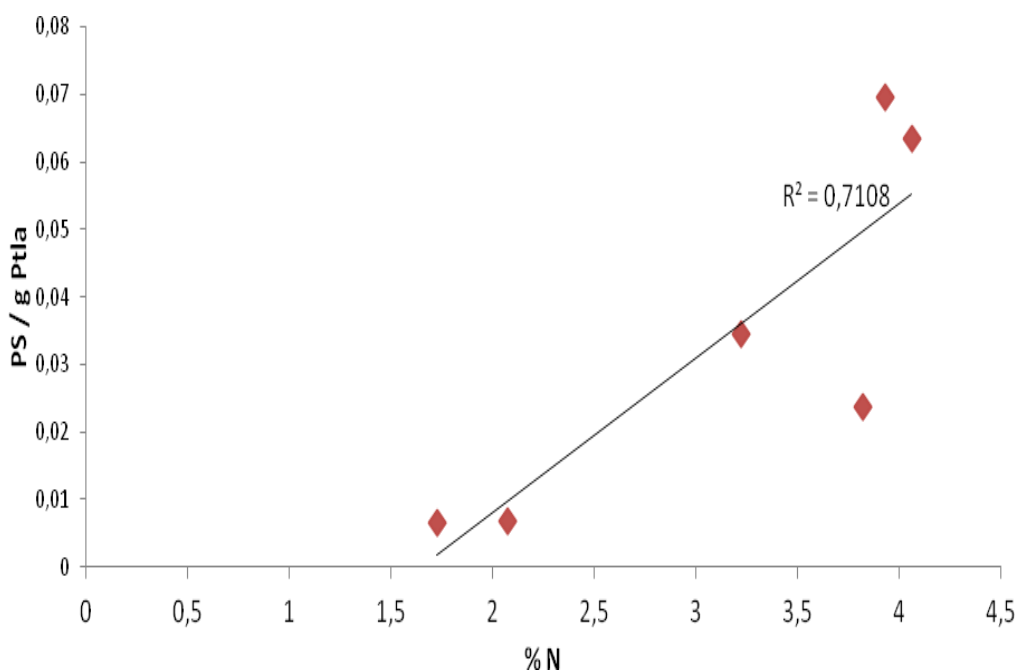


Figura 41: Correlación entre PS y %N por gramo de planta de parte aérea

- **Índices de Eficiencia a la Inoculación**

En cuanto al análisis de estos resultados (tabla 18), se pudo observar que los tratamientos SP 8W+S92, SP 8W+S35 y SP 8W+S54 exceden al valor de 70% considerado como aceptable. El tratamiento inoculado sólo con SP queda por debajo de este valor, demostrando la carencia de N, que en los otros casos es suministrado por la simbiosis rizobio-leguminosa.

Tabla 18: Índices de Eficiencia a la Inoculación

Tratamientos	IEI (respecto testigo sin inocular)
SP 8W	41,63%
SP 8W + S92	90,15%
SP 8W + S54	80,18%
SP 8W + S35	89,19%

La caracterización de las bacterias aisladas permitió:

- ◆ Observar que los aislamientos S35, S54 y S92, pueden corresponder a la especie *Mesorhizobium loti*, según los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización: tinción de Gram, electroforesis de izoenzimas, parámetros biotecnológicos y respuesta a la inoculación.
- ◆ Observar que el aislamiento S96, no corresponde a la especie *Mesorhizobium loti*, según los resultados arribados por los parámetros evaluados.

La caracterización de propiedades PGPBs de las bacterias aisladas permitió:

- ◆ Comprobar que los aislamientos S54, S92 y S96, poseen la capacidad de producir exopolisacaridos al medio, de gran importancia en el proceso de FBN, en la iniciación y formación del nódulo en la planta.
- ◆ Comprobar que los aislamientos S35 y S92, tienen la capacidad de hidrolizar almidón, con el fin de tomarlo como fuente de carbono para su nutrición.
- ◆ Determinar que todos los aislamientos (S35, S54, S92 y S96), no generan sustancias inhibitorias (HCN, sideróforos) al medio, ni poseen capacidad de biocontrol frente al patógeno probado.
- ◆ Determinar que el aislamiento S92 posee la capacidad de producir ácido 3-indol-acético (AIA), indicándose como muy promisorio debido a que esta fitohormona genera un efecto promotor en cuanto al desarrollo radicular.

