



***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES***

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER**

**EL GRADO ACADÉMICO DE**

**LICENCIADO EN QUÍMICA**

***"Evaluación de caracteres PGPR en *Azospirillum brasilense* Az-39 y su interacción con *Bradyrhizobium japonicum* E-109"***

**Tamara MUHLBERGER**

**SANTA ROSA (LA PAMPA)**

**ARGENTINA**

**2014**

## **Prefacio**

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 Laboratorio de Microbiología, dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, comenzando como ayudante, con fecha de aprobación del Proyecto de Tesina de Junio de 2012, Res. N° 297/12 y con fecha de presentación de Tesina el día 20/02, bajo dirección de la Lic. Carolina Castaño; y bajo codirección de la Dr. Graciela Lorda.

Fecha: 20 de febrero de 2014

Tamara Muhlberger

DEPARTAMENTO DE QUIMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## **Agradezco...**

A la Universidad Nacional de La Pampa, puntualmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por brindarme el lugar y la educación para llevar a cabo este trabajo y mi carrera de grado.

A la Lic. Carolina Castaño y la Dra. Graciela Lorda, por dejarme formar parte de su grupo de investigación, por enseñarme y apoyarme durante todo este trabajo, gracias por su ¡¡¡paciencia!! y su afecto.

A todo el personal del Departamento de Química por su buena predisposición; en especial a Mari y Marcelo, por todo el apoyo, cariño y el hombro que me prestaron siempre que los necesite, sin ustedes no hubiera sido tan divertido.

También quiero agradecer a todos mis amigos por apoyarme siempre y en especial a Jime, Yoa y los agrónomos, que son mi familia elegida, y me acompañan en mis buenos y malos momentos, haciendo que todo tenga color.

Por último agradezco a mi gran mamá, a Fabito, a los abuelos, a mi hermana y a mi tío José (hermano mayor) que son el pilar fundamental en mi vida y gracias a su amor incondicional, su paciencia y apoyo, hoy estoy a un paso de ser Licenciada.

Gracias a todos de corazón porque sin ustedes no lo hubiera logrado. Eternamente agradecida porque forman parte de mi vida.

**GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS!!!!**

MUHLBERGER Tamara.

## Resumen

La agricultura mundial ha tendido a buscar la sustentabilidad de los cultivos a través de alternativas de origen biológico que sean más económicas, que mejoren la rentabilidad de los cultivos y que eviten el deterioro del medio ambiente. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales. En la actualidad se busca el desarrollo de biofertilizantes basados en bacterias promotoras del crecimiento vegetal, por ejemplo con la bacteria *Azospirillum* spp., fijadora de nitrógeno y productora de fitohormonas y el simbiote de soja *Bradyrhizobium*. El estudio de las interacciones entre diversos microorganismos de distinta naturaleza es base fundamental para el desarrollo de biofertilizantes mixtos, debiendo valorar la pertinencia de las mezclas para optimizar este tipo de biofertilizantes. En base a estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue evaluar si la producción de metabolitos promotores del crecimiento vegetal en *Azospirillum brasilense* (*A. brasilense*) se ve influenciada por la interacción con *Bradyrhizobium japonicum* (*B. japonicum*). Se demostró que las moléculas señal que se acumulan en el sobrenadante de un cultivo de *B. japonicum* influyen en el comportamiento de *A. brasilense*, debido a que provoca un aumento en la biomasa, potenciando la producción de metabolitos secundarios, como ácido indol acético, considerado beneficioso para el desarrollo de las plantas.

# Índice

1	Introducción .....	6
1.1	Problemática mundial .....	6
1.2	Mecanismos directos implicados en la actividad PGPR.....	8
1.2.1	<b>Producción de reguladores de crecimiento vegetal</b> .....	8
1.2.2	<b>Fijación simbiótica de Nitrógeno</b> .....	10
1.2.3	<b>Solubilización de fosfatos insolubles</b> .....	11
1.3	Mecanismos indirectos implicados en la actividad PGPR.....	11
1.3.1	<b>Producción de sideróforos</b> .....	12
1.3.2	<b>Producción de antibióticos</b> .....	12
1.3.3	<b>Resistencia sistémica inducida</b> .....	13
1.4	Microorganismos con capacidad PGPR .....	13
1.4.1	<b>Género Azospirillum</b> .....	13
1.4.2	Características de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	14
1.4.3	<b>Género Bradyrhizobium</b> .....	15
1.5	<i>Quorum sensing</i> .....	17
2	HIPÓTESIS: .....	19
2.1	OBJETIVO GENERAL:.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	19
3	Materiales y métodos .....	20
3.1	Estudio cinético de crecimiento .....	20
3.1.1	Microorganismos .....	20
3.1.2	Medios de cultivo y producción de inóculos .....	20
3.2	Conservación y mantenimiento de cepas.....	22
3.2.1	Conservación de <i>Azospirillum brasilense</i> Az-39 .....	22
3.2.2	Conservación de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E-109.....	22
3.3	Análisis de características PGPR.....	22
3.3.1	Solubilización de fósforo.....	22
3.3.2	Producción de sideróforos .....	23
3.3.3	Incidencia de la adición de metabolitos inductores de la síntesis de AIA, como triptófano y tripteína. ....	24
3.3.4	Cuantificación de ácido indol acético (AIA).....	24
3.4	Extracción de moléculas autoinductoras.....	24
3.4.1	Detección de autoinductores.....	25
3.4.2	Bioensayo con <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 .....	25
3.4.3	Bioensayo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1-pZLR4.....	26
3.5	Extracción de Proteínas Celulares Totales.....	26
3.5.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proteínas celulares totales.....	28
3.5.2	Revelado del gel de proteínas mediante tinción con Coomassie Blue R-250	30
4	Resultados y discusión.....	30
4.1	Fisiología del crecimiento de <i>A. brasilense</i> Az-39 en un medio Nfb .....	30
4.2	Evaluación de la producción de metabolitos promotores del crecimiento vegetal .....	34
4.2.1	<b>Producción e inducción de la síntesis de ácido indol acético (AIA)</b> 34	
4.2.2	<b>Solubilización de fósforo</b> .....	37
4.2.3	<b>Producción de sideróforos</b> .....	38
4.3	Determinación de la producción de moléculas señal <i>quorum</i> .....	40

4.4	Incidencia de las moléculas señal de <i>B. japonicum</i> sobre <i>A. brasilense</i> .....	44
4.4.1	<b>Cinética de crecimiento</b> .....	44
4.4.2	<b>Producción de sideróforos en presencia de autoinductores de <i>B. japonicum</i></b> .....	48
4.4.3	<b>Producción de ácido indol acético (AIA) en presencia de autoinductores de <i>B. japonicum</i></b> .....	49
4.4.4	<b>Comparación de perfiles proteicos</b> .....	50
5	Conclusiones .....	51
	CONSIDERACIONES GENERALES.....	51
6	Bibliografía .....	53

# **1 Introducción**

## **1.1 Problemática mundial**

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la agricultura, en un contexto de un deterioro ambiental progresivo, es el de cubrir la demanda creciente de alimentos provocada por el incremento continuo de la población humana. La salinización del agua y de los suelos así como la escasez de agua, son los principales estreses abióticos a los que la producción agrícola podría enfrentarse en un futuro próximo, agravados por los cambios climáticos globales. Es ya manifiesto que el cúmulo de acciones tendientes a incrementar la producción extensiva ha producido efectos antropogénicos evidenciables en diversos agroecosistemas, incluyendo la degradación de suelos y acuíferos, y la alteración de los ciclos biogeoquímicos (Drinkwater & Snapp, 2007).

El suelo necesita utilizarse de forma responsable y sustentable a través de tecnologías que favorezcan la productividad y la calidad de los cultivos, utilizando de forma óptima los insumos requeridos, reduciendo costos. Todos estos aspectos pueden ser respaldos a través del uso de los biofertilizantes.

Todas las definiciones de biofertilizante coinciden con los siguientes elementos: es una mezcla de sustancias que contiene microorganismos vivos, los cuales, cuando se aplican a semillas, superficies de plantas o suelos, colonizan la rizosfera o el interior de la planta, y promueven el crecimiento al incrementar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta huésped.

La acción de introducir hongos y/o bacterias sobre las semillas, al suelo o a los sistemas de riego en cultivos de leguminosas, gramíneas, hortalizas y frutales, principalmente, se define como inoculación. Generalmente los beneficios se traducen en un aumento del desarrollo de la raíz y rendimiento en el grano. Los resultados a través del tiempo son suelos más ricos en contenidos de materia orgánica y nutriente (nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, entre otros).

El éxito en el proceso de inoculación depende de factores como la cantidad de luz, temperatura, tipo de suelo, regiones climáticas, mezcla con otros biofertilizantes y agroquímicos, caducidad de los productos, entre otros. Estos aspectos requieren de un proceso de capacitación y acompañamiento por lo que varias dependencias

gubernamentales y empresas particulares dedicadas a la producción de biofertilizantes ayudan a entender cómo usar la tecnología para lograr mejores beneficios.

Las rizobacterias que componen los biofertilizantes, conocidas en la literatura con el acrónimo PGPR (del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”), que colonizan la raíz y su zona de influencia (suelo rizosférico), desempeñan funciones claves para la planta tales como: (i) *control biológico de patógenos* mediante efectos antagonistas o inducción de resistencia sistémica (Schuhegger *et al.*, 2006), (ii) *incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales* como por ejemplo la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, o (iii) *la fitoestimulación* al propiciar la emergencia o el enraizamiento. La fitoestimulación provocada por la inoculación de PGPR ocurre por varios mecanismos. Uno de ellos se basa en la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento, giberelinas, citoquininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrientes y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, como la sequía (Huergo *et al.*, 2008).

Las PGPR están asociadas a muchos tipos de plantas y se encuentran comúnmente presentes en diversos ambientes. Algunas rizobacterias colonizan la superficie de la raíz y la interfase del suelo subsiguiente; otras pueden tener características endofíticas en raíz, vástago, hojas, tubérculos y otros órganos (Compant *et al.*, 2005). Las PGPR deben cumplir con 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 de crecimiento y (iii) estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994).

En el proceso de colonización de la raíz o rizosfera la bacteria es atraída por quimiotaxis basada en compuestos presentes en los exudados radicales, para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias como *Azospirillum* spp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Bradyrhizobium*-Leguminosa. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Barea *et al.*, 2004).



En resumen, se acepta que las PGPR pueden afectar al crecimiento de plantas, bien de forma directa mediante el suministro de determinados compuestos a las plantas, o facilitando la captación de nutrientes solubles del suelo, como en el caso de *Azospirillum* spp., o bien pueden actuar de forma indirecta evitando los efectos deletéreos de uno o más fitopatógenos, fundamentalmente *Pseudomonas* spp., de ahí que actualmente se tienda a clasificar o dividir a las PGPR en dos grupos “PGPB” ( del inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”) y “Biocontrol-PGPB” (Cattelan *et al.*, 1999). El término “PGPB” por “PGPR” se debe a que muchas bacterias que ejercen efectos beneficiosos sobre las plantas no son buenas colonizadoras. Cassán *et al.* (2008) amparan la actuación conjunta de diversos mecanismos, siendo los mecanismos individuales menos importantes que si operan de manera conjunta.

En lo referente a los efectos indirectos son de destacar los basados en la producción de antibióticos y cianuro de hidrógeno (HCN) que generan un decrecimiento en la población de fitopatógenos (Zahir *et al.*, 2004). La producción de sideróforos es la base de otra actividad de las PGPR ya que estos metabolitos actúan mediante dos mecanismos: la captación de hierro que puede beneficiar directamente a la planta aumentando la disponibilidad del elemento o indirectamente como agente patógeno para otros microorganismos o plagas por cumplir esta misma labor.

La conjunción de todos los mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente de crecimiento en plantas, un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento de hasta el 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, tomate, trigo y soja (Jiménez *et al.*, 2001).

## **1.2 Mecanismos directos implicados en la actividad PGPR**

### **1.2.1 Producción de reguladores de crecimiento vegetal**

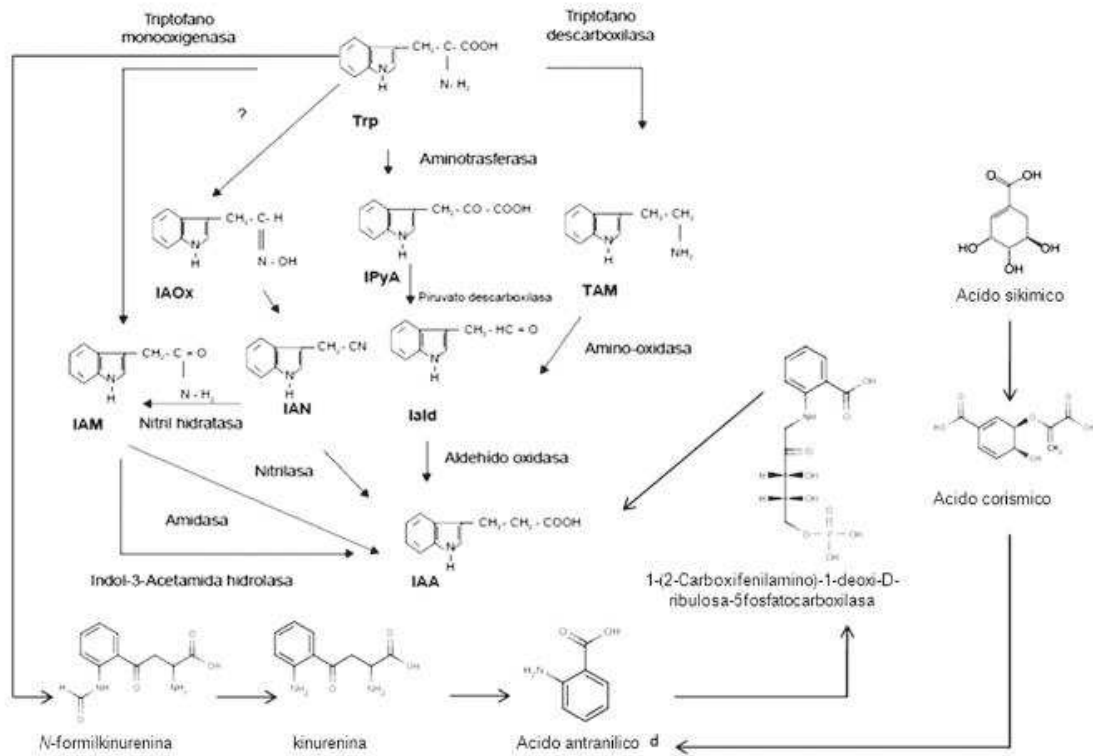
La formación de órganos en la planta y su consecuente desarrollo, están mediados por factores internos de vital importancia. Los reguladores de crecimiento en las plantas son conocidos como hormonas vegetales; pequeñas moléculas que afectan el desarrollo y crecimiento vegetal a muy bajas concentraciones. Se sabe que los niveles endógenos hormonales generan cambios en los procesos fisiológicos, que repercuten en la floración, fructificación y rebrote de hojas principalmente. Las hormonas vegetales pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada

uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación en el crecimiento de las plantas. En estos grupos se incluyen auxinas, giberelinas, etileno, citoquininas y ácido abscísico. (Cassán *et al.*, 2008).

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA), hormona de la cual aún se conoce poco sobre los mecanismos de expresión, metabolismo, transporte y distribución final. Su efecto en las células vegetales es controlar los tropismos que se manifiestan, inclinaciones, giros o curvaturas del tallo y desarrollo del sistema radical. Se ha descrito que esta hormona vegetal otorga beneficios a la planta puesto que incrementa su división a nivel celular, lo cual se representa en un aumento de tamaño de los frutos y número de hojas (Creus *et al.*, 2008).

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 (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 plántulas jóvenes tener pronto un acceso a nutrientes y agua provenientes de su medio ambiente (Patten & Glick, 2002).

El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano, y probablemente es este el precursor del AIA formado en la planta viva; aunque se conocen cuatro vías de formación de dicha auxina cada una de ellas con un intermediario distinto (Cassán *et al.*, 2008). Diferentes grupos de plantas emplean diversas rutas para producir AIA a partir del triptófano. En bacterias, la producción de AIA ocurre 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 (Figura 1) (Patten & Glick, 2002).



**Figura 1: rutas metabólicas de síntesis de AIA. Tres rutas dependientes de triptófano y una no dependiente. (Patten & Glick, 2002)**

### 1.2.2 Fijación simbiótica de Nitrógeno

El nitrógeno es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etcétera.

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es la única reserva de nitrógeno accesible en la biósfera. Prácticamente ilimitada, esta reserva no es directamente utilizada por los vegetales y animales. Para que el nitrógeno pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido (Bacca *et al.*, 2000). Los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa que convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado en un proceso denominado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN).

