



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Obtención de cultivos de *Bradyrhizobium japonicum* en sistema feed- batch, y su utilización en
la producción de inoculantes para soja.**

María de los Angeles Cavallero

Santa Rosa (La Pampa)

Argentina

2007

Directora: MSc Fabiola Pagliero

Codirector: Dr Marcelo Soria

Agradecimientos:

- **Al departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa; por la ayuda y el apoyo brindado durante el desarrollo del trabajo de Investigación.**
- **A mi familia por acompañarme durante todo este tiempo.**

Resumen

Los procesos de agriculturización e intensificación que han experimentado los sistemas productivos en nuestro país, han llamado la atención por su impacto sobre el eje ecológico del concepto de sustentabilidad.

En este escenario, los cultivos y las nuevas tecnologías deben integrarse, analizarse y evaluarse. El énfasis internacional sobre el desarrollo sustentable de los recursos ha fijado nuevamente su atención en el rol potencial de proveer nitrógeno a la agricultura. Una alternativa es aumentar la fijación biológica del nitrógeno (FBN) mediante el empleo de inoculantes optimizados. En función de la problemática planteada y teniendo en cuenta que el nitrógeno es esencial en los cultivos, se planteó como hipótesis de trabajo que es posible obtener cultivos con alta concentración de rizobios en fase de crecimiento exponencial, más eficientes en la nodulación que los microorganismos provenientes de fase estacionaria del crecimiento.

Se utilizaron células pertenecientes a cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, que se encontraban en fase exponencial y estacionaria del crecimiento, empleadas con el objetivo de evaluar la eficiencia diferencial en la nodulación de plantas de soja (*Glycine max*). Se realizó la caracterización del microorganismo, selección de medios de cultivo, evaluación del crecimiento celular, curva de crecimiento celular y caracterización cinética del proceso. Posteriormente se evaluó la infectividad mediante ensayos en plantas por la técnica del NMP, de microorganismos pertenecientes a las distintas fases del crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en inoculantes líquidos en base alginato.

En los resultados obtenidos se observó que los microorganismos en fase estacionaria del crecimiento tienen características diferenciales en cuanto a su comportamiento fisiológico, metabólico y morfológico con respecto a aquellos que se encuentran en fase exponencial del crecimiento. Los cultivos exponenciales obtenidos en sistema *feedbatch* tuvieron ventaja en cuanto a la supervivencia y la infectividad, con respecto a cultivos provenientes de la fase estacionaria del crecimiento. Este modo de formular los inoculantes, sería una estrategia que combina requerimientos de alta densidad junto con estado fisiológico óptimo de las células.

Índice

Introducción	1
Problemática del nitrógeno en la naturaleza.....	2
Ciclo del nitrógeno	3
Interacción rizobio-leguminosa.....	7
Características generales de los rizobios.....	8
Proceso de nodulación.....	9
Polisacáridos y componentes de superficie bacterianos requeridos para una simbiosis efectiva...	12
Bioquímica de la fijación de nitrógeno en los nódulos.....	13
Limitaciones de la interacción rizobio-leguminosa.....	15
Tipos de nódulos	16
Cultivo de leguminosas.....	17
Cultivo de soja.....	17
Importancia del cultivo de soja en la economía.....	19
Inoculación de soja con cepas seleccionadas de rizobios.....	20
Producción de inoculantes	21
Sistemas de cultivo.....	23
Cultivo continuo.....	23
<i>Batch</i> alimentado.....	24
<i>Batch</i>	25
Hipótesis y Objetivos	26
Materiales y Métodos	27
Microorganismo.....	28
Métodos de mantenimiento de la cepa.....	28
Métodos de conservación a largo plazo: Congelación.....	28
Métodos de conservación a corto plazo: agar inclinado.....	28
Medios de cultivo.....	29
Medio de cultivo inóculo.....	29
Medio de cultivo proceso.....	29
Medio para recuento de células viables y mantenimiento de la cepa.....	30

Medio de alimentación usado en experimentos de cultivos en <i>feedbatch</i>	31
Determinación del crecimiento celular.....	31
Determinación de unidades de densidad óptica (UDO).....	31
Determinación del número de células viables.....	31
Determinación de peso seco.....	32
Estudio de la cinética de crecimiento del microorganismo.....	32
Cálculo de parámetros cinéticos.....	32
Caracterización del microorganismo por análisis genómico, perfil de LPSs y proteínas.....	33
Análisis genómico.....	33
Purificación de ADN en pequeña escala.....	33
Ensayos de <i>fingerprinting</i> empleando la reacción en cadena de la polimerasa... 34	
Análisis de los productos de REP-PCR.....	35
Determinación del perfil de lipopolisacáridos (LPSs).....	36
Extracción de LPSs.....	36
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para LPSs.....	37
Revelado de geles de LPSs mediante tinción con Nitrato de plata.....	37
Determinación de proteínas totales.....	38
Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	38
Ensayos en fermentador de laboratorio.....	39
Obtención de cultivos con células en estado estacionario con alta concentración celular desarrollados en <i>batch</i>	39
Ensayo con alta concentración celular en escala de fermentador de laboratorio desarrollado en sistema <i>feedbatch</i>	40
Inoculantes líquidos acuosos.....	41
Formulación de inoculantes líquidos.....	41
Envasado y conservación de inoculantes realizados.....	41
Supervivencia en inoculantes.....	42
Determinación de la capacidad simbiótica de la cepa mediante ensayos de infectividad y efectividad en plantas.....	42
Esterilización de semillas y pregerminación.....	42

Ensayo de plantas en macetas.....	43
Solución de riego.....	44
Recuento de rizobios por el método del número más probable (NMP).....	45
Número de nódulos e infectividad.....	45
Conservación de nódulos.....	46
Resultados y discusión	47
Obtención y mantenimiento de la cepa.....	48
Selección de medios de cultivo.....	48
Curva de crecimiento y caracterización cinética del mismo.....	49
Cálculos de parámetros cinéticos.....	52
Perfiles de LPSs y proteínas del microorganismo en distintas fases del crecimiento.....	53
Obtención de cultivos en sistema de crecimiento <i>batch</i> en escala de fermentador de laboratorio.	54
Obtención de cultivos en sistema de crecimiento <i>feedbatch</i>	55
Ensayo de supervivencia celular en inoculantes.....	58
Ensayo de infectividad y efectividad en plantas: número más probable (NMP).....	61
Análisis genómico de microorganismos obtenidos de nódulos de plantas infectadas, por REP-PCR.....	62
Consideraciones Generales.....	64
Bibliografía.....	66

Introducción

Problemática del nitrógeno en la naturaleza

Uno de los componentes esenciales de las proteínas, al igual que los ácidos nucleicos y otras moléculas importantes para los seres vivos, es el nitrógeno. El principal reservorio de nitrógeno es la atmósfera, constituye hasta el 78% de los gases presentes en la misma. Sin embargo, la mayor parte de los seres vivos no pueden utilizar el nitrógeno atmosférico en su forma elemental para elaborar aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, sino que dependen del nitrógeno que se encuentra en los minerales del suelo. A pesar de la abundancia de este gas en la atmósfera, la escasez en el suelo suele ser el principal factor limitante del crecimiento vegetal. (Schoot Uiterkamp, 1990 ; Raymond, 2004).

Existen muy pocos organismos que pueden utilizar nitrógeno directamente en estado gaseoso. Las plantas lo deben tomar a partir del suelo, como nitratos disueltos en agua. Los vegetales convierten los iones inorgánicos nitrato y amonio obtenidos del suelo, en componentes orgánicos, especialmente aminoácidos constituyendo de esta forma proteínas vegetales, que luego pasarán a formar parte de proteínas animales.

Cuando los residuos de estos animales son biodegradados en los suelos, los compuestos nitrogenados inician el proceso de mineralización. El nitrógeno amoniacal tiene una mineralización rápida, formándose en primer lugar nitritos y posteriormente nitratos, ambos solubles en agua, constituyendo este último la forma adecuada de extracción por parte de los vegetales. Esta mineralización es un proceso aerobio en el que intervienen diferentes bacterias tales como azotobacter y nitrobacter. En medio anaerobio, se produce una desnitrificación, que da lugar a la formación de nitrógeno en fase gaseosa que se libera a la atmósfera.

Cuando un ecosistema se encuentra en equilibrio, el ciclo del nitrógeno por sí solo abastece al suelo del nitrógeno necesario para el desarrollo de los seres vivos. Pero ese equilibrio se altera en la mayoría de las explotaciones agrícolas, donde la gran cantidad de nitrógeno fijado no retorna al suelo, lo que implica un empobrecimiento del mismo, situación que se va agravando con las sucesivas cosechas y la aplicación de nuevas técnicas dirigidas a incrementar la producción (Peoples et.al; 1995). También puede reducir la cantidad de nitrato disponible para las plantas, la erosión del suelo, los incendios y el agua que se lixivia en el suelo. Por lo tanto, para mantener la fertilidad de los suelos, es necesario el aporte de nitrógeno fijado mediante el uso de fertilizantes químicos. Por otro lado, el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en la agricultura ha ocasionado graves problemas de contaminación. No todo el fertilizante que se aplica lo utiliza la planta sino que una cuantía importante acaba en lagos y lagunas ó lixivia a napas freáticas. La fijación biológica por medio de microorganismos agregados al suelo es la opción natural a la fertilización química.

Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es uno de los ciclos elementales que tiene lugar en la naturaleza, y se realiza principalmente por las actividades bioquímicas de los microorganismos del suelo. Este ciclo es de importancia crítica para todos los organismos. Como se muestra en la **Figura 1**, implica varias etapas: la amonificación, degradación de los compuestos orgánicos nitrogenados a amoníaco o ion amonio; la nitrificación, oxidación del amoníaco o el amonio a nitratos que son incorporados por las plantas; y la asimilación, conversión de nitratos a amoníaco y su incorporación a compuestos orgánicos. Los compuestos orgánicos

que contienen nitrógeno regresan finalmente al suelo o al agua, completándose el ciclo. El nitrógeno perdido por el ecosistema puede ser restituido por la fijación de nitrógeno, que es la incorporación de nitrógeno elemental a compuestos orgánicos.

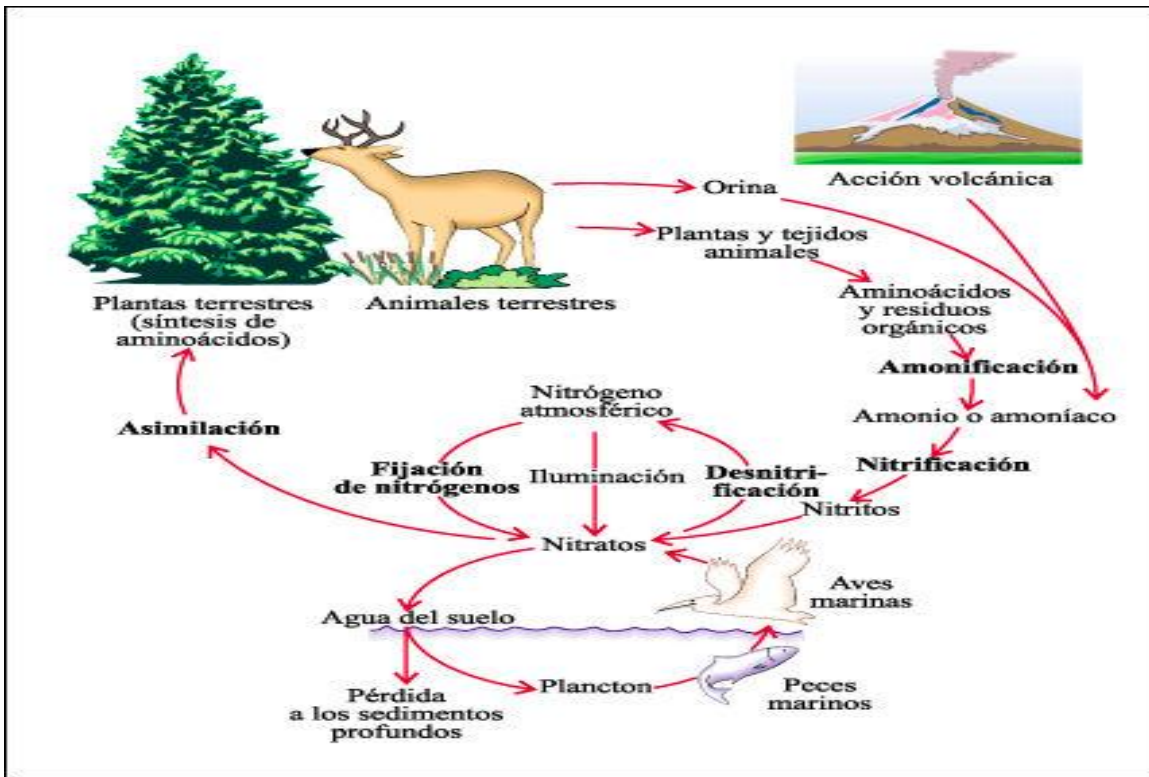


Figura 1: Ciclo del nitrógeno (Curtis, H; 2003).

El principal reservorio de nitrógeno es la atmósfera, que contiene cerca de 10^{15} toneladas de gas N_2 y el ciclo del nitrógeno involucra en forma global, la transformación de $3 \cdot 10^9$ toneladas de N_2 por año (Wang et al ; 2005). El nitrógeno gaseoso es un gas inerte y se necesita una gran cantidad de energía para romper la unión entre sus dos átomos componentes y convertirlo en nitrógeno utilizable biológicamente, capaz de combinarse

con otros elementos como el carbono y el oxígeno. Esta ruptura se denomina fijación del nitrógeno y puede realizarse por dos mecanismos:

- Las descargas eléctricas y la fijación fotoquímica que proveen suficiente energía para romper la unión del nitrógeno y unirse a tres átomos de oxígeno para formar nitratos (NO_3^-). Este mecanismo es reproducido en las plantas productoras de fertilizantes.
- La segunda forma de fijación del nitrógeno es llevada a cabo por bacterias que usan enzimas especiales en lugar de la luz solar o las descargas eléctricas. Entre estas bacterias se encuentran las que pueden vivir libres en el suelo, aquellas que lo hacen en simbiosis con raíces de plantas leguminosas y las cianobacterias fotosintéticas que viven libres en el agua. Las tres fijan N, como nitratos (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+).