Del ensayo en cámara climatizada, se pudo arribar a las siguientes conclusiones:

- ◆ Los aislamientos estudiados (S35, S54 y S92) son importantes en cuanto a sus propiedades de infección y efectividad según los valores obtenidos en los parámetros evaluados (en relación a la FBN); ya que se obtuvieron diferencias significativas respecto del tratamiento con limitación de nitrógeno (testigo).
- ◆ Estos aislamientos poseen valores que exceden el 75% de eficiencia a la inoculación, considerado como promisorio para otros estudios agronómicos y biotecnológicos considerando una posible transferencia.
- ◆ En cuanto al aislamiento S96, indicó una deficiencia e ineffectividad en relación a los parámetros evaluados en la FBN en *Lotus glaber*, aunque manifestó otras capacidades PGPBs.

Del ensayo en Invernadero, se pudo concluir:

- ◆ En relación a los parámetros estudiados, los aislamientos S35, S54 y S92 coinoculados con la solubilizadora de fósforo, muestran una mayor efectividad y eficiencia en relación al inoculado solo con la solubilizadora de fósforo (*Pseudomona*) y al testigo, debido a una mayor disponibilidad de N y P en el medio, siendo corroborado por los valores de IEI.

Perspectivas Futuras

Si bien estos resultados son preliminares y es necesario realizar estudios en condiciones que involucren competitividad, se puede inferir su posible aplicación en inoculantes en función de sus parámetros biotecnológicos y de los resultados de eficiencia, para suelos con condiciones limitantes, dado que los aislamientos provienen de suelos salinos, levemente sódicos.

Se deberían continuar los estudios para el aislamiento S92 en razón de los distintos efectos promotores de crecimiento vegetal que presenta (FBN, producción de AIA, producción de exopolisacáridos e hidrolizar almidón).

Es importante resaltar la actividad potenciadora de S96 para iniciar una etapa de estudios de coinoculación.

- Alexander M. (1980). “Introducción a la Microbiología del Suelo”. *AGT Editores*, Mexico pp. 234-362.
- Antoun H, Presvost D. (2006). “Ecology of Plant growth promoting rhizobacteria”. In *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer. Netherlands. pp 1-38.
- Arambarri, A. M, (1983). “Morfología y anatomía de las semillas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* (Leguminosae-Papilionoideae)”. *Rev. Fac. Agron. La Plata*. 59: 175-189.
- Atlas, R. M. (2002). “Ecología microbiana y microbiológica ambiental”. 4ª ed. *Pearson Educacion S.A* Madrid, España pp. 429-430.
- Azcón, R. and Barea, J. M. (1997). “Mycorrhizal dependency of a representative plant species in a Mediterranean shrublands (*Lavanduca spica* L.) as key factor to its use for revegetation strategies in a desertification-threatened areas”. *Applied Soil Ecology* 7:83-92.
- Azcón- Bieto J, Talón M, (2000). “Fundamentos de fisiología Vegetal”. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana. España,pp 522.
- Balatti, P.A, (1996). “Interacciones tempranas Rhizobio-leguminosa”. *Rev. Fac. De Agron. La Plata*. 101: 91-108.
- Balatti A.P., y Jardim Freire J. R. (1996). Cap 4 “Maintenance of Rhizobium and Bradyrhizobium strains” In: *Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management*. Facultad de Cs. Exactas y Naturales (UNLPam) y Centro de Microbiologia de Puerto Alegre, Brasil.
- Bangera, M. G and Thomashow, L.S (1996). “Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2-4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol Plant Microbe Interact* 9,83-90.
- Barbieri, P., Zanelli, T., Galle, E., Zanetti, G. (1993). “Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole- 3-acetic acid production”. *Res. Microbiol.* 144, 69 -75.