El proceso de FBN es de gran importancia económica y equilibra el ciclo biogeoquímico del nitrógeno al recuperar para la biósfera el nitrógeno perdido por desnitrificación. Las transformaciones en dicho ciclo no son exclusivamente biológicas: las radiaciones ultravioleta representan el 10% del aporte global; la industria de los fertilizantes aporta un 25%, por lo que la FBN corresponde al 65% aproximadamente (Bacca *et al.*, 2000).

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, mediante simbiosis, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio.

### 1.2.3 Solubilización de fosfatos insolubles

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, y en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. No es posible capturarlo biológicamente como ocurre con el nitrógeno (Milerue & Nicornpun, 2000). Informes recientes han documentado que aproximadamente el 95-99% del fósforo en el suelo está presente en la forma de fosfatos insolubles (Vassileva *et al.*, 1998), pero existe sólo 0,1% del fósforo total en forma accesible para la planta (Illmer *et al.*, 1995). Este problema puede ser aliviado por la liberación de P de una forma inmovilizada a una forma soluble a través de las actividades de los microorganismos del suelo de solubilización y mineralización (Rodríguez & Fraga, 1999).

El principal mecanismo para la solubilización de fosfato mineral por estas bacterias es la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, que tienen alta afinidad por los cationes unidos al fosfato, dando como resultado su conversión en fosfatos solubles (Rodríguez & Fraga, 1999).

## 1.3 Mecanismos indirectos implicados en la actividad PGPR

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas de control biológico (PGPB de control biológico) son capaces de producir una amplia variedad de sustancias que pueden ser utilizadas para disminuir los fitopatógenos causantes de enfermedades en las plantas. Estas sustancias incluyen sideróforos, antibióticos, otras pequeñas moléculas y una variedad de enzimas. Aunque los mecanismos usados por las PGPB de control biológico están empezando a ser comprendidos en detalle, el empleo deliberado de estos organismos para controlar los daños causados por fitopatógenos está todavía en un estado temprano de desarrollo. Mientras esta aproximación parece tener un gran potencial, la mayoría de los estudios reportados se han desarrollado bajo condiciones

controladas de laboratorio, cámaras de crecimiento o condiciones de invernadero. (Johri *et al.*, 2003).

### 1.3.1 Producción de sideróforos

Las bacterias del suelo sintetizan y secretan moléculas de bajo peso molecular (aprox. 400 a 1000 Da), conocidas como sideróforos que ligan el hierro, y de esta forma obtiene del suelo una cantidad de hierro soluble suficiente para sostener su crecimiento. Estas moléculas ligan  $\text{Fe}^{3+}$  con una alta afinidad ( $K_a=10^{-20}$  a  $10^{-50}$ ), transportan el complejo hierro-sideróforo de vuelta a la célula bacteriana, donde es absorbida por medio de un receptor celular y puesta a disposición para el crecimiento bacteriano (Chaiarn *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que las PGPB de control biológico pueden prevenir la proliferación de fitopatógenos y así facilitar el crecimiento de plantas, sintetizando sideróforos que ligan la mayoría del  $\text{Fe}^{3+}$  presente en la rizosfera de la planta hospedante (Chaiarn *et al.*, 2009). 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, proliferen en la rizosfera de la planta hospedante debido a la carencia de hierro (O'Sullivan & O'Gara, 1992). Aunque la estructura química de los sideróforos varía, se clasifican en dos grupos principales: catecol e hidroxamato, de acuerdo con el grupo químico implicado en la quelación de  $\text{Fe}^{3+}$ . En este modelo, las PGPB de control biológico compiten exitosamente frente a los fitopatógenos fúngicos por el hierro disponible. (Tortora *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Producción de antibióticos

El control biológico de patógenos se ha asociado con la capacidad de las PGPB de control biológico para sintetizar uno o más antibióticos.

Los antibióticos sintetizados por las PGPB de control biológico incluyen, pero no están limitados, a Agrocina 84, Agrocina 434, 2,4-diacetilfloroglucinol, herbicolina, fenacina, pioluteorina y pirrolnitrina. Se ha demostrado que la actividad de control biológico de algunas cepas está directamente relacionada con la capacidad de la bacteria para producir uno o más de estos antibióticos. Sin embargo, un antibiótico que es efectivo en el laboratorio contra una cepa de un agente patógeno no necesariamente actúa contra

otras cepas del mismo patógeno, y puede comportarse de manera diferente a lo esperado en condiciones de campo. (de-Bashan *et al.*, 2007).

Al limitar la proliferación de otros microorganismos en el suelo, las PGPB de control biológico que secretan antibióticos deberían facilitar su propia proliferación, ya que ellas tendrían menos competencia por los limitados recursos nutricionales. De esta manera, estas bacterias pueden crear un nicho para sí mismas en donde funcionen y estimulen el crecimiento vegetal tanto de manera directa como indirecta. Por otra parte, algunas PGPB de control biológico que actúan directamente, y cuyo uso lleva a un impresionante incremento en el crecimiento vegetal bajo condiciones controladas de laboratorio o invernadero, pueden parecer poco efectivas en situaciones de invernadero o campo donde no son competitivas frente a otros microorganismos del suelo que pueden estar presentes (de-Bashan *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Resistencia sistémica inducida

En muchas plantas de larga duración y amplio espectro sistémico, se puede inducir la resistencia a una variedad de agentes causantes de enfermedades incluyendo hongos patógenos, tratando la planta o la semilla con factores ambientales, microorganismos o ambos (Schuhegger *et al.*, 2006). La resistencia sistémica puede ser inducida por patógenos, no patógenos, tratamiento de semillas con PGPB y metabolitos microbianos. La mayoría de los estudios sobre resistencia sistémica se han desarrollado en contra de hongos fitopatógenos; sin embargo, estas aproximaciones también pueden tener potencial validez en el control de enfermedades bacterianas.

## 1.4 Microorganismos con capacidad PGPR

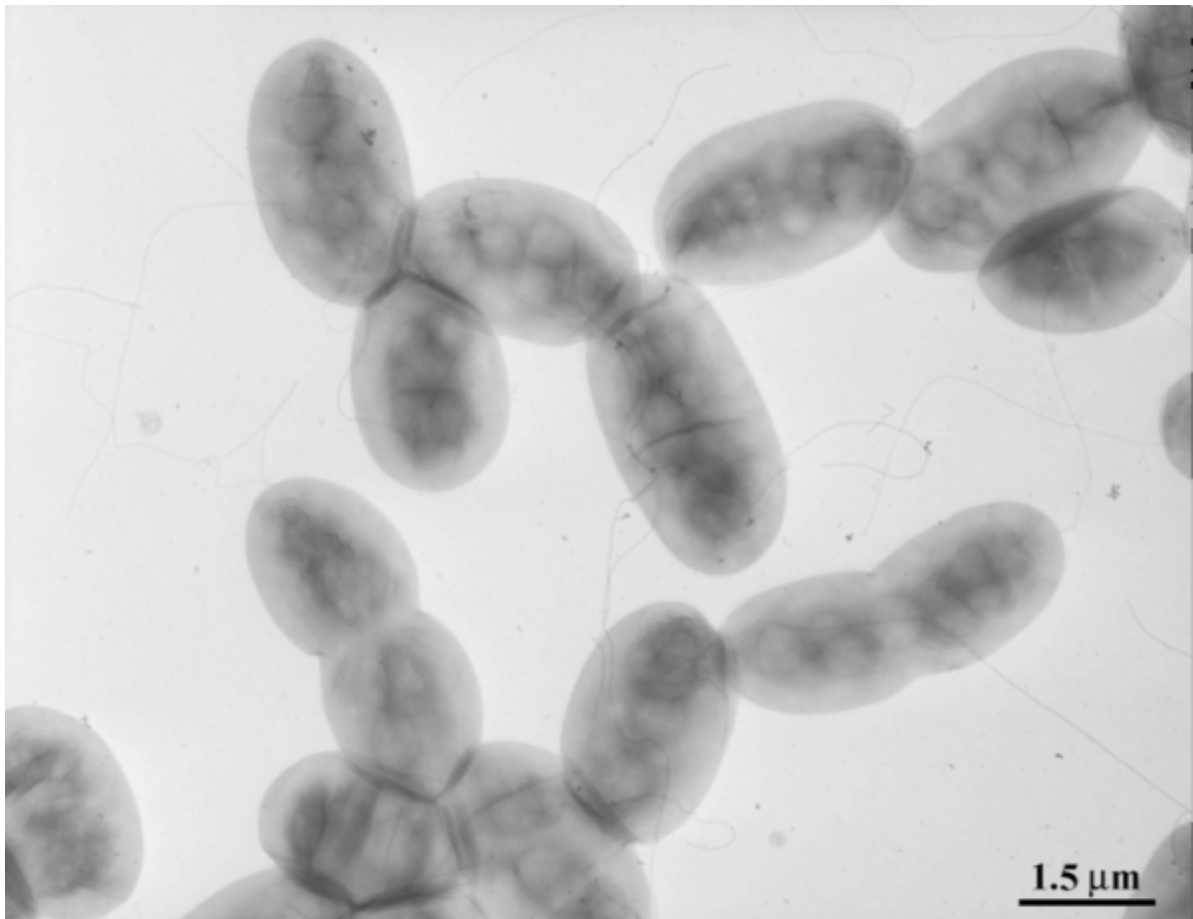
### 1.4.1 Género *Azospirillum*

Se han descrito 16 especies en este género entre ellas: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. largimobil*, *A. dobereinae*, *A. orizae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. irakense* y *A. zea* (Ecker *et al.*, 2001). El rasgo que distingue a esta especie de los otros es su capacidad de utilizar como fuente de carbono varios azúcares y ácidos di- y tricarbónicos. El crecimiento óptimo se produce a 30°C, y en valores de pH entre 6,0 y 7,0 (Hartmann & Zimmer, 1994).

Las bacterias del género *Azospirillum* han sido aisladas de la rizósfera o del interior de la planta (endofíticas), de diferentes monocotiledóneas o dicotiledóneas, de regiones templadas y tropicales del mundo. Clasificada como una PGPB; principalmente por su capacidad de producir diversas fitohormonas que mejoran el crecimiento de la raíz, la absorción de agua y minerales, promueve un mayor rendimiento de semillas y de biomasa (Dobbelaere *et al.*, 2003), en una amplia variedad de plantas: maíz, arroz, caña de azúcar, sorgo, algunas forrajeras y otras plantas de interés agronómico. La capacidad de *Azospirillum* spp. para estimular el crecimiento de las plantas y de aumentar el rendimiento de los cereales, estimuló numerosos estudios sobre la ecología, fisiología y genética de esta bacteria. En la actualidad su uso comercial comienza a extenderse en diferentes países. (Bashan & de-Bashan, 2010).

#### 1.4.2 Características de *Azospirillum brasilense*

*A. brasilense*, es una bacteria Gram negativa heterotrófica, efectúa varias etapas del ciclo del nitrógeno, fija nitrógeno a amonio bajo condiciones microaeróbicas y en ausencia de nitrógeno combinado; puede utilizar una amplia gama de azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos como fuentes de carbono. Pertenece a la subclase de las  $\alpha$ -proteobacterias. Para la identificación de este género las características más importantes son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral (Döbereiner, 1992). Sus células contienen cantidades elevadas de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) (Figura 2), hasta 50% del peso seco celular, observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes gránulos, pero en cultivos realizados en medios de cultivo semigelificados y gelificados con más de 24 horas de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a “quistes” (conocidos como formas C), conduciendo a la agregación celular y a la formación gránulos visibles de PHB de gran tamaño, estas formas mejoran la supervivencia de este género. Se ha sugerido que el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), desempeña su función al servir como almacén de carbono y energía además de conferirle una función fisiológica para resistir a la desecación, la luz ultravioleta y el choque osmótico (Kadouri *et al.*, 2003).



**Figura 2: micrografía electrónica de *A. brasilense*.**(Fuente: Just science).

Una forma de identificar las bacterias del género es crecerlas en un medio adicionado con rojo Congo, cuyas colonias adquieren una coloración rojo escarlata característica, no obstante, en este medio pueden observarse colonias mutantes de *Azospirillum* spp. de color blanco debido a la incapacidad de producir exopolisacáridos. Otra de las características relevantes de *A. brasilense* es la capacidad de producción de bacteriocinas y sideróforos (Tapia-Hernández *et al.*, 1991).

### 1.4.3 Género *Bradyrhizobium*

*Bradyrhizobia* es un grupo muy heterogéneo de bacterias nitrificantes. La motilidad de este grupo se produce por un flagelo polar o subpolar. Estas bacterias son bacilos de  $0.5-0.9 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$ . Las colonias son circulares, rara vez translúcidas, blancas y convexas con un diámetro menor a 1 mm después de 5-7 días de incubación.

El metabolismo es aerobio. La temperatura máxima de crecimiento varía entre 30 y 42°C, pero la mayoría de las cepas no crecen por encima de 39°C. Las cepas son generalmente tolerantes a la acidez, aunque no exclusivamente, y crecen a un pH mayor



de 4,5. El crecimiento no se produce normalmente por encima de pH 9,0. Las bacterias del grupo *Rhizobium* de crecimiento lento son muy diferentes de las bacterias del grupo de rápido crecimiento, por lo que se colocaron en un género separado, *Bradyrhizobium*. Estas bacterias fijadoras de N atmosférico (N<sub>2</sub>) convierten este nutriente en amonio mediante la acción de la enzima nitrogenasa. La soja (*Glycine max* (L.)) fija el N<sub>2</sub> en simbiosis mutualista con *Bradyrhizobium japonicum*. La expresión de esta asociación es la presencia de órganos en las raíces, llamados nódulos dentro de los cuales se lleva a cabo la reducción del N<sub>2</sub>. El cultivo se nutre del nitrógeno aportado por la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) y del disponible existente en el suelo. La combinación de factores tales como las características del huésped, temperatura y humedad ambiental, las propiedades físico-químicas del suelo y la naturaleza de la población rizobiana naturalizada determinan la adecuada formación de nódulos, la eficiencia en la fijación del nitrógeno y la productividad del cultivo (González *et al.*, 1997).

La FBN puede aportar entre el 25 al 90% del nitrógeno necesario para el desarrollo del cultivo, pero esto sólo puede concretarse cuando los factores ambientales no actúan como limitantes (González *et al.*, 1997; Peticari *et al.*, 2003; Peticari, 2005). El uso de especies capaces de nodular vigorosamente y de fijar el nitrógeno eficientemente, combinado con estrategias agronómicas simples, permitirán obtener altos rendimientos y contribuir a las reservas nitrogenadas del suelo (Brockwell, 1995; Peticari *et al.*, 2003).

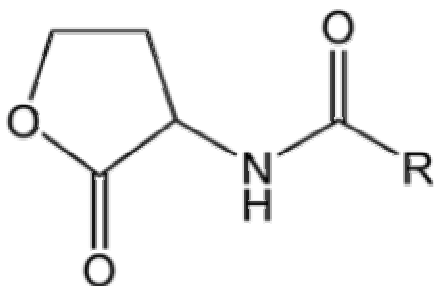
En cultivo de leguminosas, la aplicación dual de rizobios y azospirilos ha sido señalada como un área de investigación de interés, ya que existen trabajos en los que se han observado efectos positivos en producción de materia seca, en rendimiento en grano y contenido de N en leguminosas en comparación con inoculaciones con rizobios solamente (Burdman *et al.*, 1998; González, 2006). Los resultados positivos de la inoculación dual en leguminosas han sido atribuidos a la ocurrencia de una nodulación más temprana, incremento en el número de nódulos, mayores tasas de fijación de N<sub>2</sub> e incrementos en el desarrollo radical en general. Similar a lo observado en pastos y cereales, se encontró que la inoculación con *A. brasilense* en poroto y alfalfa promovía la formación de pelos radicales. *Rhizobium* sp. forma cordones infectivos en los pelos radicales, y la estimulación de un mayor número de células epidérmicas que se diferencien en pelos radicales susceptibles de infección por *Rhizobium* sp. incrementa el potencial de formación de nódulos (Yahalom *et al.*, 1987). Cassán *et al.* (2009) también

encontraron que la coinoculación produjo un crecimiento positivo en distintos cultivos, particularmente en los estadios tempranos de desarrollo del vegetal.

### 1.5 *Quorum sensing*

El *quorum sensing* es un fenómeno ampliamente extendido en una gran variedad de especies bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas para coordinar su comportamiento en comunidad. Ello implica usualmente la regulación de genes específicos en respuesta a la densidad de población. Esta expresión coordinada de los genes es alcanzada por la producción, liberación y detección de pequeñas moléculas señal llamadas autoinductores.