Las descargas eléctricas atmosféricas aportan cerca del 10% del nitrógeno que se fija. La producción mundial industrial de nitrógeno fijado a partir de N_2 , usado para fertilizantes químicos, aporta alrededor del 25% del N_2 fijado en la tierra y la fijación biológica del nitrógeno (FBN) provee del 60% del N_2 fijado en el planeta. Las plantas pueden tomar el amonio (NH_4^+) y el nitrato (NO_3^-) por las raíces y, finalmente utilizan los átomos de N para la síntesis de las proteínas y los ácidos nucleicos. Los animales obtienen su nitrógeno al alimentarse de vegetales o de otros animales. En el metabolismo de los compuestos nitrogenados, en los animales se forma ión amonio que es tóxico, por lo cuál debe ser eliminado. Esta eliminación se hace en forma de amoníaco (algunos peces y organismos acuáticos), en forma de urea (el hombre y otros mamíferos), o en forma de ácido úrico (aves y otros animales de zonas secas). Durante el proceso de nitrificación, el amonio

(NH_4^+) se transforma primero en nitrito (NO_2^-), y éste en nitrato (NO_3^-) mediante la acción de las bacterias aerobias del suelo. El proceso se lleva a cabo en dos etapas coordinadas, controlada cada una por diferentes grupos de bacterias. Globalmente se las llama nitrobacterias. Al grupo responsable de la conversión de compuestos amoniacales en nitritos se les llama Nitrosomonas. El grupo encargado de la oxidación de los nitritos a nitratos recibe el nombre de Nitrobacter. El nitrato es absorbido por las plantas que completan su ciclo. Existe un tercer grupo de bacterias desnitrificantes (entre ellas *Pseudomonas desnitrificans*) que convierten nitritos y nitratos en nitrógeno gaseoso o en óxidos de nitrógeno gaseosos, que van a la atmósfera. También puede ocurrir el proceso de lixiviación o lavado del nitrato que es arrastre del mismo por el agua del suelo que percola más debajo de la zona radicular. Este proceso es el que produce la contaminación de las aguas subterráneas por nitrato, ya que, en general, una vez que éste deja de estar al alcance de las raíces, continúa su movimiento descendente hacia los acuíferos sin apenas ninguna transformación química o biológica. A pesar de la dinámica de este ciclo, el N suele ser uno de los elementos que escasean y actúa como factor limitante de la productividad de muchos ecosistemas. Tradicionalmente se ha abonado los suelos con nitratos para mejorar los rendimientos agrícolas. Desde que se consiguió la síntesis artificial de amoníaco, fue posible fabricar abonos nitrogenados que se emplean actualmente en grandes cantidades en la agricultura. Globalmente, el consumo de fertilizantes nitrogenados se ha incrementado de 8 a 17 Kg/ha en un período de 15 años desde 1.973-1.988 (FAO; 1990).

Mientras que la FBN puede ser regulada a las necesidades del organismo, los fertilizantes son usualmente aplicados en dosis muy altas, 50% superiores de lo que puede ser aprovechado. Esto no solamente consume energía y dinero, sino que también causa serios problemas de contaminación, particularmente en aguas de consumo. Esta situación se

agrava aún más en países subdesarrollados debido al elevado costo de los insumos e infraestructura. Situación que provoca un tratamiento indebido del suelo, con consecuencias muy desfavorables para el mismo, no asegurando la sustentabilidad del sistema productivo, pudiendo provocar en cortos períodos de tiempo, pérdidas importantes de fuentes nitrogenadas. Una de las alternativas posibles para evitar esta situación es la utilización de plantas leguminosas en los sistemas agrícolas, cuya ventaja radica fundamentalmente en su potencial para obtener nitrógeno del aire, mediante el empleo de microorganismos procariotas que poseen un sistema enzimático (nitrogenasa) que cataliza la reducción de oxígeno molecular a amonio, el cual es utilizado en distintas vías metabólicas (Wang et al; 2005).

La explotación agropecuaria de las leguminosas está distribuida en todo el mundo, incluye plantas de importancia económica como soja, trébol, alfalfa, maní, poroto, utilizadas como forrajeras o granos de importancia económica (Sprent et al; 1990).

En forma alternativa, desde hace más de 100 años, la FBN ha sido explotada extensivamente en la práctica de la agricultura. Su importancia como fuente primaria de nitrógeno, disminuyó frente al incremento del uso de fertilizantes para la producción de alimentos. Sin embargo, el énfasis internacional sobre el desarrollo sustentable, en el uso de recursos renovables ha fijado nuevamente la atención sobre el rol potencial de la FBN para proveer de nitrógeno a la agricultura (Postgate; 1982).

Interacción rizobio-leguminosa

La interacción rizobio-leguminosa es uno de los sistemas simbióticos más estudiados debido a su importancia en la producción agrícola. Esta asociación que se establece de

beneficio mutuo, de alta especificidad microorganismo-planta, se denomina simbiosis, en donde la planta huésped obtiene nutrientes nitrogenados de las bacterias, y le ofrece a éstas, una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno. Esta interacción es inhibida si existe un exceso de nitrato o amonio en el suelo (Sessitsch et al, 2002).

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. Los rizobios, 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.

Es una de las interacciones más interesantes y destacadas entre bacterias y plantas causando un aumento significativo del nitrógeno combinado.

Características generales de Rizobios

Los rizobios son bacterias del suelo pertenecientes a la familia *Rizobiaceae* y se agrupan en 6 géneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, y *Sinorhizobium*). (Martínez Romero, J;2005) (Bergey's; 2005). Se conocen hasta el momento 30 especies y todas son bacilos aeróbicos Gram-negativos. Todas las especies comprendidas en estos géneros comparten la característica específica de formar nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas (Sawada, et al; 2003).

Aproximadamente el 90% de las especies de plantas leguminosas puede llegar a formar nódulos, existiendo una alta especificidad entre las especies de leguminosas y cepas de rizobios.

Entre los rizobios que pueden establecer simbiosis con soja (*Glycine max*), el más importante desde el punto de vista agronómico es *Bradyrhizobium japonicum* (*B. japonicum*).

Las bacterias de este género son bacilos de 0.5-0.9 x 1.2-3.0 μm . Se mueven con un flagelo polar o subpolar. Este género consiste de cepas de lento crecimiento, productoras de álcali. Las colonias son circulares, rara vez translúcidas, blancas y convexas con un diámetro menor a 1 mm. Poseen un período de incubación entre 5 y 7 días. Las tres especies definidas en este género, *B. japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* y *B. liaoningense* pueden nodular a la soja. *B. japonicum* tiene una amplia gama de plantas huéspedes incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas (Madigan, M et al; 2003).

Proceso de nodulación

La efectividad en el proceso de nodulación es un complejo evento biológico que requiere coordinación en la expresión de una variedad de genes por parte de la planta y la bacteria. Este proceso es controlado al menos en parte por un intercambio difuso de señales entre la bacteria simbiote y la planta huésped. Los genes que dirigen las etapas específicas de la nodulación se denominan genes *nod* (Dixon, et al: 2004) .El proceso de nodulación implica una serie de etapas en las cuales se produce la infección y desarrollo de los nódulos radicales (Stacey et al; 1995) (Broughton, et al; 1999).

Estas etapas incluyen:

- 1) Reconocimiento adecuado de organismos, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y adherencia de la bacteria a los pelos radicales.
- 2) Invasión del pelo radical y formación de un canal o hilo de infección.

- 3) Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través de un canal de infección.
- 4) Diferenciación de las bacterias en un nuevo tipo al que se llama bacteroides, dentro de las células de la planta, y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno.
- 5) División de las células bacterianas y vegetales y formación del nódulo radical maduro.

1) Reconocimiento de organismos, tanto por parte de la planta como de la bacteria y la

adherencia de la bacteria a los pelos radicales: Las raíces de las plantas leguminosas secretan compuestos específicos que atraen a los rizobios. Entre estos compuestos se encuentran flavonoides y en respuesta a ellos los rizobios activan una serie de genes implicados en la nodulación (Blandergroen et al; 1998). El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. En la superficie del rizobio se localiza una proteína específica de la adherencia, la ricasina. Esta proteína se une al calcio y actúa captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. Otras sustancias, como las lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos, cumplen también una función en la adherencia planta-bacteria (Hirsch; 1998). Las lectinas han sido identificadas en los extremos de los pelos radicales y en la superficie de las células de Rhizobium. Después de la unión, los pelos radicales se enroscan debido a la acción de sustancias específicas secretadas por la bacteria, que se conocen como factores Nod; siendo el verdadero rol iniciar el proceso de desarrollo y diferenciación del nódulo (Gage, et al; 2000).

2) Invasión del pelo radical y formación de un canal o (hilo) de infección. Las

bacterias quedan atrapadas en la curvatura interior del pelo radical, posteriormente penetran e inducen la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición

similar a la pared celular, conocido como canal de infección, que avanza por el pelo radical. Este canal o hilo de infección se forma por invaginación de la pared celular del pelo radical, a través del cuál migran los rizobios hacia la zona subcortical.

- 3) Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través del canal de infección. La infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales, y los factores Nod estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo. Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis. Los rizobios quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora llamada membrana peribacteroidal (MBP).
- 4) Diferenciación de las bacterias en un nuevo tipo llamado bacteroides, dentro de las células de la planta. Hay una división sincronizada de los rizobios rodeados de MBPs. Al cesar la división las bacterias se transforman en unas formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas bacteroides (Oke V, et al; 2000).
- 5) División de las células bacterianas, vegetales y formación del nódulo radical maduro. Los bacteroides quedan rodeados, individualmente o en pequeños grupos por la MBP. A la estructura que contiene estos grupos de bacteroides rodeados por la MBP se les llama simbiosomas. Los bacteroides pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan, y hasta varios miles se encuentran en una sola célula vegetal. La fijación de nitrógeno no se inicia hasta que no se hayan formado los bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Cuando el nódulo se deteriora las bacterias pasan al suelo. En algunos casos las formas

bacteroides no tienen capacidad de división, pero los nódulos contienen siempre algunos rizobios en estado de latencia.

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en especial los ácidos de cuatro carbonos succinato, malato y fumarato. Estos ácidos son utilizados como dadores de electrones para la producción de ATP, y después de su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N₂. Cuando los suelos a sembrar con leguminosas tienen deficiencia en la calidad y cantidad de bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, es necesario colocar sobre la semilla o en el suelo cepas que posean la capacidad de nodular y fijar nitrógeno en simbiosis con la leguminosa huésped (Brockwell; 1995).

Polisacáridos y componentes de superficie de la bacteria requeridos para una simbiosis efectiva.

Para la formación de nódulos simbióticamente efectivos son necesarios otros componentes de superficie. Entre ellos se encuentran los exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs), antígenos de tipo K (KPSs), y glucanos cíclicos (Corzo Varillas; 2006) (Frayse, et al; 2003).

Las cepas silvestres de rizobio, como también otras bacterias Gram-negativas suelen producir grandes cantidades de exopolisacáridos. La estructura del LPS se divide en tres partes: Lípido A, núcleo oligosacárido y antígeno O. El Lípido A consiste en un

oligosacárido al que se unen ácidos grasos y es la parte hidrofóbica que ancla toda la molécula en la membrana externa. El antígeno O es una cadena polisacárida de gran peso molecular, que es altamente variable de cepa a cepa y le confiere propiedades antigénicas. Hay muchos ejemplos de mutantes de rizobio que carecen de antígeno O y son defectivos en el proceso de infección (Mathis R, et al ;2005). En general, los EPSs y los LPSs se requieren para nodular plantas que forman nódulos indeterminados.

Los beta glucanos cíclicos son moléculas cíclicas de glucosa. Están presentes en el periplasma y se secretan al medio. Su producción aumenta a baja osmolaridad y parece ser esencial para una osmoadaptación adecuada. Los mutantes de rizobio que no producen mutantes cíclicos presentan un fenotipo pleotrópico y no son capaces de llevar a cabo una simbiosis efectiva.

Bioquímica de la fijación de nitrógeno en los nódulos

En la fijación de nitrógeno interviene la enzima nitrogenasa, una proteína de gran tamaño que consiste de dos componentes, la proteína homodimérica que contiene hierro y la proteína tetradimérica que contiene hierro y molibdeno. La nitrogenasa de los nódulos radiculares posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, incluyendo la sensibilidad al oxígeno y la capacidad de reducir acetileno y N_2 (Igarashi, R etal; 2003). La nitrogenasa está localizada en el interior de los bacteroides y no es liberada al citosol de la célula vegetal. Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en especial los

ácidos de cuatro carbonos succinato, malato, y fumarato. Estos ácidos son utilizados como dadores de electrones para la producción de ATP y, después de su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción de N₂. El primer producto estable que se obtiene en la fijación del N₂ es el amoníaco, y varios tipos de pruebas indican que la asimilación del amoníaco para formar compuestos de nitrógeno orgánico en los nódulos radicales la lleva a cabo principalmente la planta. Aunque los bacteroides pueden asimilar algo de amoníaco en forma de compuestos orgánicos, poseen unos niveles muy bajos de enzimas asimiladoras de amoníaco. En cambio, la enzima glutamina sintetasa, que asimila amoníaco está presente en elevadas concentraciones en el citoplasma de la célula vegetal. Por lo tanto el amoníaco transportado desde el bacteroide a la célula vegetal puede ser asimilado por la planta en forma de aminoácido glutamina. Además de glutamina otros compuestos nitrogenados especialmente otros aminoácidos y amidas, como la asparragina y la 4-metil glutamina, y los ureidos alantoína y ácido alantoico, son sintetizados por la planta y transportados a los tejidos vegetales (Smith ; 2002).

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno.

La enzima nitrogenasa cataliza la siguiente reacción:



Este complejo enzimático cataliza en varias etapas la reducción del nitrógeno. El primer producto estable que se obtiene de la fijación de nitrógeno es el amonio, y varias pruebas indican que la asimilación del amonio para formar compuestos de nitrógeno orgánico en los nódulos radicales lo lleva a cabo principalmente la planta. Aunque los bacteroides pueden

asimilar algo de amonio para ser transferido a la planta en forma de alanina, poseen niveles muy bajos de enzimas asimiladoras de amoniaco (Rees D., et al; 2000).

En cambio, la enzima glutamina-sintetasa, que asimila amoniaco, está presente en elevadas concentraciones en el citoplasma de la célula vegetal. Además de alanina, glutamina, otros compuestos de nitrógeno, especialmente aminoácidos y amidas, como la asparragina y la 4-metil glutamina, y ureidos alantoína y ácido lantoico, son también sintetizados por la planta y transportados luego a los tejidos vegetales.

La planta posee también proteínas específicas del nódulo que son llamadas nodulinas. Entre ellas se encuentran la leghemoglobina que tiene la función de aportar oxígeno a los bacteroides y además es la que confiere el típico color rojo o rosado a los nódulos funcionales, a diferencia de la coloración blanca de los nódulos no infectivos o la marrón verdosa de los senescentes (Schroder, 1995).

