

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**Tesina presentada para obtener el grado académico de**

**LICENCIADO EN QUÍMICA**

**“Recolección *in situ* de *Rhynchosia*, domesticación y aislamiento de microorganismos simbiotes”**

**Cinthia Tamara LUCERO**

**SANTA ROSA (LA PAMPA)  
ARGENTINA**

**2014**

## **PREFACIO:**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología, dependiente del Departamento de Química, durante el período comprendido entre el 31 de Mayo de 2013, Res. N° 134/13 y el 11 de Diciembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. PAGLIERO Fabiola; y bajo la codirección de la Dra. RUIZ, María de los Ángeles.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme todas las herramientas para la realización de la tesina y de la carrera de grado.

A mi directora Fabiola Pagliero, co-directora María de los Ángeles Ruiz, Carolina Castaño y a Graciela Lorda, por brindarme sus conocimientos, su tiempo, dedicación, apoyo y afecto en todo momento. Fue un honor haber formado parte de este hermoso grupo de trabajo.

A Mari y Marcelo, por la colaboración y compañía, por hacer que las horas se pasen más rápido y por darme una mano siempre que pudieron.

A Mamá, Papá y Maripaz, que son el pilar fundamental de mi vida, por apoyarme en todo momento y por ayudarme a hacer posible este primer logro en mi vida profesional.

A mi abuela Chela por estar siempre a mi lado, rezando su rosario cada vez que tenía que rendir y no me puedo olvidar del Chelito que sea donde sea que esté estoy segura que está feliz por este logro diciendo “cuánto le pagaste a las maestras” con esa sonrisa pícara.

A Ramiro, por estar incondicionalmente durante este camino, apoyándome en los malos momentos y alegrándose junto conmigo con los buenos.

A mis amigos por acompañarme. Por darle siempre esa cuota de humor cuando veía la mitad del vaso vacío y ayudarme a buscar esa mitad llena para seguir adelante. Dentro de ellos, tengo que destacar a la Prof. Adriana Flecha que colaboró en la realización del Abstract de esta tesina.

A TODOS!!! MUCHISIMAS GRACIAS!!!

**Cinthia Tamara LUCERO**

**Fecha: 11 de Diciembre de 2014**

**Departamento de Química**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

## **RESUMEN:**

El estudio de la biodiversidad microbiana contribuyente al mejoramiento de prácticas agrícolas en zonas desfavorecidas como lo es la región semiárida pampeana, es una alternativa para la implantación de técnicas sustentables. La gran mayoría de los estudios que se realizan sobre microorganismos con capacidad simbiote corresponden a especies de leguminosas de cultivo intensivo. En contraste, se ha puesto poca atención en simbioses de leguminosas nativas, aquellas cuya ecología no es directamente afectada por la acción del hombre. Las asociaciones rizobio-leguminosa son indudablemente la forma mayoritaria de fijación de nitrógeno y juega un rol de suma importancia en la contribución de este nutriente manteniendo y mejorando la fertilidad del suelo, sumado a la acción de microorganismos co-habitantes de rizobios con características promotoras del crecimiento vegetal. En el presente trabajo se caracterizaron microorganismos endofíticos provenientes de nódulos de la leguminosa *Rhynchosia*. Considerando las características de la región semiárida pampeana, los aislamientos obtenidos fueron caracterizados en cuanto a su capacidad de crecimiento en tres condiciones de estrés salino (50, 100 y 200 mM NaCl) y en cuatro condiciones de pH (6, 7, 8 y 9). Se realizó la caracterización genética por REP-PCR para estimar la variabilidad microbiana y se determinaron los perfiles de lipopolisacáridos (LPS). Además se realizaron ensayos de capacidad simbiótica. Los resultados obtenidos demuestran gran variabilidad entre los aislamientos, en cuanto a las características estudiadas. Estos hallazgos conjuntamente con otras publicaciones realizadas sobre leguminosas nativas ponen en manifiesto la gran variabilidad endofítica en relación con la incapacidad de recuperar rizobios nodulantes.

## **ABSTRACT:**

The study of microbial biodiversity contributing to the improvement of agricultural practices in deprived areas such as the Pampean semiarid region is an alternative for the implementation of sustainable techniques. The vast majority of studies conducted on microorganisms with symbiotic capacity correspond to leguminous species of intensive cultivation. In contrast, there has been little attention on symbiotic organisms of native leguminous, those whose ecology is not directly affected by human action. The rhizobia-leguminous associations are certainly the major forms of nitrogen fixation and play an important role in the contribution of this nutrient, maintaining and improving soil fertility, coupled with the action of co-inhabitant microorganisms of rhizobia with features that promote plant growth. In this work, endophytic microorganisms from *Rhynchosia* leguminous nodules were characterized. Considering the characteristics of the Pampean semiarid region, the isolates obtained were characterized in terms of their ability to grow in three salt stress conditions (50, 100 and 200 mM NaCl) and four pH conditions (6, 7, 8 and 9). Genetic characterization by REP –PCR was performed in order to estimate microbial variability, and lipopolysaccharides profiles (LPS) were determined. Moreover, tests on symbiotic capacity were developed. The results show great variability among isolates in terms of the characteristics studied. These findings, together with other publications on native leguminous, manifest great endophytic variability regarding the inability to recover nodulating rhizobia.

## ÍNDICE:

	Pag.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 LA REGIÓN SEMIÁRIDA PAMPEANA. LEGUMINOSAS NATIVAS Y NATURALIZADAS -----	1
1.2 LA FAMILIA LEGUMINOSAE -----	3
1.2.1 <i>Rhynchosia</i> Lour-----	4
1.3 MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU INTERACCIÓN CON PLANTAS -----	5
1.3.1 Rizobios: La familia <i>Rhizobiaceae</i> -----	6
1.3.2 Simbiosis <i>rizobio</i> leguminosa -----	7
1.4 CUBIERTA BACTERIANA -----	12
1.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA -----	14
1.6 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA -----	14
1.7 ESTRÉS AMBIENTAL Y MICROORGANISMOS -----	15
<b>2. 2.1 HIPÓTESIS -----</b>	<b>17</b>
<b>2.2 OBJETIVOS -----</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1 REGIONES DE COLECTA DE LOS EJEMPLARES DE LA LEGUMINOSA NATIVA PERTENECIENTE AL GÉNERO <i>Rhynchosia</i> -----	18
3.2. CARACTERÍSTICAS EDÁFICAS DE LAS ZONAS DE MUESTREO -----	18
3.2.1 Determinación de la textura -----	18
3.2.2 Determinación de Nitrógeno -----	20
3.2.3 Determinación de fosforo -----	20
3.3 EVALUACION DE LA CAPACIDAD FORRAJERA DE LA ESPECIE <i>Rhynchosia</i> . 3.3.1 Determinacion de biomasa total y aérea -----	21
3.3.2 Determinacion del peso seco de la parte aérea -----	21
3.3.3 Fibra detergente neutra y ácida -----	22
3.3.4 Digestibilidad de materia seca y energía metabolizable -----	23
3.3.5 Proteína bruta -----	24
3.4 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS -----	24
3.5 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL NÓDULO -----	25
3.6 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO -----	25
3.7 TINCIÓN GRAM -----	26
3.8 DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS -----	27
3.9 FINGERPRINTING GENÓMICO POR BOX-PCR -----	30
3.10 CAPACIDAD SIMBIÓTICA -----	31
3. 11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO -----	32
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 CARACTERÍSTICAS EDÁFICAS DE LA ZONA DE COLECTA DE LOS EJEMPLARES DE LA LEGUMINOSA NATIVA PERTENECIENTE AL GÉNERO <i>Rhynchosia</i> -----	33
4.2 CAPACIDAD FORRAJERA DE LA ESPECIE <i>Rhynchosia</i> -----	34
4.3 OBTENCION DE AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS NATIVOS SIMBIONTES DE LA LEGUMINOSA <i>Rhynchosia</i> -----	35

4.4 CARACTERIZACION DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS	
4.4.1 Morfología, tinción de gran y lipopolisacaridos -----	37
4.4.2 Crecimiento celular en condiciones estándar y en condiciones de estrés, por pH y osmolaridad -----	40
4.4.3 Fingerprinting Box- PCR -----	50
4.5 CAPACIDAD DE NODULACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS -----	52
<b>5. CONCLUSIONES -----</b>	<b>55</b>
<b>6. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO -----</b>	<b>56</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA -----</b>	<b>57</b>
Anexo I -----	63
Anexo II -----	67
Anexo III -----	76

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 - LA REGIÓN SEMIÁRIDA PAMPEANA. LEGUMINOSAS NATIVAS Y NATURALIZADAS**

La región semiárida y árida central, 70 % de la superficie de las provincias de La Pampa y San Luis, presenta serios problemas de degradación de los recursos forrajeros, poniendo en riesgo la sostenibilidad económica, social y ambiental de los sistemas ganaderos (INTA, 2011).

Dentro de los factores que produjeron cambios en las comunidades originales de esta región, el de mayor importancia es el sobrepastoreo provocado por ganado doméstico, seguido por los desmontes, el destino de tierras con especies nativas a cultivos, cultivos transgénicos, siembra directa, uso de fertilizantes y plaguicidas y en menor medida agricultura de precisión (Carreño y Viglizzo, 2007), los incendios y las variaciones climáticas intra e inter anuales (Stritzler, *et al.* 2007).

Los factores antes mencionados, guardan estrecha relación con la heterogeneidad espacial, transformando estas áreas en sitios de muy baja receptividad ganadera, ocasionando cambios estructurales en la vegetación. (Estelrich y Cano, 1985; Morici, *et al.* 2003).

En los últimos años, importantes áreas del Caldenal, dominados por pastizales naturales, con buena aptitud para la agricultura, han sido incorporadas para este fin (Roberto, *et al.* 2005). Este hecho ha motivado una mayor homogeneización del paisaje con pérdida de límites ecotonales y el desplazamiento de la ganadería hacia zonas más marginales del cardenal y el monte o zona semiárida. De éste modo se ha agudizado la presión sobre estos ambientes, ya que el pastoreo provocado fue continuo y altamente selectivo, estimulando a un reemplazo paulatino de especies nativas. La alta carga animal afecta la estructura y composición de la vegetación existente y por ende también se ve afectado el banco de semillas del suelo (Morici, *et al.* 2009; Ernst, *et al.* 2011). También se produjo la invasión de numerosas especies leñosas o indeseables y el deterioro del suelo (Deregibus y Soriano, 1981; Sala, *et al.* 1986; Jacobo, *et al.* 2006).

Como la ganadería de esta zona semiárida utiliza para su dieta principalmente los pastizales naturales y estos en la actualidad son escasos, una alternativa para mejorar la productividad sería la introducción de especies forrajeras nativas o naturalizadas tanto

gramíneas como leguminosas, que estén adaptadas a la zona (Zabala, *et al.* 2010; INTA, 2010).

En una vasta zona del centro de la provincia de San Luis, por ejemplo, se ha detectado una drástica reducción en la cobertura de pastizales naturales. Estos pasaron de cubrir casi el 93% de la superficie en 1985 a tan solo el 44% en 2001, a manos de cultivos y otras pasturas (Demaría, *et al.* 2008). La situación es similar en muchas zonas del país según los datos proporcionados por los últimos Censos Nacionales Agropecuarios (Paruelo, *et al.* 2005).

En la actualidad son escasos los trabajos sobre especies leguminosas nativas o naturalizadas como *Adesmia*, *Rhynchosia*, *Hoffmanseggia*, *Lotus*, *Vicia*, *Melilotus*, *Medicago* entre otros (INTA, 2010; Martínez, *et al.* 2010). Algunas de estas especies presentan ciertas dificultades para su domesticación, por ejemplo se ha mencionado la dificultad de coleccionar semilla de *Rhynchosia* sp. debido a su rápida dehiscencia (Bell, *et al.* 2010).

La existencia de una red de Bancos de Germoplasma en INTA permite la conservación *ex situ* de la diversidad vegetal gracias a las actividades de colecta, conservación, caracterizaciones y evaluaciones agronómicas, bioquímicas y moleculares que contribuyen a la valorización de dichos recursos (Clausen, *et al.* 2008).

Como los suelos de los pastizales naturales de la región semiárida pampeana tienen déficit de nitrógeno resulta de mucha importancia la siembra de leguminosas, nativas o introducidas, ya que tienen la particularidad de propagarse por semilla, lo que implica una gran resiembra natural; poseen la capacidad de crecer en comunidades vegetales junto a gramíneas, de manera de incrementar la productividad y calidad del forraje y poseen la posibilidad de fijar nitrógeno atmosférico por simbiosis con bacterias. (Bell, *et al.* 2010; Interrante, *et al.* 2011). Este proceso contribuye con una parte considerable del nitrógeno fijado en la tierra y permite a las leguminosas crecer sin la adición de fertilizantes nitrogenados (Postgate, 1982; Peoples, *et al.* 1995).



## **1.2 - LA FAMILIA LEGUMINOSAE**

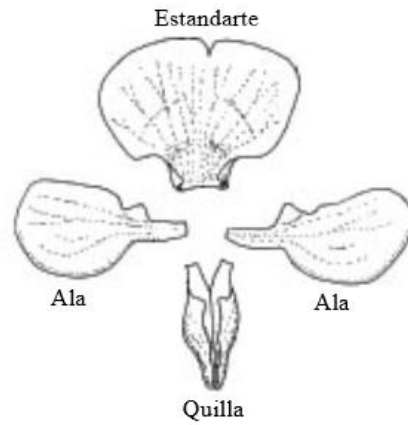
La familia *Leguminosae* es una de las más amplias del reino vegetal, catalogándose en ella unas 18.000 especies, encuadradas en aproximadamente 700 géneros.

Su importancia económica es extraordinaria, ya que incluye especies esenciales en la alimentación humana como el guisante (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*) o la lenteja (*Lens culinaris*). A esta familia pertenecen también especies oleaginosas como la soja (*Glycine max*); plantas forrajeras como la alfalfa (*Medicago sativa*) y el trébol (*Trifolium sp.*); colorantes como el índigo (*Indigofera tinctoria*); plantas ornamentales como la falsa acacia (*Robinia pseudoacacia*); y plantas medicinales como el sen (*Cassia acutifolia*), de hojas purgantes, tónicos cardíacos como la retama negra (*Cytisus scoparius*), antiespasmódicos y antiinflamatorios como el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*).

Son hierbas, arbustos o árboles, con una gran diversidad de hábitats, incluyendo plantas acuáticas, trepadoras, y fuertemente xerofíticas. Una característica esencial es su asociación en simbiosis con bacterias del orden Rhizobiales, que se alojan en nódulos formados en raíces o tallos, y que son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, lo cual les permite colonizar incluso los suelos más pobres que enriquecen en nitrógeno asimilable.

Las hojas son normalmente compuestas, raramente simples, a veces provistas de zarcillos y con estípulas que pueden ser espinosas. Las flores son pentámeras, con perianto doble y 10 o más estambres que a menudo se sueldan por sus filamentos.

El ovario está formado por un único carpelo que da un fruto en legumbre o vaina. Existen tres subfamilias que se distinguen por la disposición de sus piezas florales. En la subfamilia *Mimosoideae* las flores son regulares, con numerosos estambres de largos filamentos. La subfamilia *Caesalpinoideae* presenta flores irregulares, con los pétalos laterales, llamados alas, cubriendo el superior o estandarte en el capullo. Ambas son predominantemente tropicales o subtropicales. En la tercera subfamilia, *Papilionoideae* (**Figura 1**), las flores son irregulares y amariposadas, con el estandarte envolviendo a los otros pétalos (alas y quilla) en el capullo.



**Figura 1-** Piezas florales de una flor *Papilonecea* típica.

### 1.2.1 *Rhynchosia* Lour.

El género *Rhynchosia* (**Figura 2 y 3**) pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Phaseoleae*, se estima que unas 200 especies integran el mismo.



**Figura 2:** *Rhynchosia senna* (planta florecida)



Las diferentes especies, son abundantes en África y aproximadamente una cuarta parte de ellas se distribuyen en América, desde Estados Unidos hasta el centro de Argentina. En nuestro país habitan 14 especies y 3 variedades (Fortunato 1983); de las cuales, 3 especies y 2 variedades llegan hasta el sur de la Provincia de Córdoba: *R. senna* var. *senna*, *R. senna* var. *lexana* y *R. diversifolia* var. *prostrata*, quienes también están citadas para San Luis, La Pampa y Buenos Aires (Cunquero y Covas, 1982; Fortunato, 1983).



**Figura 3:** *Rhynchosia senna*: Distribución de la especie en la localidad “Loventue”, La Pampa, Argentina.

### **1.3 - MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU INTERACCIÓN CON PLANTAS.**

El ambiente rizosférico difiere del resto del suelo debido a la influencia ejercida por diversas actividades de las raíces, que puede extenderse a varios milímetros desde la superficie del vegetal. La influencia de las raíces es decisiva para la multiplicación y diversificación de los microorganismos que crecen asociados a este ambiente, debido a la

secreción y exudación de diversos compuestos tales como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios, entre otros, que conducen a un enriquecimiento selectivo de nutrientes. Más aun, diversas especies de plantas suelen liberar diferentes perfiles de metabolitos en su rizosfera, e incluso una misma planta puede liberar diferentes compuestos a lo largo de su raíz, con lo cual la composición de las poblaciones microbianas asociadas a la rizosfera suelen variar entre especies de plantas y entre distintas zonas de la raíz de una planta. Las rizobacterias pueden moverse desde el suelo hacia las raíces para iniciar su colonización y posteriores etapas de interacción con el hospedador que, como en el caso de los rizobios fijadores de nitrógeno, involucran también la infección radical y la nodulación.

### 1.3.1 Rizobios: La familia *Rhizobiaceae*

En la primera edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology la familia *Rhizobiaceae* se definía como sigue (Jordan, 1938):

“Son células sin endosporas, normalmente con forma de bastón. Móviles, bien con 1 flagelo polar o subpolar, o bien con flagelos peritricos en número de 2 a 6. Son microorganismos aerobios, Gram negativos. Pueden utilizar distintos carbohidratos como fuente de carbono. En medios de cultivo que contienen carbohidratos el crecimiento se caracteriza por la producción de gran cantidad de exopolisacáridos”.

“Todas las especies, excepto *Agrobacterium radiobacter*, producen hipertrofias en plantas. El género *Agrobacterium* comprende bacterias que producen hipertrofias en forma de agallas en raíces y tallos de diversas plantas, considerándose estas bacterias como fitopatógenas con la excepción de la mencionada anteriormente. Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* producen nódulos en las raíces de plantas de la familia *Leguminosae* con las que establecen una simbiosis. Algunos rizobios forman nódulos en raíces y tallos de plantas del género *Sesbania*, también perteneciente a la familia *Leguminosae*. Las bacterias del género *Phyllobacterium* originan nódulos en las hojas de plantas de las familias *Myrsinaceae* y *Rubiaceae* (Jordan, 1938)”.

La capacidad de *Rhizobium* para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas y su gran implicación en la agricultura ha hecho que la taxonomía del grupo se haya realizado, durante mucho tiempo, en función de las especies de leguminosas que pueden comportarse como huéspedes en la simbiosis.

Baldwin y Fred (1929) propusieron una caracterización taxonómica de los rizobios sobre la base de grupos de inoculación cruzada. Fred, *et al.* (1932) definieron éstos grupos de inoculación cruzada como “grupos de plantas dentro de los cuales los organismos de los nódulos de la raíz son intercambiables”. Es decir, que los *rhizobia* aislados de plantas de un mismo grupo de inoculación cruzada pueden nodular a las distintas plantas que componen dicho grupo.

Hasta el trabajo de Wilson (1944) los estudios experimentales de inoculación cruzada no habían sido realizados con un número suficiente de plantas, ni tampoco con un número suficiente de cepas como para justificar el establecimiento definitivo de los grupos de inoculación cruzada y promover, consecuentemente, este criterio como el adecuado para realizar un exhaustivo ordenamiento de *Rhizobium*. Si la planta establece simbiosis con microorganismos aislados de otros grupos, o si el microorganismo nodula plantas de grupos distintos, los grupos pierden su valor y el microorganismo no sería específico de un grupo de plantas.