En bacterias Gram-negativas el mayor grupo de autoinductores son las acil homoserina lactonas (AHL), cuya estructura se muestra en la Figura 3. Ellas tienen un anillo homoserina lactona (HSL) conservado, con una cadena lateral acilo variable. (Loh *et al.*, 2001).



**Figura 3: Estructura general de las acil homoserina lactonas (AHL)**

Las AHLs pueden clasificarse en moléculas de cadena corta o moléculas de cadena larga, basándose en el largo de los grupos acilo. El largo y el nivel de saturación de las cadenas acilo unido a la presencia o ausencia de sustituyentes oxo o hidroxilo en la posición C-3 de dicha cadena, provee variación y especificidad para la comunicación por *quorum sensing* en una población bacteriana mixta. (González. & Keshavan, 2006). Con bajas densidades de población, el gen que codifica para la enzima LuxI para la síntesis del autoinductor, posee un nivel basal de expresión, que resulta en la producción de pequeñas cantidades de moléculas señal que difunden fuera de la célula y se diluyen inmediatamente en el medio circundante. Un incremento de la población bacteriana resulta en una acumulación gradual de autoinductor alrededor de las células, que activa específicamente una proteína reguladora transcripcional (LuxR) por unión a ella. Los reguladores activados interactúan entonces con secuencias blanco de ADN y aumentan

o bloquean la transcripción de genes regulados por *quorum sensing*, que resulta en la activación sincronizada de ciertos fenotipos en una población bacteriana (González & Keshavan, 2006). El fenómeno se ilustra en la Figura 4.

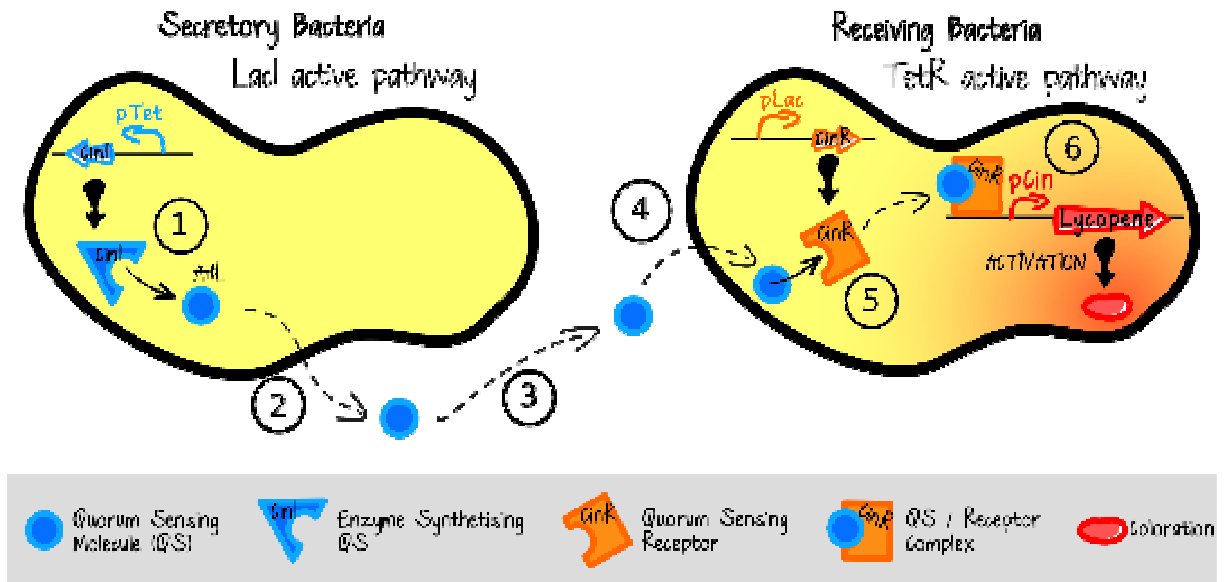


Figura 4: Esquemmatización de fenómeno *quorum sensing*. (Fuente: Da tu opinión).

Diferentes especies bacterianas pueden producir las mismas AHLs o bien con estructuras y propiedades similares, lo que sugiere que la comunicación cruzada entre poblaciones ocurre y es evidente que el *quorum sensing* vía AHLs es más común entre bacterias que se asocian a plantas que en las poblaciones generales de bacterias del suelo (Sánchez-Contreras *et al.*, 2007).

Trabajos recientes revelaron que algunos organismos eucariotas son capaces de interferir con la comunicación bacteriana por la producción de moléculas señal, que interactúan con el sistema bacteriano de *quorum sensing*. Tales compuestos que interfieren el *quorum sensing* (QS) han sido extensamente investigados por su potencial uso como agentes de control microbiano (González & Keshavan, 2006).

## **2 HIPÓTESIS:**

El efecto promotor de crecimiento vegetal de *Azospirillum brasilense* Az-39 está influenciado por la presencia de *Bradyrhizobium japonicum* E-109, a través de moléculas señal difusibles intercambiables.

### **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar si la producción de metabolitos promotores del crecimiento vegetal en *Azospirillum brasilense* Az-39 se ve influenciada por la interacción con *Bradyrhizobium japonicum* E-109.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1.- Estudiar la fisiología del crecimiento de *A. brasilense* Az-39 en un medio de cultivo específico.
- 2.- Evaluar la producción de metabolitos promotores del crecimiento vegetal, tales como AIA, solubilización de fósforo y producción de sideróforos e incidencia de la adición de diferentes metabolitos inductores de la síntesis de AIA, tales como triptófano, tripteína, etc.
- 3.- Determinar si la elevada densidad celular alcanzada en un cultivo de *Azospirillum* spp., promueve la síntesis de moléculas señal *quórum*, que intervienen en el diálogo molecular.
- 4.- Evaluar si la síntesis de metabolitos promotores del crecimiento de plantas producidos por *Azospirillum* spp. está influenciada por la presencia moléculas señal presentes en el sobrenadante de un cultivo de *Bradyrhizobium* spp.

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Estudio cinético de crecimiento

##### 3.1.1 Microorganismos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes microorganismos: *Azospirillum brasilense* Az-39 y *Bradyrhizobium japonicum* E-109, recomendadas actualmente en Argentina para la formulación de inoculantes para gramíneas y leguminosas respectivamente (cedidas gentilmente por el Ing. Agr. Alejandro Peticari - IMIZA- INTA Castelar).

##### 3.1.2 Medios de cultivo y producción de inóculos

Para cultivar *Azospirillum brasilense* Az-39 se utilizó el medio de cultivo Nfb (Döbereiner & Day, 1976), descrito en la tabla 1. El proceso se llevó a cabo en erlenmeyer con agitación rotatoria a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad por un tiempo de 70 horas a 29°C.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo Nfb.

Composición	Concentración
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
FeCl <sub>3</sub> (10%, p/v)	0,15 mL
KOH	4 g/L
Extracto de levadura	0,5 g/L
Solución de micronutrientes (tabla 2)	2 mL
Ácido málico	5 g/L
pH	6,8

Tabla 2: Composición de solución de micronutrientes.

<b>Composición</b>	<b>Concentración</b>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,008 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,024 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,28 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,235 g/L

Para estudiar la cinética de crecimiento de *Azospirillum brasilense* Az-39 mediante el recuento de células viables; se utilizó el medio de cultivo Rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982) descrito en la tabla 3, utilizando la técnica de siembra en superficie.

Tabla 3: Composición del medio Rojo Congo.

<b>Composición</b>	<b>Concentración</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
FeCl <sub>3</sub> (10%, p/v)	0,15 mL/L
KOH	4 g/L
Extracto de levadura	0,5 g/L
Solución de micronutrientes	2 mL/L
Ácido málico	5 g/L
Rojo congo	10 mL/L
Agar	15 g/L
pH	6,8

Para cultivar *B. japonicum* E-109 se utilizó el medio de cultivo Balatti (Balatti, 1992) descrito en la tabla 4. Se realizó el ensayo en erlenmeyer con una relación de volumen de medio/volumen de erlenmeyer de 1/5; durante 96 horas a 37°C y con agitación rotatoria a 250 rpm.

Tabla 4: Composición del medio de cultivo Balatti.

Composición	Concentración
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g/L
NaCl	0,1 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (sol. 10%)	2 gotas
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (sol. 10%)	2 gotas
KNO <sub>3</sub>	0,8 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
Glicerol	10 g/L
H <sub>2</sub> O	Cant. necesaria
pH	6,8

### 3.2 Conservación y mantenimiento de cepas

#### 3.2.1 Conservación de *Azospirillum brasilense* Az-39

Para conservar esta cepa se utilizó el método de congelación con el agregado de un crioprotector, en este caso glicerol y se colocaron a -20°C y se realizaron tubos picos de flauta con medio de cultivo Rojo Congo (tabla 3), y fueron conservados a temperatura ambiente.

#### 3.2.2 Conservación de *Bradyrhizobium japonicum* E-109

Para el mantenimiento y conservación de *B. japonicum* E-109 se utilizó el método de congelación con el agregado de glicerol y se colocaron a -20°C y se realizaron tubos picos de flauta con medio YEM (tabla 7) Conservados a 4°C.

### 3.3 Análisis de características PGPR.

#### 3.3.1 Solubilización de fósforo

Cuando se analizó la propiedad de solubilizar fósforo en *A. brasilense* Az-39 se utilizó el medio de cultivo sólido NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) (Nautiyal 1999) descripto en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición del medio de cultivo NBRIP.

Composición	Concentración
Glucosa	10 g/L
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g/L
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g/L
KCl	0,2 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g/L
Agar	15 g/L
pH	6,8

Todos los medios descriptos anteriormente se autoclavaron durante 20 min a 120°C.

Para realizar este ensayo de solubilización de fósforo se volcaron dichos medios en placa de Petri y se sembraron 10 µL de caldo proveniente del microorganismo en estudio. Se cultivaron en estufa a 28°C durante 15 días.

### 3.3.2 Producción de sideróforos

En la evaluación de producción de sideróforos por *A. brasilense* Az-39 se utilizó el ensayo universal cromo azurol-S (CAS), el cual evidencia un cambio de color del complejo CAS-hierro (de azul a amarillo) cuando el hierro es quelado por un sideróforo. Dicho medio se preparó de la siguiente manera: 60,5 mg de CAS se disolvieron en 50 mL de agua miliQ y se mezcló con 10 mL de solución de hierro (1 mM FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O en HCl 10 mM) agitándolo. Esta solución se mezcló lentamente con 72,9 mg de hexadeciltrimetil bromuro de amonio (HDTMA) disuelto en 40 mL. La solución azul oscuro resultante se autoclavó (20 min., 121°C), se enfrió y fue mezclado con medio Nfb sólido estéril, al que se le había adicionado 30,24 g de ácido 1,4-piperazina dietanosulfónico (PIPES) previamente llevado a pH 6,8; valor correspondiente a su pKa, con NaOH 50% (p/v). Este medio fue colocado en placas de Petri estériles, inoculadas con 10 µL de muestra y se incubaron 7 días a 30°C. La muestra de *A. brasilense* Az-39 que se utilizó se cultivó en medio Nfb por 24 hs en las



condiciones establecidas; la cual fue centrifugada a 10000 rpm por 15 min., se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado dos veces con 1 mL de agua miliQ estéril para eliminar impurezas. Se realizaron las diluciones correspondientes para inocular con una concentración de  $10^6$  ufc/mL.

### 3.3.3 Incidencia de la adición de metabolitos inductores de la síntesis de AIA, como triptófano y tripteína.

En este ensayo se realizaron seis procesos en medio de cultivo Nfb, en las condiciones de crecimiento descritas en el apartado 3.1.2., de los cuales cuatro tratamientos contenían diferentes concentraciones de tripteína, un tratamiento con 0,05 g/L de triptófano como metabolito inductor y un testigo sin inducir. Todos los tratamientos fueron inoculados con una concentración de  $10^7$  ufc/mL y la toma de muestra fue llevada a cabo por triplicado. Se recolectó muestra a las 20, 48, 56 y 65 hs; ya que antes de las 20 horas no se midieron concentraciones apreciables de AIA en ensayos previos. Se tomaron 5 mL de cultivo, se centrifugaron por 20 min. a 3000 rpm. Se tomó 1 mL de sobrenadante que fue colocado en un tubo de ensayo y conservado a 4° C hasta su utilización.

### 3.3.4 Cuantificación de ácido indol acético (AIA)

Se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita por Glickmann & Dessaux (1995). Se determinó la absorbancia a 530 nm de los patrones y de los sobrenadantes procedentes de la centrifugación de las muestras luego de hacerlos reaccionar con el reactivo de Salkowsky. El reactivo de Salkowsky ( $H_2SO_4$  7,9M-  $FeCl_3$  40 mM) se adicionó en proporción muestra/reactivo (1:2), produce la oxidación de los grupos indol, generando una coloración que va de la gama de los rosados al fucsia, evidenciando la presencia de moléculas con grupos indol presumibles como compuestos auxínicos.

## 3.4 Extracción de moléculas autoinductoras

Se cultivaron los microorganismos estudiados hasta alcanzar alta densidad celular ( $10^9$  ufc/mL aproximadamente).

Se obtuvo el sobrenadante de centrifugación, a 3000 rpm durante 15 min. en centrífuga refrigerada. Luego se le realizó una extracción repetida con acetato de etilo (solvente con el cual éstas moléculas son afines), se agregó sulfato de sodio anhidro (para eliminar los restos de agua). Después se filtró y se rotoevaporó a 40°C hasta reducir su volumen 200 veces. Los extractos logrados se conservaron en freezer a -20°C.

#### 3.4.1 Detección de autoinductores

#### 3.4.2 Bioensayo con *Chromobacterium violaceum* CV026

*C. violaceum* CV026 es una cepa mutada en el gen *cviI* (Mc Lean *et al*, 1997), mediante inserción del Tn5, incapaz de producir la sintetasa CviI que interviene en la producción de 3-hexanoil homoserina lactona (C<sub>6</sub>-HSL). Este compuesto induce la producción del pigmento violaceína, cuya producción se restaura mediante incubación con homoserina lactona exógena.

Se cultivó *C. violaceum* CV026 en 5 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Miller 1972) (Tabla 6) durante 18 hs. Luego sobre placas con medio LB agarizado (1.4% p/v de agar), se adicionaron 5 mL de medio LB semisólido (0.8% p/v de agar) suplementado con 5 µg/mL de kanamicina, e inoculado con 150 µL de una suspensión del cultivo de *C. violaceum* CV026. Luego de solidificado el medio, se realizaron pocillos en el agar, donde se sembró la muestra del extracto orgánico de autoinductores, los controles respectivos y los sobrenadantes de cultivos de diferentes tratamientos. Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 hs.

Tabla 6: Composición del medio de cultivo LB

Componentes	Concentración
NaCl	5 g/L
Triptona	10 g/L
extracto de levadura	5 g/L
Glucosa	1g/L
agua destilada	Cant. Necesaria
pH	6.8-7

### 3.4.3 Bioensayo con *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4

*A. tumefaciens* NT1-pZLR4 es una cepa que carece del plásmido Ti y contiene el plásmido pZLR4 en el que se ha clonado el gen *traR* y una fusión *traG::lacZ* (Cha *et al.*, 1998). Esta cepa es incapaz de producir su propio autoinductor, y la fusión *traG::lacZ*, que da un pigmento azulado, sólo se expresa en presencia de moléculas autoinductoras exógenas.

Se cultivó *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 en 5 mL de YEM líquido (Tabla 7) durante 18 hs. Se prepararon placas con medio YEM agarizado (1.4% p/v de agar) suplementadas con 30 µg/mL de gentamicina y sobre éste medio, se adicionaron 5 mL de medio YEM semisólido (0.7% p/v de agar) suplementado con 40 µg/mL de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido; 20 mg/mL en dimetilformamida), e inoculado con 500 µL de una suspensión del cultivo de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Luego de solidificado el medio, se realizaron pocillos en el agar, donde se sembró la muestra del extracto orgánico de autoinductores, los controles respectivos y los sobrenadantes de cultivo correspondientes a diferentes tratamientos. Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 hs.

Tabla 7: medio de cultivo YEM

Composición	Concentración
Manitol	5 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
FeCl <sub>3</sub> (10%, p/v)	0,1 mL
MnSO <sub>4</sub> (10%, p/v)	0,1 mL
Ext. Levadura	0,5 g/L
pH	7

### 3.5 Extracción de Proteínas Celulares Totales.

La extracción y determinación se realizó de acuerdo al protocolo de Skorupska *et al.* (1985). Se centrifugaron 5 mL de cada cultivo celular a 10000 rpm por 10 min a 20°C, se resuspendió en 1 mL de agua destilada, las cuales se centrifugaron a 10000 rpm, y los pellets se resuspendieron en 1 mL de NaCl (0.85% p/v). Las muestras se

centrifugaron 10 min., y los pellets se resuspendieron en buffer de extracción. Se realizó una nueva centrifugación por 10 min., y los pellets fueron resuspendidos en buffer de sonicación. Se realizó la sonicación (3 pulsos de 10 seg. en cada muestra) utilizando el sonicador KONTES Microsonic Cell Disrupter, y luego se centrifugaron las muestras por 10 min.