Limitaciones de la simbiosis rizobio-leguminosa

El sistema simbiótico rhizobium-leguminosa requiere que no haya condicionantes por exceso o por defecto para el desarrollo normal del cultivo. Uno de los factores que limitan la fijación de nitrógeno en soja, es la presencia de formas combinadas de nitrógeno en el suelo. Los suelos fértiles con moderada o alta disponibilidad de formas inorgánicas de N en el momento de la siembra, o importantes tasas de mineralización durante el ciclo del cultivo, afectan el establecimiento de la simbiosis ya que retardan el inicio de la nodulación causando inhibición del sistema fijador (Giorda; 1997).

Altas concentraciones de nitratos inhiben el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad nitrogenasa. Existen evidencias de que cuando la

relación C/N es baja, el limitado suplemento de C al nódulo retrasa la FBN. En tales condiciones para la planta es más económico tomar N del suelo o del fertilizante que de la FBN. A mayor presencia de nitrógeno en el suelo, menores posibilidades hay para la FBN, a la inversa a menor presencia de N del suelo, hay más N de la FBN. Al limitarse la FBN, el balance de N del suelo resulta negativo en extremo, porque convierte a la soja como expoliadora, más que restauradora de la fertilidad del suelo. Las carencias de Fósforo, Potasio, Calcio, Azufre y de micronutrientes, disminuyen la formación de nódulos, y por consiguiente la FBN.

Tipos de nódulos

Debido a la gran diversidad de plantas leguminosas cuyo número asciende aproximadamente a 20.000 especies, no es correcto hacer generalizaciones respecto a los modos de infección, no siempre es a través de canales de infección, como así también de las formas y modo de desarrollo de los nódulos.

Los procesos desde la infección hasta la senescencia ocurren de diferentes maneras según los nódulos sean de crecimiento determinado e indeterminado.

Los nódulos indeterminados, como los de trébol, arveja y alfalfa, poseen un meristemo persistente resultando en formas cilíndricas y a menudo ramificadas. En cambio los nódulos determinados, como es el caso de la soja, poroto y lotus tienen forma redondeada e histológicamente se pueden distinguir en ellos un tejido periférico y un tejido central.

Cultivo de Leguminosas

Las leguminosas se utilizan en agricultura, como alimento, forraje, abono verde, etc. En la antigüedad, se las cultivaba en casi todo el mundo, y algunos ejemplos de antiguos cultivos son habas, lentejas, garbanzos, soja, alfalfa, porotos y maní.

La soja es el cultivo de leguminosas de grano más importante en el mundo en términos de uso para la alimentación humana y animal, concentrándose en Argentina, junto con Brasil, China y Estados Unidos más del 95% de su producción mundial.(Giroda; 1997).

El grupo de plantas leguminosas muestra una amplia diversidad tanto morfológica como de habitats y ecología, se encuentran formas herbáceas anuales hasta árboles tropicales. Muchas de estas leguminosas son noduladas por rizobios.

Cultivo de soja

La soja (*Glycine max*) es una planta anual perteneciente a la familia de las Leguminosas, originaria de China y otros países del este y sudeste asiático. Es una especie con respuesta fotoperiódica y alta interacción genotipo ambiente y fue introducida en el continente americano a principios del siglo pasado con fines forrajeros principalmente.

Se la cultiva comercialmente debido a que produce un grano con un alto contenido de proteína y aceite, razón por la cuál está difundida ampliamente a nivel mundial, lo cuál la convierte en el cultivo con la mayor demanda de N y la menor producción por unidad de fotoasimilado producido. Por lo tanto el N es el elemento más crítico. Si no existen limitantes mayores, el rendimiento de la soja es función directa de la capacidad de acumular N que exhiba el cultivo.

La soja se cultiva en Argentina desde la década del 60, en una amplia zona ecológica que va desde los 22° a los 40° de latitud sur, con una amplia variedad de suelos y clima.

En el inicio de la expansión del cultivo, las primeras experiencias estuvieron en manos de algunos pioneros. En ese momento, las primeras experiencias realizadas con materiales genéticos desarrollados en otras latitudes, podrían haber acabado en el fracaso debido a su falta de adaptación. Sin embargo, el mejoramiento genético se constituyó en una herramienta fundamental en el proceso de adaptación y mejora del cultivo para las variadas condiciones de producción en la Argentina. (Giorda; 1997) (SAGPyA; 2007).

En su carácter de leguminosa, la soja puede cubrir sus requerimientos de N a partir del aporte del suelo por la mineralización de N orgánico, la fertilización y el aire, por medio de la fijación biológica del nitrógeno (FBN).

La FBN, funcionando normalmente, aporta entre el 25 y 84% del total absorbido por el cultivo. Este aporte es muy variable, ya que depende de diversos factores, como la presencia o no de rizobios y su abundancia en el suelo; el género, especie y cepas de rizobios existentes en el suelo o inoculados; las características físicas químicas de los suelos y las condiciones ambientales.

El cultivo de soja está adaptado a un amplio rango de texturas del suelo. Se pueden producir altos rendimientos tanto en suelos arenosos como arcillosos; si bien la soja es inusualmente productiva en suelos pobres, es exigente en fertilidad para alcanzar altos rendimientos.

Dada la gran capacidad de la soja de particionar nitrógeno a los granos, el retorno de este elemento al suelo, en los residuos, es exiguo e independiente del origen (suelo o suelo + FBN). Por lo tanto se observa por ciclo de cultivo un balance negativo de N. Esto evidencia, que la soja no es restauradora de la fertilidad. La FBN es un componente

importante de los sistemas de agricultura sostenible, dado su efecto positivo sobre la conservación del suelo. Es una herramienta más, de suma utilidad y beneficio, que debe ser adecuadamente contemplada en el marco del manejo racional de los cultivos.

Importancia del cultivo de soja en la economía

Poco conocida a principios de los años 70, la soja es hoy la oleaginosa más difundida del país, y con sus derivados, constituye el principal producto de exportación argentino.

Argentina se ubica como el principal exportador de aceite de soja del mundo y como segundo proveedor de los subproductos proteicos del cultivo.

El esfuerzo conjunto de entidades públicas y privadas, fortalecidas en su accionar por el apoyo de la industria aceitera y los sectores comerciales, fueron elementos determinantes en la obtención de estos resultados.

Las exportaciones de productos procesados predominan actualmente en la composición de las ventas al exterior.

La Unión Europea (UE) era el principal y creciente mercado de destino de las exportaciones de los granos de soja, con un 77%. A su vez, la UE tiene importancia como destino de productos procesados (harinas, pellets, tortas y aceites), aunque sólo en un 33%.

El 67% restante se reparte entre el Mercosur (2%) y los países asiáticos y africanos, entre otros. En 1.996, las exportaciones del complejo soja tuvieron como principales destinos China, Irán, Marruecos y Hong Kong.

En la última campaña la producción de 40 millones de toneladas de soja, a un valor de 10 millones de dólares se exportó en un 98%, la mayor parte en forma industrializada como harina y aceite. Más del 50% de la superficie agrícola en Argentina está sembrada con soja:

14 millones de hectáreas sobre un total de 27 millones. Se estima que 8.600 millones de dólares ingresarán a la Argentina por exportación del cultivo.

El complejo soja representa la mitad de la producción y las exportaciones agrícolas, un cuarto de las exportaciones totales argentinas y más del 40 por ciento de la recaudación total por retenciones (SAGPyA; 2007).

En el ciclo 2005/6 la soja, con 12.630.000 hectáreas concretó la mayor área sembrada por un cultivo en el país estimándose una producción final de 35 millones de toneladas.

Inoculación de soja con cepas seleccionadas de rizobios

La técnica de la inoculación consiste en adicionar a las semillas o en su entorno y al momento de la siembra, una determinada concentración de rizobios mediante un producto que se denomina inoculante.

Una de las ventajas de la inoculación es su menor costo con respecto a la fertilización nitrogenada, además de que se reduce el aporte de cantidades excesivas de nitrógeno al ecosistema, reduciéndose la eutrofización de los cuerpos de agua cercanos. (Brockwell, 1995).

Una de las desventajas que presenta el uso de inoculantes es que en su cadena de comercialización y utilización pueden enfrentar situaciones de desecación, calor o frío, lo que lleva a la muerte de las bacterias y al deterioro de la calidad del inoculante (van Kessel; 2000). Sin embargo la inoculación asegura una mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno, que queda disponible para el uso de la planta, además de evitar el consumo de nitrógeno del suelo. Hay varios tipos de inoculantes; para llevar a cabo el trabajo experimental de esta tesina se utilizó un inoculante líquido acuoso (Charley, 1995).

Producción de inoculantes

Los inoculantes se formulan de distintas maneras, algunos son rizobios adsorbidos sobre turba estéril, mientras que otros son suspensiones de bacterias en soluciones acuosas u oleosas (Stephens et al; 2000) (Stephens et al; 2002) (Singleton, et al; 2002).

Las bacterias deben ser capaces de sobrevivir en estos soportes por periodos de hasta seis meses, a veces durante lapsos prolongados a temperaturas elevadas. Esto impone sobre el inoculante la necesidad de poder adaptarse a situaciones de estrés por desecación y ausencia de nutrientes y estrés térmico.

La inoculación asegura una mayor eficiencia en la fijación del nitrógeno, que queda disponible para el uso de la planta y, lo que es aún más importante, evita el consumo de

nitrógeno del suelo. De este modo, se cumple el objetivo de preservación del suelo mediante tecnologías no contaminantes y de una agricultura sustentable en el tiempo.

En la **Figura 2** se compara el crecimiento de dos plantas de soja, una de ellas ha sido inoculada y la otra no.

La inoculación es una práctica compleja que requiere el asesoramiento de un profesional para decidir su realización y supervisar su ejecución.



Figura 2: Crecimiento comparativo entre una planta de soja inoculada y otra sin inocular

A pesar de las dificultades apuntadas más arriba la inoculación presenta ventajas evidentes, incluso si solo se restringiera a zonas de reciente introducción del cultivo. Es importante tener en cuenta que hay un creciente aumento en la superficie cultivable destinada a la producción de soja.

Las soluciones a los problemas anteriores son de dos tipos: por un lado, se deben intensificar las prácticas de extensión orientadas al uso correcto de la inoculación de leguminosas en general. Por otro lado se debe aumentar el conocimiento básico de la fisiología y genética bacteriana con relación a la adaptación de *B. japonicum* a situaciones de estrés y a la simbiosis planta-bacteria. Este último ítem, con vistas a aplicar ese conocimiento al mejoramiento de los inoculantes comerciales y de las prácticas de inoculación.

En principio, se debe realizar una cuidadosa selección de la cepa a utilizar. Esta debe poseer:

- Alta capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno
- Alto poder competitivo específico con relación al de las cepas nativas, competitividad saprofítica que le permita sobrevivir y multiplicarse en los suelos en presencia o no de la planta huésped.

Para la preparación del inoculante se requiere la obtención de suspensiones bacterianas, con alta concentración celular, y que al mismo tiempo lograr un buen estado fisiológico. Existen diversos sistemas de cultivo para lograr este objetivo, entre ellos cultivo continuo, *batch* alimentado (*feedbatch*) y *batch* (Ertola, R y col; 2001).

Sistemas de cultivo

Para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia.

$$d(V \cdot C_i)/dt = F_1 \cdot C_{i1} - F_2 \cdot C_i + V r_{fi} - V r_{ci} \quad (1)$$

donde V es el volumen de cultivo, F_1 es caudal de alimentación, F_2 el de salida, C_{i1} la concentración del componente "i" en la alimentación y C_i la concentración en el caudal de salida, la que, si el cultivo está bien mezclado, se puede asumir idéntica a la que hay dentro del biorreactor. Los restantes términos, r_{fi} y r_{ci} se refieren a la velocidad de formación y consumo del componente "i" respectivamente.

Por otra parte el volumen de cultivo variará en el tiempo según sean F_1 y F_2 .

Suponiendo que la densidad del cultivo y de la alimentación son iguales resulta:

$$dV/dt = F_1 - F_2 \quad (2)$$

Ahora bien, dependiendo de como sean F_1 y F_2 surgen, básicamente, tres sistemas de cultivo:

Cultivo continuo

Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo *batch* y en un momento dado se comienza a alimentar con medio fresco a un caudal F y por un rebalse se mantiene el volumen constante.

El caudal de salida contendrá células, medio de cultivo parcialmente agotado y eventualmente, algún producto. Si alimentamos con medio fresco sólo deberemos considerar la concentración de sustrato limitante del crecimiento, en la alimentación.

Ambos caudales son iguales y por la ecuación 2, es V constante, por lo tanto la ecuación.

(1) se reduce a:

$$V \cdot d C_i / dt = F (C_{i1} - C_i) + V (r_{fi} - r_{ci})$$

En estado estacionario las concentraciones dentro del biorreactor permanecerán constantes en el tiempo, siendo D la velocidad de dilución, la ecuación que describe este estado estacionario es:

$$F / V = D = \mu \quad (3)$$

Batch alimentado

Para iniciar un *batch* alimentado valen las mismas consideraciones que se hicieron para iniciar un cultivo continuo, salvo que en este caso supondremos que se inicia la alimentación del cultivo cuando el sustrato limitante se ha agotado.

Si bien éste no es un requisito indispensable, permite simplificar el tratamiento matemático y además es un buen punto de partida con respecto al objetivo del *batch* alimentado, es decir: controlar la velocidad de crecimiento mediante la velocidad de alimentación.

También supondremos que alimentamos con medio de cultivo fresco.

El caudal de salida, F_2 , es nulo, por lo que V aumentará en el tiempo en función del caudal de entrada, en base a la ecuación (2),

$$dV / dt = F \quad (4)$$

Debe destacarse que en este caso V permanece dentro del operador diferencial pues varia con el tiempo según la ecuación (4). Por tal motivo el *batch* alimentado, y a diferencia del caso anterior, tiene duración limitada en el tiempo ya que el volumen no puede incrementarse más allá del volumen útil que posee el biorreactor.

Como criterio adicional conviene seleccionar la concentración de sustrato tan alto como sea posible y F relativamente pequeño a fin de evitar la excesiva dilución del cultivo.

La contrapartida es que la duración del *batch* alimentado puede prolongarse excesivamente, por lo que normalmente se trata de encontrar la solución de compromiso, donde intervienen además, aspectos económicos.

La diversidad de alimentaciones posibles que pueden emplearse es, quizás, una de las características más apreciables de *batch* alimentado. La otra es que este sistema de cultivo es muy apropiado para obtener altas concentraciones de biomasa, muy superiores a las que se podrían obtener en un *batch*, donde la limitación está dada por la concentración inicial de nutrientes del medio de cultivo que pueden tolerar los microorganismos.