Los *rhizobia* no forman un grupo coherente de microorganismos, ya que aparecen junto con otras bacterias no simbióticas cuando se reconstruye su filogenia en base al gen ADNr 16S (Young y Haukka, 1996). A lo largo de las últimas décadas la clasificación de los miembros de la familia *Rhizobiaceae* ha sufrido multitud de cambios. La actual familia *Rhizobiaceae* (todavía en revisión) contendría los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* y se incluiría dentro del orden *Rhizobiales*, que además de la familia *Rhizobiaceae* comprendería otras, entre ellas las familias *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Phyllobacteriaceae* que albergarían microorganismos fijadores de nitrógeno en simbiosis.

### **1.3.2 Simbiosis rizobio leguminosa**

La simbiosis leguminosa-rizobio es la relación recíproca entre las plantas y la bacteria. La bacteria invade las raíces (o en casos raros, los tallos) e induce la formación de un nódulo, en el cual ésta reduce el nitrógeno atmosférico en amonio y provee a la planta de compuestos nitrogenados a cambio de compuestos carbonatados y otros nutrientes. La planta gana en habilidad para crecer en suelos pobres en nitrógeno y la bacteria obtiene fotosintatos, junto con una cubierta protectora en la que se multiplica, y de la cual escapa en un gran número al ocurrir la senescencia del nódulo.

El género *Rhizobium* ha dejado de ser único para las bacterias que fijan nitrógeno atmosférico en las leguminosas. A partir de las investigaciones realizadas sobre la base de la taxonomía numérica y las técnicas de biología molecular, ha surgido una nueva nomenclatura que comprende representantes de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Allorhizobium*. Estos géneros representan las bacterias que provocan la nodulación radicular de un enorme rango de leguminosas diseminadas a través de las más variadas zonas geográficas y climáticas del mundo.

La infección de una leguminosa por los rizobios es una relación íntima, la cual depende del reconocimiento mutuo específico para una fijación efectiva del nitrógeno atmosférico (Vincent, 1982).

De acuerdo con lo expresado por Kijne (1992), una infección exitosa no se inicia en la superficie de la raíz, sino que consiste en un proceso multidisciplinario que comienza en la rizosfera. En este proceso toman parte la activación de los genes de nodulación, la ocupación por la bacteria de los sitios más apropiados de la superficie radicular y la liberación del estímulo por el rizobio.

En los exudados que emiten las raíces de las leguminosas existe un rango determinado de aminoácidos, azúcares, flavonoides y ácidos carboxílicos, los cuales resultan atrayentes en la quimiotaxis que se forma entre la bacteria y las raíces, aunque aparentemente la quimiotaxis no es el mayor factor en la determinación de la especificidad en la planta hospedera (Gaworzewska y Carlile, 1982).

Muchos de los genes rizobianos responsables de la nodulación (genes *nod*) están localizados en los plásmidos de algunos géneros. Estos codifican para las funciones comunes y específicas en la nodulación de la planta hospedera y están organizados en al menos cuatro operones inducibles. La expresión de estos operones requiere de la presencia de un gen *nod* funcional, así como de los flavonoides exudados por la planta huésped que ejercen una estimulación en los genes *nod*.

La proteína NodD es una proteína reguladora de transcripción derivada del gen *nodD* que interactúa con los exudados radiculares, entre ellos los flavonoides, lo cual contribuye a la especificidad del huésped en esta primera fase (Geiger, *et al.* 1994; Sprent, 2001). En una segunda fase la bacteria, después de activados los genes comunes *nodABC*, produce metabolitos (metabolitos o factor Nod), algunos de los cuales pueden actuar como señales en las plantas huésped respectivas. En todos los casos estudiados estas señales son lipooligosacáridos (LCO), los cuales son acompañados por grupos funcionales

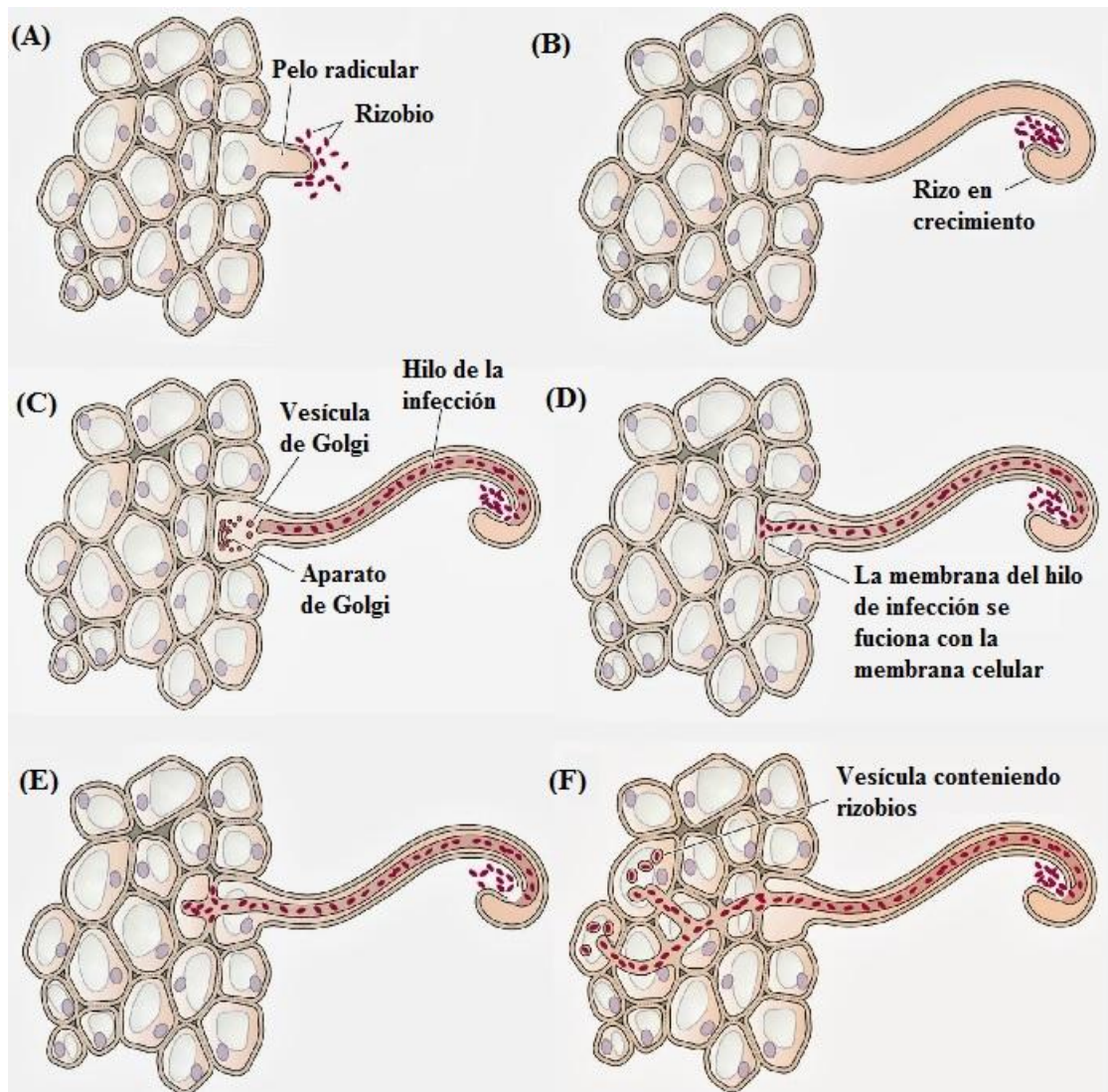
característicos para las especies de rizobios relacionados en su síntesis, que posteriormente inducen el proceso de nodulación en la planta (Denarié, *et al.* 1992; Verma, 1992; Sprent, 2001).

En la planta huésped el rizobio migra hacia el primordio nodular por un pasaje intracelular. Las células infectadas están localizadas en la zona radicular entre los pelos radiculares más pequeños emergentes y el extremo no piloso de la raíz (Kijne, 1992). Los pelos radiculares, ante la presencia de la bacteria, adoptan diferentes formas. La unión del rizobio con la superficie radicular ocurre en dos fases: en la primera, las células bacterianas se adhieren por separado a la superficie del pelo radicular. En la segunda, otros rizobios de adhieren a la cadena de células, lo cual termina en una acumulación de rizobios en el sitio de unión (Smit, *et al.* 1989).

Después de la unión del rizobio con la superficie, el pelo radicular responde con un encorvamiento (Haack, 1964; Newcomb, *et al.* 1979). El rizobio atrapado en este encorvamiento puede ser ingerido por la célula radicular, lo que se conoce como proceso de endocitosis.

La llegada del rizobio al pelo radicular es seguida por la formación de una invaginación tubular creciente de la membrana plasmática huésped, acompañada de una deposición de material de la pared celular en las regiones subapicales de la membrana invaginada. La estructura resultante es llamada filamento de infección y contiene el rizobio invasor; existen evidencias que sugieren que los polisacáridos extracelulares del rizobio están involucrados en la formación de este filamento (**Figura 4**) (Kijne, 1992).





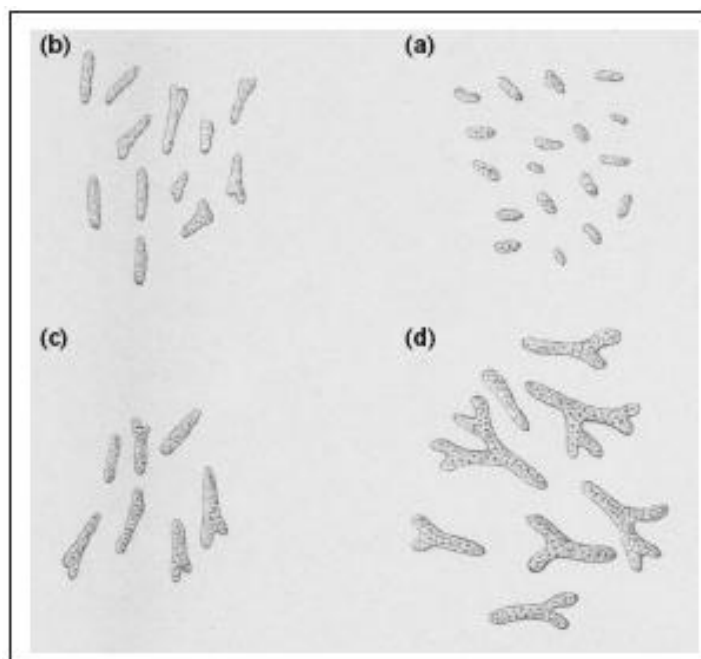
**Figura 4** - (A) Los rizobios se unen a un pelo radicular emergente en respuesta a la atracción de químicos que son exudados por la planta. (B) En respuesta a los factores producidos por las bacterias, el pelo radicular exhibe un crecimiento ondulado anormal y las células rizobiales proliferan dentro de la cola (nódulo). (C) Una degradación localizada de la pared del pelo radicular conduce a la infección y la formación del hilo a las vesículas secretoras de Golgi de las células de la raíz. (D) El hilo de la infección llega al final de la célula y su membrana se fusiona con la membrana plasmática de la célula del pelo radicular. (E) Los rizobios son liberados en el apoplasto y penetran de la lamela media a la membrana plasmática de las células subepidérmicas, conduciendo un nuevo hilo de infección, que forma un canal abierto por la primera entrada. (F) El hilo de la infección se extiende y bracea hasta que llega a las células diana, donde las vesículas compuestas de la membrana vegetal encierran a las células bacterianas y las liberan en el citosol (Gaje, 2004).



Posteriormente, la bacteria se sitúa dentro de un compartimento celular rodeado de una membrana del huésped: el simbiosoma (Roth, *et al.* 1988), el cual es producido por la planta huésped por un flujo de membrana de Golgi. Se ha demostrado que el microsimbionte tiene un papel decisivo en la formación, estabilidad, composición proteínica y densidad de las partículas de esta membrana (Werner, 1992). Durante el desarrollo del nódulo se induce la biosíntesis de la membrana y un flujo de proteínas, entre las que se encuentran las lectinas (Downie y Kondorosi, 1998).

Según Van Kammen (1995), cada una de las fases sucesivas de la formación del nódulo en las raíces es marcada por la expresión de genes de la planta, específicos en la nodulación, que codifican las proteínas llamadas nodulinas.

En el simbiosoma los rizobios se dividen y cada uno adopta una forma pleiomórfica (los llamados bacteroides, **Figura 5**) y comienzan a reducir  $N_2$  en amonio en el nódulo completamente formado (Kijne, 1992).



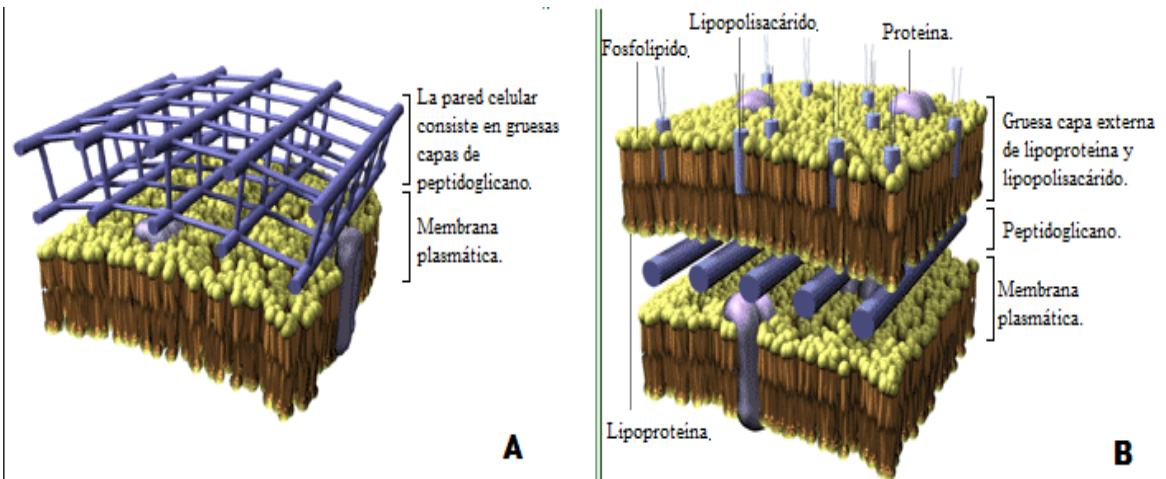
**Figura 5** - Proceso de diferenciación en bacteroides. Desde la bacteria de vida libre (a) hasta el bacteroide funcional (d) (Oke y Long, 1999).

De acuerdo con Boogerd y Van Rossum (1997), existe otra vía de penetración del rizobio a la raíz, y es la que se realiza a través de dos células de la epidermis. Esto se ha comprobado en especies arbóreas como *Mimosa scabrella* y nunca pudo ser observado el filamento de infección.

#### **1.4 - CUBIERTA BACTERIANA**

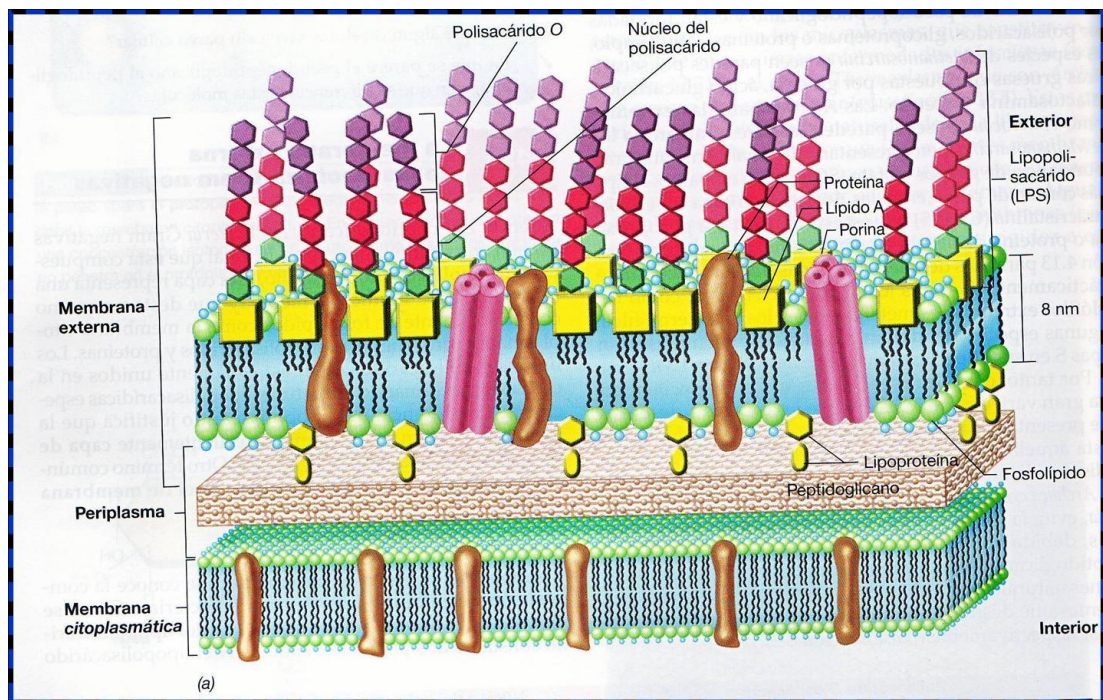
Todas las células poseen una membrana citoplasmática compuesta de una bicapa de fosfolípidos que delimita el interior celular. Adicionalmente a esta “frontera”, un grupo de bacterias, denominadas Gram negativas, evolucionaron desarrollando una segunda membrana exterior a la citoplasmática (**Figura 6**) Esta membrana externa tiene una configuración asimétrica: la cara interna está compuesta de fosfolípidos, mientras que la externa está compuesta mayoritariamente de unas moléculas únicas en la naturaleza denominadas lipopolisacáridos (LPS).

Los LPS son glucolípidos anfipáticos complejos. Constituyen el 3.5% del peso seco total de una célula promedio de *Escherichia coli* y el 75% de la superficie de la membrana externa (Lerouge y Vanderleyden, 2002; Neihardt, *et al.* 1990). Estructuralmente pueden dividirse en tres dominios: lípido A, oligosacárido del núcleo (ON) y antígeno O (**Figura 7**). El lípido A está constituido de un disacárido al que están unidos ácidos grasos, los cuales anclan las moléculas de LPS a la membrana externa. Una cadena corta de monosacáridos unida al lípido A constituye el ON. El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades de monosacáridos u oligosacáridos repetidos muy variables, está unido al ON y es el dominio distal de la molécula de LPS. El antígeno O puede no estar presente en algunas especies e incluso en algunas cepas de una misma especie. Cuando esto sucede, generalmente las colonias presentan una apariencia rugosa y el LPS producido se denomina LPS rugoso o LPS II, ya que migra más rápido en geles de SDS-PAGE que las moléculas con antígeno O que son llamadas LPS liso o LPS I (Raetz y Whitfield, 2002). Gracias a los LPS la membrana externa tiene la capacidad de excluir compuestos hidrofóbicos, siendo así una barrera de permeabilidad protectora contra muchos antibióticos y xenobióticos (Firdich y Whitfield, 2005; Lerouge y Vanderleyden, 2002). Por este motivo no sorprende que los LPS sean esenciales para la viabilidad de la mayoría de bacterias Gram negativas, siendo la unidad mínima necesaria el lípido A y los Kdo del ON (Neihardt, *et al.* 1990).



**Figura 6:** Representación esquemática de la pared celular.

**A.** Bacterias Gram-positivas. **B.** Gram-negativas (Silhavy, *et al.* 2010).



**Figura 7:** Esquema de la membrana celular donde se pueden visualizar los lipopolisacáridos

(Silhavy, *et al.* 2010).

## **1.5 – CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.**

El fenotipo es la expresión observable del genotipo, y por lo tanto depende de las condiciones ambientales. Dado que la información genética no se expresa en su totalidad, el fenotipo refleja únicamente una pequeña parte de dicha información.