#### Buffer de Extracción

0,1M Tris

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,101 g

Glicerol 15 g

β-mercaptoetanol 100 μL

Volumen final 100 mL

pH 7,2

#### Buffer de Sonicación

0,1M Tris

Glicerol 15 g

Volumen final 100 mL

Para cuantificar las proteínas celulares totales en las muestras se siguió el protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando seroalbúmina como patrón proteico.

#### **Reactivo de Bradford**

Se disolvieron 100 mg de Coomassie Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95% (v/v), se adicionaron 100 mL de ácido fosfórico (85% p/v) y se llevó a volumen final de 1 litro con agua miliQ. La solución fue filtrada hasta la desaparición del color azul.

Una vez agregado el reactivo de Bradford, tanto las muestras como los patrones, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar 10 minutos. Luego, se midió absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Visible de simple haz, contra blanco de reactivos.

### 3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proteínas celulares totales

Para obtener el perfil de proteínas celulares totales mediante SDS-PAGE se siguió el protocolo descrito por Laemmli (1970).

A las muestras sonicadas se le agregó un 10 % del volumen total en buffer muestra.

Se prepararon dos geles: el concentrado (o de apilamiento) y el separador (o de corrida).

El gel separador se preparó según se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Composición del gel separador para proteínas.

Solución	Gel separador
Stock acril/bis(30%)	12 mL
Agua Mili Q	10 mL
1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8)	7,5 mL
SDS 10%	0,3 mL
APS 10%	150 $\mu$ L
TEMED 100%	15 $\mu$ L
Volumen Total	30 mL

Tabla 12: Composición del gel concentrador para proteínas

Solución	Gel concentrador
Stock acril/bis (30%)	1,3 mL
Agua miliQ	6,1 mL
0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8)	2,5 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L
APS 10%	50 $\mu$ L
TEMED 100%	10 $\mu$ L
Volumen Total	10 mL

Las condiciones de corrida fueron 200 volt hasta que el frente de corrida llegó al final del gel.

#### Soluciones:

##### Stock acril/bis 30% (p/v)

Acrilamida            292g

Bis-acrilamida      8g

Llevar a 1000 mL con Agua miliQ

1,5 M Tris-HCl

Tris 181.5 g

Disolver en 500 mL de agua miliQ. llevar a pH 8.8 con HCl. Completar con agua hasta volumen final (1000mL)

0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8)

Tris 121g

Disolver en 500mL de agua miliQ. llevar a pH 6.8 con HCl. Completar con agua hasta volumen final (1000 mL)

SDS 10%

SDS 100g

Añadir agua destilada hasta completar el volumen de 1000 mL.

APS (Persulfato de Amonio)

APS 150 mg

Agua Mili Q 1.5 mL

Buffer muestra

Agua miliQ 3 mL

0.5 M Tris-HCl (pH: 6,8) 1 mL

Glycerol 50% 1.6 mL

2-β-Mercaptoetanol 0.4 mL

Azul de bromofenol 1% 0.4 mL

Buffer de corrida (5x)

Tris 15 g/L

Glicina 72 g/L

SDS 5 g/L

pH 8.3

### 3.5.2 Revelado del gel de proteínas mediante tinción con Coomasie Blue R-250

#### Procedimiento:

Se sumergió en solución fijadora y se dejó 16 hs. Se lavó tres veces durante 15 min. con agua miliQ. Se coloreó con solución fijadora durante 30 min. Se agregó solución decolorante hasta que el fondo del gel apareció limpio.

#### Soluciones:

##### Solución fijadora:

Metanol	446.6 mL
Ácido acético glacial	93.3 mL
Agua miliQ	446.6 mL

##### Solución colorante:

Coomasie Blue R-250	1 g
Agua miliQ	1000 mL

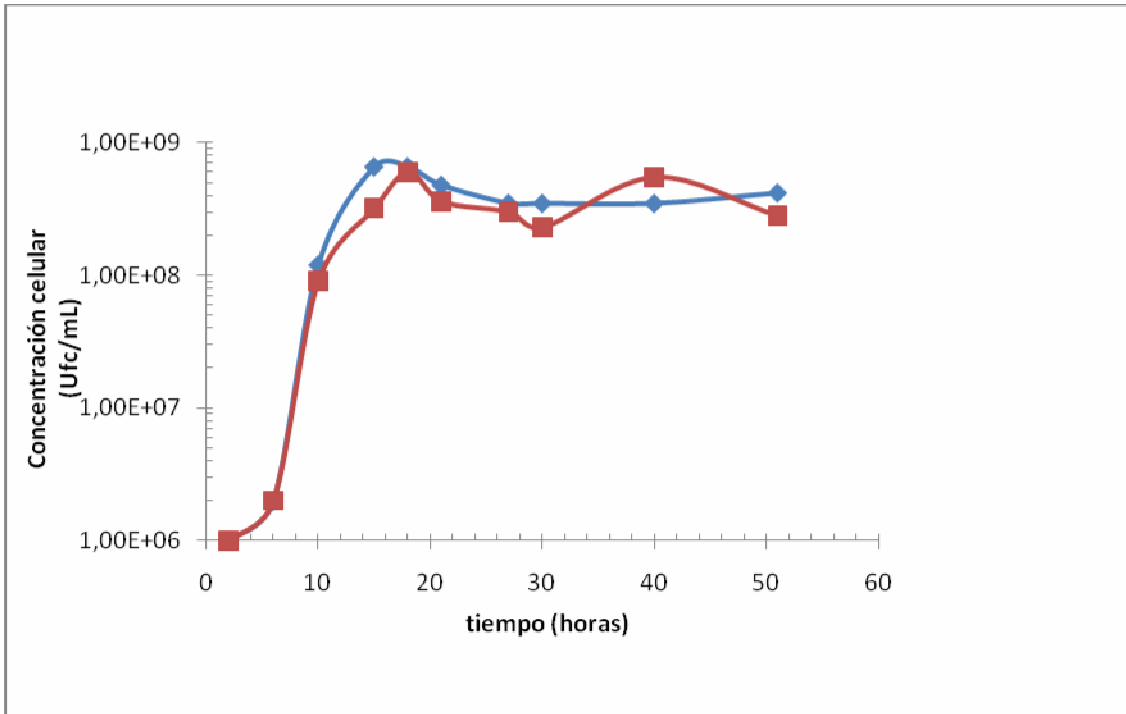
##### Solución decolorante:

Ácido acético	70 mL
Metanol	250 mL
Agua miliQ	680 mL

## **4 Resultados y discusión**

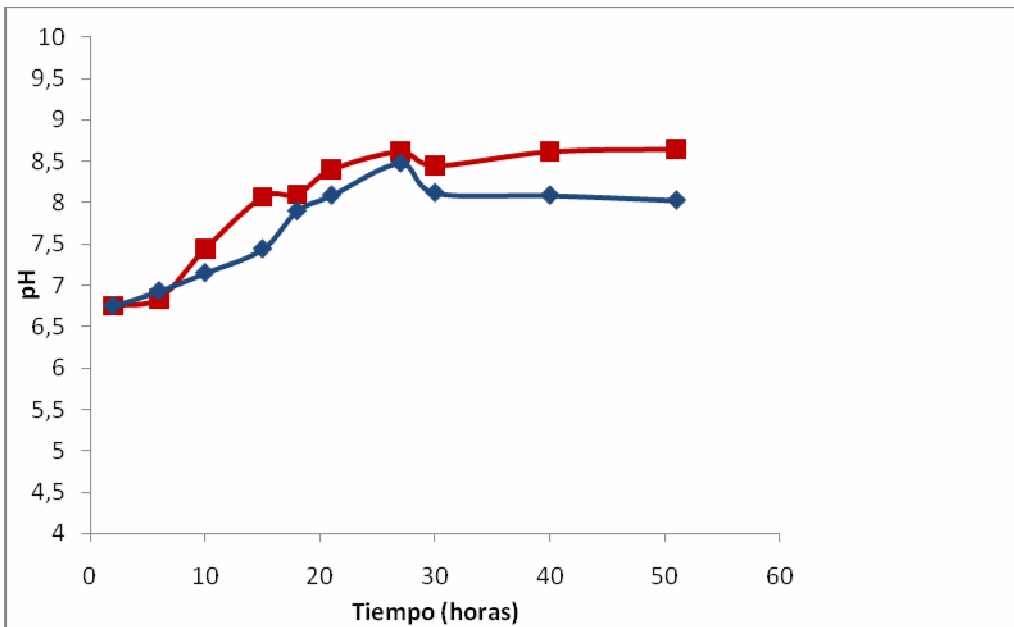
### **4.1 Fisiología del crecimiento de *A. brasilense* Az-39 en un medio Nfb**

El estudio de la cinética de crecimiento de *A. brasilense* Az-39 se llevó a cabo en el medio de cultivo Nfb (descrito en materiales y métodos). En base a información bibliográfica respecto de sus características microaerofílicas, se plantearon ensayos en dos condiciones de aireación, en los que se utilizó la relación 1/5 y 3/5 de volumen de medio/volumen de frasco, con una agitación de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad, obteniéndose los resultados que se observan en la Figura 5.



**Figura 5:** Cinética de crecimiento de *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb desarrollado en diferentes condiciones de aireación. (■) 1/5 y (◆) 3/5 relación volumen de medio/ volumen de frasco.

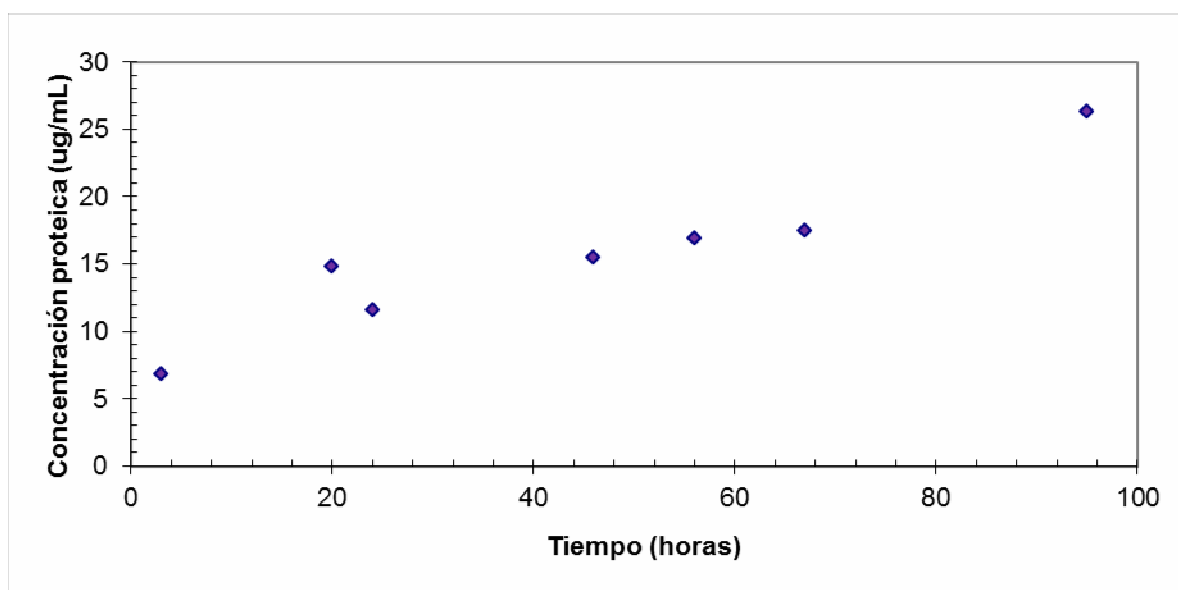
Al mismo tiempo se realizó un registro de los valores de pH en ambos procesos.



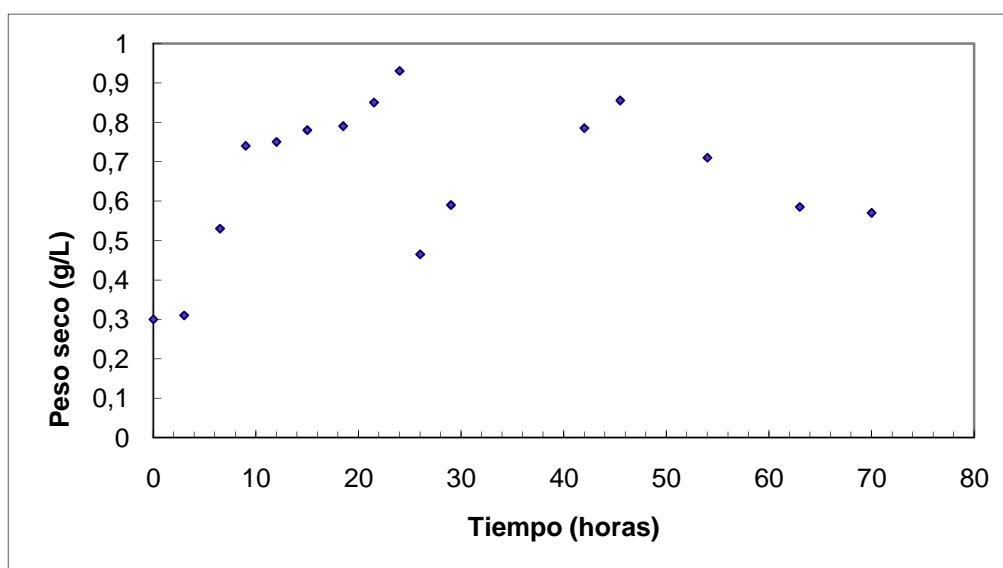
**Figura 6:** Evolución de pH de los cultivos líquidos de *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb crecido en diferentes condiciones de aireación. (■) 1/5 y (◆) 3/5 relación volumen de medio/ volumen de frasco.



En la Figura 5 se observa una fase exponencial de crecimiento bien definida en ambos procesos hasta las 20 horas, luego se evidencia una fase estacionaria estable para el proceso con relación de 3/5 y variable para el proceso con relación de 1/5. Este ensayo se extendió durante 52 horas, superado este tiempo se dificultó tomar una muestra representativa del cultivo debido a la floculación del mismo. Este fenómeno está descrito en *A. brasilense* y es atribuido a diferentes factores. Según Sadasivan & Neyra (1987) la floculación suele estar inducida por la edad y condiciones del cultivo, tanto como estrés por falta de agua. En este caso, una de las causas sería que se produce un estrés inducido por el aumento de pH ya que *A. brasilense* Az-39 en este medio de cultivo alcaliniza debido al consumo de la fuente de carbono (ácido málico), el cual se muestra en la Figura 6. Si bien este mecanismo utilizado por la cepa se pudo observar en ambos procesos, pasadas las 24 horas de crecimiento fue acentuado en aquel cuya relación era 1/5, motivo por el cual se seleccionó la relación 3/5, como condición de operación para los ensayos previstos en el plan de trabajo. Una vez determinadas las condiciones de trabajo, se procedió a calcular los parámetros cinéticos de crecimiento. Para evitar que el proceso de floculación nos condujera a errores en la curva de crecimiento, se realizó peso seco de la biomasa y proteínas celulares totales. En la Figura 7 se observa la curva de crecimiento obtenida en base a la concentración proteica vs. tiempo, por medio del método de Bradford (1976) y en la Figura 8 se observa la curva de crecimiento obtenida para peso seco vs. tiempo.



**Figura 7:** Concentración de proteínas en el desarrollo del crecimiento de *A. brasilense* en medio Nfb.



**Figura 8:** Estimación de biomasa en el cultivo de *A. brasilense* Az-39 crecido en medio Nfb.

En las gráficas obtenidas de las Figuras 7 y 8 se puede observar que tanto para peso seco como proteínas luego de las 24 horas de crecimiento se generó un descenso en el número de células, que arrojó valores menores de concentración proteica y peso seco; debido posiblemente al comienzo del proceso de floculación, momento en el cual se puede observar la aparición de los primeros flóculos. Los parámetros cinéticos calculados en base a dichos datos se muestran en la siguiente tabla:

	Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )	Tiempo de duplicación (h)
Peso seco	0,14	4,77
Concentración proteica	0,15	4,40

Los valores hallados en el presente trabajo son coincidentes con los reportes presentados por Ona *et al.* (2005) en los que obtuvieron una velocidad específica de crecimiento de  $0,19 h^{-1}$ . Los mismos autores también reportan el fenómeno de floculación, lo que confirma nuevamente esta característica del género en cuestión.