Batch

Ambos caudales son nulos por lo que V es constante y en la ecuación. (1) se anulan los términos $F_1 C_{i1}$, $F_2 C_i$.

$$dC_i / dt = r_{fi} - r_{ci} \quad (6)$$

La duración del cultivo *batch* es, por supuesto, también limitada en el tiempo y depende esencialmente de las condiciones iniciales del cultivo. Una vez inoculado el medio, la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, se alcanza la máxima concentración de biomasa y finaliza el *batch* (fase estacionaria).

El cultivo tipo *batch*, si bien es quizás el más difundido, es el que menos posibilidades de control ofrece. Una vez sembrado el medio de cultivo y fijada la temperatura, las células quedan "libradas a su propia suerte" o, dicho de otro modo, a su propia potencialidad, que se manifiesta creciendo a la máxima velocidad que le permite el medio de cultivo empleado, siendo el operador un mero espectador de los acontecimientos. En este aspecto tanto el cultivo continuo como el *batch* alimentado superan ampliamente al *batch*.

Hipótesis y Objetivos

Como hipótesis de este proyecto se plantea que es posible obtener cultivos con alta concentración de rizobios en fase de crecimiento exponencial, más eficientes en la nodulación que los microorganismos provenientes de fase estacionaria del crecimiento.

Los objetivos de este proyecto son:

- estudiar la relevancia del estado fisiológico microbiano en el proceso de nodulación.
- desarrollar cultivos de microorganismos para producir inoculantes de alta densidad celular, con elevada competitividad, infectividad y efectividad

-.

Materiales y métodos

1. Microorganismo:

El microorganismo utilizado es: *Bradyrhizobium japonicum*, cepa E-109 (*B japonicum* E109) recomendada para la formulación de inoculantes en Argentina, fue cedida gentilmente por el Ingeniero Alejandro Peticari, del INTA-IMYZA, Castelar.

2. Métodos de mantenimiento de la cepa:

2.1 Métodos de Conservación a largo plazo: Congelación

La técnica utilizada es la de criopreservación, que consiste en resuspender las células a congelar en glicerol (agente crioscópico) y mantenerlas a baja temperatura. La suspensión celular se coloca en forma aséptica en tubos *eppendorff* con glicerol al 30%, mediante pipeta automática con punta estéril; también se utilizan tubos de ensayo con glicerol al 20%, mediante pipeta estéril. Posteriormente, se agitan en un vórtex hasta lograr una suspensión homogénea. Luego se colocan en freezer a aproximadamente -14°C (Hunter; 1995).

2.2 Métodos de conservación a corto plazo: Agar inclinado

Para el mantenimiento de la cepa, se efectúan repiques en tubo pico de flauta, con medio (YMA) cada 6 meses y se guardan a 4°C . La técnica utilizada es la siembra por estría en tubos inclinados con medio sólido inclinado (**ver Tabla 3**). Se toma una cantidad de muestra con anza de siembra previamente esterilizada por flameado, y se siembra en tubos inclinados con medio sólido inclinado, desde el fondo de la superficie de éste, realizando movimientos ascendentes en zig-zag hasta completar toda la superficie del medio. Luego de sembrar los tubos, se colocan en estufa a 29°C . Una vez desarrollados se cubre el tapón de algodón con un film plástico para evitar la deshidratación de los medios. Se guardan en

heladera a 4°C para reducir su metabolismo a un estado basal, durante un lapso de 15 días hasta 6 meses.

3. Medios de cultivo:

Los medios se preparan como indican las tablas correspondientes, se llevan a pH adecuado y posteriormente se esterilizan a 121°C y 1 atm. de sobrepresión durante 20 minutos en autoclave.

3.1 Medio de cultivo Inóculo:

Se siembran en forma aséptica los medios inóculos (**Tabla 1**) de 100 ml. cada uno en erlenmeyer de 500ml, mediante dos azadas de la cepa original. Todas las operaciones se realizan en flujo laminar. Posteriormente se mantienen 48hs. a 72hs. en agitador rotatorio de 250 r.p.m. y con 2,5 cm. de excentricidad a una temperatura de 29°C.

Luego se observa al microscopio la suspensión celular para estudiar la morfología celular, la densidad del cultivo y confirmar la pureza de la suspensión (ausencia de contaminantes).

Componentes	Concentración g/l
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
MnSO ₄ (10%)	2 gotas
FeCl ₃ (10%)	2 gotas
KNO ₃	0,8
(NH ₄)HPO ₄	0,3
Ext.de	
levadura	2
Glicerol	3,8
pH	6,8-6,9

Tabla 1: Composición de medio inóculo para el desarrollo de *B japonicum*

3.2 Medio de cultivo Proceso

Los cultivos se siembran en forma aséptica por transferencia de un cultivo inóculo de 48 horas, en una proporción al 10% del volumen del proceso.

Se utilizan dos medios distintos, que son modificaciones del caldo de levadura y manitol formulado por Vincent, 1970, a diferentes concentraciones. En la **tabla 2** se muestra la composición de los medios ensayados.

Componentes	Concentración g/l				
	MEDIO 1			MEDIO APE	
	1 X	0,6 X	1,5 X	APE 0.6x	APE 1x
KH ₂ PO ₄	0,5	0,3	0.75	0.18	0.3
K ₂ HPO ₄	0,5	0,3	0.75	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,12	0.3	0.18	0.3
NaCl	0,1	0,06	0.15	0.12	0.2
MnSO ₄ (10%)	2 gotas	1,2	3 gotas	-	-
FeCl ₃ (10%)	2 gotas	1,2	3 gotas	-	-
KNO ₃	0,8	0,48	1.2	-	-
(NH ₄)HPO ₄	0,3	0,18	0.45	0.39	0.65
Ext.de levadura	4	2,4	6	1.2	2
Glicerol	7,6ml	4,56 ml	11.4 ml	2.4 ml	4ml
pH	6,8-6,9	6,8-6,9	6.8-6.9	6.8-6.9	6.8-6.9

Tabla 2: Composición del Medio 1 en concentraciones (06x); (1 x) y (1,5 x) y Medio APE 0.6x y 1x, utilizados para el cultivo líquido de *B. japonicum*.

3.3 Medio para recuento de células viables y mantenimiento de la cepa

Para la siembra de placas y mantenimiento en tubos con agar inclinados, se utiliza el medio YMA (Tabla 3).

Componentes	Concentración g/l
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Extracto de Levadura	0.5
Manitol	1.
Agar-Agar	15
Rojo Congo	10 ml
Ph	6,8-6,9

Tabla 3: Composición de medio YMA utilizado para mantenimiento y recuento en cultivos de *B. japonicum*.

3.4 Medio de alimentación usado en experimento de cultivos en *feedbatch*

Componentes	Concentración g/l
Glicerol	100
Na glutamato	4
NaOH	10,0 Mm.

Tabla 4: Composición del medio de alimentación de *feedbatch*

4. Determinación del crecimiento celular

Durante el desarrollo de los cultivos, se toman muestras a distintos tiempos y se determinan parámetros del crecimiento celular: unidades de densidad óptica (U.D.O.) a longitud de onda $\lambda=550$ nm, número de células viables y peso seco.

Además, en cada caso se toman en forma aséptica alícuotas del medio de cultivo y se determinan sus respectivas lecturas con un pHmetro Digimeter Marca II Luftman.

4.1. Determinación de unidades de densidad óptica (U.D.O.)

Se utiliza un espectrofotómetro Metrolab 1700 ultravioleta-visible, haz simple, con microcomputador y memorias incorporadas. Se realiza la medición a una longitud de onda correspondiente a los 550nm. Se usa agua destilada como blanco, las determinaciones se hacen en celdas de vidrio, realizando diluciones. La densidad óptica se expresa como U.D.O., unidades de densidad óptica absorbidas por la muestra.

4.2. Determinación del número de células viables

Se realiza mediante el método de dilución y plaqueo (Somasegaran et al; 1994). Con una pipeta automática se toma una alícuota de la muestra de 0.1 ml y se la coloca en un tubo de ensayo con 9,9 ml. de agua destilada estéril. Con el vórtex se procede a homogeneizar la muestra, y luego se extrae 0,1 ml. de la muestra diluida y se adiciona a un tubo con 9,9 ml. de destilada estéril. Estas operaciones se repiten todas las veces que sea necesario hasta obtener una dilución con una concentración entre 10^{-2} - 10^{-8} células/ml.

Con las diluciones se siembran placas con medio YMA (**Tabla 3**). Estas se colocan en estufa a 29°C hasta que se desarrollen colonias visibles y luego se cuentan aquellas cuyo número de colonias esté entre 30 y 300. En este método se considera que cada célula viable forma una colonia. Se expresa en número de células viables/ml.

4.3. Determinación de peso seco

Se toman alícuotas de 10 mL de cultivo, posteriormente las muestras se centrifugan a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos, en centrífuga Electronic G-42, de cabezal fijo, de 45° de inclinación. Los precipitados se resuspenden en agua destilada y se centrifugan nuevamente. Estas operaciones de lavado se repiten 2 veces para eliminar los restos de impurezas. Se colocan en tubos de ensayos previamente tarados luego, se secan en estufa a 100-105°C, hasta obtener peso constante. Los valores de peso seco se expresan en g/L, gramos de células secas por litro de caldo fermentado.

5. Estudio de la cinética de crecimiento del microorganismo

Cálculo de parámetros cinéticos (Ertola et al; 2001).

Los parámetros cinéticos que se calculan son: velocidad específica de crecimiento (u) y tiempo de generación (tg), de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$u = \ln(x/x_0)/t \qquad tg = \ln 2/u$$

donde:

x: concentración final de células (expresada como nº de células viables/ml o en unidades de U.D.O.).

x₀: concentración inicial de células (expresada como nº de células viables/ml o en unidades de U.D.O.)

t: intervalo de tiempo considerado.

La duración de los cultivos y los tiempos en que se tomaron muestras, se indican para cada experimento en Resultados.

6. Caracterización del microorganismo por análisis genómico, perfil de lipopolisacáridos y proteínas

6.1. Análisis genómico

Para realizar este análisis, se utilizan los protocolos de Ausubel et al, 1994 y Versalvic et al, 1994; con modificaciones. En un primer paso se hace la preparación del DNA genómico de las bacterias, luego el ensayo de amplificación y finalmente se realiza una corrida en geles de agarosa y análisis de los patrones de banda obtenidos.

6.1.1. Purificación de ADN en pequeña escala

La extracción de ADN genómico total se realiza partiendo de colonias aisladas en placas de YMA provenientes de los inoculantes o de nódulos de las plantas; cada aislamiento se inocula en 5 ml de medio YMA y se incuba a 28 °C con agitación (300 rpm) por 3-6 días hasta observar turbidez. Se examina la pureza de los cultivos al microscopio óptico mediante el método de tinción de Gram, y una vez confirmada se inocula 1 ml de ese cultivo en 5 ml de TY, el cual se incuba 24 horas en las condiciones anteriores.

Para la preparación de ADN se centrifuga 1,5 ml del cultivo en microcentrífuga a 11600 x g durante 5 minutos hasta obtener un *pellet* compacto. El *pellet* se resuspende en 567 µl de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), se agrega Proteinasa K y SDS hasta una concentración final de 100 µg/ml y 0,5 % respectivamente, y se incuba 1 hora a 37°C. Luego se agrega NaCl para alcanzar una concentración salina adecuada (0,7 M) para el agregado de la solución de CTAB (CTAB 10 % en NaCl 0,7 M) a una concentración final del 1 %, y se incuba a 65°C por 10 minutos. Después de la incubación se realiza una

extracción con un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) , y otra con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v). En ambos casos se recupera la fase acuosa. El ADN se precipita con 0,6 vol. de isopropanol y previa centrifugación a 11600 x g se lava con etanol 70°. El *pellet* se seca en bomba de vacío y se resuspende en 50 µl de agua Milli Q estéril (Millipore Corporation).

La concentración y pureza del ADN se estima midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm en un cuantificador de RNA/DNA (Genequant, Pharmacia Biotech), y se ajusta la concentración a 50 ng/µl haciendo las diluciones apropiadas. También se analiza la integridad del ADN aislado mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % para corroborar que no presente fragmentos en trozos de bajo peso molecular. Las preparaciones de ADN se conservan a 4°C hasta su uso.

6.1.2. Ensayos de *fingerprinting* empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utiliza el protocolo de rep-PCR, según los *primers* empleados en la reacción de PCR se denomina REP-PCR, ERIC-PCR o BOX-PCR, y en general rep-PCR. En este caso se utilizan los *primers* REP y BOX.

Los *primers* son por DNAgency (Malvern, Pa) y sus secuencias se muestran a continuación:

REP1R-I 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'

REP2-I 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

Las reacciones de PCR se hacen en un volumen total de 25 μ l conteniendo: 2,5 μ M de cada *primer*, 1,25 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 50 ng de ADN molde, 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa, DMSO 10% v/v, glicerol 5% v/v, Tris-HCl 67 mM pH 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16,6 mM, EDTA 6,7 μ M, β -mercaptoetanol 30 mM y MgCl_2 6,7 mM.

Las amplificaciones se realizan en un termociclador automático (MJ Research PTC-100) con un ciclo de desnaturalización inicial de 7 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), *annealing* (40°C, 2 min), y una extensión final a 65°C por 16 minutos. Los microtubos con los productos de reacción se almacenan a 4°C o -20°C hasta su posterior análisis.

6.1.3. Análisis de los productos de rep-PCR

Los productos de reacción se separan mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 % en *buffer* TBE 1x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 20 mM, pH 8,3). Se utilizan geles de 20 x 24 cm en los cuales se siembran 6 μ l de muestra con 1,5 μ l de *buffer* de siembra 6x (Ficoll 400 15 %, azul de bromofenol 0,03 %, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y EDTA 50 mM) y se corren a 5 V/cm (constante) a temperatura ambiente durante 4,6 horas.

En cada gel se incluyen los marcadores de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega) y Lambda DNA / *Hind III* Markers (Promega) como referencia.

Las bandas se revelan sumergiendo los geles en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,6 μ g/ml) por 30 minutos y luego se los lava con agua destilada por otros 30 minutos.

Los geles se tiñen y se observan con un transiluminador de luz UV y se fotografian usando una cámara Polaroid DS 34 y película Polaroid 667.