- Bashan Y, Holguin G. (1998). "Proposal for the division of plant growth-promoting Rhizobacterias into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB". *Soil Biol. Biochem.* 30:1225-1228.
- Bashan Y, Levanony H. (1990). "Current status of *Azospirillum* as a challenge for agriculture". *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998). "Production of Indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media". *Plant Growth Reg.* 24, 7 -11.
- Ben Rebah, F et al. (2007). "Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review". *Biores. Technol.* 98, 3535-3546.
- Beuselinck, P.R., Ben Younes, M and McGraw, R.L. (1986). "Taxonomic investigation of an accession of *Lotus* spp". *Crop Sci.* 26: 661-664.
- Bohlool B. (1990). "Introduction to nitrogen fixation in agriculture and industry: contribution of BFN to sustainability of agriculture". Gresshoff, PM, Rhoth L.E, Stacey G, Newton W.E (Eds.) *Nitrogen fixation: achievements and objectives.* Chapman and Hall, New York. Pp 613-616.
- Bric J. M, Bostock R. M , Silvestones S. E (1991). "Rapid in situ Assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a Nitrocellulose Membrane". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 57 N°2, 535-538.
- 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.
- Caballero-Mellano J. (2006). "Microbiología Agrícola e Interacciones Microbianas con plantas". *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2): 154-161.

- 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.
- Chen Y, P.; Rekha , P. D; Arun, A. B; Shen, F. T ; Lai, W. A; Young, C. C (2006). “Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities”. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Correa, O.S and Barneix, A.J, (1997). “Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizonium loti*”. *World J. Microb Biot.* 13: 153-157.
- Costacurta, A, Keijers, V and Vanderleyden, J. (1995). “Molecular cloning and secuence analysis of an *Azospirillum brasilence* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243: 463-472.
- Diaz, P., Borsani, O. and Monza, J. (2005). “Lotus-related species and their agronomic importance”. In *Lotus japonicas Handbook* ed Marquez, A.J., Stougaard, J., Udvardi, M., Parniske, M., Spaink, H., Saalbach, G., Webb, J. and Chiurazzi, M. pp. 25-37 Berlin: Springer Netherlands.
- Dowling, D.N., R. Sexton, A. Fenton, I. Delany, S. Fedi, B. McHugh, M. Callanan, Y. Moënné-Loccoz y F. O’Gara. (1996). “Iron regulation in plant-associated *Pseudomonas fluorescens* M114: implications for biological control”. In: *Molecular Biology of Pseudomonads*, eds. T Nakazawa, K Furukawa, D Haas, S Silver, 502-511. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Dowling, D.N. y F. O’Gara. (1994). “Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease”. *Trends Biotechnol.* 12: 133-141.
- Dubeikovesky, A.N., Modokhova, E.A., Kocheskov, V.V., Polikarpova, F.P., Boronin, A.M. (1993).” Growth promoyion of blackcurrant softwood cuttings by

recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indol-3-acetic acid”. *Soil. Biol. Biochem.* 25, 1211 -1221.

- Fernández Canigia, M.V (2003). “Manual de nodulación”. www.nitrugin.com.ar
- Fett, W.A ; Osman, S. F; Dunn, M. F (1987). “Auxin Production by Plant-Pathogenic *Pseudomonads* and *Xanthomonads*”. *Applied and Environmental Microbiology.* 53;8:1839-1845.
- Fraysse, N., Couderc, F and Poinso, V. (2003). “Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis”. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380.
- Frioni, L. (1990).”*Ecología Microbiana del Suelo*”. Dpto. Publicaciones, Universidad de la Republica, Montevideo, 517 pp.
- Frommel M, Nowak J, Lazarovits G (1991). “Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *Tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp”. *Plant Physiol.* 96: 928-936.
- Garate A, Bonilla I (2000). “Nutrición mineral y producción vegetal”. Azcon- Bieto J, Talon E (Eds). *Fundamentos de fisiología vegetal.* McGraw-Hill Interam. Madrid, España. Pp: 113-130.
- García Breijo, F. J. (2006). “*Biología y Botánica, parte III: El Funcionamiento de las Plantas*”. Universidad Politécnica de Valencia.
- Grassano, A., Ronchi, A. L., Garcia, P., Mazzaferro, L y Breccia J. (2009). “Quantitative relationship between maximum growth rates and the intracellular pattern of α -esterase and β -esterase activity of leguminous infecting bacteria”. *New Biotechnology*, Vol 26 N°5.
- Grassano, A., Ronchi, A.L y Balatti, A.P.(1996). “Respuesta de alfalfa a la inoculación en áreas de la provincial de La Pampa”. *RIA-INTA.* Vol 26 (2): 1-14.