Dentro de los métodos clásicos se incluyen las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. En estos criterios se basaron las clasificaciones de los microorganismos antes del advenimiento de las técnicas de biología molecular. En la actualidad han pasado a un segundo plano debido a que los resultados de este tipo de pruebas pueden variar dependiendo de múltiples factores; entre otros, la edad del cultivo o la temperatura de incubación.

Tanto las características macroscópicas de las colonias (forma, tamaño y color) como las características de las propias células, observables por microscopía (forma, tamaño, presencia de endosporas, flagelos, cuerpos de inclusión etc.), son de gran utilidad en taxonomía bacteriana. Asimismo, el análisis de perfiles de lipopolisacáridos en bacterias gram negativas, podría dar una idea aproximada de diversidad debido a que es diferente en microorganismos estrechamente relacionados.

Las pruebas fisiológicas más utilizadas en taxonomía microbiana incluyen, entre otras, la resistencia a antibióticos, la existencia de funciones enzimáticas, la cinética de crecimiento en condiciones de cultivo determinadas.

## **1.6 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.**

El genotipo es la información contenida en el material genético de la célula, y por lo tanto la esencia de todo organismo vivo. Existen diversas metodologías que permiten establecer relaciones taxonómicas entre los microorganismos mediante el estudio del genoma de los mismos: secuenciación de DNA total, secuenciación de rDNA 16S, ARDRA, RFLP, AFLP, RAPDS, rep-PCR, etc. Todas ellas utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) que permite amplificar más de un millón de veces una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. La técnica a implementar dependerá de las relaciones que se quiera establecer entre los organismos.

- **rep-PCR**

La técnica rep-PCR se basa en la utilización de cebadores complementarios a fragmentos de regiones que aparecen repetidas en el genoma bacteriano, como son los elementos REP (35-40 pb), ERIC (124-127 pb) y BOX (154 pb). Mediante esta técnica podemos determinar la diversidad que existe entre un grupo de microorganismos determinados.

En la bibliografía, dependiendo de los cebadores utilizados, se pueden encontrar los siguientes nombres: REP-PCR (PCR sobre elementos palindrómicos extragénicos reiterativos), ERIC-PCR (PCR sobre elementos consenso intergénicos reiterativos de enterobacterias) y BOX-PCR (PCR sobre elementos box), pero la técnica en conjunto recibe el nombre genérico de rep-PCR.

Los perfiles obtenidos tras someter los productos de la rep-PCR a una electroforesis en gel de agarosa permiten distinguir cepas y deducir sus relaciones filogenéticas (Versalovic, *et al.* 1991 y 1994; De Bruijn, 1992; Schneider y De Bruijn, 1996; Chen *et al.*, 2000).

## **1.7. ESTRÉS AMBIENTAL Y MICROORGANISMOS**

Todos los organismos vivos se encuentran expuestos a cambios de los factores biológicos, químicos y físicos que definen su hábitat y, para su supervivencia, deben ser capaces de detectar dichos cambios y de reaccionar utilizando diversos mecanismos de adaptación. La presión osmótica del medio es uno de los parámetros físicos que determinan la capacidad de los organismos para proliferar en un determinado ambiente. Los cambios en la osmolaridad del medio no son relevantes únicamente para los organismos de hábitat salinos sino también para muchos otros seres vivos. Por ejemplo, en el suelo, las precipitaciones seguidas por evaporación del agua pueden causar variaciones drásticas en la osmolaridad.

El término osmoadaptación describe las manifestaciones fisiológicas y genéticas de la adaptación a ambientes con variaciones en la disponibilidad de agua (Galinski, 1995).

Las células vivas han desarrollado dos estrategias principales para mantener la turgencia celular y evitar la pérdida de agua ocasionada por un aumento de osmolaridad del medio. Una de ellas es conocida como “sal en el citoplasma” y consiste en la acumulación de iones inorgánicos, principalmente potasio y cloro, hasta niveles citoplasmáticos semejantes a los extracelulares. La segunda estrategia consiste en la acumulación de

“solutos compatibles”, los cuales se definen como compuestos orgánicos altamente solubles y con un pequeño tamaño molecular, que no interfieren con el metabolismo central, incluso cuando se acumulan en altas concentraciones (Brown, 1976). Estos solutos se sintetizan o captan del medio, acumulándose a elevadas concentraciones, de modo que equilibran la presión osmótica del medio externo manteniendo la turgencia celular, sin interferir en procesos celulares básicos.

En el caso de las leguminosas el efecto de la salinidad es más grave cuando su nutrición nitrogenada depende de la simbiosis (Zhou, *et al.* 1992), ya que, además de la planta, la bacteria es sensible a la salinidad tanto en su forma libre como en el estado simbiótico. Además, la concentración de sal que inhibe la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa puede ser menor que la que inhibe el crecimiento de los simbiontes individualmente, como ocurre en la simbiosis *S. meliloti-Medicago sativa* (Bordeleau y Prévost, 1994).

Existe evidencia de que la tolerancia a sales en los rizobios está gobernada por factores interconectados: la temperatura, el valor de pH, el tipo de sal, la fuente de carbono, la textura del suelo y el genotipo de la cepa en particular (Fujihara y Yoneyama, 1993; Lippi, *et al.* 2000; Faituri, *et al.* 2001). En general, la sensibilidad a estrés salino aumenta a pH alcalino y a valores de temperatura alejados del óptimo para el crecimiento bacteriano (Correa y Barneix, 1997).

Además, existen mecanismos de adaptación al estrés; por ejemplo, en varias especies de rizobios, la exposición previa a un medio de acidez moderada le permite a la bacteria sobrevivir mejor a niveles mayores de acidez que aquellas células que no recibieron el pretratamiento. Como respuesta a cambios en el pH del medio de crecimiento se han encontrado cambios en el perfil de proteínas totales, proteínas de membrana externa y composición de fosfolípidos y ácidos grasos de membrana citoplasmática (Aranda Ricket, *et al.* 2000). Asimismo, en algunos rizobios se ha podido determinar la existencia de una respuesta adaptativa al pH y su dependencia de la síntesis proteica (Correa, *et al.* 1999).

Entre los efectos de la alta concentración salina sobre la simbiosis se puede destacar la disminución del número de rizobios que colonizan la raíz (Tu, 1981), la inhibición de las primeras etapas del proceso de infección (Zahran y Sprent, 1986), la reducción de la actividad nitrogenasa (Baker, *et al.* 1995; Shamseldin y Werner, 2005), la disminución del peso y número de nódulos (Elsheikh y Wood, 1990; Cordovilla, *et al.* 1994) y la afectación de las paredes celulares y la membrana peribacteroidal (Bolaños, *et al.* 2003).

## 2.

### 2.1 HIPÓTESIS

El hallazgo de cepas nativas específicas de *Rhynchosia* adaptadas a la región semiárida, es una alternativa para el mejoramiento del proceso de fijación de nitrógeno a partir de este par simbiote, como una contribución para la preservación del agroecosistema.

### 2.2 OBJETIVOS

El proyecto en el cual se enmarca este plan de trabajo tiene como objetivo general proporcionar bases de conocimiento acerca de estrategias de intervención tendientes a incrementar y/o mantener la sustentabilidad en la región semiárida pampeana.

Los objetivos específicos de este trabajo de tesina fueron:

- Colectar ejemplares de la leguminosa nativa perteneciente al género *Rhynchosia*.
- Evaluar la potencialidad de *Rhynchosia* como especie forrajera.
- Obtener aislamientos de microorganismos nativos a partir de nódulos de esta leguminosa.
- Caracterizar los aislamientos obtenidos.
- Evaluar su capacidad para nodular la leguminosa *Rhynchosia*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 REGIONES DE COLECTA DE LOS EJEMPLARES DE LA LEGUMINOSA NATIVA PERTENECIENTE AL GÉNERO *Rhynchosia***

Para el desarrollo de este trabajo se colectaron leguminosas herbáceas autóctonas del género *Rhynchosia*, en diferentes localidades de la zona semiárida pampeana. En la **Tabla 1** se muestra la localización y altura de cada muestreo.

Localidades La Pampa Argentina	Coordenadas geográficas		Altura msnm
	Latitud	Longitud	
Toay	-36.66934	-64.37872	188
Santa Rosa	-36.62269	-64.28593	179
Rucanelo	-36.15434	-64.50.298	259
Loventuel	-36.14916	-65.20716	268
Ataliva Roca	-37.02877	-64.28208	212
Quehué	-37.12829	-64.50897	255
El triángulo	-36.42773	-64.29149	235

**Tabla 1.** Colecta de ejemplares de la especie *Rhynchosia* en diferentes localidades de la Región Semiárida Pampeana muestreadas.

#### **3.2 CARACTERÍSTICAS EDÁFICAS DE LAS ZONAS DE MUESTREO.**

La caracterización edáfica se realizó determinando la textura y dos de sus macronutrientes (fósforo y nitrógeno).

##### **3.2.1 Determinación de la textura**

Para obtener datos de la textura se utilizó el método de la pipeta de Robinson. Su principio está basado en la ley de Stokes, es decir en la diferencia de velocidades de sedimentación de las partículas con distinto diámetro. Para realizarlo se pesaron 20g de suelo seco al aire y tamizado por tamiz de 2 mm. Se colocaron en un vaso de precipitado y se agregó 25 ml de ácido acético al 5% con el fin de destruir el material calcáreo. Se dejaron durante 24 hs y se evaporó por calentamiento suave sobre mechero Bunsen. Luego



se agregaron 50 ml de agua oxigenada 100 % v/v. para destruir la materia orgánica y gotas de alcohol amílico para anular la producción de espuma que se produce con el agregado de agua oxigenada. Posteriormente se dejó evaporar en mechero Bunsen en forma suave. El siguiente paso consistió en centrifugar para eliminar los electrolitos presentes y favorecer la dispersión de la muestra, para ello se agregó a la muestra hexametáfosfato de sodio al 1% como dispersante. Una vez pasada la centrifugación se trasvasó la muestra a una probeta de 1 litro y se enrazó con agua destilada. El contenido de la probeta se agitó invirtiéndola 20 veces y posteriormente se determinó la temperatura de la misma. En base a este dato, y utilizando la ecuación de Stokes, se estableció la profundidad y el tiempo que debió transcurrir para realizar la extracción por un pipeteado de volumen de muestra determinado.

Ecuación de Stokes:

$$v = k \times r^2$$

Donde: v: velocidad

k: constante que depende de la temperatura

r: radio de la partícula que queremos muestrear. En un primer momento se fija un radio de 50 µm que corresponde a la fracción limo+arcilla, luego se vuelve a calcular fijando un radio de 2 µm que corresponde a la fracción arcilla.

También se utilizó la ecuación de velocidad ( $v=\text{distancia}/\text{tiempo}$ ), se fijó la distancia a la cual se tomó la muestra en la probeta y se calculó el tiempo al cual se pipeteó para obtener las partículas con el radio fijado o menor. El volumen correspondiente a cada extracción se colocó en un pesafiltro previamente tarado y se llevó a 105-110 °C hasta peso constante. Se pesó cada una de las fracciones por separado.

Cálculos:

- **Arcilla (A) + Limo (L) (< 50 µm)**

$$A + L = \frac{(T - M) \times 100 \times 1000}{25 \times 20}$$

Donde: T: tara del pesafiltro

M: pesafiltro + A + L

- **Arcilla (A) (< 2 µm)**

$$A = \frac{(T - M) \times 100 \times 1000}{25 \times 20}$$

Donde: T: tara del pesafiltro

M: pesafiltro + A

- **Limo (L) (entre 2 y 50  $\mu\text{m}$ )**

$$L = (A+L) - A$$

- **Arena (S) (entre 50 y 2000  $\mu\text{m}$ )**

$$S = 100 - (A + L)$$

### 3.2.2 Determinación de Nitrógeno

La determinación de nitrógeno se realizó por el método Kjeldahl (AOAC, 1990). Para ello se colocan 0,5g de suelo seco al aire y tamizado por un tamiz de 2 mm en el balón Kjeldahl seco, se agregaron 5 gotas de agua destilada y se dejó reposar. Luego se agregaron 1,1g de la mezcla de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y catalizadores (Hg y Cu) con 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se calentó en balón en el digestor hasta oxidación completa de la materia orgánica. Se dejó enfriar y se agregó aproximadamente 40 ml de agua destilada para disolver cualquier residuo que hubiera quedado. Luego se decantó la suspensión a otro frasco dejando en el balón original las arenas. Se adicionaron 10 ml de la mezcla de ácido bórico e indicadores en un Erlenmeyer y se lo colocó debajo del condensador del aparato de destilación. Luego se agregó 20 ml de NaOH 10N al frasco de destilación y se destiló el digesto hasta un volumen de 50 ml aproximadamente, momento a partir del cual se determinó N por titulación con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . El viraje de color al punto final de la titulación es de verde a rosado.

#### Cálculos

ml HCl  $\times$  N HCl = meq de  $\text{NH}_3\text{-N}$  en el digesto

meq de N  $\times$  0.014= gramos de nitrógeno contenidos en 0.1 g de muestra.

Al referir esa cantidad a 100 g de muestra obtendremos el porcentaje de nitrógeno total.

### 3.2.3 Determinación de fósforo

La determinación del contenido de fósforo asimilable en los suelos fue por el método "Bray-Kurtz N° 1" (1945). Para ello se pesaron 2,5 g de suelo seco tamizado por tamiz de 0,5 mm y se colocaron en un Erlenmeyer agregándole 20 ml de solución

extractiva. Se agitó durante 5 minutos, se filtró y se tomó una alícuota de 5 ml que fue colocada en un matraz de 50 ml para la determinación colorimétrica. Posteriormente, se agregó al matraz 8 ml de reactivo mezcla y se completó con agua destilada hasta enrasar. Se agitó manualmente y se dejó en reposo durante media hora.

---

<b>Solución extractiva</b>	
NH <sub>4</sub> F	1,11g
H <sub>2</sub> O destilada: hasta un volumen final de 1 litro	

---

---

<b>Solución mezcla</b>	
<b>Reactivo A</b>	
Molibdato de amonio y potasio	0,6g
Tartrato de amonio y potasio	0,1454g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500ml
H <sub>2</sub> O destilada: hasta un volumen final de 1 litro	
Ácido ascórbico	1,056 g / 200ml de reactivo A

---

La lectura se realizó a 880 nm. Previamente se obtuvo una curva patrón de fósforo, con soluciones patrón de concentración conocida, donde luego se extrapolaron las absorbancias obtenidas para las muestras. El resultado final se expreso en ppm de P.

### **3.3 – EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FORRAJERA DE LA ESPECIE**

#### **Rhynchosisia**

##### **3.3.1 Determinación de biomasa total y aérea**

Se determinó por pesada directa tanto de la planta completa como de la parte aérea obtenida luego de separar la raíz.

##### **3.3.2 Determinación del peso seco de la parte aérea**

La parte aérea de la planta, una vez separada de la raíz, se guardó en un sobre de papel madera y se colocó en una estufa a 60°C, hasta que alcanzó peso constante.

### 3.3.3 Fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA)

La determinación de fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) se realizó mediante el método secuencial de Goering y Van Soest (1970).

Para la determinación de la Fibra Detergente Neutra (FDN) se pesaron 0,5g de la muestra molida y secada a 65°C directamente en la bolsa de filtro, la cual fue sellada por calor cerca del borde, cuidando que el lado interno de las mismas esté bien limpio para garantizar el sellado, para luego distribuir la muestra uniformemente dentro de las bolsas. Para procesar las 24 bolsas se agregaron 2000 ml de solución de Detergente Neutro (SDN) dentro del vaso de digestión. Se agregaron 4 ml de la  $\alpha$ -amilasa termoestable durante la digestión y se calentó hasta 90-100°C dentro del vaso digestor antes de colocar las muestras. Una vez hecho esto y que la solución esté caliente, se colocaron las muestras en una gradilla dentro del vaso digestor. Se dejó digerir durante 60 minutos. Una vez pasado ese tiempo se liberó la solución y se agregó 2000 ml de agua destilada a 70-90°C con 4 ml de amilasa. Con esta solución se agitó durante 3-5 min. Luego se liberó el agua y se repitió el procedimiento cuatro veces en total, siendo solo en los dos primeros que se agregó la  $\alpha$ -amilasa. Posteriormente se sacaron las bolsas del digestor y se sacó el exceso de agua de las mismas presionándolas. Las bolsitas fueron lavadas con acetona por inmersión durante tres minutos y su exceso también fue removido por presión. Las bolsas se dejaron secar a temperatura ambiente para luego completar el secado a 105°C durante 4 horas. Finalmente se dejaron enfriar en desecador para luego pesarlas.

La preparación de la muestra para determinar Fibra Detergente Ácida (FDA) es la misma que para la determinación de FDN. En éste caso, para procesar las 24 bolsas se agregaron 2000 ml de Solución de Detergente Ácida (SDA) dentro del vaso de digestión. Se calentó esta solución hasta 90-100°C dentro del vaso digestor. Una vez hecho esto se colocaron las muestras en una gradilla dentro del vaso digestor. Se dejó digerir durante 60 minutos. Finalizado este tiempo se extrajo la SDA y se agregó 2000 ml de agua destilada a 70-90°C y se agitó por 5 minutos. Luego se liberó el agua y se repitió el procedimiento hasta obtener pH neutro en el agua de lavado descartada. Se sacaron las bolsas del digestor y se eliminó el exceso de agua presionando con los dedos. Las bolsitas se lavaron con acetona por inmersión durante tres minutos y luego se dejaron secar a temperatura ambiente, completando el secado a 105°C durante 4 horas. Luego de enfriar en desecador se pesaron.

Cálculos:

$$\text{FDN (\% bs)} = 100 \times \{(\text{T+FDN}) - \text{T1}\} / (\text{MH1} \times \text{MS105})\}$$

$$\text{FDA (\% bs)} = 100 \times \{(\text{T1+FDA}) - \text{T1}\} / (\text{MH1} \times \text{MS105})\}$$

Donde:

%bs: Porcentaje sobre base seca.

MH1 (g): peso de la muestra.

MS105 (g/g): coeficiente de materia seca a 105°C.

T+FDN (g): peso final de la bolsa con la fibra.

T1 (g): Peso de la bolsa vacía.

<b>Solución de detergente neutro (SDN)</b>	
lauril sulfato de sodio (SDS),	30,0 g/l
EDTA-sodio dihidratado;	18.61 g/l
tetraborato de sodio decahidratado;	6,81 g/l
fosfato dibásico de sodio anhidro;	4,56 g/l
trietilenglicol,	10 ml/l
Ajustar el rango de pH entre 6,9 y 7,1	

<b>Solución de Detergente Ácido (SDA)</b>	
bromuro de cetil trimetilamonio	20 g/l
ácido sulfúrico concentrado.	27,7 ml/l

### 3.3.4 Digestibilidad de materia seca (DMS) y energía metabolizable (EM)

Ambos parámetros se calculan mediante ecuaciones matemáticas las cuales se detallan a continuación:

$$\text{DMS} = 88,9 \times (0,779 \times \% \text{FDA})$$

$$\text{EM} = 3,6 \times \text{DMS}$$

### 3.3.5 Proteína bruta

La determinación se realizó por el método Kjeldahl (AOAC, 1990). Para ello se peso 0.1 g de muestra de parte aérea molida sobre papel y se agregó 1.25 g de catalizador, posteriormente se agregó el ácido sulfúrico y se dejaron digestar las muestras durante una hora. Luego se realizó la destilación y titulación en equipo automático Tecator Kjeltex Auto 1030 Analyzer, utilizando ácido bórico y HCl 0.09952 N. La determinación del porcentaje de nitrógeno y el porcentaje de proteína se calcula a través de las siguientes ecuaciones:

$$M \times N = \text{meq de N}$$

$$\text{Meq de N} \times 0.014 = G$$

Donde:

M: ml de HCl gastados en la valoración.

N: normalidad del HCl.

G: g de nitrógeno contenidos en 0.1 g de muestra.

Al referir esa cantidad a 100 g de muestra obtendremos el porcentaje de nitrógeno total, al cual se lo multiplicó por factor 6.25, para expresar el valor en proteína bruta.