Los *fingerprints* se obtienen por REP-PCR y BOX-PCR y se analizan mediante inspección visual y con la ayuda de un paquete de *software* comercial. Las fotos correspondientes se registran como archivos TIF utilizando un *scanner* (UMAX S-12) y los distintos *fingerprints* se analizan por separado y linealmente combinados con el programa GelCompar v. 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

6.2. Determinación del perfil de lipopolisacáridos (LPSs) (Hirsch, 1999).

6.2.1. Extracción de LPSs (Hitchock et al, 1983).

Se toman 1,5 a 3ml de cultivo bacteriano (1ml de cultivo $DO_{600}=0.8$). Luego se centrifuga durante 5 minutos a 6000 r.p.m. Se lava con H_2O o 0,9% de NaCl y se resuspende el pellet en 50 ul de buffer de lisis. Se incuba en baño de agua a $100^{\circ}C$ durante 10 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionan 10 ul de proteinasa K (8 2,5 mg/ml en buffer de lisis) y se procede a incubar a $60^{\circ}C$ durante una hora. Luego se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 15 minutos. Se toma un volumen de sobrenadante al que se le agregan 2 volúmenes de buffer de muestra. Se guardan a $-20^{\circ}C$ hasta la siembra en SDS-PAGE.

Se utilizaron las siguientes soluciones buffer:

Buffer de lisis

1 M Tris HCL pH 6,8; 2% SDS; 4% β -mercaptoetanol; 10% Glicerol; 0.005% BPB (Azul de Bromofenol)

Buffer de muestra

120 Mm Tris HCL pH 6,8; 3% SDS; 9% β -mercaptoetanol; 30% Glicerol; 0.03 % BPB (Azul de bromofenol)

6.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), para LPS

(Laemmli et al, 1970)

La preparación de los geles se realiza de la siguiente forma:

Soluciones	<u>Gel separador (T=16,5%; C=6%)</u>	<u>Gel concentrador (T=4%; C=3%)</u>
H ₂ O	2,3 ml	4,2 ml
Buffer del gel	3,32 ml	1,5 ml
Glicerol	1,04 ml	-
Stock Acril/Bis	3,32 ml	0,5 ml
APS (10% en H ₂ O)	40 ul	150 ul
Temed (10%)	40 ul	7,5ul

Buffer del gel (1L)

3 M Tris; 0,3% SDS. Titular a pH= 8,5 con HCl concentrado (mayor a 40 ml HCL)

Stock Acril/Bis (T=49,5%; C=6%)

93g acrilamida; 6g bisacrilamida; 200 ml H₂O

Buffer ánodo

0,2 M Tris-HCL pH=8,9

Buffer cátodo

0,1 M Tris; 0,1 M tricina; 0,1% SDS; pH=8,25

Se realizan geles de 10 x 8 cm, y las condiciones de corrida 30 mA durante 1 hora (o hasta que el frente de corrida llegue al final del gel).

La cantidad de proteína a sembrar en cada calle se ajusta entre 70 y 100 ug.

6.2.3. Revelado de los geles de LPS mediante tinción con Nitrato de Plata

Se retira el gel de la placa y se deja en solución fijadora toda la noche con agitación lenta.

Lavar con H₂O. Adicionar solución oxidante y dejar reposar durante 5 minutos. Lavar tres veces durante 15 minutos en H₂O. Luego, colocar solución de tinte durante 10 minutos (en oscuridad). Lavar seguidamente 3 veces durante 10 minutos con H₂O. Agregar solución reveladora hasta la aparición de bandas (30 seg.-2 minutos).

Detener la reacción con adición de ácido acético al 0,5 % (30 seg). Lavar con H₂O 1 –2 minutos.

Para realizar el revelado de LPS se usan las siguientes soluciones:

Solución fijadora

400 ml de etanol al 40%; 50 ml. de ácido acético glacial al 5%.

Solución oxidante

Ácido Periódico (0,7% en H₂O)

Solución de tñido

70 ml de H₂O; 1,4 ml. de NaOH 1N; 1 ml de NH₄OH AL 25%; 2,5 ml. de AgNO₃ 20% (agregar gota a gota).

Solución reveladora

100 ml. de H₂O; 50 ul de Formaldehído al 37%;: 50 ul. De Ácido Cítrico 100 mg/ml.

6.3. Determinación de patrones de proteínas totales celulares

6.3.1. Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La electroforesis de proteínas en geles disociantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realiza de acuerdo a (Laemmli, 1970), con modificaciones. El material de partida es hidrolizados de pellets celulares en cracking buffer por 5 minutos a 100°C.

Composición del cracking buffer

Buffer Tris-HCL 0.5M pH 6.8

SDS 10% p/v

β-Mercaptoetanol

Azul de Bromofenol 0.05% p/v.

Glicerol 50% p/v.

Agua Milli-Q

Se realizan geles de 16x20cm., en gradiente continuo de poliacrilamida 11-15% y las condiciones de corrida fueron 40,0 mA y 226 V durante 3 horas.

La cantidad de proteína sembrada por calle se ajustó entre 70 y 100 ug.

La coloración se realiza con Coomassie Blue R-250 y tinción con plata.

Se escanea el gel coloreado y el patrón de bandas se analiza densitométricamente con el *software* de imágenes-Pro Plus V20 (Media Cybernetics, E.E.U.U.).

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se aplica la metodología de Lowry et al., 1951, y se utiliza como estándar seroalbúmina bovina (BSA).

La determinación se realiza luego del tratamiento de los pellets celulares en NaOH 1N durante 10 minutos a 100°C.

7. Ensayo en fermentador de laboratorio.

7.1 Obtención de cultivos con células en estado estacionario con alta concentración celular desarrollados en batch.

Se realiza el cultivo en batch en pequeña escala de la cepa E-109, en un fermentador New Brunswick de 5000ml.

Para la siembra del bioreactor se utilizan 4 inóculos de 50 ml. cada uno en erlenmeyers de 500ml cada uno. Antes de realizar la transferencia al medio proceso, se realiza una observación microscópica de la suspensión celular. Se realiza la siembra en relación del 10%, eligiendo cultivos que presentan ausencia de contaminantes, gran movilidad de microorganismos y alta densidad celular.

Se preparan 2500 ml. de medio proceso 1 en concentración 0.6 x, en el vaso del fermentador y luego se lleva a autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atm. de

sobrepresión. En este caso se agrega al medio proceso una solución antiespumante al 1%. Luego de finalizar el tiempo de esterilización se conecta, tomando las precauciones necesarias para evitar contaminación. Se realiza la conexión, se procede al encendido de la parte automática con la finalidad de poder controlar los parámetros necesarios para llevar a cabo esta experiencia. A distintos tiempos se toman muestras del cultivo, aproximadamente 20 ml. para no variar el volumen original y no modificar algunas de las variables del proceso. Las muestras se obtienen en erlenmeyers de 250 ml; se utilizan mecheros para evitar posibles contaminaciones, y sobre ella se determinan parámetros de crecimiento, se toma el pH y se utilizan para formular inoculantes líquidos.

7.2. Ensayo con alta concentración celular en escala de fermentador de laboratorio desarrollado en sistema *feedbatch*.

Se realiza el cultivo en sistema de cultivo *feedbatch* en pequeña escala en un fermentador de 5000ml., con agregado de medio de cultivo en forma continua. Se utilizan 4 inóculos de 50 ml cada uno, en erlenmeyer de 250 ml. Luego se colocan en un agitador rotatorio a 250 r.p.m. y con 2,5 cm. de excentricidad durante 48., luego se colocan en la heladera, hasta el momento de realizar su transferencia al medio proceso. Antes de realizar la transferencia al medio proceso, los inóculos se observan en el microscopio para determinar el grado de homogeneidad del cultivo.

Se utiliza el medio proceso medio 1 en concentración 0.6 x.; se preparan 2.500ml y se coloca en el fermentador previamente acondicionado para su esterilización por un tiempo de 20 minutos. Antes de llevar a esterilizar el medio proceso se coloca una solución antiespumante. Se utiliza el medio de alimentación indicado en la **Tabla 4**. Se prepararan 2.710 ml de este medio en un recipiente con capacidad para 5000ml y se lleva

posteriormente para su esterilización en autoclave, previamente acondicionando las mangueras para evitar cualquier contaminación en el momento de proceder a su conexión.

Se parte de un volumen de cultivo de 2500ml y en el momento en que el cultivo se encuentra hacia el final de la fase exponencial, se comienza con el agregado de medio de alimentación.

A distintos tiempos desde el comienzo del proceso, se realizan tomas de muestras en erlenmeyers de 500 ml y 250 ml previamente esterilizados durante 20 minutos, para tener valores de pH, recuento de células viables y peso seco y hacia el final del proceso, para la formulación de inoculantes líquidos.

8. Inoculantes líquidos acuosos

8.1. Formulación de inoculantes líquidos

Los inoculantes se formulan de acuerdo a la formulación patentada por R. Charley , 1994.

La formulación se basa en el agregado de polisacáridos que estabilizan los microorganismos en los inoculantes.

Se usa medio de cultivo, suplementado con alginato en una concentración final del 1% , a partir de una solución madre de alginato de sodio al 5%.

8.2. Envasado y conservación de inoculantes realizados

Los inoculantes se envasan en frascos previamente esterilizados durante 20 minutos en autoclave con tapones de algodón. con capacidad para 45ml. El envasado de los mismos se realiza en el flujo laminar. Los tapones de algodón se cambian por tapones de plástico previamente esterilizados. En cada uno de los frascos, se coloca 20 ml del cultivo y 20 ml de solución alginato.

La conservación se realiza en algunos casos a 4°C y en otros a temperatura ambiente, según se indica más adelante.

8.3. Supervivencia en inoculantes

Se realiza un seguimiento de la sobrevivencia de los microorganismos en los inoculantes envasados tomando muestras para realizar el recuento de células viables durante el almacenamiento de los inoculantes. Las muestras para analizar los parámetros se toman en el flujo laminar.

Los valores que se obtienen para cada uno de los tratamientos en que se toman muestras, se indican para cada experimento en Resultados.

9. Determinación de la capacidad simbiótica de la cepa mediante ensayos de

infectividad y efectividad en plantas (Somasegaran, 1994)

9.1. Esterilización de semillas y pre-germinación

Se colocan las semillas en un vaso estéril y se lavan en alcohol durante 10 segundos en alcohol al 95%, se descarta el alcohol y se agrega la solución esterilizante (hipoclorito de sodio comercial al 2.5%), en cantidad suficiente para cubrir las semillas, luego se agita suavemente durante 3-5 minutos y se descarta nuevamente la solución. Seguidamente, las semillas deben ser lavadas al menos 6 veces con cantidad suficiente de agua estéril, y se las prepara para la pregerminación.

Las semillas estériles se colocan en un pliego de papel secante previamente esterilizado por autoclavado a 121°C y 1 atm. de sobrepresión durante 20 minutos. El papel debe ser previamente humedecido con agua estéril. Una vez dispersas las semillas se enrollan formando un tubo que es introducido en un recipiente apto, estéril que impida la rápida

deshidratación. Se coloca en cuarto de estufa a 29°C durante dos días, tiempo suficiente para obtener una raicilla de aproximadamente 1,5 cm.

Se eligen semillas de tamaño uniforme y alta viabilidad (95-100%), bien germinadas, de similar tamaño y longitud radical.

9.2. Ensayo de plantas en macetas

En el ensayo, se utilizan tubos plásticos de aproximadamente 25 cm. de largo por 3 cm. de diámetro; previamente a su utilización se lavan con agua y lavandina y luego se enjuagan nuevamente con agua estéril. Para el armado de cada una de las plantas de soja se utiliza una bandeja de plástico color transparente, un cuadrado rectangular de tela de tul que cubre la base del tubo, la cuál se sujeta mediante una goma elástica. Los tubos se rotulan para su identificación.

Como soporte para esta experiencia se utiliza vermiculita esterilizada en tres ciclos consecutivos de 1 hora en autoclave a 121°C y 1 atm. de sobrepresión. Antes de proceder a su esterilización se toma el pH de la vermiculita, siendo este de 7.35 y para evitar cualquier variación se procede a tomar el pH nuevamente de la vermiculita previamente humedecida, y se observa que no varía durante toda la noche.

En cada ciclo se procede a remover la vermiculita para lograr una esterilización homogénea.

Como paso previo a la siembra de las semillas de soja se procede a regar la vermiculita con agua estéril el día anterior para permitir tener humedad adecuada y poder realizar los hoyos y colocar las semillas esterilizadas y pregerminadas de acuerdo a lo citado anteriormente.

Una vez humedecida la vermiculita se realizan tres hoyos en la tierra y se colocan tres semillas pregerminadas por maceta. Nuevamente las macetas se riegan con agua estéril y se colocan para su germinación en el invernadero.

Luego de aproximadamente 5 días se procede a ralear 1 planta por maceta dejando solamente dos a lo largo de todo el proceso.

Las plantas se observan y se riegan de acuerdo a las necesidades diarias y se controlan ante la presencia de insectos. Durante toda la experiencia los testigos de cada ensayo se riegan con solución de riego. Al cabo de 45 días se realiza el registro de presencia o ausencia de nódulos. Para ello se debe proceder a lavar las raíces para remover la vermiculita.

9.3. Solución de riego

Medio Faharaeus libre de nitrógeno (Somasegaran et al; 1994).

Macronutrientes	Concentración g/l
CaCl ₂	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12
KH ₂ PO ₄	0,1
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,15
CLF ₃	0,0017
Solución stock de micronutrientes	1 ml

-Mezclar todos los constituyentes, ajustar el pH a 6,8-7 con NaOH. Autoclavar a 121°C por 20 minutos.

<u>Micronutrientes</u>	Concentración en g/l
H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ .7H ₂ O	2,03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.14

Tabla N°5: Composición de soluciones de macronutrientes y micronutrientes utilizadas para regar plantas en invernadero.

9.4 Recuento de rizobios en plantas por el método del número más probable (NMP)

Se prepara, para cada recuento, una serie de 4 diluciones 1/10 de la muestra de inoculante, y se inoculan las plantas con estas diluciones. Se deben realizar cuadruplicados de cada tratamiento. Después de 45 días de crecimiento, se evalúa la nodulación (presencia o ausencia de nódulos en la raíz de cada planta) y se utiliza la tabla de NMP para calcular el número más probable de rizobios infectivos por semilla o por gramos de suelo.

Se emplea la fórmula:

$$\text{NMP} = \frac{m \times d}{v \times n}$$

Donde:

m=número más probable en la primera dilución considerada

d=dilución de la primera dilución considerada

v=volumen inoculado

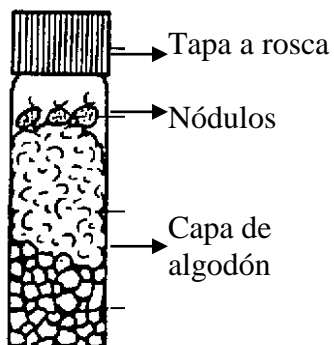
n=número de semillas, volumen o peso del inoculante

9.4. Número de nódulos y efectividad

Los nódulos fueron sacados cuidadosamente a fin de minimizar algún daño. Con la masa radicular separada de la parte aérea se procede a contar, por cada raíz el número de nódulos presentes. Utilizando un bisturí se procede a cortar nódulos para ver si presentan coloración rojiza. La coloración rojiza se debe a la presencia de leghemoglobina, proteína encargada de la fijación biológica del nitrógeno.