## 4.2 Evaluación de la producción de metabolitos promotores del crecimiento vegetal

### 4.2.1 Producción e inducción de la síntesis de ácido indol acético (AIA)

Según Cassán *et al.* 2008, *A. brasilense* posee tres vías biosintéticas de AIA dependientes de triptófano. En el presente trabajo se estudió su producción en medio líquido Nfb y se evaluó la inducción de su síntesis mediante el agregado de triptófano y tripteína. Esta última tiene un alto contenido en triptófano y es una fuente alternativa del mismo.

Según lo expuesto por Salkowsky (1889) y Brick *et al.* (1991), la concentración del grupo orgánico indol que posee la auxina es directamente proporcional a la intensidad del color rojo producido. En este método colorimétrico, el cambio de color es debido al resultado de una reacción oxidativa a partir del ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación es sustituido un grupo amino por el otro proveniente de  $\text{FeCl}_3$ . Se realizó una curva patrón con concentraciones de AIA comprendidas entre 0 y 60  $\mu\text{g/ml}$ . Los datos obtenidos a partir de los patrones se indican en la Figura 9.

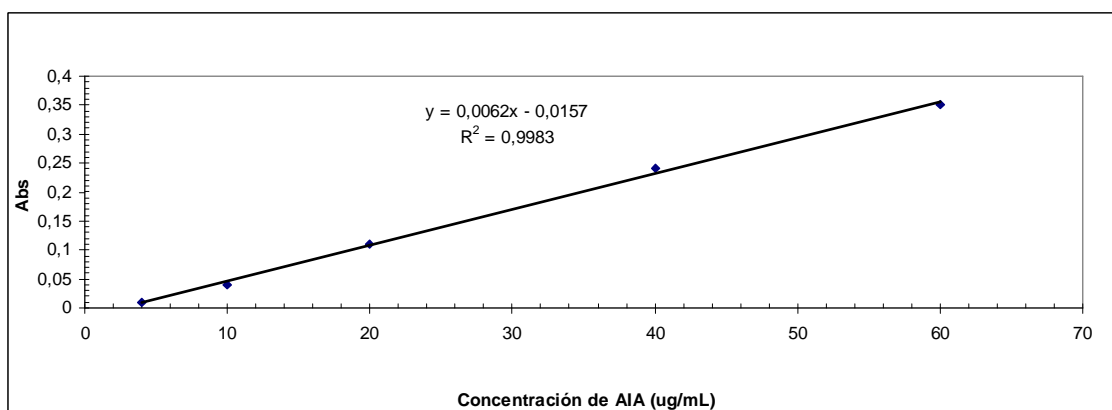
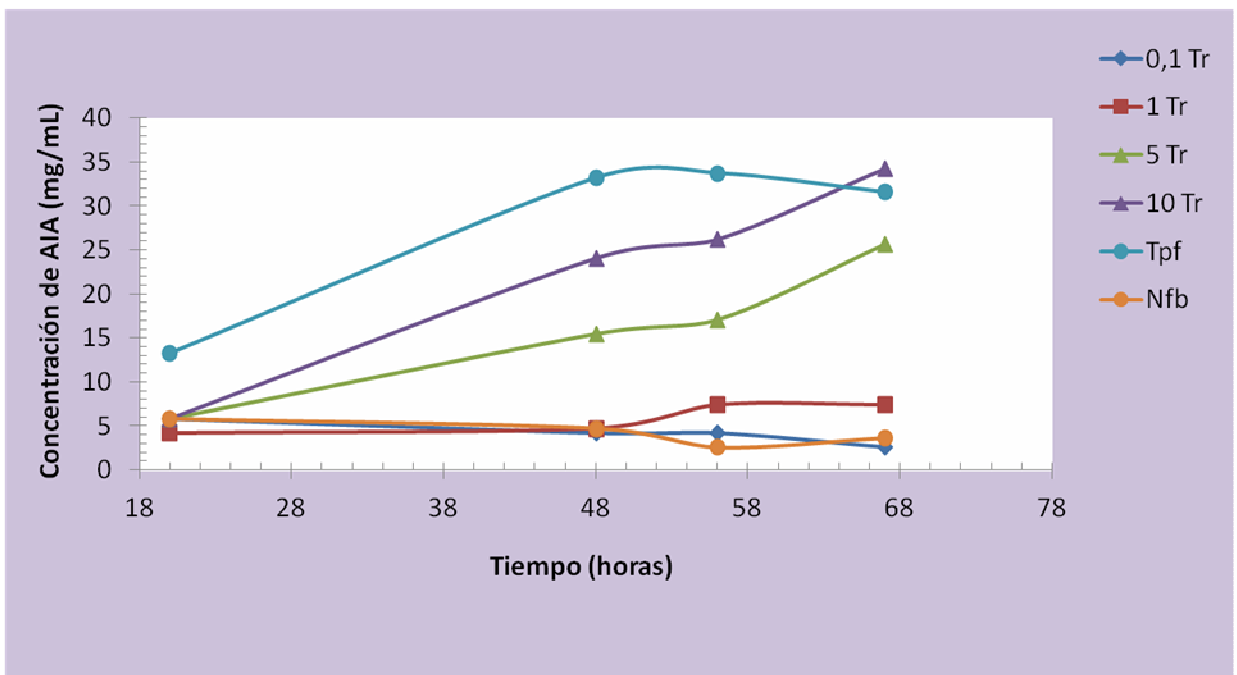


Figura 9: Curva de calibración de AIA.



**Figura 10: Graduación de color de las diferentes concentraciones de AIA en las soluciones patrón.**

En la Figura 10 se muestran los valores de AIA producidos por *A. brasilense* se cuantificaron en el sobrenadante obtenido de los cultivos en diferentes tiempos.

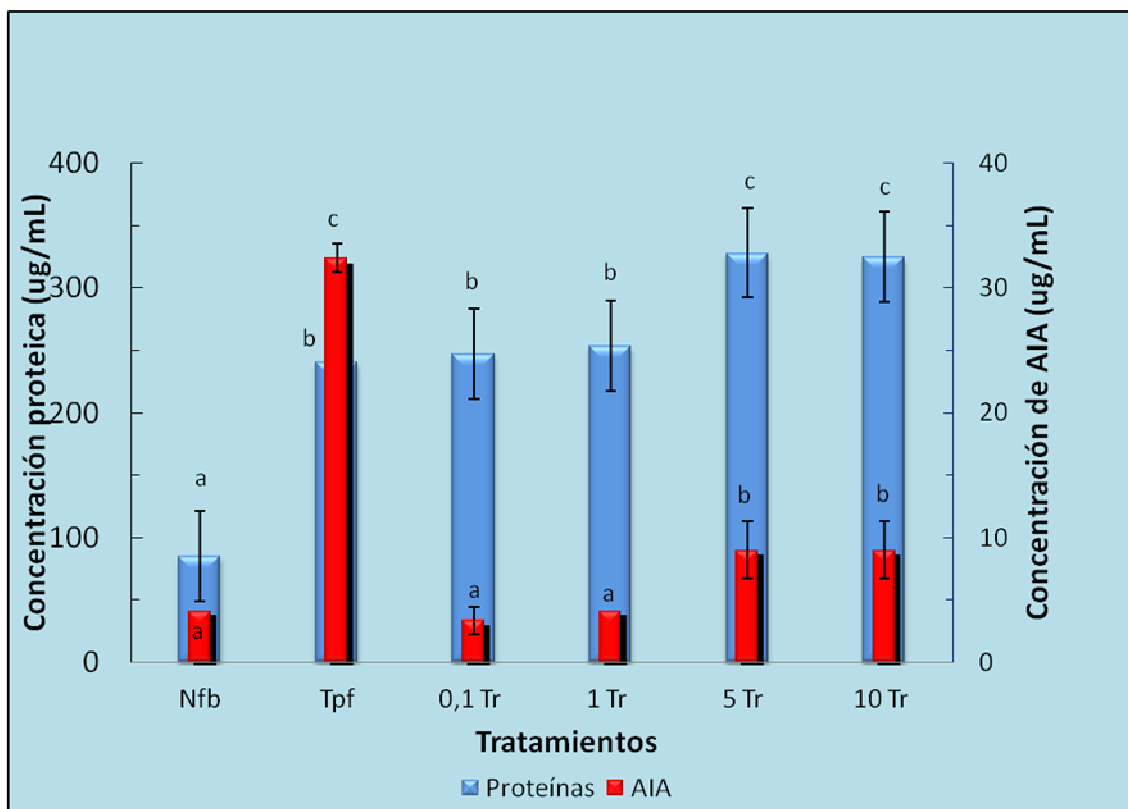


**Figura 10: Valores de AIA obtenidos de *A. brasilense* inducido con: 0,1 g/L de tripteína; 1g/L de tripteína; 5 g/L de tripteína; 10 g/L de tripteína; 0,05 g/L de triptófano y un control (Nfb) sin inducción.**

Se observó en el período evaluado, que todos los tratamientos producen reacción positiva frente al reactivo de Salkowsky, indicando de esta manera que aún en el tratamiento control (sin inducir), *A. brasilense* tiene la capacidad de sintetizar AIA. Este

resultado indicaría que la ruta utilizada para la síntesis, no dependiente de Trp es utilizada o bien que el extracto de levadura utilizado en el medio Nfb contiene la cantidad suficiente para facilitar esta vía sintética. Esto se condice con los resultados de Ahmad *et al* (2005), donde establecieron que la concentración óptima de triptófano en el medio debe ser de 2000 a 5000  $\mu\text{g/ml}$  para obtener una concentración de AIA de 22.4  $\mu\text{g/ml}$ . Con respecto a los valores hallados en el resto de los tratamientos, no hay diferencia significativas entre 0.1 y 1g. de tripteína adicionado, respecto del control, pero sí es marcado el aumento en la producción de AIA en 5 y 10 g de tripteína y Trp. Por otra parte, según se puede observar en la Figura 10, la producción de AIA es dependiente del medio de cultivo y de la fase de crecimiento de los mismos.

Los valores obtenidos respecto de concentración proteica y concentración de AIA, para el punto de mayor productividad establecido a las 48 horas de proceso son mostrados en la Figura 11.



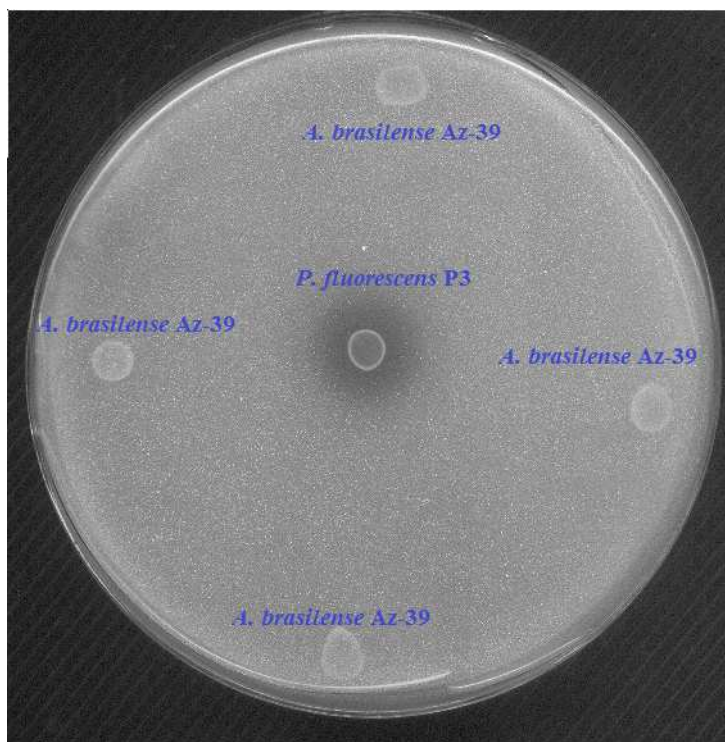
**Figura 11: Concentración proteica y de AIA en el punto de mayor productividad (48 horas) por parte de *A. brasilense* Az-39 cultivados en medio líquido.**

Del análisis estadístico con el test DSM ( $p < 0,05$ ) por lo que se puede inferir que no hay diferencias significativas entre la concentración de AIA para los tratamientos Nfb (control), 0,1 Tr y 1 Tr. Tampoco se observaron diferencias significativas para los

tratamientos 5 Tr y 10 Tr. Si hubo diferencias significativas entre los dos grupos mencionados anteriormente, entre ellos y con el tratamiento Tpf. En cuanto a la concentración proteica las diferencias significativas fueron observadas entre 5 Tr, 10 Tr y el control. Y los tratamientos 0,1 Tr, 1 Tr y Trp mostraron diferencias significativas con el control y los tratamientos 5 Tr y 10 Tr. Como se indicara anteriormente, se pudo comprobar que las vías utilizadas por *A. brasilense* para la producción de AIA son dependientes de triptófano y por otro lado, la tripteína es utilizada en mayor medida para la producción de biomasa, lo que permitió alcanzar altas concentraciones celulares. Ambos resultados serían prometedores al momento de utilizar dicha cepa para la preparación de biofertilizantes aplicables al cultivo de soja. En tal sentido, Cassán *et al.* (2009) demuestran el efecto positivo de esta fitohormona sobre la promoción de la germinación de semillas en soja. Varios estudios, entre ellos el llevado a cabo por Mathesius *et al.* (1995), sugieren que este tipo de auxinas juegan un rol importante en el desarrollo del nódulo.

#### 4.2.2 Solubilización de fósforo

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y además, en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Alexander 1980). Por este motivo se estudió si *A. brasilense* Az-39 cultivada en medio de cultivo Nfb, tenía la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico en el medio NBRIP. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12. Se observó que en ninguna de las cuatro repeticiones se puede apreciar solubilización de fosfato respecto del control positivo utilizado, *P. fluorescens* P3.



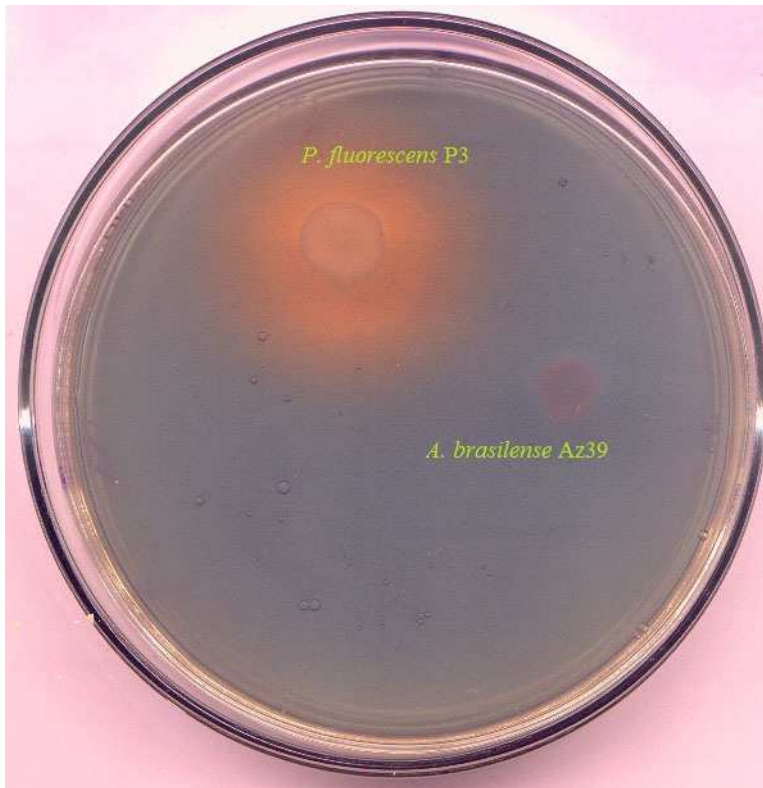
**Figura 12: Ensayo de solubilización de fosfato inorgánico en NBRIP.**

Según diferentes reportes bibliográficos, otras especies de *Azospirillum* tienen la capacidad de solubilizar fosfatos. Seshadri *et al.* (2000), indican que *A. halopraeferens*, una bacteria que no metaboliza la glucosa, y por lo tanto no produce ácidos orgánicos, solubilizó fosfato inorgánico insoluble *in vitro* por mecanismos desconocidos. Según reportes de Puente *et al.* (2004) y Rodríguez *et al.* (2004), dos cepas de *A. brasilense* y una cepa de *A. lipoferum* fueron capaces de producir ácido glucónico, lo que condujo a la solubilización de fosfato insoluble en las rocas. Por otro parte, la inoculación de cardón (un cactus gigante) con *A. brasilense* Cd evidenció una mayor solubilización de fosfato y un aumento en el crecimiento de las plantas (Carrillo *et al.*, 2002).