### 3.4 - MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

<b>Medio Nutritivo</b>	
Peptona de carne	5g/L
Extracto de carne	3g/L

<b>Medio TY</b>	
Triptona	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,87 g/l
Agar	15 g/l
pH (ajustar con NaOH 1N)	6,8 - 7,2

Para los ensayos de estrés osmótico y de pH se trabajó con medio TY al cual se le realizaron modificaciones. Para el caso de la determinación de estrés por pH se llevó a pH 6 con HCL 1N, y a pH 7, 8 y 9 con NaOH 1N. En condiciones de estrés osmótico al medio de cultivo detallado en el cuadro anterior se le dieron diferentes condiciones de salinidad (50mM, 100mM y 200mM) con NaCl.

### **3.5 - AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL NÓDULO**

Para la obtención de microorganismos endófitos de nódulos se comenzó con una esterilización superficial (Sakiyama, *et al.* 2001) de los mismos. El proceso consistió en dos lavados en agua destilada estéril; luego agitación durante 15 minutos en solución tampón fosfato de potasio 0.05M a pH 7 e inmersión por 1 minuto en alcohol al 70%. Posteriormente se realizó una agitación por 5 minutos en hipoclorito de sodio 5% y Tween 80; una inmersión por 1 minuto en alcohol al 70% y nuevamente agitación durante 15 minutos en solución tampón fosfato de potasio 0.05M a pH 7. Finalmente se realizaron cuatro lavados en agua destilada estéril.

A modo de controlar la correcta esterilización, se sembraron 100 µl de la última agua de lavado en una placa de Petri con agar nutritivo y se incubaron durante 72 horas. Una vez realizado esto, para el aislamiento de microorganismos se procedió de 2 maneras diferentes, según el tamaño de nódulo. Aquellos cuyo tamaño permitía tomarlos con una pinza, se los cortó con un bisturí y se estiraron directamente sobre una placa de Petri con medio de cultivo TY sólido. Los de menor tamaño se colocaron sobre una gota de agua estéril y se maceró con una varilla de vidrio, luego se estiró en una placa de Petri con medio de cultivo TY sólido con un anillo esterilizado en la llama del mechero.

### **3.6 - DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO**

Los diferentes aislamientos se inocularon en Erlenmeyer con medio de cultivo TY líquido, se cultivaron a 28°C, con 200 rpm de agitación, hasta alcanzar una absorbancia de 2 a una longitud de onda de 600nm. Luego de realizar una observación al microscopio se reinocularon en tubos de ensayo con 5 ml medio TY líquido. Para cada aislamiento se realizaron duplicados de todas las condiciones de pH y concentración de sales tratadas.

El crecimiento celular se midió en base a determinaciones de Densidad Óptica a una longitud de onda de 550 nm, utilizando un espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Visible de simple haz. Las mediciones se realizaron utilizando celdas de vidrio, usando como blanco el medio de cultivo donde se desarrollaron los aislamientos. La densidad óptica se expresó como Unidades de Densidad Óptica (U.D.O.).

Los parámetros cinéticos que se calcularon son: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de generación (Tg), de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$\mu = \ln (x/x_0)/t$$

$$Tg = \ln 2/\mu$$

Donde:

x: concentración final de células (expresada como n° de células viables/ml).

x<sub>0</sub>: concentración inicial de células (expresada como n° de células viables/ml).

t: intervalo de tiempo considerado.

### **3.7 - TINCIÓN GRAM**

Se colocó en un portaobjetos de vidrio una gota de cultivo bacteriano crecido en medio de cultivo TY líquido y se fijó al portaobjetos a la llama. Luego se tiñó con una solución con cristal violeta (solución 1) por 1 minuto. Pasado este tiempo se lavó con agua y se aplicó una solución de yodo (solución 2) por 1 minuto. A continuación se decoloró (solución 3) durante 30 segundos, para luego volver a teñir con una solución con safranina (solución 4). Por último se lavó con agua y se dejó secar al aire. La observación se realizó con un microscopio óptico, con aceite de inmersión.

<b>SOLUCIÓN 1</b>	
Cristal Violeta	10 g
Oxalato de Amonio	4 g
Etanol	100 ml
Agua destilada	400 ml

<b>SOLUCIÓN 2</b>	
Iodo	1 g
Ioduro de Potasio	2 g
Etanol	25 ml
Agua destilada	100 ml



<b>SOLUCIÓN 3</b>	
Etanol	5 ml
Agua destilada	95 ml

<b>SOLUCIÓN 4</b>	
2,5% de Safranina en Etanol	10 ml
Agua destilada	100

### **3.8 - DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)**

#### **- Procesamiento de los cultivos bacterianos**

Para la determinación de lipopolisacáridos (LPS) se procedió al tratamiento alcalino en ebullición según la técnica descrita por Hitchcock y Brown (1983).

Se partió de un cultivo bacteriano líquido, del cual se tomó 2 mililitros y se centrifugaron descartando el sobrenadante.

Los pellets se resuspendieron en 10 ml de NaCl 0.5M y se agitaron en vórtex durante 60 segundos, luego se centrifugaron 15 minutos a 14000 rpm a 4°C. Esta centrifugación fue realizada en centrífuga refrigerada Hitachi Himac CR22G. Se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó en 2 ml de NaCl 0.5M y se resuspendió en 50 µl de buffer de lisis y se calentó por 10 minutos en baño a 100°C. Posteriormente se agregaron 10 µl de Proteinasa K, se incubó una hora en baño a 60° C, y se realizó una nueva centrifugación por 15 minutos a velocidad máxima. Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se agregaron 100 µl de buffer muestra. Todas las muestras procesadas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la siembra en el gel.

<b>Buffer Lisis</b>
1M Tris HCl (Tris; pH: 6,8)
2% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)
4% β-mercaptoetanol
10% Glicerol
0,005% BPB (Azul de Bromofenol)

---

**Proteinasa K**

---

2,5 mg/ml buffer lisis

---

---

**Buffer Muestra**

---

120 mM Tris HCl (pH: 6,8)

3% SDS

9%  $\beta$ -mercaptoetanol

30% Glicerol

0,03% BPB (Azul de Bromofenol)

---

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida para LPS**

Para obtener los perfiles de LPS se realizaron geles de poliacrilamida al 20% (SDS-PAGE) siguiendo la metodología descrita por Laemmli, 1970. Se prepararon los geles como se indica en las tablas 5 y 6, y en cada calle se sembraron 15  $\mu$ l de cada muestra de LPS. Las condiciones de corrida fueron de 30 mA constantes, hasta que el frente de corrida se observó al final del gel.

---

**Gel Separador (T: 16,5%; C: 6%)**

---

Agua MilliQ	2,3 ml
Buffer del gel	3,32 ml
Glicerol	1,04 ml
Stock acril/bis	3,32 ml
APS 10%	40 $\mu$ l
TEMED 10%	40 $\mu$ l
Volumen total	10 ml

---

---

**Gel Concentrador (T: 4%; C: 3%)**

---

Agua MilliQ	4,2 ml
Buffer del gel	1,5 ml
Stock acril/bis	0,5 ml
APS 10%	150 $\mu$ l
TEMED 10%	7,5 $\mu$ l
Volumen total	6,36 ml

---

<b>Buffer del gel</b>	
3M Tris	36,342 g
0,3% SDS	0,3 g
Volumen final	100 ml
pH	8,5

<b>Stock acril/bis</b>	
Acrilamida	93 g
Bis-Acrilamida	6 g
Volumen final	200 ml

<b>APS (Persulfato de Amonio)</b>	
APS	150 mg
Agua MilliQ	1,5 ml

<b>Buffer Ánodo</b>	
0,2M Tris base	12,11 g
Volumen final	500 ml
pH	8,95

<b>Buffer Cátodo</b>	
0,1M Tris	6,06 g
0,1M Tricina	8,96 g
0,1% SDS	0,5 g
Volumen final	500 ml
pH	8,25

Los geles se dejaron toda la noche en solución fijadora. Al día siguiente se colocaron en la solución oxidante durante 5 minutos; después se realizaron tres lavados con agua milli Q cada 15 minutos con agitación; seguidamente se le añadió la solución de tinción; se dejó en esa solución por 10 minutos, posteriormente se realizaron tres lavados con agua milli Q cada 10 minutos y se colocó el gel en la solución reveladora hasta que las bandas alcanzaron la intensidad deseada. Se detuvo la reacción con la solución stop.

<b>Solución Fijadora</b>	
Etanol absoluto 40%	
Ácido acético 5%	

---

**Solución Oxidante**

---

Peryodato de sodio 14 mM

Ácido acético 5%

Etanol absoluto 40%

---

---

**Solución de tinción**

---

NaOH 0,1N 28 ml

NH<sub>3</sub> 2 ml

AgNO<sub>3</sub> 1 g

Vol. final en H<sub>2</sub>O milliQ 150 ml

---

---

**Solución Reveladora**

---

Ácido cítrico 0,010 g

Formaldehido 37% 100 µl

Vol. final en H<sub>2</sub>O milliQ 200 ml

---

---

**Solución stop**

---

Etanol absoluto 40%

Ácido acético 5%

---

### **3.9 - FINGERPRINTING GENÓMICO POR BOX – PCR**

Para la caracterización genética de los aislamientos por BOX-PCR se procedió según Versalovic, *et al.* (1994). Para la reacción de PCR se utilizaron colonias aisladas en placas. Se tomaron entre una y dos colonias por cepa y se suspendieron en un microtubo de 1.5 ml conteniendo agua milliQ estéril. Las suspensiones fueron centrifugadas y lavadas con solución de NaCl 1 M dos veces. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en agua milliQ estéril y almacenados a -20°C. Se utilizó 1µl de suspensión para la reacción de PCR en microtubos con 24 µl de solución *master mix*. Las condiciones de reacción programadas en el termociclador fueron las siguientes:

- Ciclos de reacción: 30 ciclos
- Desnaturalización: 94 °C; 1 minuto
- Annealing: 52 °C; 1 minuto
- Extensión: 65 °C; 8 minutos

<b>Master Mix (x1)</b>	
Buffer Gitschier base 5x	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2,5 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	9,75 µl
DMSO 100%	2,5 µl
Glicerol 100%	1,25 µl
Primer BOXA1R 50 µM	1,25 µl
dNTPs 25 mM c/u	1,25 µl
Taq DNA pol 5U/µl	0,5 µl

Para la reacción de PCR se utilizó el cebador BOXA1R el cual presenta la secuencia nucleotídica 5'-CTACggCAAggCgACgCTgACg-3' (Versalovic, *et al.* 1994).

Los productos de la reacción PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1.5% en buffer TBE 1x. La preparación de las muestras a separar se realizó sobre material *Parafilm*, en el cual se colocaron en forma de gotas 2 µl de solución *loading buffer* (composición: 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xylene cyanol FF and 15 % Ficoll 400) a cada cual se le agregó 6 µl de producto de reacción de PCR. El mismo procedimiento se llevó a cabo en la preparación de controles positivos y marcadores de peso molecular.

La electroforesis se realizó con una fuente de voltaje constante de 70 V y 20-25 mA. El tiempo de corrida fue de 3 horas.

El revelado del gel se realizó con SYBR Safe y por exposición del gel al UV en ambiente cerrado con cámara de video incorporada. El análisis de los *fingerprints* se realizó por medio del software GelCompar II v. 6.5 (Applied Maths NV), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y UPGMA.

### **3.10 CAPACIDAD SIMBIÓTICA**

Para evaluar la capacidad simbiótica se realizó un ensayo de plantas en invernadero. Se utilizaron tubos plásticos de aproximadamente 25 cm de largo por 5 cm de diámetro; previamente a su utilización dichos tubos se lavaron con agua y lavandina al 5 % y luego se enjuagaron con agua estéril. Para el armado de cada una de las macetas se utilizó una bandeja de plástico color transparente, un cuadrado de tela de tul que cubre la

base del tubo, la cual se sujetó mediante una goma elástica. Los tubos se rotularon para su identificación con adhesivos. El soporte utilizado fue suelo-vermiculita en proporción 2:1, previamente esterilizado en autoclave durante 3 ciclos de 1 hora cada uno.

Se hicieron germinar previamente semillas de *Rhynchosia*. Una vez hecho esto se colocaron en las macetas y fueron inoculadas con 1 ml de cultivo puro de cada aislamiento.

Las plantas fueron regadas con agua de lluvia estéril a modo de mantener condiciones microbiológicas adecuadas en cada uno de los cultivos desarrollados. Cada uno de los 54 aislamientos fue ensayado por duplicado, lo cual implicó 108 plantas. Se desarrollaron en igual condiciones 10 controles negativos (plántulas sin inocular) y 10 controles inoculados con fertilizante nitrogenado. El ensayo consistió en un total de 128 plantas.

El ensayo se dio por finalizado dos meses luego de haber realizado la inoculación, en concordancia con lo indicado por Doignon-Bourcier, *et al.* (1999) para ensayos con esta misma leguminosa. Se cosecharon las plantas, se lavaron las raíces y se evaluó la presencia de nódulos.

### **3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para comparar la diferencia entre las medias en los diferentes ensayos, se realizó Anova de un factor. El test utilizado fue el de diferencias medias significativas basado en la distribución t de Student (DMS), con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CARACTERÍSTICAS EDÁFICAS DE LA ZONA DE COLECTA DE LOS EJEMPLARES DE LA LEGUMINOSA NATIVA PERTENECIENTE AL GÉNERO *Rhynchosia*

Se tomaron muestras de suelo de la zona de colecta de los ejemplares de la leguminosa en estudio, según se indica en la **Tabla 1** de Materiales y métodos, a fin de determinar las características edáficas. Se realizó la determinación de la textura y los dos macronutrientes principales, fósforo y nitrógeno, en estos suelos. Los resultados obtenidos se indican en la **Tabla 2**.

Localidades	Textura					Nutrientes		
	A + L	A	L	S	Textura	P	N	pH
Toay	18	6	12	82	Arenoso franco	31.9	0.06	7.3
Santa Rosa	37	6	31	63	Franco arenoso	6.2	0.08	8.1
Rucanelo	31	2	29	69	Franco arenoso	11.1	0.09	7.6
Carro Quemado	64	24	40	36	franco	21.7	0.07	8.02
El Durazno	29	4	25	71	Franco arenoso	6.3	0.11	7.54
El triángulo	32	4	28	68	Franco arenoso	3.6	0.05	7.79
El Tropezón	35	3	32	65	Franco arenoso	4.2	0.04	7.98
Jagüel del Monte	4	2	2	96	arenoso	11.0	0.02	8.29

**Tabla 2.** Localidades muestreadas con sus respectivas características edáficas.

A= Arcilla; L= Limo; S = Arena (Sand)

Como se puede observar en los resultados obtenidos, *Rhynchosia* se encontró principalmente en suelos franco arenosos (**Tabla 2**).

Es de destacar los bajos niveles en el contenido de nitrógeno de éstos suelos, lo que remarca la necesidad de establecer estrategias de intervención como para paliar esta

situación. En este sentido, el establecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, resultaría de gran utilidad para incrementar los valores de este importante nutriente y al mismo tiempo evitar el uso de fertilizantes químicos.

Por otra parte, se observa que los valores de pH encontrados en los suelos de colecta tienen una marcada tendencia hacia valores alcalinos. Esta serie de datos sirvieron de base para realizar estudios orientados al análisis del crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones de pH.

#### **4.2 CAPACIDAD FORRAJERA DE LA ESPECIE *Rhynchosia***

Con la finalidad de evaluar el potencial forrajero de la leguminosa en estudio a través de la producción de biomasa y calidad del forraje, se llevaron a cabo diferentes determinaciones, cuyos resultados se indican en la **Tabla 3**.

<b>Población</b>	<b>Biomasa total (g/pl.)</b>	<b>Biomasa aérea (g/pl.)</b>	<b>Peso seco (g/pl.)</b>	<b>Número de tallos por planta</b>	<b>Presencia de nódulos</b>	<b>Fibra detergente neutra (%)</b>	<b>Fibra detergente ácida (%)</b>	<b>Digestibilidad de la materia seca (%)</b>	<b>Energía metabolizable (Kcal)</b>	<b>Proteína bruta (%)</b>
Toay	13,8	7,3	3,0	6,6	Si	59,6	34,5	62,0	2,24	13,6
Santa Rosa	7,7	4,2	2,1	9	Si	63,8	38,9	58,6	2,11	15,0
Rucanelo	<b>19,6</b>	<b>15,5</b>	<b>6,1</b>	11,6	Si	57,6	40,4	57,4	2,07	<b>17,6</b>
El Destino	<b>19,3</b>	<b>12,5</b>	<b>6,5</b>	11,6	Si	44,3	43,7	54,9	1,98	13,5

**Tabla 3:** Determinaciones de diferentes parámetros para evaluar la potencialidad como forrajera de las diferentes poblaciones de *Rhynchosia*. (Los valores representan la media, y los números resaltados en negro indican diferencias significativas a un  $p < 0,05$ ).



Del análisis de los resultados obtenidos, se desprende que la leguminosa *Rhynchosia* es una especie apta para uso forrajero por su distribución espacial, volumen de biomasa y nodulación.

Como se puede observar en los datos de la Tabla 3, los ejemplares colectados en las zonas de Rucanelo y El Destino, poseen mayor producción, reflejado en los valores de biomasa total y aérea, y en los niveles de peso seco. Otro de los valores que mostró diferencia significativa fue el de proteína bruta en el muestreo realizado en Rucanelo, lo que infiere mayor calidad para la leguminosa *Rhynchosia* en esta zona. Sería interesante vincular las diferencias encontradas con alguna característica edafoclimática zonal, considerando que no hay trabajos previos sobre poblaciones de *Rhynchosia* que indiquen diferencias entre estos parámetros y la calidad de la leguminosa.

Los valores encontrados de calidad de forraje son similares a los de otras leguminosas como la alfalfa, que tiene entre 16-20% de proteína bruta y 58-65% de digestibilidad de la materia seca (Juan *et al.*; 1995). En algunos casos se observa una menor DMS, posiblemente debido a la mayor proporción de tallos que son más fibrosos, respecto a hoja

#### **4.3 OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS NATIVOS PROVENIENTES DE NÓDULOS DE *Rhynchosia sp.***

De los ejemplares colectados (**Figura 8**), se extrajeron diferentes nódulos para llevar a cabo el ensayo de aislamiento de microorganismos nativos.



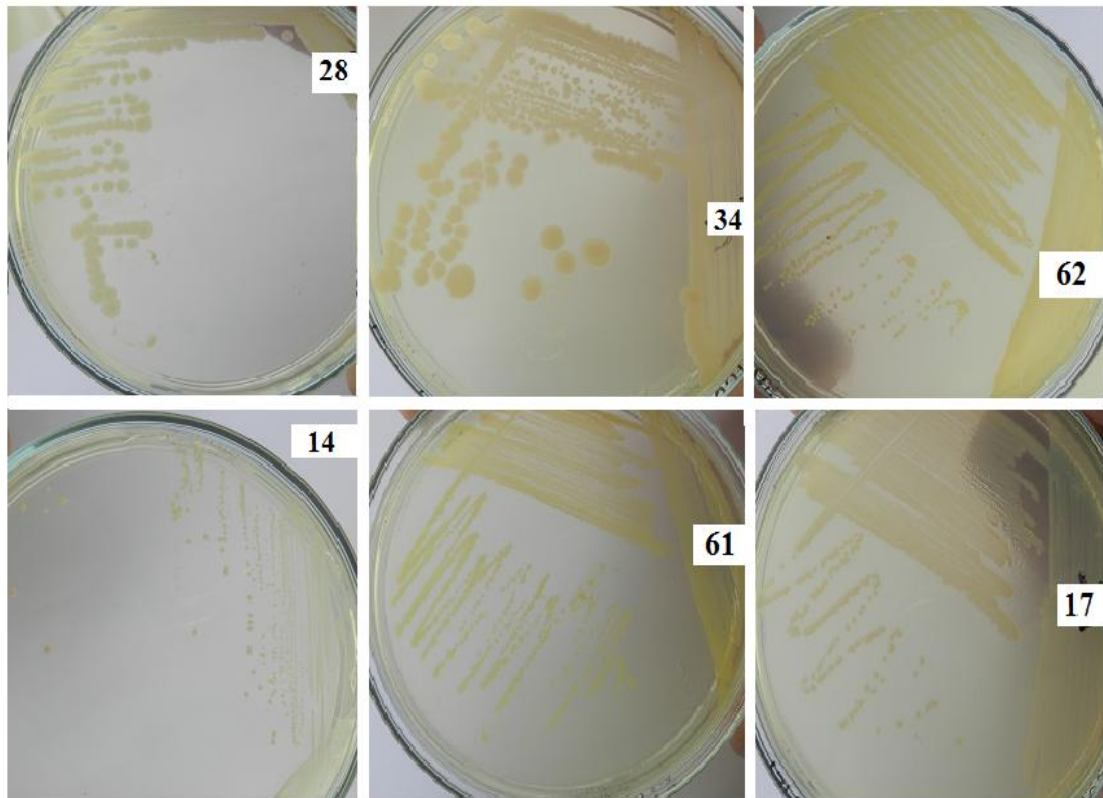
**Figura 8** – Planta de *Rhynchosia sp.*: parte aérea, raíz y nódulos

En la **Figura 9**, se puede observar un corte transversal de uno de los nódulos. El color oscuro del la zona central del mismo, es debido a la presencia de leghemoglobina, lo cual indica actividad enzimática bacteriana dentro del nódulo.