9.5. Conservación de nódulos

Se coloca en un tubo con tapa a rosca 2 a 3 cm. de silicagel, luego un taponcito de algodón



y sobre él se colocan los nódulos previamente seleccionados. Este método de preservación conserva los nódulos de 6 a 12 meses, dependiendo del tipo de leguminosa y de la temperatura de almacenamiento.

Figura 3

Se tomaron muestras de los inoculantes utilizados durante el ensayo para evaluar el número de células viables por ml durante el transcurso de la siembra.

Los datos obtenidos durante el desarrollo de esta experiencia se muestran en resultados.

Resultados y Discusión

1) Obtención y mantenimiento de cepa

La cepa utilizada durante el desarrollo de esta tesina, *B japonicum* E109, fue obtenida de un cepario de referencia (Materiales y métodos). Se recibió un tubo de ensayo con tapa a rosca, sembrado en agar inclinado y fue necesario multiplicar y preservarlo con la finalidad de asegurarnos durante todo el desarrollo del trabajo el mantenimiento de la misma.

El objetivo de la preservación es mantener la cepa viable sin la presencia de contaminantes y que no presente variación y/o mutación.

Para ello se realizó un cultivo líquido en medio inóculo durante 48 horas, que se utilizó para criopreservar en 10 *ependorff* y 10 tubos de ensayo. Además, el mismo cultivo fue usado para realizar 20 tubos de agar inclinado para un mantenimiento a corto plazo como se indica en materiales y métodos.

2) Selección de medios de cultivo

Con el fin de determinar el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la cepa a estudiar, se realizó un ensayo con dos medios de cultivo diferentes a diferentes concentraciones. Los cultivos se mantuvieron durante 72 horas al cabo de las cuales se realizaron determinaciones del crecimiento celular. Los resultados para U.F.C/ml se muestran en la **Figura 4**.

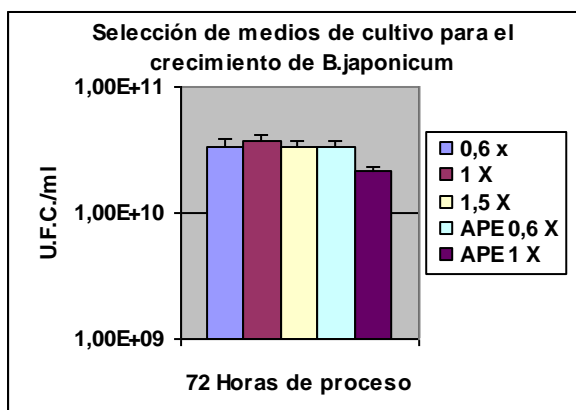


Figura 4: Crecimiento de *B.japonicum* a las 72 horas de proceso en distintos medios de cultivo. Se representan las U.F.C./ml alcanzadas a las 72 horas de cultivo en los diferentes medios de cultivo. Los ensayos en cada tratamiento se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como las medias +DS.

Por otro lado se determinó el peso seco de los cultivos a este tiempo (**Figura 5**).

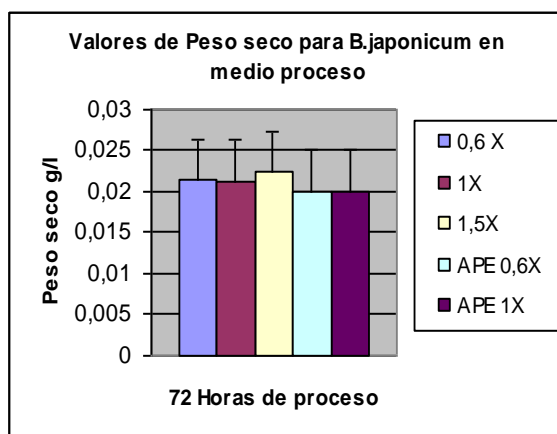


Figura 5: Valores de peso seco para *B.japonicum*. en diferentes medios de cultivo. Se representan los valores de cada medio de cultivo diferente obtenidos por duplicado como las medias + Ds.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó el Medio 1 en concentración 0,6 X debido a que no presentó diferencias en el número total de microorganismos alcanzado a las 72 horas de cultivo permitiendo obtener resultados similares pero con un costo menor que el utilizado habitualmente ya que la concentración de sus componentes fue considerablemente menor.

Además, si bien con el medio APE 0,6 X se obtuvieron resultados satisfactorios, se seleccionó el Medio 1 debido a que al final de las 72 horas de cultivo el pH, sigue siendo neutro.

3) Curva de crecimiento y caracterización cinética del mismo.

Se realizaron 3 ensayos independientes, cada proceso de 100 ml por triplicado utilizando el Medio 1 (0.6x). Debido a las características de crecimiento de la cepa, cada ensayo consistió en dos grupos de triplicados cuyo t=0 difería en 12 horas.

Se caracterizó el crecimiento de *B. japonicum* E109 en medio proceso, mediante la determinación de unidades de densidad óptica (U.D.O), del número de unidades formadoras de colonia (UFC)/ml en función del tiempo, y el pH, obteniéndose una curva de crecimiento que representa el desarrollo del microorganismo en estudio.

Se realizó el estudio de la cinética del microorganismo para determinar los parámetros cinéticos $\mu_{\text{máximo}}$ (μ_{max}) y tiempo generacional (t_g), y a partir de ellos, definir

tiempos de crecimiento correspondientes a las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento de los microorganismos en estas condiciones de trabajo.

Para ello se realizaron ensayos con procesos de Medio 1 por triplicado como se describió en Materiales y métodos y se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo. Los resultados obtenidos de U.F.C./ml y U.D.O. se muestran en las Figuras 6 y 7.

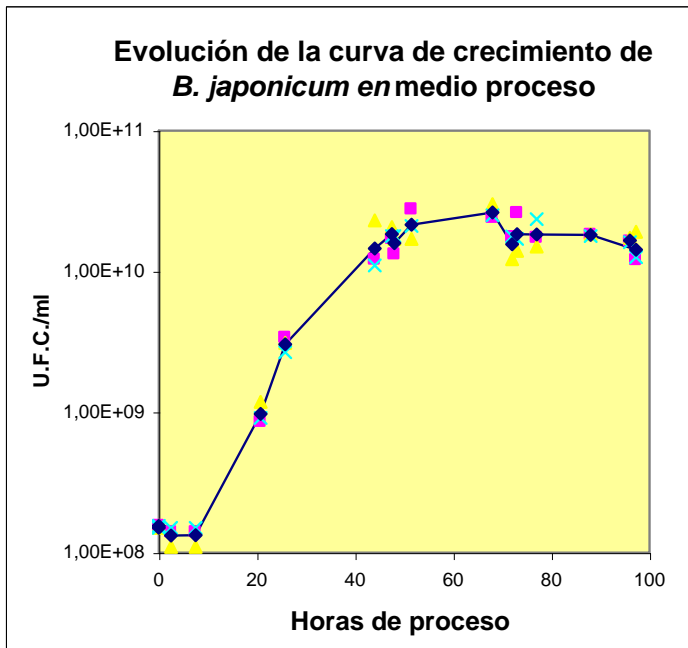


Figura 6: Crecimiento de la cepa *B. japonicum* E109 en medio proceso

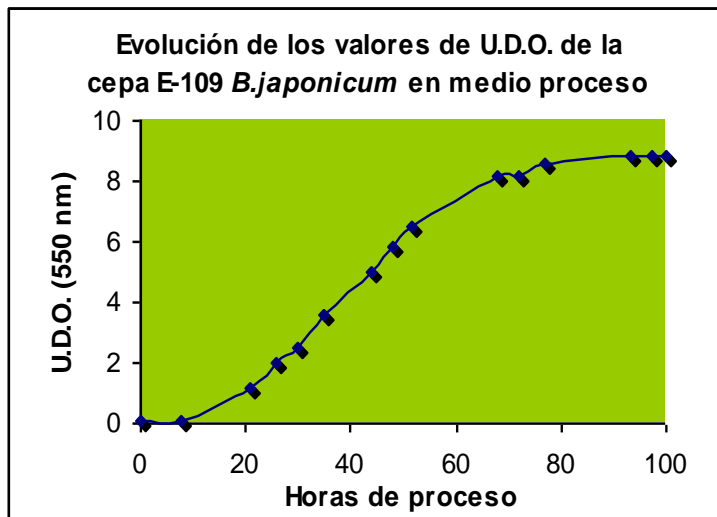


Figura 7: Evolución de los valores de U.D.O. (550 nm) para *B. japonicum* E109 en medio proceso. Los valores fueron tomados por duplicado a distintos intervalos de tiempo durante la curva de crecimiento.

Las curvas muestran un perfil similar en cuanto a los tiempos que determinan las diferentes fases de crecimiento, por lo que, es posible relacionar los valores de UDO con el número de células presente en el cultivo. Debido a que esta es una cepa de crecimiento lento, y que las colonias aisladas para realizar los recuentos aparecen después de 7 días, es importante tener una estimación celular fehaciente en forma inmediata, sobre todo en la industria, cuyos tiempos de producción y envasado de los productos debe ser lo más reducido posible.

El pH del cultivo no tuvo grandes variaciones a lo largo de la curva de crecimiento. En todos los ensayos, se observó un pequeño aumento de los valores obteniendo al final del proceso un pH levemente básico (7.6) (Figura 8).

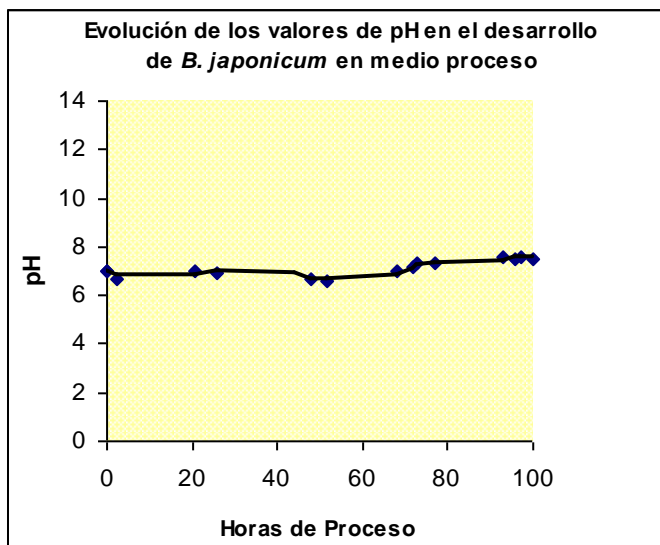


Figura 8: Evolución de los valores de pH en medio proceso para *B. japonicum*. Las muestras fueron tomadas a distintos intervalos de tiempo durante el desarrollo de la curva de crecimiento.

Con los datos obtenidos hemos podido determinar en nuestras condiciones de trabajo, las distintas fases de crecimiento del microorganismo estudiado, para poder utilizar estos datos en todos los experimentos posteriores de la tesina (Figura 9).

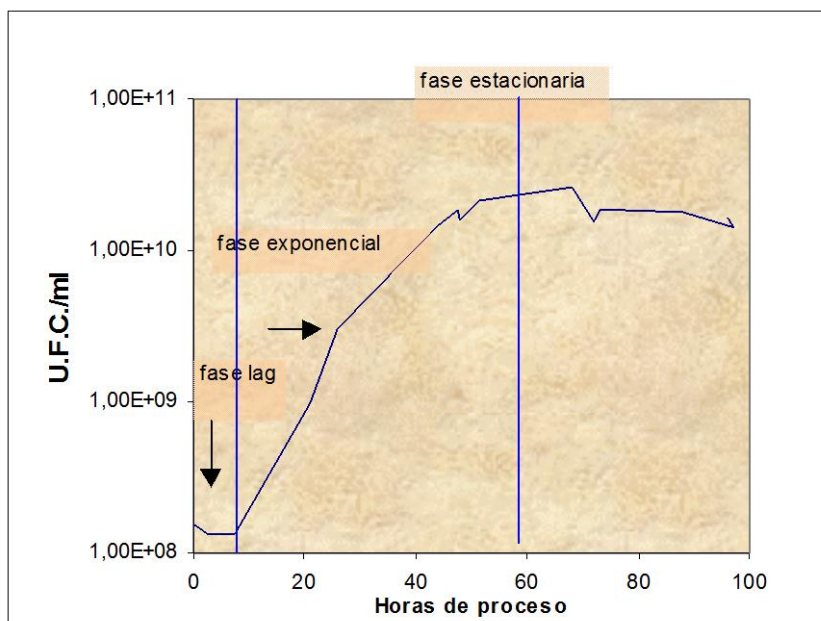


Figura 9: Fases de la curva de crecimiento de *B. japonicum* E109

Cálculos de parámetros cinéticos.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en la determinación del crecimiento para *B. japonicum* E109 en Medio 1 en concentración 0.6 X, se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos. Se calculó la velocidad específica de crecimiento en diferentes intervalos de tiempo y se determinó el valor máximo. También se determinaron los tiempos de generación. Los datos obtenidos son los siguientes:

Intervalos de tiempo	μ (1/h)	Tg (1/h)
2,50-21	0,10912718	6,32E+00
21 – 44	0,11645003	5,93E+00
44-48	0,02216947	2,75E+01
48-68	0,02509164	3,10E+01
68-73	-0,07118399	-9,69E+00
73-88	-0,00083103	-8,30E+02

Sobre la base de los datos obtenidos, se consideran los siguientes resultados como valores representativos de la cinética de crecimiento de *B japonicum E109*.

- $\mu_{max} = 0.11 \text{ h}^{-1}$
- $t_g = 5.93 \text{ h}$

Los valores obtenidos coinciden con los valores de otras cepas de la misma especie rizobiana en condiciones similares y muestran que, el medio seleccionado, es óptimo para el desarrollo de *B japonicum E109*.

4) Perfiles de LPSs y Proteínas celulares totales del microorganismo en distintas fases del crecimiento.

Con la finalidad de determinar si había variaciones en el perfil de LPS y de proteínas totales en las diferentes fases de crecimiento del microorganismo, se realizaron las determinaciones de los mismos. Los resultados para cada fase de crecimiento se muestran en la **Figura 10**.