#### 4.2.3 Producción de sideróforos

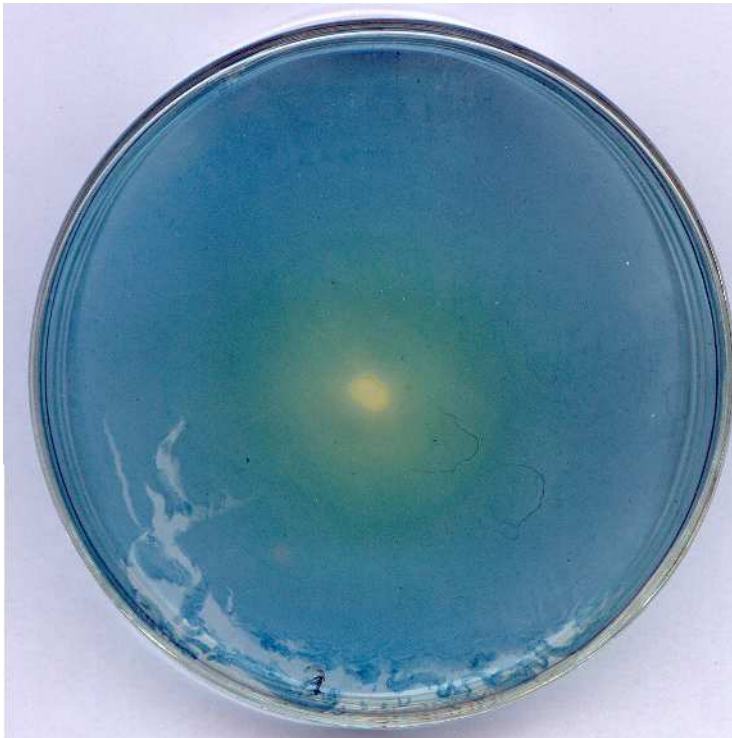
Considerando la habilidad de algunas cepas de *Azospirillum* para producir compuestos quelantes del ion  $Fe^{3+}$ , se realizó un estudio cualitativo de la producción de sideróforos por *A. brasilense* Az-39 mediante el ensayo universal CAS (Chrome Azurol Sulphonate), el cual detecta cambios de color del complejo CAS-Fe (del azul al naranja) después de la quelación del hierro por sideróforos. Dicho medio fue adaptado para el crecimiento de *Azospirillum* con el agregado de medio Nfb, según se detalla en el

trabajo de Tórtora *et al.* (2011), ya que utilizando el ensayo CAS (Schwyn & Neilands, 1987) y utilizando como control positivo *P. fluorescens* P3 no se encontraban resultados positivos (Fig. 13).



**Figura 13: Ensayo de producción de sideróforos en medio universal CAS.**



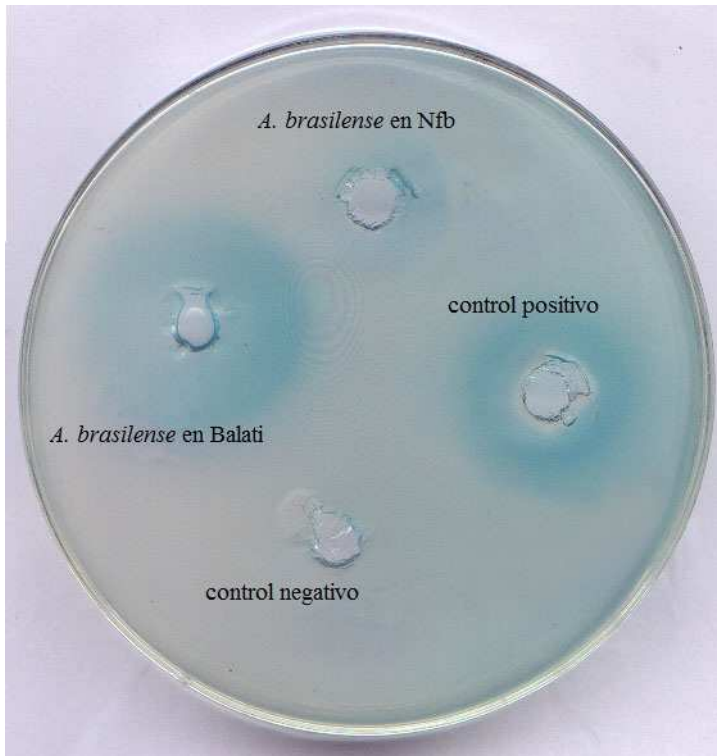


**Figura 14:** Ensayo de producción de sideróforos por *A. brasilense* Az-39. Medio Nfb+CAS, incubado por 48 horas a 28°C.

De esta manera, *A. brasilense* Az-39 se muestra con otro mecanismo para la promoción del crecimiento vegetal como las cepas *A. brasilense* endofíticas reportadas por Tórtora *et al.* (2011).

#### **4.3 Determinación de la producción de moléculas señal *quorum***

Se desarrollaron cultivos de *A. brasilense* en medio Nfb hasta fase estacionaria de crecimiento con la finalidad de estudiar si utiliza como medio de comunicación intercelular el sistema de *quorum sensing* mediado por moléculas del tipo acil homoserina lactona (AHL) dependientes de la densidad celular. Con el extracto provenientes de dichos cultivos, se realizaron los bioensayos con las cepas reporteras *Chromobacterium violaceum* CV026 (Mc Clean *et al.*, 1997) y *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4 (Cha *et al.*, 1998) que detectan moléculas del tipo AHL's de cadena corta y larga respectivamente (Figura 15 y 16).

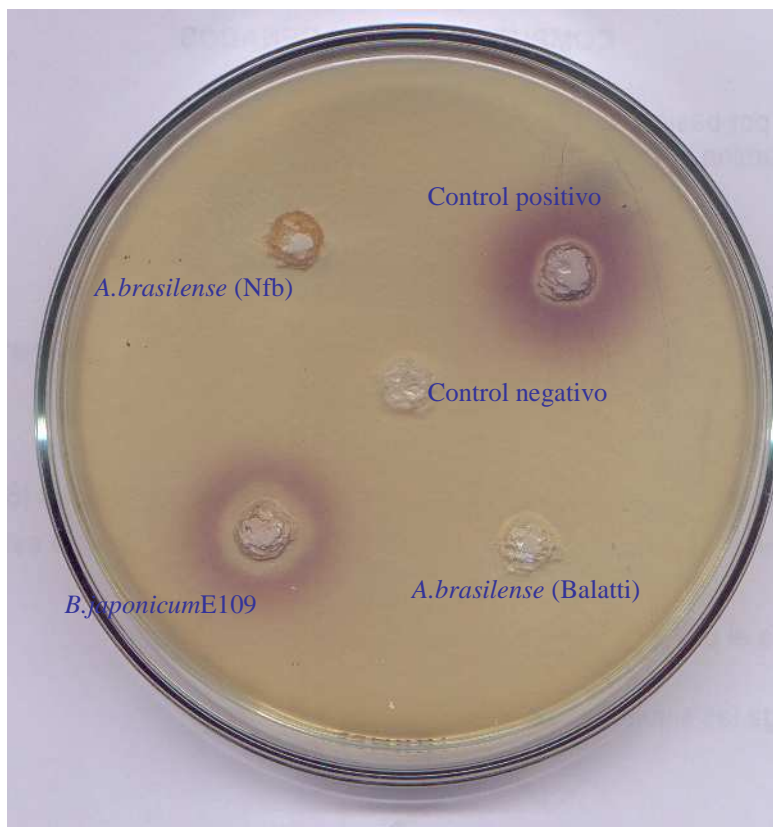


**Figura 15:** Placa con el microorganismo biosensor *A. tumefaciens* sembrada con extractos de autoinductores de: *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb; *A. brasilense* Az-39 en medio Balati; medio Nfb esteril como control negativo; *Sinorhizobium meliloti* B-399 como control positivo.

Como se puede observar, se detectó una difusa coloración formando un halo en la placa de producción de AHL's de cadena larga por *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb. Cuando se desarrollaron los ensayos para la determinación de la cinética de *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb, se comprobó que el pH del medio en fase estacionaria alcanza valores cercanos a 9. Streitwieser *et al.* (1985), considerando la estructura química de los anillos lactonados, sugirieron que las moléculas de AHL's pueden ser hidrolizadas bajo condiciones alcalinas. A continuación se realizó el mismo ensayo pero utilizando el medio de cultivo Balatti (Balatti, 1992). En dicho medio, los valores de pH se mantienen cercanos a la neutralidad (Bonino, 2013).

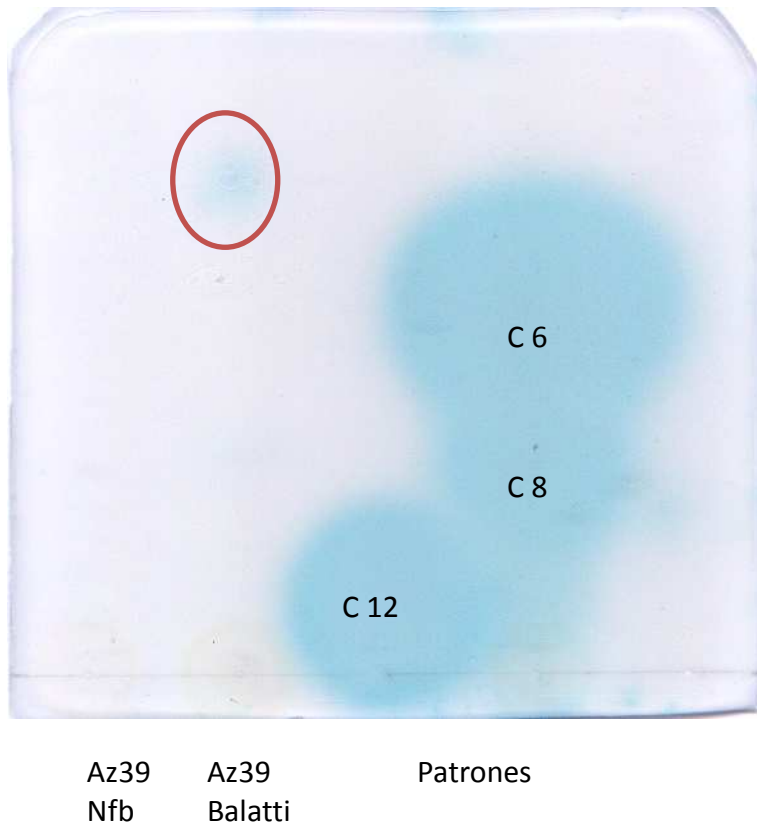
Los resultados se pueden apreciar en la Figura 15, demostrando efectivamente la presencia de moléculas autoinductoras de cadena larga en el extracto de *A. brasilense* crecido en medio Balatti.

En cuanto a la producción de moléculas AHL's de cadena corta producidas por *A. brasilense* los resultados obtenidos fueron negativos utilizando ambos medios de cultivo (Balati y Nfb), se muestran en la Figura 16.



**Figura 16:** Placa con el microorganismo biosensor *C. violaceum* sembrada con extractos de cultivos de: *B. japonicum* E-109 en medio Balatti; *Sinorhizobium meliloti* B-399 (control positivo); *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb; *A. brasilense* Az-39 en medio Balatti y medio estéril (control negativo).

La presencia de AHL's en el extracto de *A. brasilense* crecido en medio Balatti fue confirmado a través de una corrida cromatográfica en capa delgada (RP-TLC) C<sub>18</sub> (Figura 17).



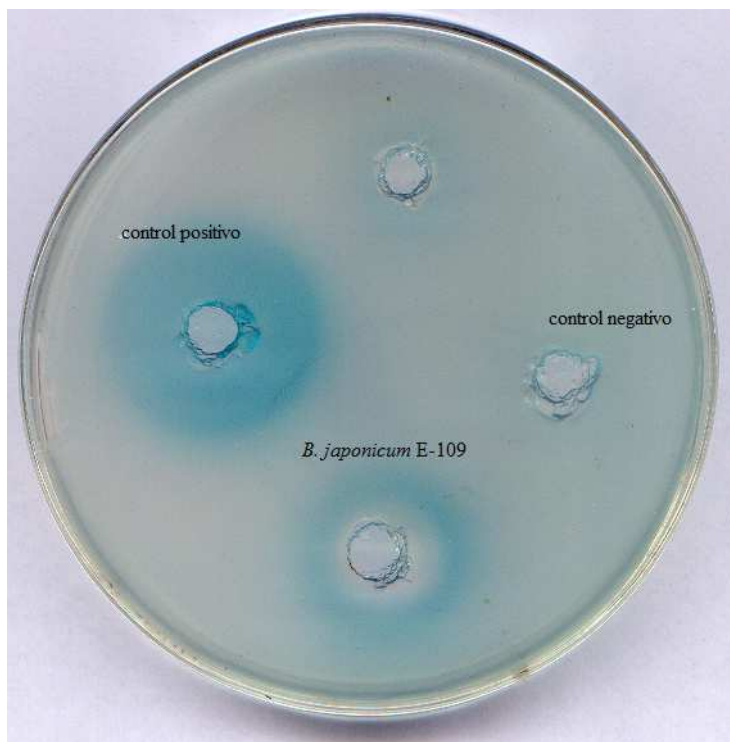
**Figura 17: Corrida cromatográfica en capa delgada de RP-TLC C<sub>18</sub>.**

En esta oportunidad se puede observar al menos una molécula de AHL.

Solo se han reportado que de 40 aislamientos de *Azospirillum* sólo cuatro cepas fueron productoras de AHL's y todas pertenecientes a *A. lipoferum* (Vial *et al.*, 2006).

Aun cuando el ensayo utilizado permite sólo una valoración cualitativa, es interesante destacar el hallazgo de AHL's producidas por *A. brasilense*, de los cuales no hay reportes previos en la literatura.

En la Figura 18 se corroboró la producción de AHL's de cadena larga por parte de *B. japonicum* E-109, ya que en la figura 4.3 se evidencia que produce AHL's de cadena corta.



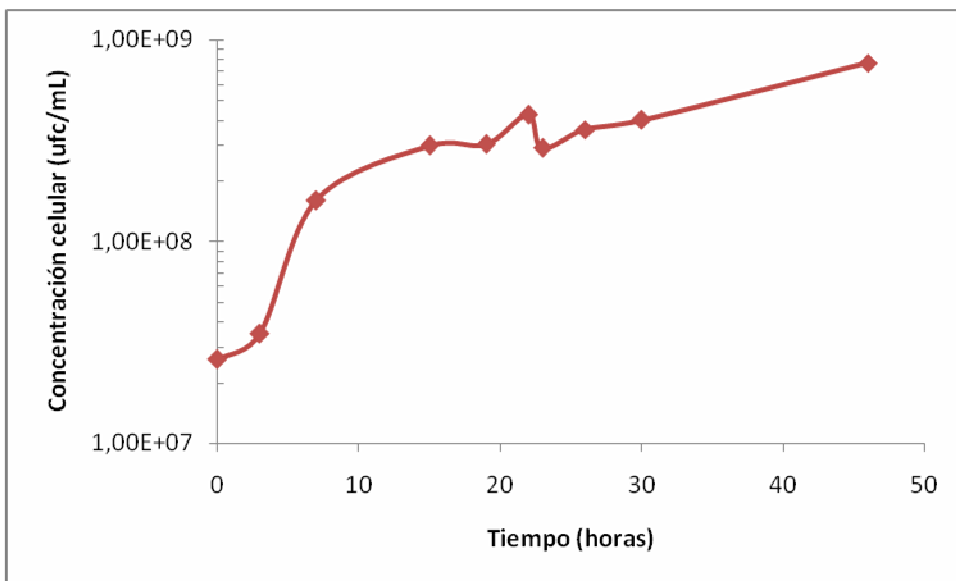
**Figura 18:** Placa con el microorganismo biosensor *A. tumefaciens* sembrada con extractos de autoinductores de: *B. japonicum* E-109 en medio Balatti; *Sinorhizobium meliloti* B-399 como control positivo y medio estéril como control negativo.

Observamos que *B. japonicum* E-109 produce moléculas AHL's tanto de cadena larga como de cadena corta.