**Figura 9** – Corte transversal de un nódulo de *Rhynchosia sp.*

Con el material obtenido del macerado de los nódulos, se realizaron diversos estriados en medio sólido. Luego del desarrollo de colonias visibles, se realizaron nuevos aislamientos a partir de las mismas, a fin de obtener cultivos puros de cada una de ellas. En la **Figura 10** se pueden observar diferentes placas conteniendo estriados de las mismas.



**Figura 10** – Estriado de diferentes aislamientos en placas de Petri con medio de cultivo sólido TY.

El hecho de que se repicó cada una de las colonias que se desarrollaron a partir del primer estriado del nódulo, llevó a la obtención de poblaciones que no necesariamente se corresponderían al taxón de rizobios. Estos ensayos condujeron a una gran diversidad microbiana endófitas, que debía ser caracterizada. Para ello se realizaron diferentes determinaciones, que se corresponden con la siguiente etapa de este trabajo.

#### **4.4 - CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS**

##### **4.4.1 Morfología, tinción de gram y lipopolisacáridos.**

Con el objetivo de determinar la morfología y tipo de pared celular presentes en los aislamientos obtenidos, se realizó a cada uno, la tinción de GRAM y se observó en

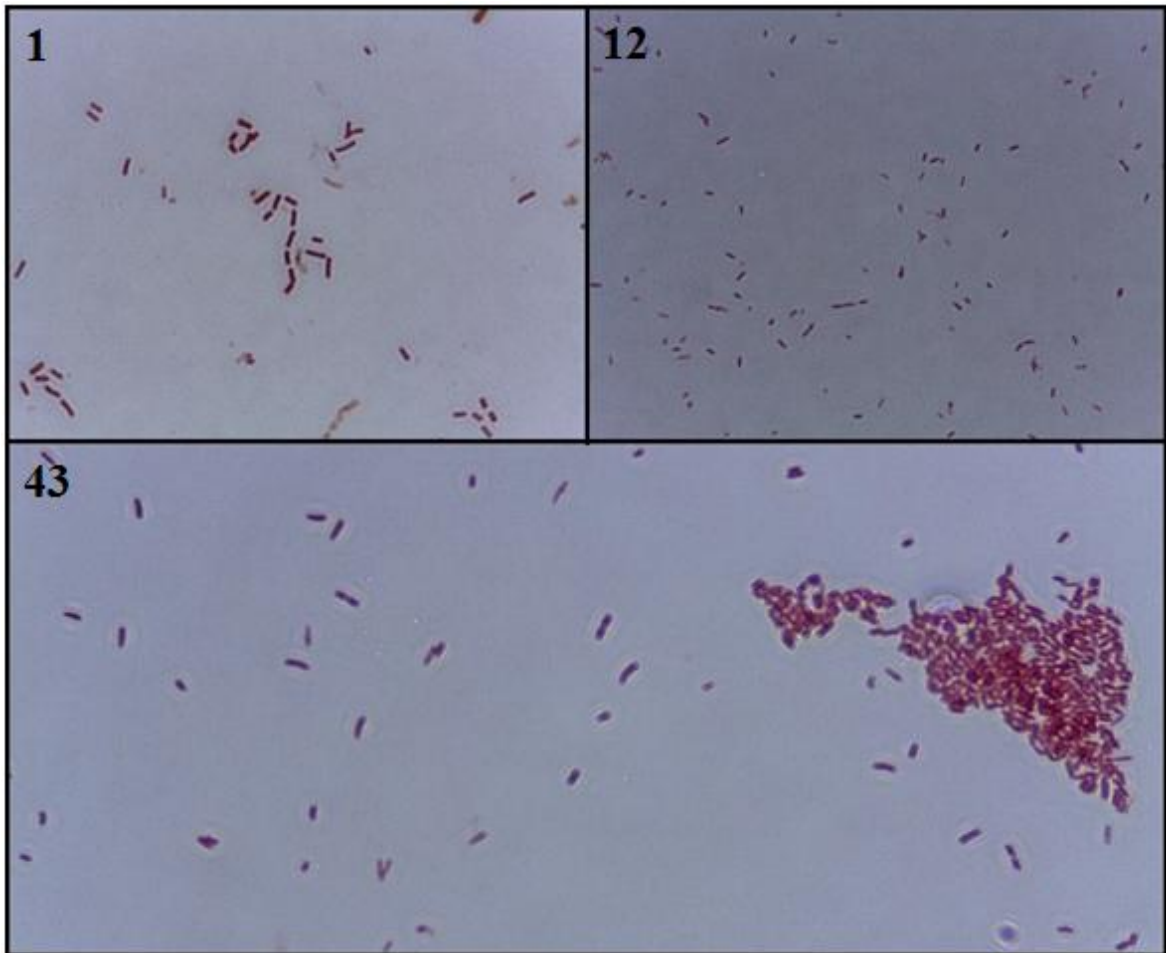
microscopio óptico con objetivo de inmersión 100X. También, para caracterizar la pared celular se determinó la presencia de LPS.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla:

<b>Aisl.</b>	<b>Pared</b>	<b>Morfología</b>	<b>LPS</b>	<b>Aisl.</b>	<b>Pared</b>	<b>Morfología</b>	<b>LPS</b>
1	Gram -	Bacilos	+	32	Gram +	Bacilos	-
2	Gram -	Bacilos	+	33	Gram +	Bacilos	-
3	Gram -	Bacilos	+	34	Gram +	Espiroquetas	-
4	Gram -	Bacilos	+	36	Gram +	Bacilos	-
5	Gram -	Bacilos	+	37	Gram +	Bacilos	-
6	Gram -	Bacilos	+	38	Gram -	Bacilos	+
7	Gram -	Bacilos	+	39	Gram +	Bacilos	-
8	Gram -	Bacilos	+	40	Gram -	Bacilos	+
9	Gram -	Bacilos	+	41	Gram -	Bacilos	+
10	Gram -	Bacilos	+	42	Gram +	Bacilos	-
11	Gram -	Bacilos	+	43	Gram -	Bacilos	+
12	Gram -	Bacilos	+	44	Gram +	Bacilos	-
13	Gram -	Bacilos	+	45	Gram -	Bacilos	+
14	Gram -	Bacilos	+	48	Gram -	Bacilos	+
15	Gram +	Bacilos	-	51	Gram -	Bacilos	+
17	Gram -	Bacilos	+	53	Gram +	Bacilos	-
18	Gram +	Espiroquetas	-	55	Gram +	Bacilos	-
20	Gram +	Bacilos	-	56	Gram +	Bacilos	-
21	Gram +	Bacilos	-	57	Gram +	Bacilos	-
22	Gram +	Bacilos	-	58	Gram -	Bacilos	+
24	Gram +	Bacilos	-	59	Gram +	Bacilos	-
26	Gram +	Bacilos	-	60	Gram -	Bacilos	+
27	Gram +	Bacilos	-	61	Gram -	Bacilos	+
28	Gram -	Bacilos	+	62	Gram -	Bacilos	+
29	Gram +	Espiroquetas	-	63	Gram -	Bacilos	+
30	Gram +	Espiroquetas	-	64	Gram -	Bacilos	+
31	Gram +	Bacilos	-	66	Gram -	Bacilos	+

De los 54 aislamientos analizados se obtuvieron 30 Gram-negativos y 24 Gram-positivos.

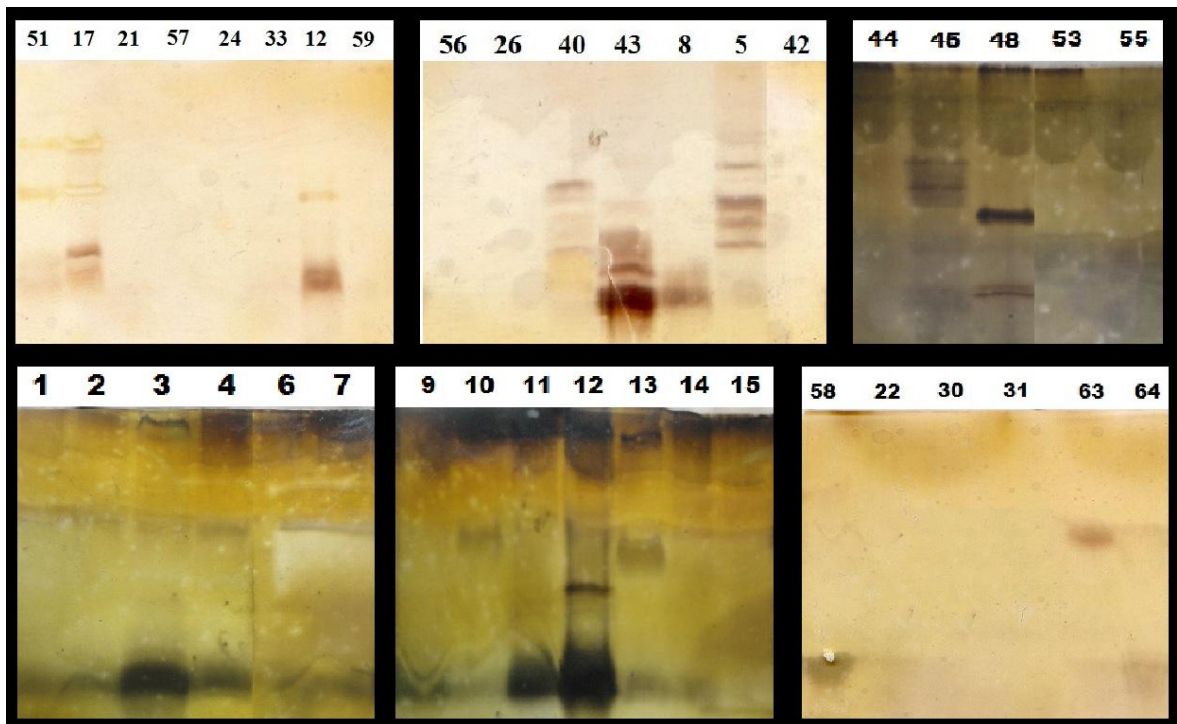
En la **Figura 11** se puede observar imágenes microscópicas de algunos de los aislamientos mencionados.



**Figura 11** – Tinción de Gram de tres de los aislamientos Gram-negativos.

La determinación de perfiles de lipopolisacáridos (LPS) acompañó esta caracterización de la pared celular ya que las bacterias Gram-negativas, debido a su alto contenido de LPS en la pared, son las que presentan un patrón de bandas detectable mediante este ensayo.

En la **Figura 12** se muestran algunos de los geles obtenidos mediante corrida electroforética de estas determinaciones.



**Figura 12:** Perfil de LPS para diferentes aislamientos.

Los perfiles de LPSs muestran diferencias entre las bandas para los distintos aislamientos, si bien entre las cepas 51 y 17 se puede observar una gran similitud, lo que indicaría que se encuentran estrechamente emparentadas. Esta hipótesis fue confirmada en este trabajo mediante ensayos correspondientes a estudios genómicos (**Figura 27**).

Más allá de que estos ensayos sobre la presencia de LPS permiten confirmar diferencias taxonómicas entre los aislamientos obtenidos, existen reportes en la bibliografía que demuestran la importancia de estos polisacáridos en el establecimiento de una exitosa nodulación con la planta (Fraysse, *et al.* 2003; Lepek y Dantuono, 2005).

#### **4.4.2 - Crecimiento celular en condiciones de estrés, tales como pH y osmolaridad.**

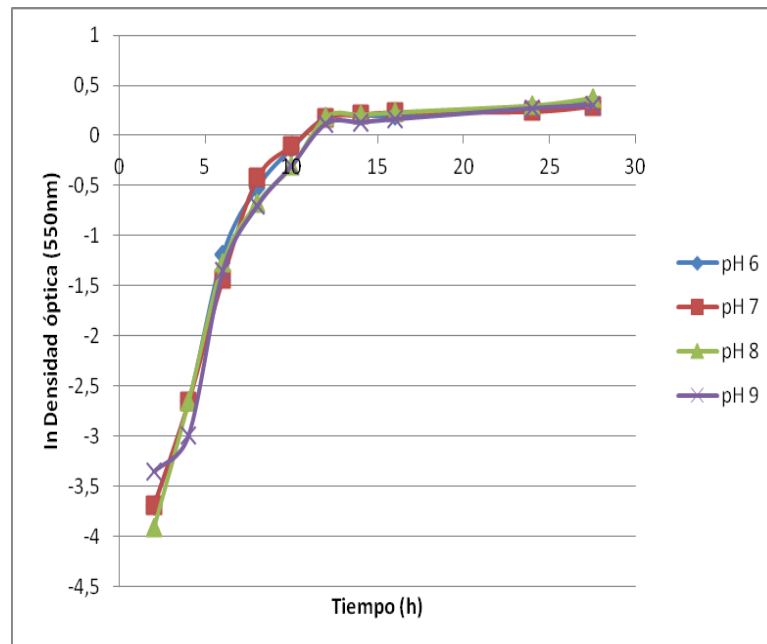
Dado que en las regiones de clima árido o semiárido son comunes los suelos salinos, lo que a su vez trae aparejado un aumento en los valores de pH, en este trabajo se estudió el comportamiento en estas condiciones de las cepas obtenidas. Para ello se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento celular en condiciones estándar y en condiciones de estrés, ya sea por variación en el pH o variando la osmolaridad del medio con NaCl.

En el **Anexo I** se muestran las tablas con cada uno de los resultados obtenidos para los aislamientos, desarrollados en las condiciones estándar de pH y osmolaridad, y en las diferentes condiciones de estrés establecidas. Se indican los valores obtenidos para velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y tiempo de generación (Tg), utilizando en cada caso el promedio de los datos del duplicado.

### **Crecimiento celular en condiciones estándar y en condiciones de estrés por pH.**

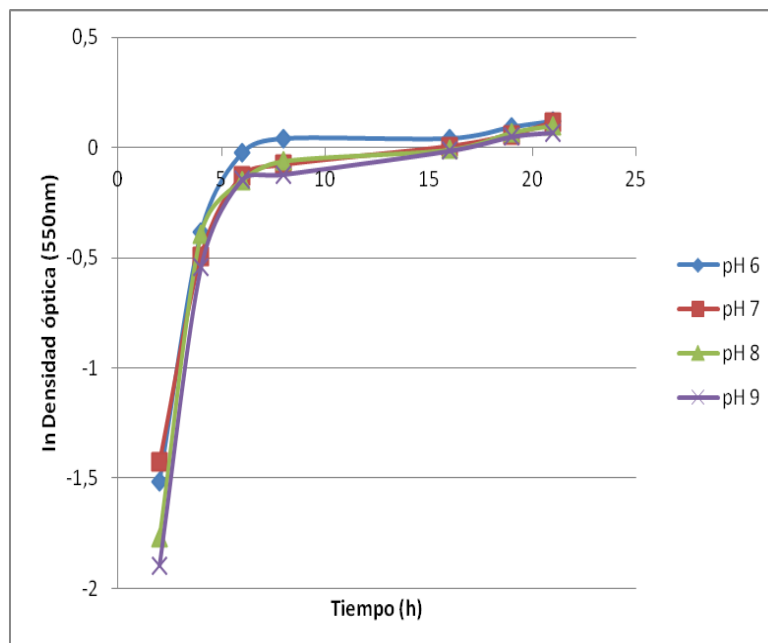
Los resultados que se obtuvieron en esta serie de ensayos mostraron, en líneas generales, diferentes comportamientos que se pueden agrupar de la siguiente manera:

- ✓ **No se vieron afectados por las diferentes condiciones de pH.** Este comportamiento se observó en los aislamientos 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 17, 21, 24, 30, 33, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 51, 53, 55, 56, 57, 60, 61, 62, 63, 64 y 66. Para ilustrar esta conducta en la cinética de crecimiento de las cepas se muestra las **figuras 13 y 14**, para los aislamientos 3 y 42.



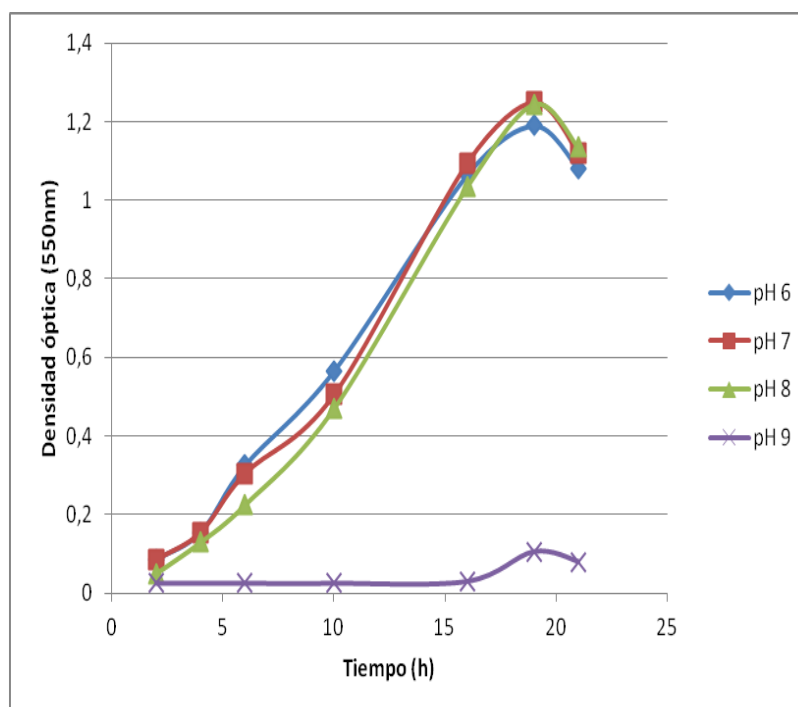
**Figura 13:** Cinética de crecimiento del aislamiento 3, en diferentes condiciones de pH.