- González-Chávez M. (2005). “Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos”. *TERRA Latinoamericana*, 23(1): 29-37.
- Halbleib C.M. and Luden P.W. (2000). “Regulation of biological nitrogen fixation. J. Nutr”. Cap. 130, Pag. 1081-1084.
- Hatch D, Goulding K and Murphy D. (2002). “Nitrogen”. *In: Agriculture, Hydrology and Water Quality*. P M. Haygarth and S. C. Jarvis (eds) pp. 7-27. CAB International. Wallingford, Oxon. UK.
- Johansson F, Paul L, Finlay R. (2004). “Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture”. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 1-13.
- Jurkevitch, E.; Hadar, Y.; Chen, Y. (1992). “Diferential Siderophore Utilization and Iron Uptake by Soil and Rhizosphere Bacteria”. *Applied and Environmental Microbiology*. 58;1 :119-124.
- Kade, M., Pagani, E.E and Mendoza, R.E, (2003). “Phosphorus utilization efficiency in populations of narrow-leaf birdsfoot trefoil”. *Commun. Soil Sci and Plant Analysis*. 34: 271-284.
- Kade, M., Pagani, E.A and Mendoza, R.E, (2003). “A morphological study of population of Lotus Glaber Mill”. (Fabaceae). *Agronomie* 23: 203-207.
- Kirkbride, J.H.Jr (1995). “Proposal to reject the name Lotus glaber Mill”. (Leguminosae). *Taxon* 44: 423-424.
- Kirkbride, J.H.; (1999). “Lotus systematic and distribution. In: Beuselinck PR, ed Trefoil: the science and technology of lotus”. *CSSA Special Publication n° 28*. American Society of Agronomy, pp 1-20.
- Kloepper J.W, Lifshitz R, Zablotowics R.M (1989). “Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity”. *Trends Biotechnol*. 7:39-43.

- Kloepper JW, Schippers B, Bakker PAHM. (1992). “Proposed elimination of the term endorhizosphere”. *Phytopathology*, 82: 726-727.
- Kloepper J.W. (1994). “Plant growth promoting rhizobacteria (other system)”. En: *Azospirillum/Plant Association* (Y Okon, Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 135-166.
- Kutuk C., Cayci G., Heng L.K. (2004).”Effects of increasing salinity and N15 labelled urea levels on growth, N uptake, and water use efficiency of youngtomato plants”. *Australian Journal of Soil Research* 42: 345-351.
- Leinweber P, Turner BL. And Meissner R.(2002).“Phosphorus”. *In: Agriculture, Hydrology and Water Quality*. P M. Haygarth and S. C. Jarvis (eds) pp.29-55. CAB International. Wallingford, Oxon. UK.
- Lugtenberg B, Kamilova F. (2009). “Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria”. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63: 541-556.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003). “Brock-Biology of Microorganisms”. 10° ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, cap. 5, 17, 19.
- Mäder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P and Niggli U, (2002). “Soil fertility and biodiversity in organic farming”. *Science* 296: 1694-1697.
- Mazliak. P. (1976). Cap. 4 “Nutrición nitrogenada”. En *Fisiología Vegetal, Nutrición y Metabolismo*. Ed. Omega S.A; Barcelona.
- 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.