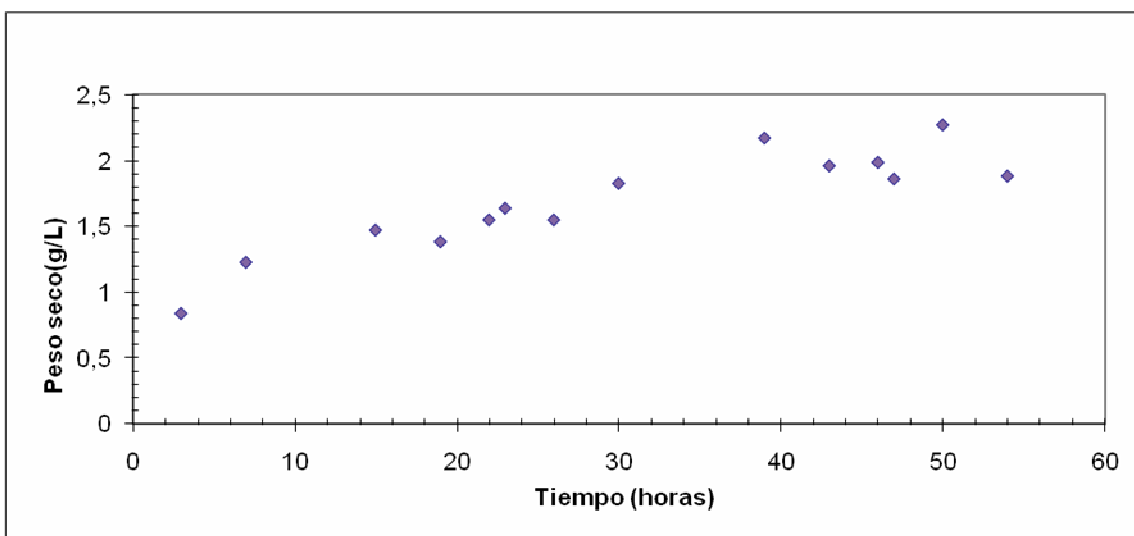
#### **4.4 Incidencia de las moléculas señal de *B. japonicum* sobre *A. brasilense***

##### **4.4.1 Cinética de crecimiento**

Al detectar mediante los ensayos antes descritos, la capacidad de *B. japonicum* para la producción de AHL's, tanto de cadena corta como de cadena larga, se procedió a concentrarlas y agregarlas al cultivo de *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb para observar si se producían cambios en la producción de metabolitos promotores de crecimiento. Para ello, se cultivó *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb el cual fue adicionado de la cantidad equivalente de moléculas señal de *B. japonicum* E-109 correspondiente al volumen de cultivo utilizado. Se realizaron las curvas de crecimiento para realizar una comparación en el comportamiento cinético (Figuras 19 y 20).



**Figura 19: Cinética de crecimiento de *A. brasilense* Az-39 en medio Nfb con el agregado de moléculas señal de *B. japonicum* E-109.**



**Figura 20: Estimación de biomasa en el cultivo de *A. brasilense* Az-39 crecido en Nfb con el agregado de moléculas señal de *B. japonicum* E-109.**

En la Figura 19 se observa la misma disminución en el número de células viables a las 24 hs atribuido al comienzo del proceso de floculación. En cuanto a los valores de peso seco obtenidos (Figura 20) la disminución a las 24 hs debida aparentemente a este proceso no fue tan marcada.

Haciendo un análisis comparativo de la cinética de crecimiento de ambos procesos se obtuvo el gráfico presentado en la figura 21.

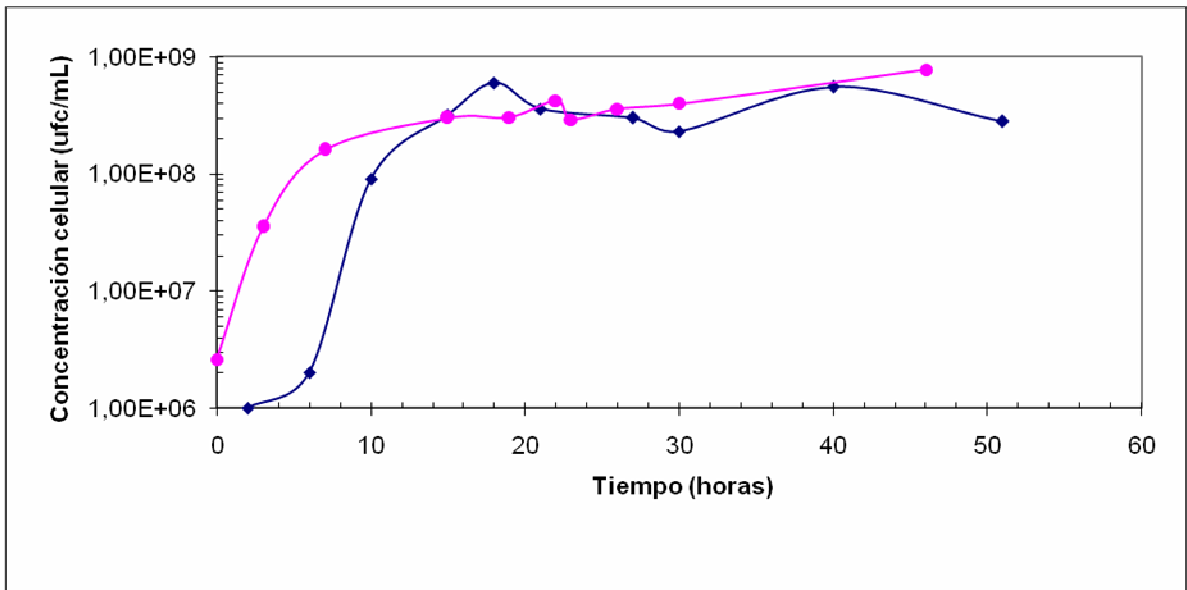


Figura 21: Curvas de crecimiento celular de *A. brasilense* en medio Nfb y medio Nfb con el agregado de autoinductores de *B. japonicum*. (◆) Nfb control, (●) Nfb + ext. *B. japonicum*.

En base a los resultados obtenidos en esta primer comparación podemos observar un comportamiento diferente de la bacteria en presencia de autoinductores de *B. japonicum*. El proceso de floculación se produce de manera similar al que se observó en los ensayos de crecimiento de *A. brasilense* realizados anteriormente. El número de células viables alcanzado fue mayor que en el tratamiento control. También podemos observar que el crecimiento de *A. brasilense* en presencia de los autoinductores luego de las 40 horas sigue aumentando y en el tratamiento control comienza la fase de muerte. A continuación en la Figura 22, se presenta la evolución de la biomasa en el tiempo de crecimiento empleado para los dos tratamientos.

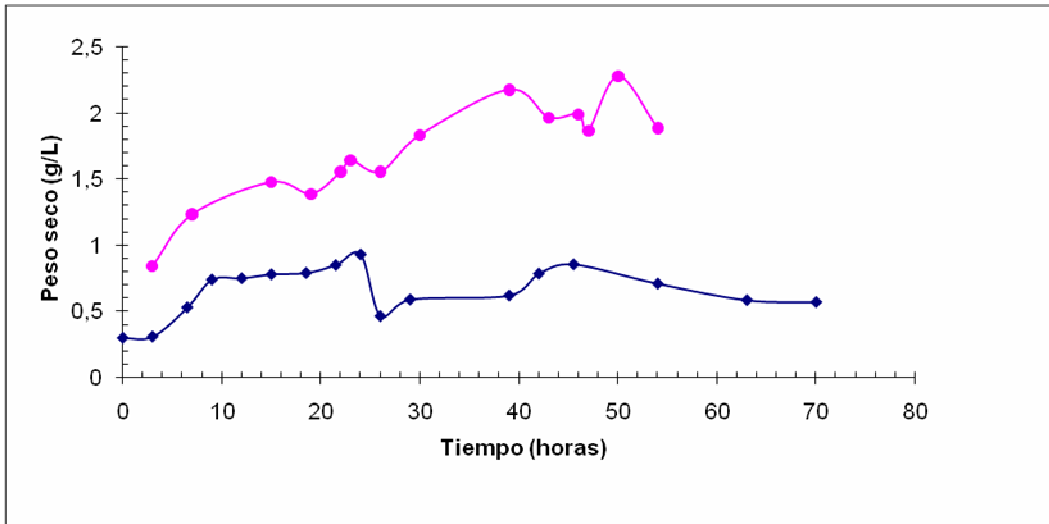


Figura 22: Comparación de las curvas de peso seco de *A. brasilense* en medio Nfb y medio Nfb con el agregado de autoinductores de *B. japonicum*. (◆) Nfb control, (●) Nfb + ext. *B.japonicum*.

Se puede observar que las diferencias entre ambos procesos son marcadas. El cultivo de *A. brasilense* en presencia de autoinductores de *B. japonicum* arrojó valores de hasta un 71% mayores de peso seco que el cultivo de *A. brasilense* (control). También se puede observar en la Figura 22 que a las 24 hs de tratamiento se presenta el descenso normal en los valores, producto del comienzo del proceso de floculación.

En la Figura 23 se presentan los resultados correspondientes a las determinaciones de concentración proteica en los procesos ya mencionados.

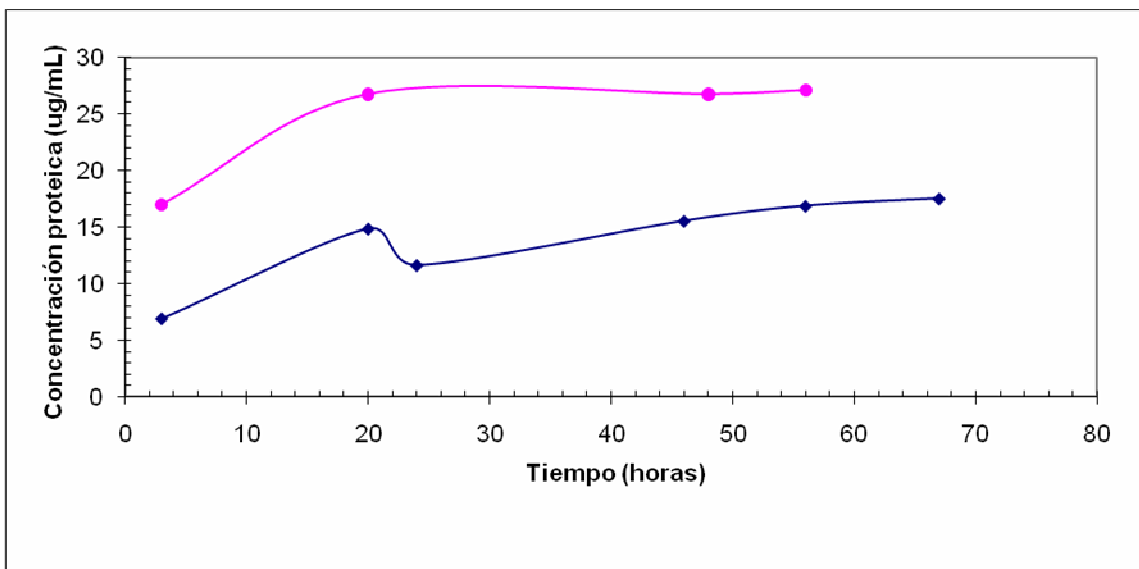


Figura 23: Incidencia del agregado de moléculas autoinductoras de *B. japonicum* sobre la concentración proteica de *A. brasilense*. (◆) Nfb control, (●) Nfb + ext. *B.japonicum*.



Estos resultados también muestran incrementos apreciables en la concentración proteica obtenida para el tratamiento de *A. brasilense* con autoinductores de *B. japonicum*, como era de esperarse ya que todas las mediciones (células viables, peso seco y concentración proteica) fueron llevadas a cabo en el mismo ensayo.

Se puede inferir que el agregado de autoinductores provenientes de *B. japonicum* al cultivo de *A. brasilense* afecta positivamente la cinética de crecimiento pero no inhibe el proceso de floculación. Chebotar *et al.* (2001) informaron resultados similares para *B. japonicum* crecido con el agregado de sobrenadante estéril de *P. fluorescens* WCS365, y confirman que el aumento de biomasa se debe a la producción de compuestos extracelulares por parte de *P. fluorescens* WCS365.

#### 4.4.2 Producción de sideróforos en presencia de autoinductores de *B. japonicum*

Para la realización de este estudio, se llevó a cabo la utilización del medio CAS modificado, utilizando el cultivo de *A. brasilense* con el agregado de autoinductores de *B. japonicum*. En la Figura 24 se muestra el resultado.

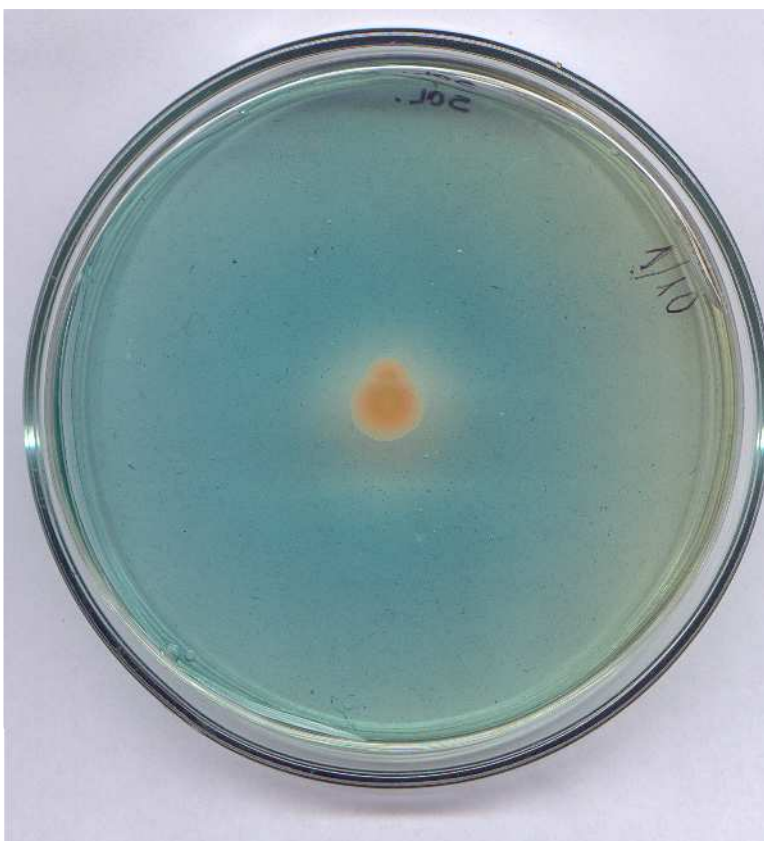


Figura 24: Ensayo de producción de sideróforos por *A. brasilense* Az-39 con el agregado de autoinductores de *B. japonicum*. Medio Nfb+CAS, incubado por 7 días a 28°C.

Bajo estas condiciones, el resultado obtenido fue negativo, ya que no se observó cambio de coloración alrededor de la colonia. Se concluye que el agregado de autoinductores de *B. japonicum* tiene un efecto negativo sobre la producción de este metabolito secundario promotor del crecimiento. Resultados similares fueron alcanzados con *A. lipoferum* por Boyer *et al.*, (2008). Si bien estos datos no han sido reportados para *A. brasilense* en otros trabajos, este hallazgo genera la necesidad de realizar estudios posteriores para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen.

#### 4.4.3 Producción de ácido indol acético (AIA) en presencia de autoinductores de *B. japonicum*

En este ensayo se realizó la medida de la producción de AIA de *A. brasilense* con el agregado de autoinductores de *B. japonicum* como se explicó anteriormente. No se realizaron los ensayos de inducción con triptófano y tripteína. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25.

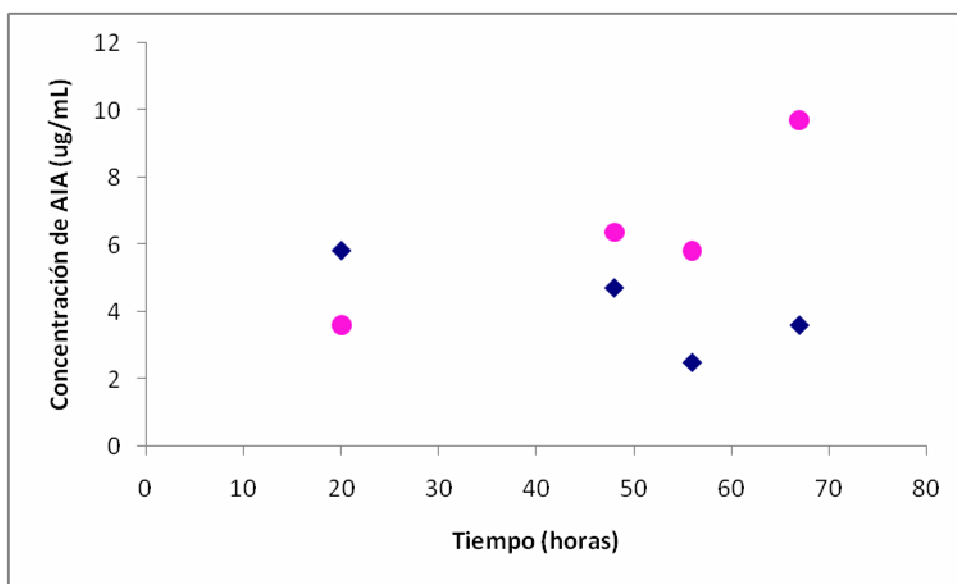


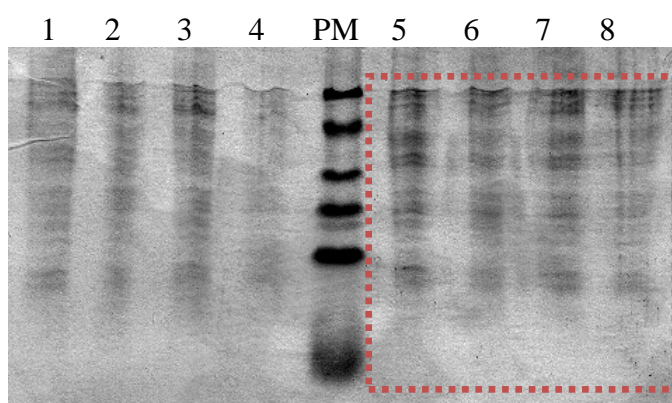
Figura 25: Incidencia del agregado de moléculas autoinductoras de *B. japonicum* sobre la concentración de AIA generada por *A. brasilense*. (◆) Nfb control, (●) Nfb + ext. *B.japonicum*.