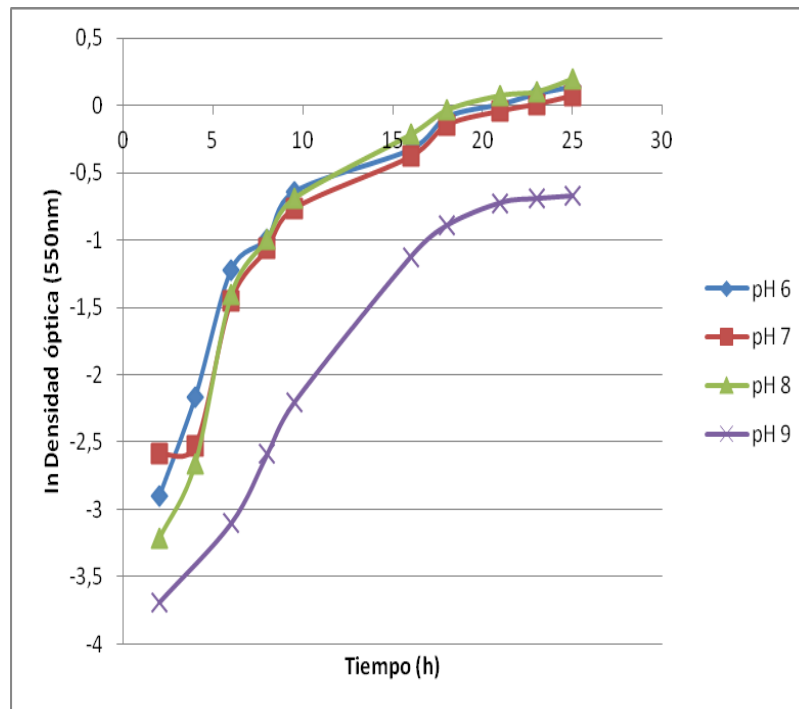
**Figura 14:** Cinética de crecimiento del aislamiento 42, en diferentes condiciones de pH.

- ✓ **Bajo o nulo crecimiento celular a pH 9.** Este comportamiento se observó en los aislamientos 1, 7, 11, 14, 15, 18, 20, 22, 29, 31, 34, 36, 48 y 59. Para ilustrar esta conducta en la cinética de crecimiento de las cepas se muestran las **figuras 15 y 16**, para los aislamientos 14 y 36.



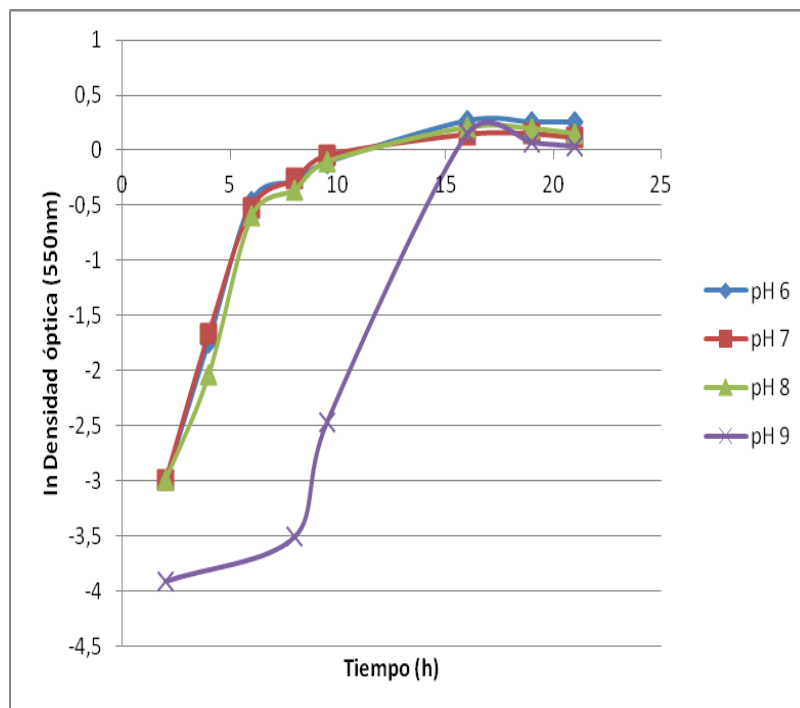
**Figura 15:** Cinética de crecimiento del aislamiento 14, en diferentes condiciones de pH.



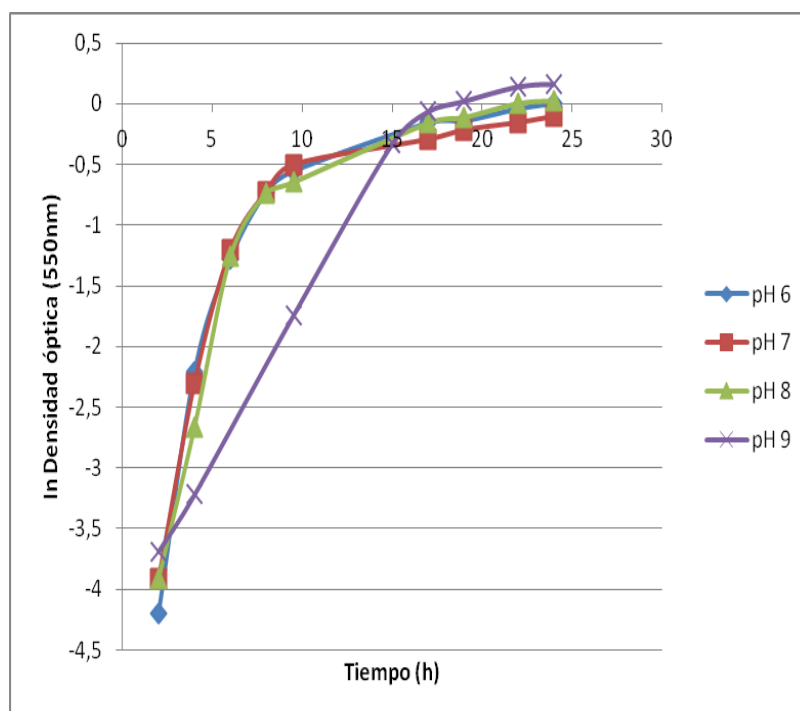


**Figura 16:** Cinética de crecimiento del aislamiento 36, en diferentes condiciones de pH.

- ✓ **Etapa “lag” de adaptación a pH 9.** Estos aislamientos presentaron una notoria etapa lag de adaptación a las condiciones de alcalinidad generadas por la condición de crecimiento a pH 9, luego de la cual la concentración celular llega a equiparar los niveles de las demás condiciones estudiadas. Este comportamiento se observó en los aislamientos 27, 28, 38, y 58. Para ilustrar esta conducta en la cinética de crecimiento de las cepas se muestran las **figuras 17 y 18**, para los aislamientos 27 y 58.



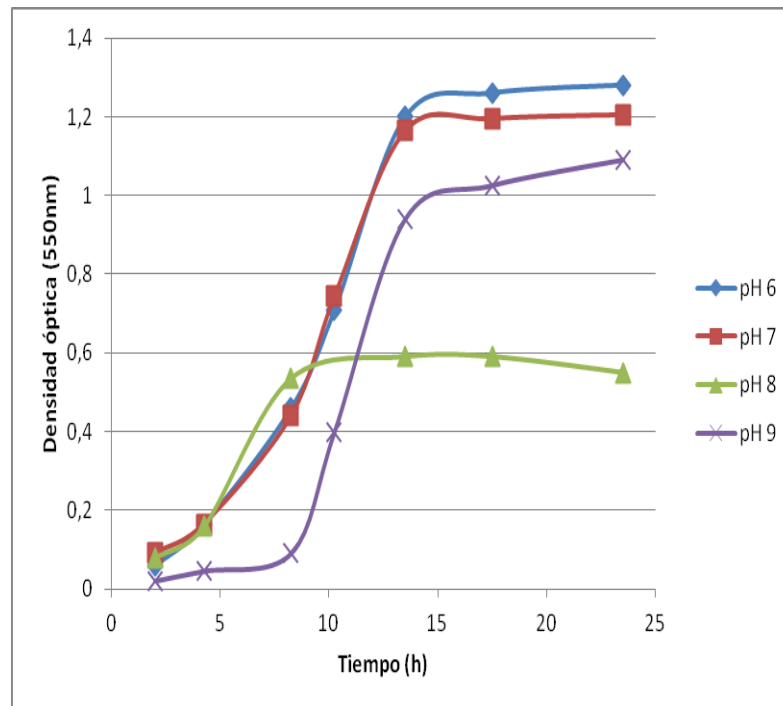
**Figura 17:** Cinética de crecimiento del aislamiento 27, en diferentes condiciones de pH.



**Figura 18:** Cinética de crecimiento del aislamiento 58, en diferentes condiciones de pH.

- ✓ **La cinética de crecimiento y/o la concentración celular se ve afectada por pHs alcalinos.** Las condiciones de alcalinidad utilizadas, pHs 8 y 9, mostraron una incidencia negativa sobre la cinética de crecimiento y/o la concentración celular

alcanzadas. Este comportamiento se observó en los aislamientos 26, 32 y 45. Para ilustrar esta conducta se muestra la **figura 19**, para el aislamiento 45.



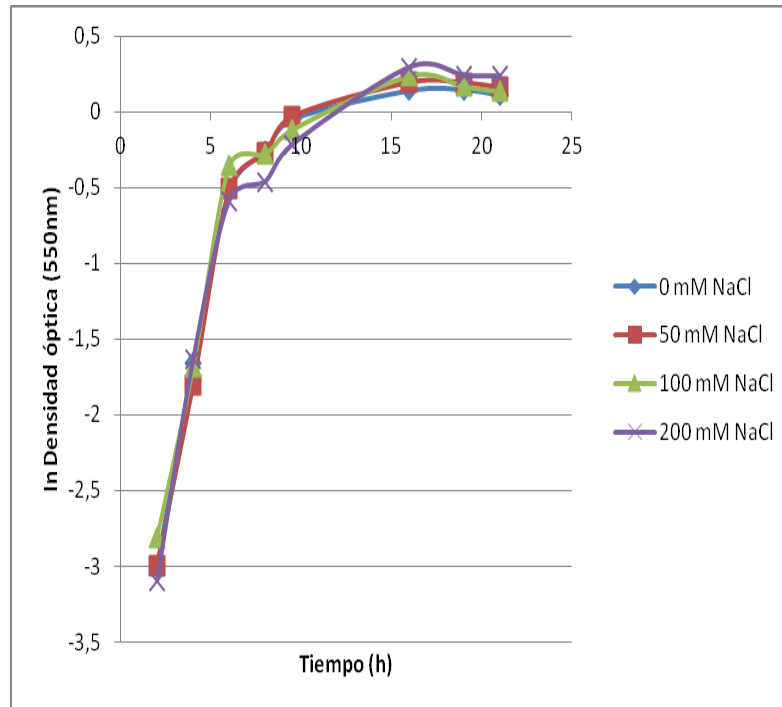
**Figura 19:** Cinética de crecimiento del aislamiento 45, en diferentes condiciones de pH.

En el **Anexo II** se adjunta la totalidad de los gráficos obtenidos para esta serie de ensayos correspondientes al crecimiento celular para cada uno de los aislamientos en condiciones de estrés por pH.

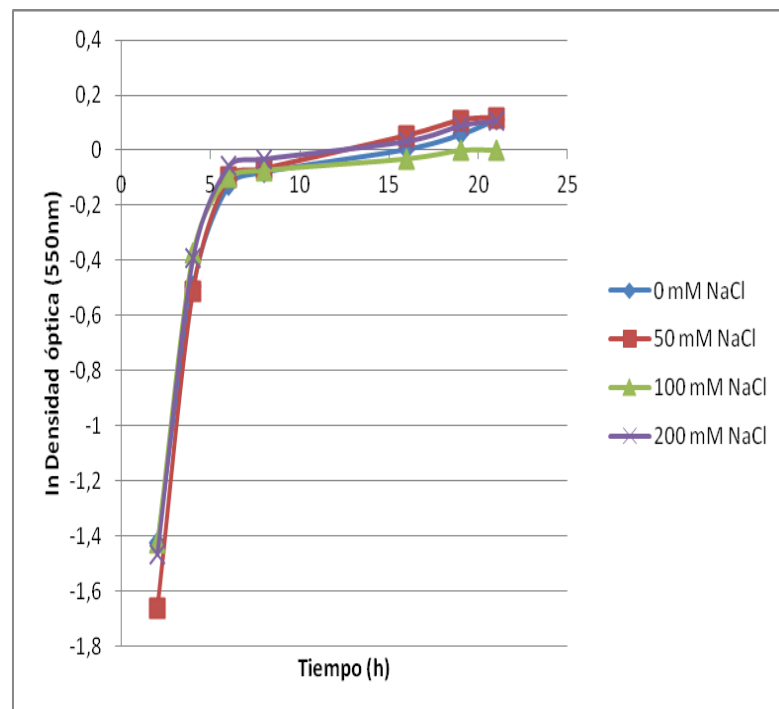
### **Crecimiento celular en condiciones estándar y en condiciones de estrés osmótico, por adición de NaCl.**

En esta serie de ensayos, se obtuvieron diferentes comportamientos que se describen a continuación:

- ✓ **No se vieron afectados por las diferentes condiciones osmóticas.** Este comportamiento se observó para la mayoría de los aislamientos, a saber: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 18, 21, 24, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 51, 53, 55, 57, 58, 61, 62, 63, 64 y 66. Para ilustrar esta conducta en la cinética de crecimiento de las cepas se muestra las **figuras 20 y 21**, para los aislamientos 27 y 42.

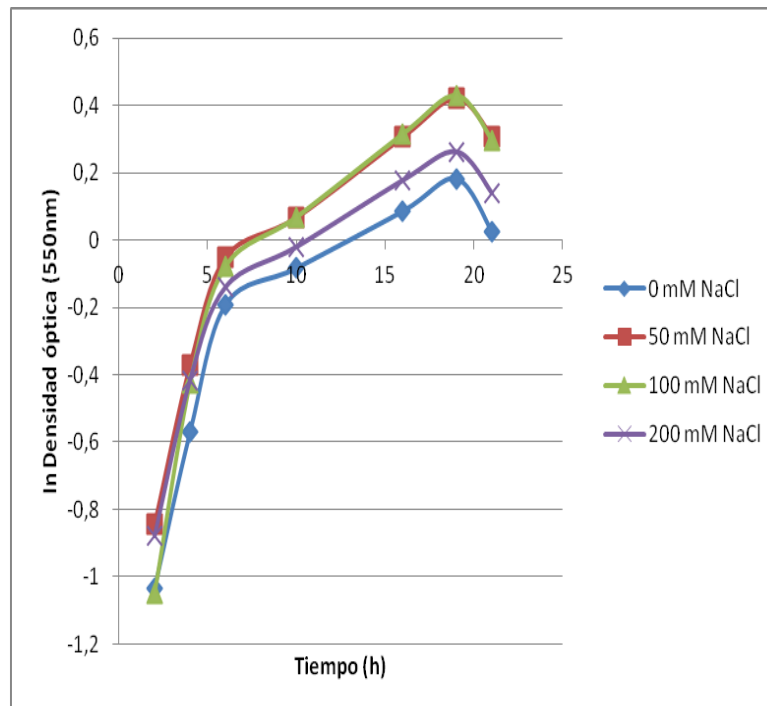


**Figura 20:** Cinética de crecimiento del aislamiento 27, en diferentes condiciones osmóticas.



**Figura 21:** Cinética de crecimiento del aislamiento 42, en diferentes condiciones osmóticas.

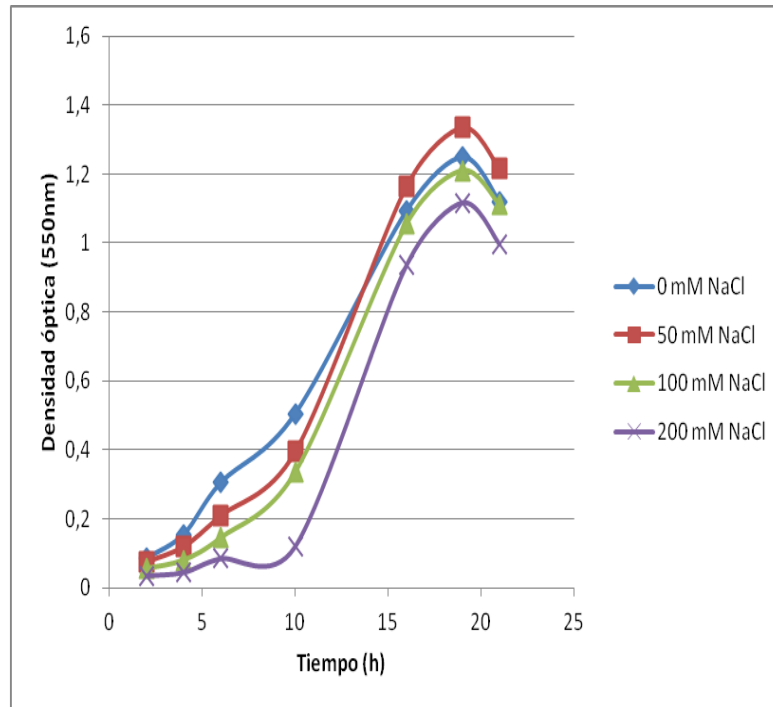
- ✓ **El crecimiento celular se ve afectado tanto por condiciones de baja (0 mM NaCl) como de alta osmolaridad (200 mM NaCl).** Este comportamiento se observó en los aislamientos 11, 12 y 30. Para ilustrar esta conducta se muestra la **Figura 22**, para el aislamiento 30.



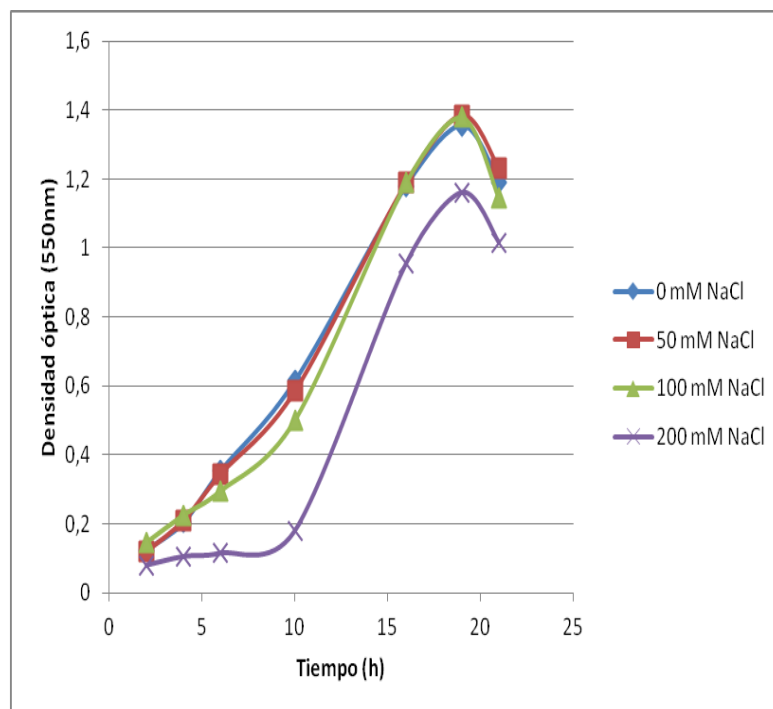
**Figura 22:** Cinética de crecimiento del aislamiento 30, en diferentes condiciones osmóticas.

✓ **El crecimiento celular se ve afectado por las condiciones de osmolaridad alta.**

En estos casos, la cinética de crecimiento se ve afectada al principio de la curva de crecimiento, atravesando una etapa de adaptación, si bien en la mayoría de los casos, alcanza a equiparar las concentraciones celulares finales de las demás condiciones ensayadas. Este comportamiento se observó en los aislamientos 14, 20, 22, 26, 48, 56, 59 y 60. Se muestra en las **figuras 23 y 24** la conducta de los aislamientos 14 y 48.