- Mendoza R.E, Escudero, V and Garcia, I., (2005). “Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil”. *Plant and soil*. 275:305-315.
- Miñon, D.P, Sevilla, G.H., Montes, L. y Fernandez, O.N. (1990). “*Lotus tenuis*: leguminosa forragera para la pampa Deprimida”. Unidad Integrada Balcarce. FCA-EEA Boletín Técnico N 98. pp 16.
- McInnes A and Haq K.(2007). “Contributions of Rhizobia to Soil Nitrogen Fertility”. In: *Soil Biological Fertility*, L K Abbott and D V. Murphi (eds). Springer pp. 99-128.
- Montes L.; (1998). “Narrow-leaf trefoil naturalized in low-land fields in Buenos Aires Province (Arg.)”. *Lotus newsletter* 11: 9-10.
- Montes, L. (1988) “*Lotus tenuis*”. *Rev argent prod anim* **8**, 367-376.
- Muller HG (1988). “An introduction to tropical food science”. Cambridge University Press.
- Munns R. and Tester M. (2008). “Mechanisms of salinity tolerance”. *Annual Review of Plant Biology* 59.651-681.
- 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.
- Neilands, J. B. (1995). “Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds”. *The Journal of Biological Chemistry* 270;45: 26723-26726.
- Ochoa, M.S; Pedraza, R. M; Trujillo, M.M y Abud, Y. C.(2010). “Plantas, hongos micorrizicos y bacterias: su compleja red de interacciones”. Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico.

- Odeh I.Q.A and Onus A. (2008). “Spatiol analysis of soil salinity and soil structural stability in a semiarid región of New South Wales, Australia”. *Enviornmental Management* 42: 265-278.
- Olivares Pascual J. (2006). “Fijación biológica de Nitrógeno”. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. España.
- O’Sullivan, D.J, O’Gara F. (1992). “Traits of fluorescents *Pseudomonas spp* involved in suppression of plant root pathogens”. *Microbiology. Rev.* 56:662-676.
- Patten, C.L., Glick, B.R. (2002).“ Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in development of the host plant root system”. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3795-3801.
- Patten, C.L., Glick, B.R. (1996). “Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid“. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- Pierson, L.S., Gaffney, T.,Lam,S.& Gong, F. (1995). “Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens*”. 30-84. *FEMS. Microbiol Lett* 134, 299-307.
- Pierson, L.S and Pierson, E.A (1996). “Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: Role in rhizosphere ecology and pathogen suppression”. *FEMS. Microbiol Lett* 136, 101-108.
- Príncipe, A., Alvarez, F., Castro, M., Zachi, L., Fischer, S., Mori, G., jofré, E. (2007). “Biocontrol and PGPR Features in Native Strains Isolated from Saline Soils of Argentina”. *Current Microbiology*, Vol. 55, pp 314-322.
- Refi, R.O. and Escuder, C.J. (1998). “Nitrogen fixation by *Trifolium repens* and *Lotus tenuis* based pastures in the Flooding Pampa, Argentina”. *Agronomie.* 18: 285-297.
- Rengasamy P. (2006). “World Salinization with emphasis on Australia”. *Journal of Experimental Botany* 57:1017-1023.

- Rickert, A.A., Soria, M.A and Correa, O.S. (2000). “The adaptive acid response in *Mesorhizobium* sp2. *World J. Microb. Biot.* 16: 475-480.
- Richardson A. E,(2001). “Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants”. *Aust. J. Plant Physiol.* 28,897-906.
- Richardson A. E, George T S, Hens M and Simpson R J; (2005). “Utilisation of soil organic phosphorus by higher plants”. *In: Organic Phosphorus in the Environment.* Eds. B L Turner, E Frossard and D S Baldwin. Pp. 165-184. CAB International, Wallingford.
- Rogers, M.E., Noble, C.L. and Pederick, R.J. (1997). “Identifying suitable temperate forage legume species for saline areas”. *Aust. J. Exp. Agr.* 37: 639-645.
- Ruz, E., Acuña, H., Zagal, E., Barreintos, L. y Pincheira, A. (1999). “Variación en las tasas de fijación simbiótica de nitrógeno en tres especies del género *Lotus* por efecto del corte y del pastoreo”. *Agricultura Técnica.* 59: 35-44.
- Saeki, K (2010). “Rhizobial measure to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model Systems”. *Cell. Mol. Life Sci.* Springer Basel A.G.
- Sánchez, L. (2006) “Metabolito bacteriano a partir de *Burkholderia cepacia* como agente biocontrolador en cultivos de interés agrícola”.
- Shaw V. K. and Brill W. J. (1977). “Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 3249-3253.
- Schippers, B., A.W. Bakker y A.H.M. Bakker (1987). “Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practice”. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 339-358.
- Schlegel H.G (1993). “General microbiology”. 7 ed. Cambridge University Press, pp. 234-244, 446-464.