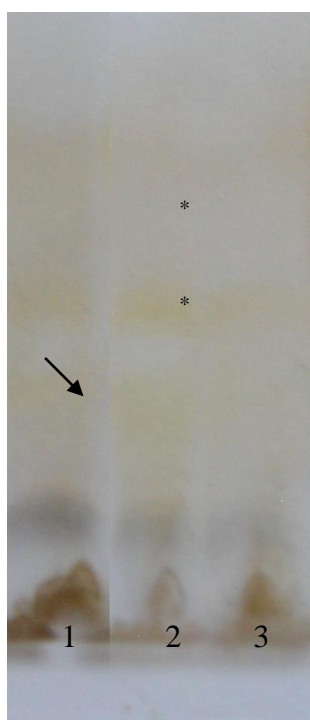


Figura 10: Perfil de LPSs para distinta fase de crecimiento de *B japonicum E109*: Los perfiles corresponden a 36, 72 y 96 horas de crecimiento en las calles 1,2 y 3 respectivamente

De acuerdo a lo observado, se comprueba que hubo variaciones en los perfiles LPS en las distintas fases del cultivo. A las 72 horas hay una intensidad mayor en las dos bandas de peso molecular mayor (*) y a las 36 horas se nota mas intensificadas las dos bandas de menor peso molecular. A su vez, en un cultivo envejecido de 96 horas dos bandas han disminuido significativamente.

Estos resultados, estarían indicando modificaciones en la envoltura de la bacteria que redundarían en diferente efectividad tanto en su capacidad para asociarse en infectar a la planta huésped como para sobrevivir en medios extremos.

Con respecto a los perfiles de proteínas totales; los ensayos realizados no permitieron obtener claramente los perfiles de bandas. Se debería repetir los ensayos, pero en nuestro caso las muestras almacenadas perdieron su representatividad ante frecuentes cortes de luz.

5) Obtención de cultivos en sistema de crecimiento *batch* en escala de fermentador de laboratorio.

Con el propósito de obtener mayor concentración de cultivo y de realizar un escalado del proceso, se repitió el desarrollo del cultivo en un fermentador de 5000ml de capacidad. A lo largo de la curva de crecimiento en sistema *batch* se tomaron muestras del cultivo a distintos intervalos de tiempo; se analizaron parámetros como U.D.O., peso seco, UFC/ml y pH. Los resultados para U.F.C./ml, UDO a 550 nm y pH se muestran en las **Figuras 11, 12 y 13.**

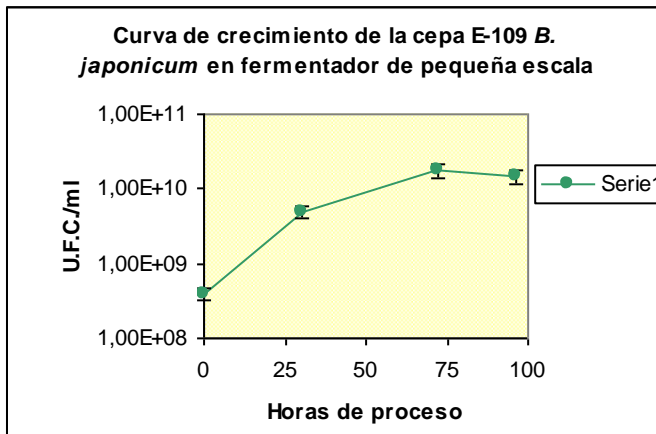


Figura 11: Crecimiento de la cepa E-109 B japonicum E109 en sistema *batch*, en fermentador de pequeña escala.

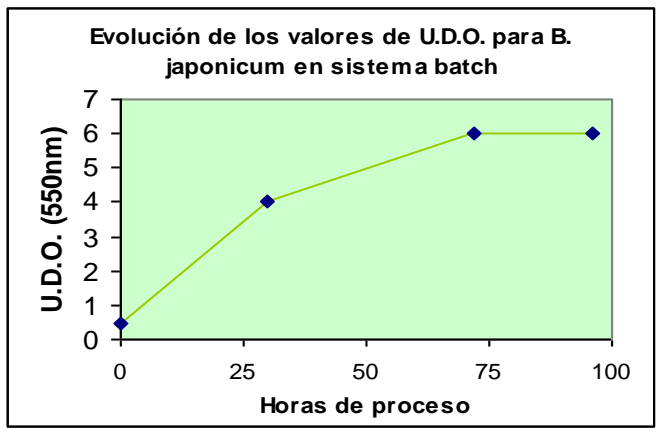


Figura 12: Evolución de los valores de U.D.O. en B japonicum E109 en medio proceso en sistema *batch*.

Los resultados obtenidos con respecto a la curva de crecimiento fueron similares a los que se obtuvieron en escala de agitador rotatorio una vez optimizado el proceso en escala de fermentador; por ello se utilizó el fermentador para ensayos posteriores.

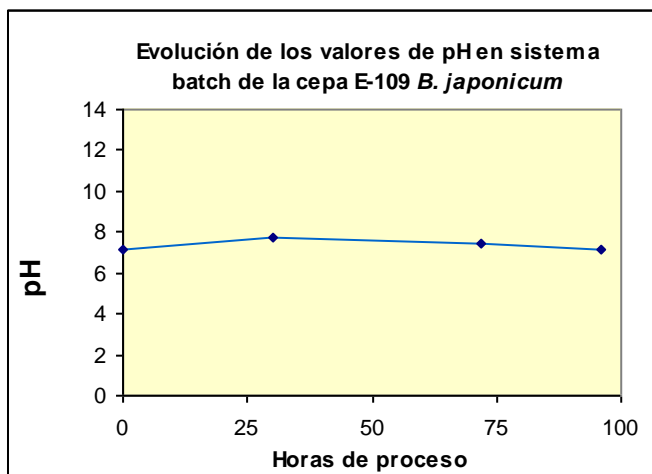


Figura 13: Evolución de los valores de pH en sistema *batch* de la cepa E-109 B japonicum E109.

6) Obtención de cultivos en sistema de crecimiento *feedbatch*.

De acuerdo a los resultados obtenidos con anterioridad en este grupo de trabajo, las células en fase exponencial del crecimiento serían más infectivas que aquellas en fase estacionaria. Para la formulación de inoculantes, usualmente se utilizan células en fase estacionaria del crecimiento, provenientes de un sistema de cultivo en *batch*, de modo de obtener cultivos con alto número de células. Formular un inoculante con células en fase exponencial, que han sido crecidas de la manera habitual, sería antieconómico y además no se lograría tener en el producto final, la densidad de microorganismos exigida para el producto. Por ello, con el objetivo de obtener altos títulos de microorganismos en fase exponencial del crecimiento, se realizó un cultivo de la cepa *B japonicum* E-109, en fermentador con agregado de medio de cultivo en forma continua (*feedbatch*). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 14 y 15.

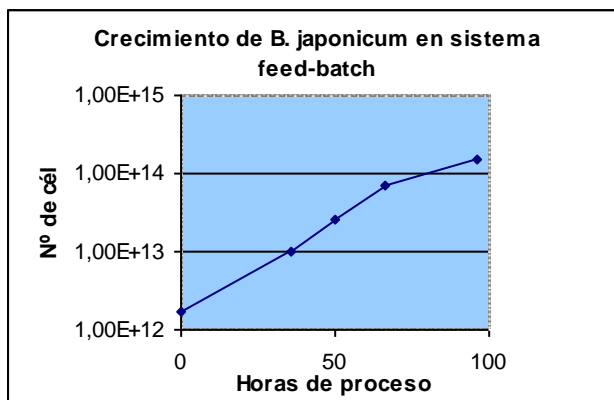


Figura 14 Crecimiento celular en sistema *feedbatch*. Crecimiento de *B japonicum* E109 E-109..

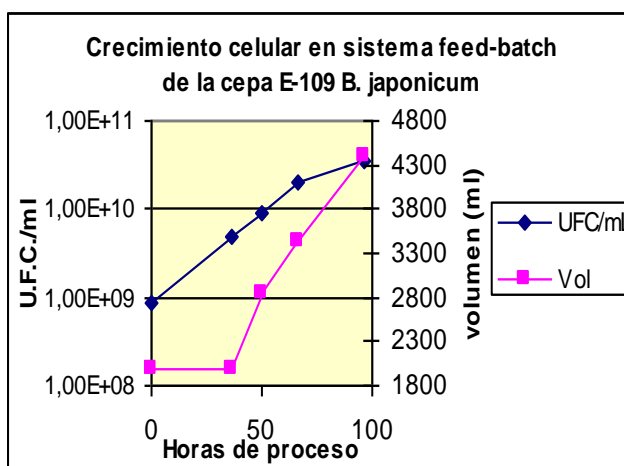


Figura 15 Crecimiento celular en sistema *feedbatch*. Crecimiento de *B japonicum* E109 E-109 en fermentador de 5000ml

En todos los casos también se determinó la turbidez del cultivo por determinación de UDO a 550 nm, y el peso seco, los resultados se muestran en las **Figuras 16 y 17**.

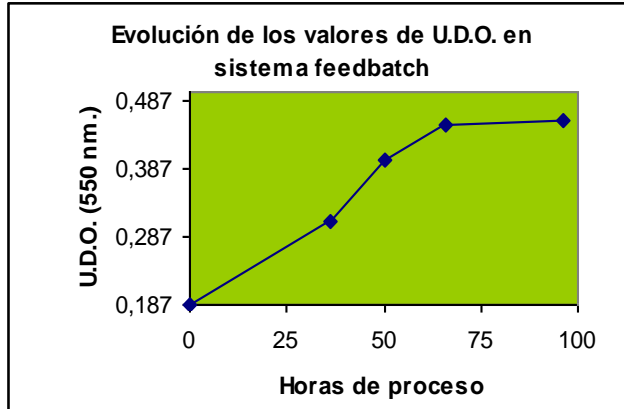


Figura 16: Evolución de los valores de U.D.O. ($\lambda = 550$ nm) en sistema *feedback*.

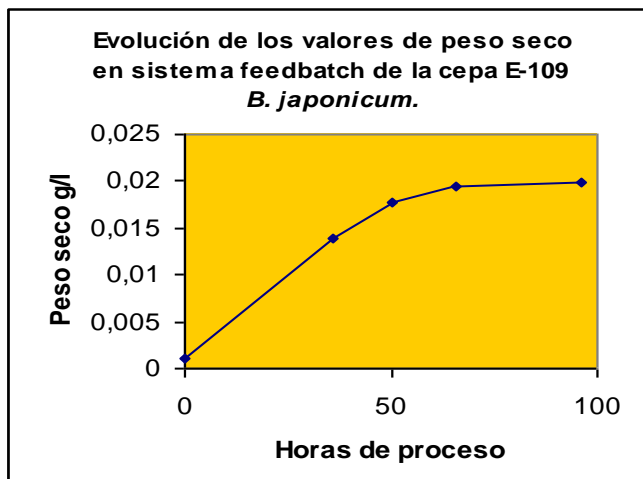


Figura 17: Evolución de los valores de peso seco en sistema *feedback* en escla de fermentador a pequeña escala.

En la **Figura 18** se observa el comportamiento del pH durante el desarrollo del proceso.

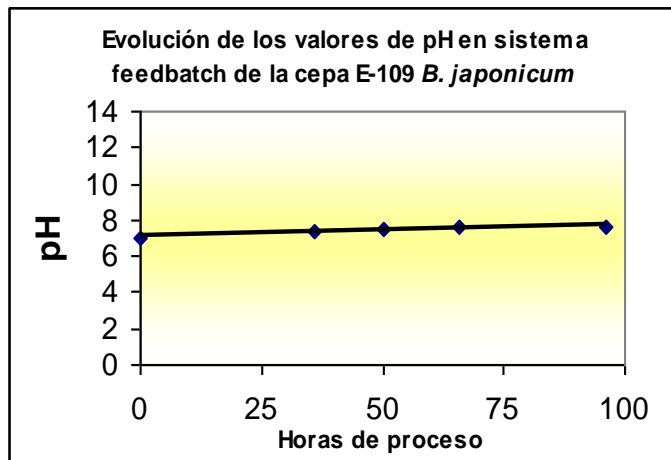


Figura 18: Evolución de los valores de pH en sistema *feedbatch*, en fermentador de pequeña escala.

Como se observa en las figuras mencionadas, fue posible obtener a pequeña escala, cultivos de alta densidad celular en fase exponencial del crecimiento.

6) Ensayo de supervivencia celular en inoculantes.

Con la finalidad de evaluar la supervivencia en inoculantes de microorganismos provenientes de distintas fases del crecimiento, se formularon inoculantes con cultivos que estaban en fases de crecimiento exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento. Para llevar a cabo estos ensayos se tomaron muestras de cultivos provenientes del sistema *batch* y *feedbatch* a distintos tiempo de proceso. En el sistema *batch* las muestras fueron tomadas a las 30, 72 y 96 horas de iniciado el proceso y conservadas en heladera y/o temperatura ambiente. En las **Figuras 19 y 20** se grafican los resultados de las curvas de supervivencia en sistema *batch*.

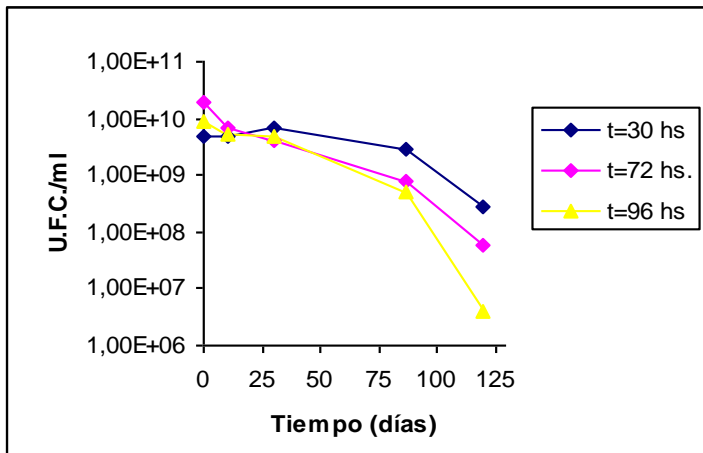


Figura 19:
Supervivencia en
inoculantes de la
cepa E-109
B.japonicum en

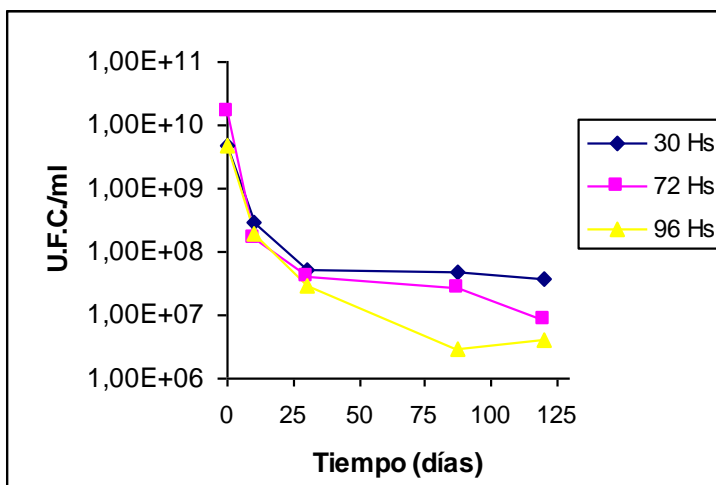


Figura 20: Supervivencia en
inoculantes de la cepa E-109
B.japonicum en sistema
batch conservados a
temperatura ambiente.