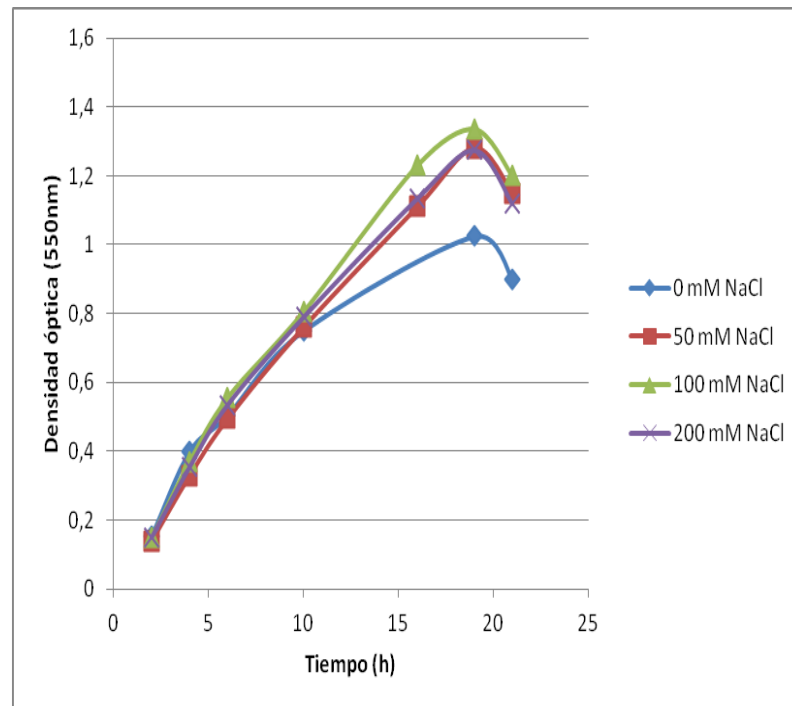
**Figura 23:** Cinética de crecimiento del aislamiento 14, en diferentes condiciones osmóticas.



**Figura 24:** Cinética de crecimiento del aislamiento 48, en diferentes condiciones osmóticas.

- ✓ **Un aumento en la osmolaridad beneficia el crecimiento celular.** En estos casos se pudo observar que la adición de NaCl tuvo una incidencia positiva en la cinética de crecimiento y/o en la concentración celular alcanzada. Este comportamiento se

observó en los aislamientos 6 y 39. Se muestra en la **Figura 25** la conducta del aislamiento 39.



**Figura 25:** Cinética de crecimiento del aislamiento 39, en diferentes condiciones osmóticas.

En el **Anexo III** se adjunta la totalidad de los gráficos obtenidos para esta serie de ensayos en condiciones de estrés osmótico.

La salinidad y los diferentes niveles de pH representan un estrés importante para los rizobios, ya que inhiben su persistencia y desarrollo. En consecuencia, una selección de cepas de rizobios tolerantes a estas condiciones es de gran importancia para el cultivo en zonas semiáridas. De los 54 aislamientos obtenidos, prácticamente la mitad, 26 de ellos (2, 3, 4, 8, 9, 10, 13, 17, 21, 24, 33, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 51, 53, 55, 57, 61, 62, 63, 64 y 66), no se vieron afectados respecto de la concentración celular alcanzada y de la cinética de crecimiento, frente a estas diferentes condiciones. La tolerancia al estrés de las cepas utilizadas en este estudio puede explicarse por el hecho de que se aislaron directamente de los suelos de regiones semiáridas. Si bien no hay trabajos referidos a diversidad de microorganismos aislados de *Rhynchosia*; en otras especies vegetales se han encontrado rizobios con comportamiento variable frente a condiciones de estrés. En este sentido, Hung *et al*, (2005), trabajaron con diferentes leguminosas arbustivas de Taiwán y hallaron comportamientos diferenciales en los aislamientos obtenidos en cuanto a su tolerancia a la

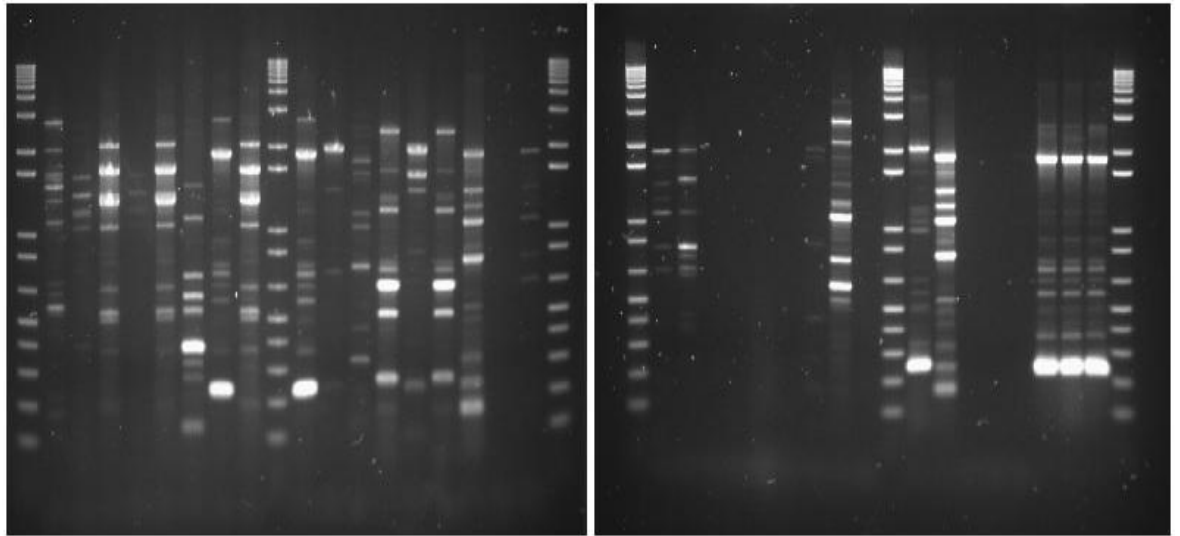
concentración salina en la que fueron capaces de crecer, que incluyó un rango desde 0,1 a 4,5% NaCl. Otros autores han trabajado realizando aislamientos de cepas rizosféricas y endófitas de leguminosas de suelos salinos, obteniendo una amplio espectro de tolerancia a las condiciones ambientales estudiadas (Sudhir, *et al.* 2009; Choudhury, *et al.* 2010 y Elboutahiri, *et al.* 2010). En nuestro país se han realizado algunos estudios preliminares de diversidad de bacterias promotoras de crecimiento en suelos rizosféricos (Principe, *et al.* 2007). La multiplicidad y redundancia de los mecanismos homeostáticos son marcas de la respuesta a estrés en bacterias que deben tenerse en cuenta al momento de seleccionar microorganismos nativos (Kempf y Bremer, 1998; Thrall, *et al.* 2009).

Los resultados obtenidos son promisorios en cuanto a la importancia potencial que tiene el restablecimiento de la vegetación nativa en suelos estresados y el interés adicional de aumentar la ventaja de esta restauración mediante la utilización de los beneficios de la interacción planta – simbiote. Para ello, es de sumo interés conocer la adaptabilidad microbiana a través del gradiente ambiental con la finalidad de optimizar esta asociación.

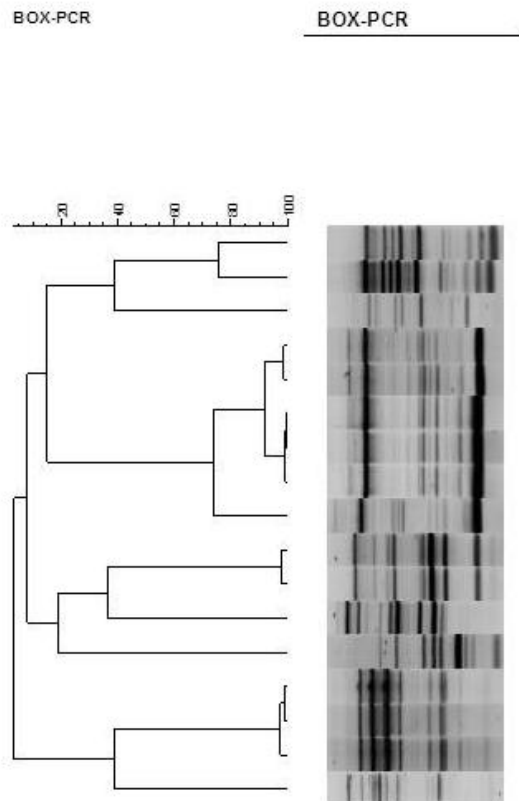
#### **4.4.3 - Fingerprinting BOX-PCR**

Este ensayo se realizó a modo de visualizar la variabilidad genética de los aislamientos de bacterias obtenidas a partir de los nódulos de la leguminosa *Rhynchosia*. Dado que el objetivo fue estudiar la diversidad de los diferentes representantes endófitos que habitan en los nódulos, se seleccionaron para realizar esta serie de ensayos, aquellos que mostraban las mayores similitudes morfológicas, descartando los aislamientos en los que ya se había evidenciado su diversidad. En base a estas consideraciones, se seleccionaron un total de 17 cepas, para la amplificación de las secuencias nucleotídicas contenidas entre los elementos repetitivos Box. Los geles obtenidos se muestran en la **Figura 26**.





**Figura 26:** Geles de agarosa revelados por exposición a UV.



**Figura 27:** Dendrograma obtenido por el software GelCompare II.

El análisis del dendrograma obtenido (**Figura 27**) a través del software Gelcompare II, indica que los aislamientos presentaban un alto nivel de variabilidad. Ninguno de los caracterizados por medio de este ensayo presentó un 100% de similitud, es decir, no se

podieron detectar dos cepas iguales en los 17 testeados. A un 10 % de variabilidad, los 17 aislamientos se encuentran divididos en 10 grupos, lo cual da otro indicio del alto nivel de diversidad. Estos resultados coinciden con los de Doignon-Bourcier, *et al* (1999) y Garau, *et al* (2009) que han encontrado diferentes cepas en nódulos de *Rhynchosia*.

Dado que en cada uno de los 10 grupos que determina este análisis, hay un alto porcentaje de similitud, sería esperable un comportamiento similar frente a las condiciones de estrés estudiadas anteriormente. Esto fue así para alguno de los grupos, por ejemplo el grupo de los aislamientos 17 y 51, en el cual además ya se había observado una gran similitud en los perfiles de bandas de LPS. Sin embargo, en otros casos se observó diferente conducta frente a la situación de estrés de pH, de osmolaridad ó de ambas (grupos de aislamientos: 12 y 14; 3, 5 y 8; 7, 9, 61, 62 y 66). Esto confirma la variabilidad dentro de cada grupo.

#### **4.5 CAPACIDAD DE NODULACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS.**

Los aislamientos provenientes del interior de los nódulos de la leguminosa *Rhynchosia*, caracterizados previamente, fueron sometidos a un ensayo de renodulación en invernadero (**Figura 28**).



**Figura 28** – Ensayo de renodulación en invernadero.

Como resultado de este ensayo se obtuvo que ninguno de los aislamientos caracterizados, provenientes del interior de nódulos esterilizados en superficie, renoduló la leguminosa.

Varios factores podrían ser los causantes de este resultado: las condiciones medioambientales no fueron logradas para el establecimiento de los nódulos, la variedad vegetal utilizada no resultó ser la específica para los microorganismos aislados, se aislaron bacterias endófitas secundarias, y/o la producción de sustancias tóxicas por parte de las mismas bacterias endófitas en perjuicio de la proliferación de los rizobios nodulantes.

A continuación se detallan las hipótesis planteadas anteriormente:

En primer lugar hay que considerar que la descripción de las asociaciones simbióticas para las diferentes leguminosas se ha basado tradicionalmente en la posibilidad de cultivar y crecer, el ocupante bacteriano del nódulo, responsable de la fijación de nitrógeno, estriándolo en placas con medio de cultivo. Los rizobios que ocupan el nódulo han sufrido un proceso de diferenciación de bacterias vegetativas a bacteroides. Estos son incapaces de multiplicarse, sin embargo, el hecho de poder aislar rizobios de la manera mencionada anteriormente implica que algunos de ellos no han sufrido la diferenciación a bacteroide o que algunos bacteroides puedan pasar de nuevo al estado cultivable, o ambas posibilidades.

Frente a esto, y dado que los resultados de renodulación fueron negativos, se podría hipotetizar que se aislaron rizobios del nódulo pero en el ensayo de invernadero no se lograron las condiciones medioambientales que promueven la nodulación, o bien la variedad vegetal utilizada para realizar esta serie de ensayos podría haber sido el factor determinante que imposibilitó el establecimiento de los nódulos (Jitacksorn y Sadowsky, 2008).

En segundo lugar, hay informes acerca de rizobios tales como *R. leguminosarum* (Alexander, *et al.* 1999) y *R. sulae* (Toffanin, *et al.* 2000) que entran en el estado viable pero no cultivable, de modo tal que los aislamientos obtenidos en este trabajo podrían ser otros taxones no rizobianos de bacterias endófitas colonizadoras de nódulos. Además de las teorías e investigaciones sobre interacciones *Rhizobium*-leguminosas, un campo paralelo de conocimiento es el de endófitos microbianos. La evidencia de que la planta sana normalmente puede contener en su interior bacterias u hongos no necesariamente relacionado con un contexto patógeno, fue presentada por primera vez por Perotti (1926). Los tallos y las raíces de diferentes especies de plantas albergan una gama de  $10^3$  -

$10^6$  bacterias internas vivas por gramo de peso fresco, cuyas funciones están relacionadas con diversos fenotipos interactivos. Las leguminosas en este sentido no son una excepción. Nódulos en sí pueden ser colonizados internamente por varios géneros bacterianos no relacionados con los rizobios involucrados en la fijación simbiótica de nitrógeno (Brundu, *et al.* 2004; Ben Romdhane, *et al.* 2005; Zakhia, *et al.* 2006, Muresu, *et al.* 2008).

La incapacidad de los cultivos puros de los ocupantes no-rizobianos de nodular la leguminosa en condiciones microbiológicamente controladas, induce a la hipótesis de la presencia de endófitos bacterianos dentro de los nódulos de plantas perfectamente sanas que establecen interacciones beneficiosas. En estudios simultáneos en nuestro grupo de trabajo sobre estos mismos aislamientos, se vio que algunos de ellos exhiben capacidad promotora de crecimiento vegetal, mediante la producción de metabolitos tales como ácido indol acético, sideróforos y/o solubilizadores de fósforo.

Por último, también es posible que los diversos endófitos en el nódulo puedan producir compuestos antagonistas que afectan negativamente a los rizobios, y/o puedan desencadenar una respuesta sistémica de defensa del huésped que resulta en la producción de compuestos inhibidores tales como el ácido salicílico al cual los simbioses rizobios pueden tener una sensibilidad diferencial. De hecho, algunas bacterias no patógenas pueden producir ellas mismas niveles suficientes de ácido salicílico para generar especies reactivas de oxígeno (De Meyer, *et al.* 1999; Audenaert, *et al.* 2002). Esto imposibilitaría el aislamiento de rizobios, lo cual también podría explicar la ausencia de nódulos en los ensayos de renodulación en plantas.

## CONCLUSIONES

- Las características edáficas de la zona de colecta mostraron parámetros típicos de suelos de regiones de clima árido o semiárido, con niveles de pHs tendientes a alcalinidad.
- Teniendo en cuenta las características edafoclimáticas del sector semiárido de la Provincia de La Pampa, se desprende que la leguminosa *Rhynchosia* es una especie promisoriosa para uso forrajero, debido a su contenido proteico y digestibilidad; además de su distribución.
- A partir de los nódulos de *Rhynchosia* se obtuvo una gran diversidad de microorganismos endófitos, los que fueron caracterizados mediante diversos parámetros. A saber:
  - El 55,56% resultaron Gram negativos, y en estos casos se pudo corroborar la presencia de LPS por las técnicas electroforéticas específicas.
  - Mediante fingerprinting BOX-PCR se determinó una gran diversidad genotípica dentro de los 54 aislamientos tratados
  - La totalidad de los mismos mostró adaptabilidad a las condiciones de estrés a las que se los enfrentó. El 50% de los mismos fue capaz de multiplicarse en condiciones de hasta 200mM NaCl y un rango de pH de 6 a 9.
- Ninguno de los aislamientos obtenidos mostró capacidad infectiva para formar nódulos frente a la leguminosa huésped.

## **5 CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO**

Sería interesante profundizar el estudio de características diferenciales de poblaciones de *Rhynchosia* en cuanto a la calidad y capacidad forrajera, con la finalidad de establecer relaciones con el acervo génico poblacional y las características edafoclimáticas del sitio en donde éstas se desarrollan.

La salinidad es un estrés importante para los rizobios, porque inhibe su persistencia y desarrollo. En consecuencia, una selección de cepas de rizobios tolerante es de gran importancia para el cultivo de leguminosas, dentro de las cuales, algunas de ellas ofrecen un gran potencial para la siembra en sitios donde la salinidad está causando la pérdida de la producción agrícola.

Por otra parte, el hallazgo de diferentes aislamientos del tipo endófitos, de los que se ha demostrado en estos estudios su capacidad de adaptación a diferentes tipos de estrés además de su capacidad de promover el crecimiento de las plantas, resulta ser de gran importancia desde un punto de vista aplicado, ya que se podría considerar el desarrollo y la formulación de biofertilizantes, los cuales posean un gran desempeño en cuanto a su efectividad y competencia, en la región semiárida.

Se propone como futuro ensayo la identificación de genes *nod* y *nif* en los aislamientos caracterizados para definir su potencial nodulante, ya que de esta manera, se podría confirmar o descartar las diferentes hipótesis respecto de los resultados en los ensayos de renodulación.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, E.; PHAM, D. y STECK, T. The viable but nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. Appl Environ Microbiol 65: 3754–3756. 1999.
- AOAC. Official methods of analysis (15th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. 1990.
- ARANDA RICKET A, SORIA M A, CORREA O S. The acid tolerance response in *Mesorhizobium loti*. World Journal of Microbiology & Biotechnology; 16, 5:475-480, 2000.
- AUDENAERT, K.; PATTERY, T.; CORNELIS, P. y HÖFTE, M. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Mol Plant-Microbe Interact. 15: 1147–1156. 2002.
- BAKER, A.; SPRENT, J. y WILSON, J. Effects off sodium chloride and mycorrhizal infection on the growth and nitrogen fixation of *Prosopis juliflora*. Symbiosis 19: 39-51. 1995.
- BALDWIN, I. y FRED, E. Nomenclature of the root nodule bacteria of the *Leguminosae*. J. Bacteriol. 17: 141-150. 1929.
- BELL, L.; BENNETT, R.; RYAN, M. y CLARKE, H. The potential of herbaceous native Australian legumes as grain crops: a review. Renewable Agriculture and Food Systems. 26(1): 72–91. 2010.
- BEN ROMDHANE, S.; NASR, H.; SAMBA-MBAYE, R.; NEYRA, M. y GHORBAL, M. Diversity of *Acacia tortilis* rhizobia revealed by PCR/RFLP on crushed root nodules in Tunisia. Ann Microbiol. 55: 249–258. 2005.
- BOLAÑOS, L.; EL-HAMDAOUI, A.; y BONILLA, I. Recovery of development and functionality of nodules and plant growth in salt-stressed *Pisum sativum*-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis by boron and calcium. J. Plant Physiol. 160: 1493-1497. 2003.
- BOOGERD, F. y VAN ROSSUM, D. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. FEMS Microbiology Reviews. 21:5. 1997.
- BORDELEAU, L.; y PRÉVOST. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. Plant Soil 161: 115-125. 1994.
- BRAY, R. y KURTZ, L. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. Soil Sci. 59: 39-45. 1945.
- BROWN, A. Microbial water stress. Bacteriol. Rev. 40: 803-846. 1976.
- BRUNDU, G.; CAMARDA, I.; CAREDDA, M.; GARAU, G.; MALTONI, S. y DEIANA, P. A contribution to the study of the distribution of *Medicago*-*Rhizobium* symbiosis in Sardinia (Italy). Agr Med 134: 33–48. 2004.
- CARREÑO, L. y VIGLIZZO, E. Provisión de servicios ecológicos y gestión de los ambientes rurales en Argentina. Área estratégica de gestión ambiental. Ediciones INTA. p. 68. 2007.
- CHEN, L.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. y HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5099-5103. 2000.
- CHOUDHURY, B.; AZAD, P. y KALITA, M. Variability in Symbiotic Effectiveness of Native Rhizobia in Acid Stress. Curr Microbiol. 61: 85–91. 2010.
- CLAUSEN, A.; FERRER, M. y FORMICA, M. Situación de los recursos fitogenéticos en la Argentina. II Informe Nacional 1996-2006. Ed. INTA. Publicaciones Regionales. p.57. 2008
- CORDOVILLA, M.; LIGERO, F. y LLUCHO, C. The effect of salinity in N<sub>2</sub> fixation and assimilation in *Vicia faba*. J. Exp. Bot. 45: 1483-1488. 1994.