En la Figura 25 se observa que la concentración de AIA para el tratamiento de *A. brasilense* con el agregado de autoinductores de *B. japonicum* fue mayor en hasta un 62% en comparación con el tratamiento control, el cual comienza con 5,83 mg/mL y decrece a medida que transcurre el tiempo. Inferimos en consecuencia que el agregado de autoinductores de *B. japonicum* favorece de manera positiva la producción de AIA por parte de *A. brasilense*. Los resultados alcanzados en este punto son novedosos, ya que en la actualidad no se encuentran reportes similares al respecto.

#### 4.4.4 Comparación de perfiles proteicos

Según informes de Di Cagno *et al.*, (2011), el dialogo molecular establecido entre bacterias se difunde a toda la comunidad. Para ser clasificado como una comunicación verdadera, el compuesto señal debe ser creado para transmitir la información, debe poder ser percibido por otro de los actores de la comunidad y generar una respuesta en el receptor durante la comunicación intra e inter especies. Así, el mensaje transmitido se traslada a nivel de expresión de proteínas, de modo que estudios de proteómica de estas comunidades, permitiría un entendimiento del lenguaje bacteriano, como por ejemplo mediado por AHL's.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proteínas celulares totales con el objetivo de observar si ocurren cambios en la expresión proteica de *A. brasilense*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.3.



**Figura 5.3:** Perfil proteico de *A. brasilense* en diferentes tratamientos. 1: control (20 hs); 2: control (48 hs); 3: control (56 hs); 4: control (67 hs); PM: marcador de PM (7,1-209 kD); 5: Nfb+AHL *B. japonicum* (20 hs); 6: Nfb+ AHL *B. japonicum* (48 hs); 7: Nfb+ AHL *B. japonicum* (56 hs); 8:Nfb+ AHL *B. japonicum* (67 hs).

A partir de la observación cualitativa del gel obtenido, se demostró que los perfiles de bandas presentan leves diferencias en aquellos tratamientos de *A. brasilense* crecidos en presencia de AHL's de *B. japonicum* respecto de los tratamientos control. Si podemos decir por la intensidad de las bandas obtenidas en el tratamiento de *A. brasilense* crecidos en presencia de AHL's de *B. japonicum* que hubo un aumento de la concentración proteica.

## 5 Conclusiones

- ✚ *A. brasilense* AZ-39 fue capaz de producir sideróforos y sintetizar AIA en diferentes condiciones.
- ✚ El medio de cultivo Balatti resultó adecuado y favorable para el desarrollo de *A. brasilense* en medio líquido.
- ✚ La cepa *A. brasilense* AZ-39 posee la capacidad de producir moléculas del tipo AHL de cadena larga cuando se cultiva en medio Balatti.
- ✚ La cepa *B. japonicum* E-109 posee la capacidad de producir moléculas del tipo AHL de cadena larga y corta.
- ✚ El crecimiento celular de *A. brasilense* en medio líquido, se vio influenciado beneficiosamente por la presencia de autoinductores de *B.japonicum*.
- ✚ Las suspensiones celulares de *A. brasilense* AZ-39 obtenidas mediante la adición de autoinductores de *B.japonicum* E-109, mostraron un aumento en la producción de AIA y ausencia en la producción de sideróforos.

### CONSIDERACIONES GENERALES

En el suelo los microorganismos adicionados en forma de biofertilizantes, podrían estar en bajas densidades celulares respecto a poblaciones nativas o naturalizadas. Los resultados obtenidos en este estudio, mostrarían la ventaja de que *Azospirillum* en presencia de AHL's secretadas por *Bradhyrizobium*, aumentaría su biomasa, condición que le conferiría mayor competitividad frente a los otros miembros de la comunidad rizosférica. La infectividad o asociación de *Azospirillum* depende de su capacidad de colonización, sobrevivencia y competitividad cuando se encuentre formando parte de la comunidad microbiana de la rizósfera. De este modo, la cepa de *Azospirillum* estimulada con el agregado de AHL's de *Bradhyrizobium* incluida en el suelo con el inoculante sería capaz de sobrevivir y asociarse a las raíces de la planta con mayor facilidad, ya que potencia casi todas sus capacidades.

Un profundo conocimiento de las relaciones rizobianas que se establecen en la rizosfera podría contribuir al adecuado desarrollo de estrategias de producción e inoculación, que posibiliten el establecimiento de relaciones simbióticas exitosas en términos agrícolas.

Este estudio sugiere que la cepa de *A. brasilense* Az-39 posee la capacidad de producir AHL's y que mediante el proceso denominado *quórum sensing* se regulan varios mecanismos PGPR de la cepa, ya que los mismos fueron modificados por el agregado de AHL's exógenas.

## 6 Bibliografía

- Ahmad F.; Ahmad I.; Khan M.S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolated of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk Journal Biology*, 29: 29-34.
- Alexander M. (1980). Transformaciones microbianas del fósforo. En: *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT editor, México, 355-371.
- Bacca B.; Soto L.; Pardo M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Elementos/ número 38*.
- Balatti P.A. (1992). Producción de inoculantes para leguminosas. Tecnología de las fermentaciones aplicada a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.
- Barea J.M.; Azcón R.; Azcón-Aguilar C. (2004). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. En: *Plant Surface Microbiology*. A. Varma, L. Abbott, D. Werner, R. Hampp Eds. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania. 351-371.
- Bashan Y. & de-Bashan L. E. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 108: 77-136.
- Boyer M.; Bally R.; Perrotto S.; Chaintreuil C.; Wisniewski-Dyé F. (2008). A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Research in Microbiology*, 159: 699-708.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brick J.M.; Bostock R.M.; Silverstone S.E. (1991). Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 535-538.
- Brockwell J.; Bottomley P.; Thies J.E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility. *Plant and Soil*, 174: 143-180.
- Burdman S.; Vedder D.; German M.; Itzigshon R.; Kigel J.; Jurkevitch E. ; Okon Y. (1998). Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. En: *Biological Nitrogen Fixation for the 21st. Century*, Elmerich,

- C, Kondorosi, A. & Newton W, Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 609-612.
- Carrillo A. E.; Li C. Y.; Bashan Y. (2002). Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften*, 89: 428-432.
  - Cassán F.; Perrig D.; Sgroy V.; Masciarelli O.; Penna C.; Luna V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az-39 and *Bradyrhizobium japonicum* E-109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil Biology*, 4: 28-35.
  - Cassán F.; Sgroy V.; Perrig D.; Masciarelli O.; Luna V. (2008). Producción de fitohormonas por *Azospirillum sp.* Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. En: *Azospirillum sp: cell physiology, plant interaction, and agronomy research in Argentina*. Asociación Argentina de Microbiología, Eds. Cap. 4: 61-78.
  - Cattelan A.J.; Artel P.G.; Fuhrmann J.J. (1999). Screening for Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Science Society*, 63: 1670-1680.
  - Cha C.; Gao P.; Chen Y.C.; Shaw P.D.; Farrand S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 11:1119-1129.
  - Chaiharn M.; Chunchaleuchanon S.; Lumyong S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal Microbioly Biotechnology*, 25(11):1919-1928.
  - Chebotar V. K.; Asis Jr C.A.; Akao S. (2001). Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Biology Fertil Soils*, 34:427-432.
  - Compant S.; Duffy B.; Nowak J.; Clement C.; Ait Barka E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71; 9: 4951-4959.

- Creus C.M.; Pereyra M.A.; Molina-Favero C.; Ramella N.A.; Cassanovas E.M.; Pereyra C.M.; Arruebarrena-Di Palma A.; Lamattina L.; Sueldo R.J.; Barassi C.A. (2008). La pared celular como target en la promoción del crecimiento de las plantas por *Azospirillum*. En: *Azospirillum sp: cell physiology, plant interaction, and agronomy research in Argentina*. Asociación Argentina de Microbiología, Eds. Cap. 6: 97-106.
- de-Bashan L. E.; Holguin G.; Glick B. R.; Bashan Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: *Microbiologia agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biologico, planta-microorganismo*, Eds. Ferrera-Cerrato, R., & Alarcon, A. Publicado por: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. C. , 8: 170-224.
- Di Cagno R.; De Angelis M.; Calasso M.; Gobbetti M. (2011). Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *Journal of proteomics*, 74: 19 - 34.
- Dobbelaere S.; Vanderleyden J.; Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22: 107-149.
- Döbereiner J. (1992). The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum* En: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H.Schleifer, Ed. *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag. New York, 2236-2253.
- Döbereiner J.; Day J. M. (1976). Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. En: *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. Editado por: W.E. Newton and C.J. Nyman. Washington State University Press, Pullman, Wash, 518-538.
- Drinkwater L.E. & Snapp S.S. (2007). Nutrients in agroecosystems: Rethinking the Management paradigm. *Advances in Agronomy*, 92: 163-186.
- Ecker B.; Weber O. B.; Kirchhof G.; Halbritter A.; Stoffels M.; Hartmann A. (2001). *Azospirillum doedereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4- grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:17-26.
- Glickmann M.; Dessaux J. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 793-796.



- González J.E. & Keshavan N.D. (2006). Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology Molecular Biology*, 73: 3587-3594.
- González N. (2006). Fijación de nitrógeno en soja. Situación actual y perspectivas en la Argentina. En: *3º Congreso de Soja del Mercosur*, Conferencia Plenaria, Rosario, Argentina, 376.
- González, N.; Peticari A.; Stegman B.; Rodríguez Cáseres E. (1997). Nutrición nitrogenada. En: Giorda L.M.y Baigorri, H.E.J. Eds. *El cultivo de la soja en Argentina*. INTA, Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez- EEA, 188-198.
- Hartmann A. & Zimmer W. (1994). Physiology of *Azospirillum*. En: *Azospirillum-plant associations*. Okon, Y., Ed. CRC Press, Boca Raton, 15-39.
- Hernández-Mendoza J.L.; Moreno-Medina V.R.; Quiroz-Velásquez J.D.; García-Olivares J. G.; Mayek-Pérez N. (2010). Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Edificio Manuel Ancizar Ed, 224.
- <http://mhrussel.wordpress.com/2013/02/06/myth-week-2-bacteria-focus-organism-azospirillum-brasilense/>
- <http://www.datuopinion.com/quorum-sensing>
- Huergo L.F.; Monteiro R.A.; Bonatto A.C.; Rigo L.U.; Steffens M.B.R.; Cruz L.M.; Chubatzu L.S.; Souza E.M.; Pedrosa F.O. (2008). Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. En: *Azospirillum sp: cell physiology, plant interaction, and agronomy research in Argentina*. Asociación Argentina de Microbiología, Eds. Cap.1: 17-28.
- Illmer P.A.; Barbato A.; Schinner F. (1995). Solubilization of hardly-soluble AIPO<sub>4</sub> with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology Biochemistry*, 27: 260-270.
- Jimenéz R.; Virgen G.; Tabares S.; Olalde V. (2001). Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: Agro-Biotecnología. *Avance y Perspectiva*, 20: 395-400.
- Johri B.N.; Sharma, A.; Sharma A.K.; Glick B.R. (2003). Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas sp.* strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology & Biochemistry*, 35:887-894.

- Kadouri D.; Jurkevitch E.; Okon Y. (2003). Involvement of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3244-3250.
- Kloepper J.W. (1994). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (other system). En: *Azospirillum/Plant Association*. Y. Okon, Eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 135-166.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Loh J.T. & Stacey G. (2001) Feedback regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Molecular Microbiology*, 41: 1357-1364.
- Mathesius U.; Schlaman H.; Spaink H.; Sautter C.; Rolfe B.; Djordjevic M. (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant Journal*, 14:23-34.
- Mc Clean K.H.; Winson M.K.; Fish L.; Taylor A.; Chhabra S.R.; Camara M.; Daykin M.; Lamb J.H.; Swift S.; Bycroft B.W.; Stewart G.S.A.B.; Williams P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143: 3703-3711.
- Milerue N. & Nikornpun M. (2000). Studies on heterosis of chili (*Capsicum annuum* L.). Kasetsart. *Journal Natural Science*, 34: 190-196.
- Miller J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.
- Nautiyal C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270.
- O'Sullivan D.J. & O'Gara F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Reviews*, 56(4): 662-676.
- Ona O.; Impe J. V.; Prinsen E.; Vanderleyden J. (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters*, 246: 125-132.

- Patten C.L. & Glick B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8: 2795-9801.
- Peticari A. (2005). Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. *Congreso Mundo Soja*. Buenos Aires, 121-126.
- Peticari A.; Arias N.; Baigorri H.; De Battista J.J.; Montecchia M.; Pacheco Basurco J.C.; Simonella A.; Toresani S.; Ventimiglia L.; Vicente R. (2003). Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. En: *El libro de la soja*. Buenos Aires. Servicios y Marketing Agropecuario, 69-76.
- Puente M. E.; Bashan Y.; Li C.Y.; Lebsky V. K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6: 629-642.
- Ravn L.; Christensen A.B.; Molin S.; Givskov M.; Gram L. (2000). Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal Microbiology Methodology*, 44: 239-251.
- Rodríguez Cáceres E.A. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 990-991.
- Rodriguez H. & Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.
- Rodríguez H.; González T.; Goire I.; Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91: 552-555.
- Sadasivan L. & Neyra C.A. (1987). Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *Journal Bacteriology*, 169: 1670-1677.
- Salkowski E. (1989). Ueber die Bildung von Flüchtigen Fettsäuren bei der ammoniakalischen Harnghährung. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 13: 264-274.
- Sanchez-Contreras M.; Bauer W.D.; Gao M.; Robinson J.B.; Downie J. A. (2007). Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 362: 1149-1163.

- Schuhegger R.; Ihring A.; Gantner S.; Bahnweg G.; Knappe C.; Vogg G.; Hutzler P.; Schmid M.; Breusegem F.B.; Eberl L.; Hartmann A.; Langebartels C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment*, 29: 909-918.
- Schwyn B.; Neilands J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47-56.
- Seshadri S.; Muthukumuramasamy R.; Lakshiminarasami C.; Ignacimuthu S. (2000). Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science*, 79: 565-567.
- Skorupska A.; Derylo M.; Lorkiewicz Z. (1985). Role of noncarbohydrate substitutions on Rhizobium exopolysaccharide in nodulation process. *Archives of Microbiology*, 143: 307-310.
- Streitwieser J.; Heathcock C. (1985). Introduction to organic chemistry. *MacMillan Publishers*, New York, N.Y, 859-861.
- Tapia-Hernández A.; Mascarúa-Esparza M.A.; Caballero-Mellado J. (1991). Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios*, 60: 73-83.
- Torres-Rubio M.G.; Valencia S.A.; Bernal J.; Martínez 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 Microbiología*, 42: 171-176.
- Tortora M.L.; Díaz-Ricci J.C.; Pedraza R.O. (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, 193: 275–286.
- Vassileva M.; Vassilev N.; Azcon R. (1998). Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system, *World Journal Microbiology Biotechnology*, 14: 281-282.
- Vial L.; Cuny C.; Gluchoff-Fiasson K.; Comte G.; Oger P. M.; Faure D.; Dessaux Y.; Bally R.; Wisniewski-Dyé F. (2006). N -acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule. *FEMS Microbiology Ecology*, 58:155-168.

- Yahalom E.; Okon Y.; Dovrat A. (1987). *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 510-514.
- Zahir A.Z.; Arshad M.; Frankenberg W.T. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agricultura. *Advances in Agronomy*, 81: 97-101.