Se muestra que hasta los 100 días, los cultivos exponenciales conservados en la heladera se mantienen bastante estables, luego comienzan a caer en un valor de un orden de magnitud. Es de notar que los cultivos en fase de crecimiento exponencial son capaces de sobrevivir durante mas tiempo que los de fase estacionaria (que es la forma como se obtienen actualmente en la industria los microorganismos a inocular). En la **Figura 20**, los cultivos conservados a temperatura ambiente muestran una baja en el título hasta los 30 días a partir de los cuales se mantienen bastantes estables, observándose un mayor

decrecimiento en el caso de los estacionarios. Esta forma de conservación es menos eficiente que en forma refrigerada en todas las fases decrecimiento, lo que indicaría la necesidad de adecuar el formulado del inoculante para que las células permanezcan con alta viabilidad, aun a temperaturas altas.

Supervivencia en sistema *feedbatch*

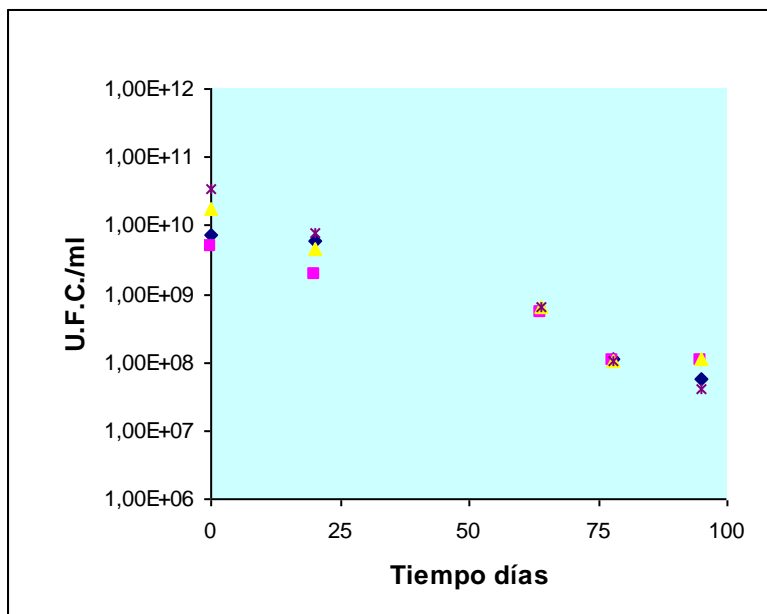


Figura 21: Supervivencia en inoculantes de la cepa E-109 *B japonicum E109* en sistema *feedbatch* conservados a temperatura ambiente. Cada serie corresponde a un inoculante independiente, cuyo recuento se realizó a distintos tiempos.

Los inoculantes provenientes de cultivos en sistemas *feedbatch* envasados a las 72 horas de iniciado el proceso, muestran un comportamiento similar a los provenientes de la fase estacionaria temprana de crecimiento en sistema *batch*, por lo que se podría determinar que el estado fisiológico de las células no es lo determinante para una mayor supervivencia en el inoculante, sino que probablemente el hecho de que los microorganismos envasados a las 36 horas en un sistema *batch* puedan sobrevivir por mas tiempo, responda a la edad del cultivo, y a la densidad celular. Posiblemente esté interviniendo un sistema de *quorum sensing* (González; 2003) (Wisniewsk et al; 2002).

8) Ensayo de infectividad y efectividad en plantas: número más probable (NMP).

Esta metodología se aplicó para determinar el número de rizobios viables e infectivos existentes en los inoculantes formulados, y comparar los distintos inoculantes provenientes de distintas fases de la curva del crecimiento del microorganismo. El objetivo fue determinar si la infectividad sigue la misma tendencia que el recuento en placa.

Fermentador: Frasco N°16

	Réplicas				Número de nódulos
Dilución	I	II	III	IV	
10^{-3}	+	-	-	-	1
10^{-4}	+	-	-	-	1
10^{-5}	-	-	-	-	0
10^{-6}	-	-	-	-	0

Fermentador: Frasco N° 18

	Réplicas				Número de nódulos
Dilución	I	II	III	IV	
10^{-3}	-	-	-	-	0
10^{-4}	-	+	-	-	3
10^{-5}	-	-	-	-	0
10^{-6}	-	-	-	-	0

Fermentador: Frasco N° 20

	Réplicas				Número de nódulos
Dilución	I	II	III	IV	
10^{-3}	-	+	+	+	3
10^{-4}	+	-	-	-	0
10^{-5}	-	-	-	-	0
10^{-6}	-	-	-	-	0

Feedbatch: Frasco N°108

	Réplicas				Número de nódulos
Dilución	I	II	III	IV	
10^{-4}	-	+	+	+	3
10^{-5}	-	-	-	-	0
10^{-6}	-	-	-	-	0
10^{-7}	-	-	-	-	0

Feedbatch: Frasco N° 113

	Réplicas				Número de nódulos
Dilución	I	II	III	IV	
10^{-4}	-	-	-	+	1
10^{-5}	-	-	-	-	0
10^{-6}	-	-	-	-	0
10^{-7}	-	-	-	-	0

Sistema de cultivo del microorganismo	NMP/ ml	Recuento en placa (UFC/ml)
Batch	2×10^5	$5,4 \times 10^6$
Feed batch	1×10^6	5×10^7

Los resultados indican que a los 180 días de almacenamiento de los inoculantes, se aprecian diferencias en cuanto a la infectividad al utilizar inoculantes con células provenientes de diferentes estado fisiológicos, por lo que consideramos que esto es debido a que durante este período de tiempo, las células conservan capacidad diferencial para infectar, lo que estaría apoyando nuestra hipótesis de trabajo.

10. Análisis genómico de microorganismos obtenidos de nódulos de plantas infectadas por REP-PCR

Con la finalidad de asegurarnos que los microorganismos que estaban en los nódulos eran los que habíamos utilizado en el inoculante, ya que es necesario descartar el riesgo de contaminación; se analizó el patrón de bandas de los aislamientos obtenidos que se muestra en la **Figura 22**, a partir del cual se puede determinar que cada nódulo contiene células provenientes del inoculante utilizado.

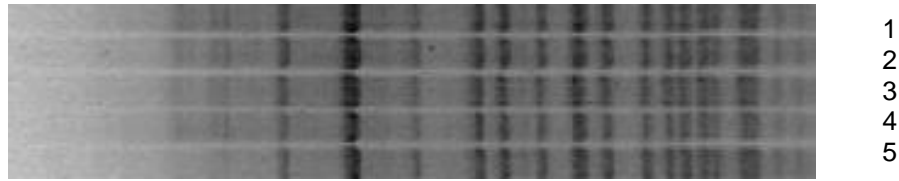


Figura 22 : Patrón de bandas BOX- PCR para los microorganismos provenientes de los inoculantes y de los nódulos. En la figura se muestran los resultados obtenidos para algunas de las cepas. Línea 1, cultivo feedbatch ; línea 2, nódulo de cultivo anterior; línea 3,cultivo *batch* 36 horas; línea 4, nódulo cultivo anterior; línea 5, nódulo de inoculante *batch* 72 horas.

Consideraciones Generales

Los microorganismos que se encuentran en la fase estacionaria del crecimiento, tienen características diferenciales en cuanto a su comportamiento fisiológico, metabólico y morfológico con respecto a aquellos que se encuentran en fase de crecimiento exponencial (Kolter, 1993; Nyström, 1999; Ferenci, 1999). En el hábitat natural de las bacterias, la condición en la que pasan la mayor parte del tiempo es en fase estacionaria, ya que los recursos son escasos, el crecimiento exponencial ocurre durante cortos lapsos. Desde el punto de vista ecológico, entonces, la fase estacionaria es el estado fisiológico en que debe sobrevivir la célula bacteriana mientras no haya recursos; por esto, a lo largo de la evolución, se desarrollaron mecanismos que permiten una mayor tolerancia a situaciones ambientales adversas.

De acuerdo a los objetivos planteados en el desarrollo de esta tesina, fue posible obtener suspensiones celulares de alta concentración.

Por otra parte, se determinaron los perfiles de LPSs para cada fase de la curva de crecimiento, y la infectividad de los inoculantes obtenidos como modo de aproximación para contrastar la hipótesis de trabajo.

Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que, los cultivos exponenciales tuvieron ventaja en cuanto a la supervivencia y en cuanto al título mostrado en el recuento de NMP con respecto a los cultivos que provenían de la fase estacionaria del crecimiento. A partir de ello, el desarrollo en sistema *feedbatch* se propone como una estrategia que permitiría cumplir con los requisitos de los inoculantes en cuanto a la densidad del cultivo y al estado de las células en el material de partida.

La continuación de estos experimentos en escala de fermentador con mayor capacidad, es una línea de investigación futura.

Bibliografía

1. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smit, J.A., Seidman, J.C. and Struhl, K.S. Current protocols in molecular biology, section 2.4. John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1994.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Bergey's Manual Trust, Michigan. Second Edition, Vol.2. 2005.
3. Blandergroen MR and Spaink HP. Genes and signal molecules involved in the rhizobia- Leguminosae symbiosis. Current Opinion in Plant Biology; 1:353-359, 1998.
4. Brock, Thomas D. and Madigan, Michael T. Microbiología. Sexta Edición Prentice Hall Hispanoamericana. S.A. Cap 17, Ecología Microbiana, pp715-720. La Fijación Biológica del Nitrógeno Atmosférico. Dpto. de Agronomía y Suelos. Universidad de Puerto Rico. Apuntes de Cátedra, 1995.
5. BrockwellJ, Bottomley PJ. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. Soil Biol Biochem; 27, 4/5:683-697, 1995.
6. Broughton WJ and Perret X. Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. Current Opinion un Plant Biology; 2:305-311, 1999.
7. Charley R. Method of using polysaccharides to stabilize microorganisms for inoculating plant seeds. United States patent N° 5292507, Mar 8, 1994.
8. Curtis, H y Barnes S. Biología. Sexta Edición. 2003.
9. Date RA Advances in inoculant technology: a brief review. Australian journal of experimental agriculture; 41, 3:321-325,
10. Dixon, R., y D. Kahn. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nature Rev. Microbiol. 2:621-631. 2004.

11. Ertola R, Yantorno O, Mignone C. Monografía de Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Secretaría General de la organización de Estados Americanos.2001.
12. FAO. Fertilizer yearbook, vol 39. FAO, Rome, Italy, 1990.
13. Ferenci T. Regulation by nutrient limitation. *Current opinion in Microbiology*; 2:208-213, 1999.
14. Fraysse, N., F.Couderc, y V. Poinso. Surface polysaccharide involvement in establishing the Rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380, 2003.
15. Gage DJ and margolin W. Hanging by a tread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology*; 3:613-617, 2000.
16. Giorda, LM. La soja en la Argentina. El cultivo de la soja en la Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentación, 11-26; 1997.
17. González and Marketon Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia -- *Microbiology and Molecular Biology Reviews*67 (4) 574 , 2003—
18. Hirsch, AM. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*; 2:320-326, 1999.
19. Hitchcock y Brown. *Journal of Bacteriology*154:269-277.
20. Hunter-Cevera Jennie C. Maintaining culturesfor Biotechnology and industry. Academic Press, Inc. 1994.
21. Igarashi, R.Y., y L.C. Seefeldt. Nitrogen fixation: The mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit. Rev. Biochem.Mol.Biol.* 38:351-384. 2003.
22. Kolter R, Siegele D.A., Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Reviews of Microbiology*; 47:855-874, 1993.

23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685, 1970.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*; 193: 265-275, 1951.
25. Mathis, R., F. Van Gijsegem, R. De Rycke, W.D'Haese, E. Van Maelsaeke, E. Antonio, M. Holster, y D.Vereecke. Lypopolysaccharides as a communication signal for progresión of legume endosymbiosis. *Proc. Nat.Acad. Sci.* 102:2655-2600, 2005.
26. Nyström T. Starvation, cessation of growth and bacterial aging. *Current opinion in Microbiology*; 2:214-219, 1999.
27. Oke V and Long SR. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*; 2:641-646, 2000.
28. Peoples, M.B., Ladha J.K. and Herridge D.F. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil*; 174:3-28, 1995.
29. Postgate, J.R. *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1982.
30. Raymond, J. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biol. Evol.* 21 541-554. 2004.
31. Rees, D.C., y J.B. Howard. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opi.. Chem. Biol.* 4:559-566. 2000.
32. Sawada, H., L.D. Kuykendall, y J.m. Young. Changing concepts in the sistematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49:155-79.
33. Schoot Uiterkamp, AJM. Nitrogen cycling and human interventions, p.55-66. In PM Gresshoff, LE Roth, G Stacey, and WE Newton (ed.), *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. Chapman & Hall, New York, N.Y., 1990.

34. Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H, Martinez-Romero E. Advances in Rhizobium research. Critical reviews in plant sciences; 21, 4:323-378, 2002.
35. Somasegaran P, Hoben HJ. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Bacterial Growth Media and Plant Nutrient Solutions. Springer - Verlag, New York, 1994.
36. Sprent, J.I. and Sprent P. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1990.
37. Stacey G, Sanjuan J, Luka S, Dockendorff T, Carlson RW. Signal exchange in the Bradyrhizobium-soybean symbiosis. Soil Biol Biochem; 27, 4/5: 473-483, 1995.
38. Stephens JHG, Rask HM. Inoculant production and formulation. Field Crops Research; 65:249-258, 2000.
39. van Kessel C, Hartley C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? Field Crops Research; 65:165-181, 2000.
van Leeuwenhoek 81: 397-407, 2002
40. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Meth. Mol. Cell. Biol; 5:25-40, 1994.
41. Vincent, JM., A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook n°15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.
42. Wang T, Martínez Romero J, López Lara I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Cap 8. Microbios. Editores: Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. CIFN, UNAM, México. 2005.
43. Wisniewski- Dye and Downie ,Quorum-sensing in *Rhizobium Antonie*

44. Wisniewski-Dye, F. y Downie, J.A. Quorum sensing in Rhizobium. ANTONIE Van Leeuwenhoek. 81:397-407. 2002.
45. www.sagpya.mecon.gov.ar. SAGPyA. Dirección de Mercados Agroalimentarios, 2007.