- Seany R.R. and Henson P.R. (1970). Birdsfoot trefoid. “Advances in Agronomy”. Cap. 22, pag. 119-157.
- Spaink H. P. (2000). “Root nodulation and infection factors produced by rhizobial Bacteri”. Ann. Rev. Microbiol. 54: 257-288.
- Solomonson L. P. (1981). “Cyanide as a metabolite inhibitor”. In Cyanide in Biology. Ed. B. Benesland 11-28. Academic Press, London U.K.
- Sprent J.I. (2001). “Nodulation in legumens”. Review Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Sylvia, D. M.(2005). “Principles and applications of soil microbiology”. Segunda Edicion. Pearson/*Prentice Hall*. New Jersey, USA, pages 259-306.
- Timmusk S. (2003). “Mechanism of Action of the Plant Growth Promoting Bacterium *Paenibacillus polymyxa*”. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Science and Tecnology* 908. 40pp. Uppsala. ISBN 91-554-5802-5.
- Torres-Rubio, M. G; Valencia, S.A; Bernal, J.; Martinez, P. (2000). “Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*, producers of Indole 3- Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere”. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 42:171-176.
- Uggla, C.; Moritz, T ; Sandberg, G; Sundberg, B. (1996). “Auxin as a Positional Signal in Pattern Formation in Plant”. *Proceeding of the National Academy of Science*. 93:9282-9286.
- 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.

- Urzúa, H. (2000). “ Fijación Simbiótica de Nitrogeno en Chile: Importante herramienta para una agricultura sustentable”. Publ. XX Reunion Latinoamericana de Rhizobiología (IDEMA/U.S. Agustín). Arequipa, Perú. 221-228.
- Vignolio, O.R and Fernandez, O.N. (1999). “Germination and emergence of populations of *Lotus tenuis* (Waldst) under saline conditions and in defferent soil”. *J. Appl. Seed Prod.* 17:55-60.
- Voisard, C., C. Keel, D. Haas y G. Défago. (1989). “Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions”. *EMBO J.* 8: 351-358.
- Von Lützow M, Leifeld J, Kainz M, Kögel-Knabner I and Munch JC, (2002). “Indications for soil organic matter quality in soil under different management”. *Geoderma* 105: 243-258.
- Wang, T and Romero-Martinez, J. (2005). “Taxonomia de Rhizobium”. Dpto, de Microbiología, Esc. Nacional de Cs. Biológicas, Instituto Politécnico Nacional y Centro de Investigación sobre FBN. Universidad Autonoma de México.
- Weller, D.M. and Cook, R.J. (1983).”Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads”. *Phytopathol* 73, 463-469.
- Wild A. (2003). “Soil, land and food: managing the land during the twunty-first century”. Cambridge University. Press pp 245, Cambridge, UK.
- Wood, D. W. and Pierson, L. S. (1996). “The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production”. *Gene* 168,49-53.
- Wood, M., Cooper J.E and Bjourson, A.J. (1988). “Response of *Lotus* rhizobia to acidity and aluminium in liquid culture and in soil”. *Plant and Soil.* 107: 227-231.

- Zakharova, E., Shcherbakov, A., Brudnik, V., Skripko, N., Sh. Bulkhin, N., Ignatov, V. (1999). “Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry”. *Eur. J. Biochem.* 259, 572 – 576.
- Zhu J. K. (2001). “Plant salt tolerance”. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

Sitios web, utilizados:

- www2.epm.com.co/bibliotecaepm
- www.curiosidadesdelamicrobiologia
- www.plant-hormone
- www.inta.gov.ar