- CORREA O S, RIVAS E A, BARNEIX A J. Cellular envelopes and tolerance to acid ph in *Mesorhizobium loti*. *Current Microbiology*; 38:329-334, 1999.
- CORREA O S, BARNEIX A J. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; 13: 153-157, 1997.
- CUNQUERO, H. Y COVAS, G. Las Leguminosas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa. *Apuntes para la flora de la Pampa*: 273-308. 1982.
- DE BRUIJN, F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive in tergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187. 1992.
- DE MEYER, G.; CAPIAU, K.; AUDENAERT, K.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. y HÖFTM. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol Plant-Micro Interact* 12: 450-458. 1999.
- DEMARÍA, M.; AGUADO, I. y STEINAKER, D. Reemplazo y fragmentación de pastizales pampeanos semiáridos en San Luis, Argentina. *Ecología Austral*. 18: 55-70. 2008.
- DENARIÉ, J.; DEBELLÉ, F. y ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 497. 1992.
- DEREGIBUS, V. y SORIANO, A. Los pastizales de la zona de cría de la depresión del salado desde el punto de vista ecológico. *Rev. Arg. De Producción Animal*. 1(2): 60-83. 1981.
- DOIGNON-BOURCIER, F.; ABDOULAYE, S.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. y DE LAJUDIE, P. Diversity of *Bradyrhizobia* from 27 Tropical *Leguminosae* Species Native of Senegal. *System. Appl. Microbiol.* 22: 647-661. 1999.
- DOWNIE, J. y KONDOROSI, A. Interactions in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: *Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century*. Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation. Institut Pasteur, Paris, France. 207. 1998.
- ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I. y UDUPA, S. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. Elbouthahiri et al. *BMC Microbiology*. 10: 15. 2010.
- ELSHEIKH, E. y WOOD, M. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 22: 343-347. 1990.
- ERNST, R.; MORICI, E.; MUIÑO, W.; BERRUETA, M. y LERNER, P. Comparación pre y post quema del banco de semillas germinable y total de gramíneas en un área del caldenal pampeano. XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica. Posadas. Misiones. 2011.
- ESTELRICH, D. y CANO, E. Disponibilidad forrajera y determinación de capacidad de carga de un bosque de *Prosopis caldenia*. En actas 1º jornadas de Biología y 2º Jornadas de Geología de La Pampa. UNLPam. 30-35. 1985.
- FAITURI MY, EL-MAHI YE, EL-HASSAN GA. Effects of some salts and sodicity on the growth of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strain isolated from a salt-affected soil. *Canadian journal of microbiology*; 47, 9:807-812, 2001.
- FORTUNATO, R. Sinopsis de las especies argentinas del género *Rhynchosia*. *Parodiana* 2(1): 25-58. 1983.
- FRAYSSE. N.; COUDERC, F. y POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1365-1380. 2003.
- FRED, E.; BALDWIN, I. y MCCOY, E. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press. Madison. USA. 1932.



- FRIRDICH, E. y WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide innercore oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. *J. Endotoxin Res.* 11: 133-144. 2005.
- FUJIHARA S, YONEYAMA T. Effects of the pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology*; 59, 4:1104-1109, 1993.
- GAGE, D. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2): 280-300. 2004.
- GALINSKI, E. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 273-328. 1995.
- GARAU, G.; YATES, R.; DEIANA, P. y HOWIESON, J. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. *Soil Biology and Biochemistry.* 41: 125-134. 2009.
- GAWORZEWSKA, E.; y CARLILE, M. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1179. 1982.
- GEIGER, O.; RITSEMA, T.; VAN RUSSELL, A.; TAK, T. y WIJFJES, A. Role of rhizobial lipo oligosaccharides in root nodule formation on leguminous plants. *Plant and Soil.* 161: 81 . 1994.
- GOERING, H. y VAN SOEST, P. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procederes and some applications). In: *Agriculture Handbook*, USDA Washington, DC. p379. 1970.
- HAACK, A. Uber den Einfluss der Knollchenbakterien auf die Wurzelhaare von Leguminosen und Nichtleguminosen. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II.* 117: 343. 1964.
- HITCHCOCK, P. y BROWN, T. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154: 269-277. 1983.
- HUNG, M.; BHAGWATH, A.; SHEN, F.; DEVASYA, R. y YOUNG, C. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia.* 49: 577-584. 2005.
- INTA. Taller: Especies Leguminosas para la región árida-semiárida central, Villa Mercedes (San Luis). 2010.
- INTA. Diagnóstico y prospectiva del cultivo de especies leguminosas forrajeras extra-pampeanas en Argentina. Seminario Nacional. INTA EEA San Luis. 2011.
- INTERRANTE, S.; SINGH, R.; ISLAM, M.; STEIN, J.; YOUNG, C. y BUTLER, T. Effectiveness of *Sinorhizobium* Inoculants on Annual Medics. *Crop Science.* 51: 2249-2255. 2011.
- JACOBO, E.; RODRIGUEZ, A.; BARTOLINI, N. y DEREGIBUS, V. Rotational grazing effects on rangeland vegetation at a farm scale. *Rangeland Acol. Manage.* 59: 249-257. 2006.
- JITACKSORN, S. y SADOWSKY, M. Nodulation Gene Regulation and Quorum Sensing Control Density-Dependent Suppression and Restriction of Nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum*-Soybean Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology.* 74: No. 12. 3749-3756. 2008.
- JORDAN, D. Family III *Rhizobiaceae* Conn. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 1: 234-245. 1938.
- JUAN, N.; ROMERO, L. y BRUNO, O. Conservación del forraje de alfalfa. En: *La alfalfa en la Argentina.* INTA C.R. Cuyo. 173-192. 1995.
- KEMPF, G. y BREMER, D. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170: 319-330. 1998.
- KIJNE, J. The *Rhizobium* infection process. In: *Biological nitrogen fixation.* (Eds. G. Stacey, R.H. Burris and H. Evans). Chapman and Hall, Inc. Routledge. New York. p349. 1992.

- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685. 1970.
- LEPEK, C. y DANTUONO, L. Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. *Lotus Newsletter*. 35(1): 93-105. 2005.
- LEROUGE, I. y VANDERLEYDEN, J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 17-47. 2002.
- LIPPI D, DE PAOLIS MR, DI MATTIA E, GREGO S, PIETROSANTI T, CACCIARI I. Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. *Biology and fertility of soils*; 30, 4:276-283, 2000.
- MARTÍNEZ, O.; RUIZ, M. y ROSSI, M. Leguminosas nativas de importancia forrajera para la región semiárida pampeana –Argentina-. Conferencia Internacional de Leguminosas: avances en el siglo XXI. 8-14. 2010.
- MORICI, E.; ERNST, R.; KIN, A.; ESTELRICH, D.; MAZZOLA, M. y POEY, S. Efecto del pastoreo en un pastizal semiárido de Argentina según la distancia a la aguada. *Archivos de Zootecnia*. 52: 59-66. 2003.
- MORICI, E.; DOMÉNECH, V.; GÓMEZ, G.; KIN, A.; SAENZ, A. y RABOTNIKOF, C. Diferencias Estructurales entre parches de pastizal del cardenal y su influencia sobre el banco de semillas, en la provincia de La Pampa, Argentina. *Agrociencia*. 43(5): 529-537. 2009.
- MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. y SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *Microbiol. Ecol.* 63: 383–400. 2008.
- NEIHARDT, F.; INGRAHAM, J. y SCHAECHTER, M. *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*, Sinauer Associates, Sunderland. 1990.
- NEWCOMB, W.; SIPELL, D. y PETERSON, R. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* 57: 2603. 1979.
- OKE, V. y LONG, S. R. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* 1999. 2: 641-646. 1999.
- PARUELO, J.; GUERSCHMAN, J. y VERÓN, S. Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. *Ciencia Hoy*. 15: 14-23. 2005.
- PEOPLES, M.; LADHA, J. y HERRIDGE D. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil*. 174: 3-28. 1995.
- PEROTTI, R. On the limits of biological enquiry in soil science. *Proc. Int. Soc. Soil Sci.* 2: 146–161. 1926.
- POSTGATE, J. *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1982.
- PRÍNCIPE, A.; ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; ZACHI, L.; FISCHER, S.; MORI, G. y JOFRÉ, E. Biocontrol and PGPR Features in Native Strains Isolated from Saline Soils of Argentina. *Current Microbiology*. 55: 314-322. 2007
- RAETZ, C. y WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 635-700. 2002.
- ROBERTO, Z.; ADEMA, E. y RUCCI, T. Relevamiento fisonómico de la vegetación en el área del caldenal. *Publicación Técnica N° 60*. INTA EEA Anguil. p24. 2005.
- ROTH, L.; JEON, K. y STACEY, G. Homology in endosymbiotic systems: The term symbiosome. In: *Molecular genetics of plant microbe interactions*. (Eds. R. Palacios and D.P.S. Verma). Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul. p220. 1988.

- SAKIYAMA, C.; PAULA, E.; PEREIRA, P.; BORGES, A. y SILVA D. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. Letter in Applied Microbiology 33(2): 117-121. 2001.
- SALA, O.; OESTERHELD, M.; LEÓN, R. y SORIANO, A. Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. Vegetation. 67: 27-32. 1986.
- SCHNEIDER, M. y DE BRUIJN, F. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer -assisted phylogenetic pattern analysis. World J. Microbiol. Biotechnol. 12: 163-174. 1996.
- SHAMSELDIN, A. y WERNER, D. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium meliloti* in planta revealed by transposon Tn5-*gusA*. Genes Dev. 4: 344-356. 2005.
- SILHAVY, T.; KAHNE, D. y WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(5): a000414. 2010.
- SMIT, G.; LOGMAN, T.; BOERRIGTER, M.; KIJNE, J. y LUGTENBERG, B. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca<sup>2+</sup>- dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. J. Bacteriol. 171: 4054. 1989.
- SPRENT, J. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K. p.146. 2001.
- STRITZLER, N.; PETRUZZI, H.; FRASINELLI, L.; VENECIANO, J.; FERRI, C. y VIGLIZZO, E. Variabilidad climática en la región semiárida central argentina. Adaptación tecnológica en sistemas extensivos en producción animal. Revista Argentina de Producción Animal. 27(2): 111-123. 2007.
- SUDHIR, K.; UPADHYAY; DEVENDRA, P.; SINGH y SAIKIA, R. Genetic Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Rhizospheric Soil of Wheat Under Saline Condition. Current Microbiology. 59: 489-496. 2009.
- THRALL, P.; BROADHURST, L.; HOQUE, M. y BAGNALL, D. Diversity and salt tolerance of native *Acacia* rhizobia isolated from saline and non-saline soils. Austral Ecology. 34: 950–963. 2009.
- TOFFANIN, A.; BASAGLIA, M.; CIARDI, C.; VIAN, P.; POVOLO, S. y CASELLA, S. Energy content decrease and viable not culturable (VNC) status induced by oxygen limitation coupled to the presence of nitrogen oxides in *Rhizobium* “hedysari”. Biol Fertil Soils 31: 484–488. 2000.
- TU, J. Effect of salinity on *Rhizobium* root hair interaction, nodulation and growth of soybean. Can.J. Plant Sci. 61: 231-239. 1981.
- VAN KAMMEN, A. The molecular development of nitrogen fixing root nodules. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Inter-national Congress on Nitrogen Fixation. St. Petersburg, Russia. p9. 1995.
- VERMA, D. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. Plant Cell. 4: 373. 1992.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. y LUPSKI, J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19: 6823-6831. 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. y LUPSKI, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell. Biol. 5: 25-40. 1994.
- VINCENT, J. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, Sydney. p.288. 1982.

- WERNER, D. Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. In: Biological nitrogen fixation. (Eds. G. Stacey, R.H. Burris and H. Evans). Chapman and Hall, Inc. Routledge, London. p399. 1992.
- WILSON, J. Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes. Soil Sci. 58: 61-69. 1944.
- YOUNG, J. y HAUKKA, K. Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytol. 133: 87-94. 1996.
- ZABALA, J.; GIAVEDONI, J.; TOMAS, P. y BUDINI, E. Variabilidad en caracteres morfológica relacionados con la implantación de *Desmantis virgatus* (L.) Willd. Y *Desmantis paspalaceus* (Lindm.) Burkart. Agriscientia. 27(2): 97-105. 2010.
- ZAHRAN, H. y SPRENT, J. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plant by *Rhizobium leguminosarum*. Planta 167: 303-309. 1986.
- ZAKHIA, F.; JEDER, H.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. y DE LAJUDIE, P. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. Microbial Ecol 51: 375–393. 2006.
- ZHOU, M.; TUCKERS, T.; PESSARAKLI, M. y CEPEDA, J. Nitrogen fixation by alfalfa with two substrate nitrogen levels under sodium chloride stress. Soil Sci. Soc. Am. J. 56: 1500-1504. 1992.

**ANEXO I:** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y tiempo de generación (Tg), obtenidos para los aislamientos desarrollados en las condiciones estándar de pH y osmolaridad, y en diferentes condiciones de estrés establecidas

Aislamientos	Estrés por pH											
	pH 6			pH 7			pH 8			pH 9		
	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)
1	0,214	0,411	3,244	0,227	0,462	3,056	0,232	0,445	2,988	0,095	0,272	7,333
2	0,287	0,671	2,413	0,289	0,589	2,400	0,258	0,781	2,685	0,303	1,029	2,287
3	0,445	0,515	1,557	0,449	0,616	1,545	0,410	0,693	1,691	0,347	0,824	1,997
4	0,230	0,511	3,015	0,237	0,383	2,929	0,299	0,626	2,321	0,253	0,659	2,738
5	0,515	0,867	1,347	0,326	0,656	2,125	0,443	0,941	1,563	0,385	0,612	1,800
6	0,202	1,099	3,438	0,262	1,151	2,650	0,174	0,251	3,981	-	-	-
7	0,730	1,844	0,949	0,499	0,805	1,390	0,636	1,510	1,089	0,491	1,701	1,413
8	0,515	0,805	1,345	0,279	0,733	2,487	0,345	1,070	2,008	0,248	0,646	2,794
9	0,474	1,099	1,463	0,305	0,518	2,272	0,391	0,923	1,771	0,329	0,478	2,108
10	0,287	0,585	2,418	0,286	0,590	2,422	0,328	0,896	2,115	0,292	0,590	2,371
11	0,311	0,478	2,230	0,364	0,733	1,905	0,366	0,733	1,894	0,493	0,882	1,406
12	0,195	0,456	3,556	0,119	0,359	5,821	0,229	0,378	3,027	0,285	0,574	2,435
13	0,219	0,709	3,168	0,218	0,454	3,173	0,232	0,476	2,993	0,246	0,558	2,818
14	0,181	0,370	3,839	0,183	0,338	3,797	0,216	0,478	3,203	0,418	0,418	1,660
15	0,253	0,417	2,736	0,183	0,347	3,795	0,264	0,421	2,621	0,233	0,327	2,976
17	0,293	0,693	2,366	0,306	0,620	2,265	0,256	0,458	2,705	0,267	0,528	2,599
18	0,234	0,626	2,965	0,280	0,775	2,474	0,305	0,438	2,272	0,168	0,203	4,129
20	0,193	0,347	3,594	0,152	0,277	4,571	0,170	0,305	4,078	0,194	0,463	3,572
21	0,382	0,852	1,816	0,349	0,431	1,988	0,419	0,805	1,654	0,354	0,643	1,960
22	0,623	0,896	1,113	0,300	0,843	2,314	0,382	1,151	1,814	0,205	0,203	3,378
24	0,278	0,941	2,496	0,349	1,099	1,988	0,257	0,508	2,695	0,396	0,693	1,751
26	0,251	0,485	2,766	0,325	0,973	2,015	0,327	0,387	2,122	-	-	-
27	0,385	0,640	1,802	0,393	0,668	1,762	0,386	0,721	1,795	0,694	0,694	0,998
28	0,273	0,441	2,541	0,254	0,388	2,731	0,270	0,444	2,567	0,339	0,639	2,048
29	0,183	0,389	3,781	0,201	0,438	3,450	0,177	0,248	3,911	0,353	0,308	1,961
30	0,089	0,215	7,813	0,119	0,232	5,823	0,236	0,265	2,936	0,159	0,291	4,369

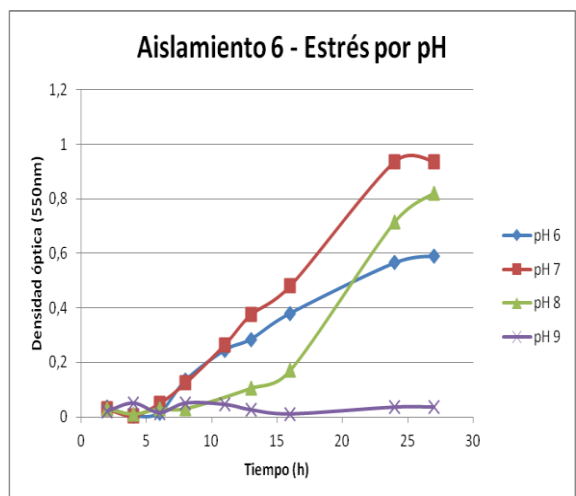
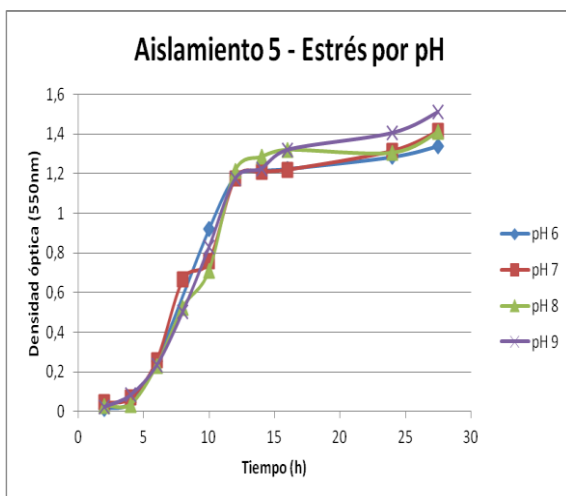
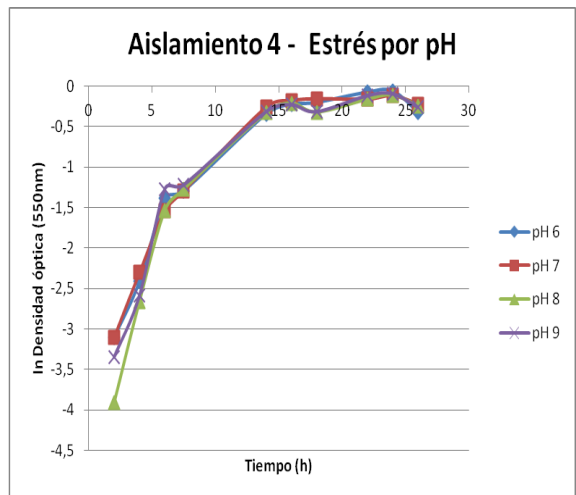
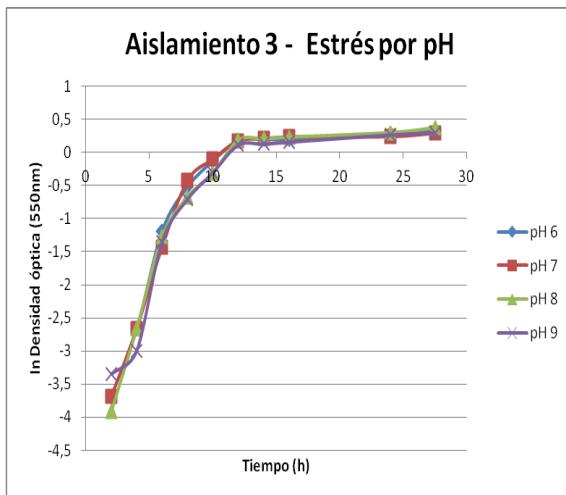
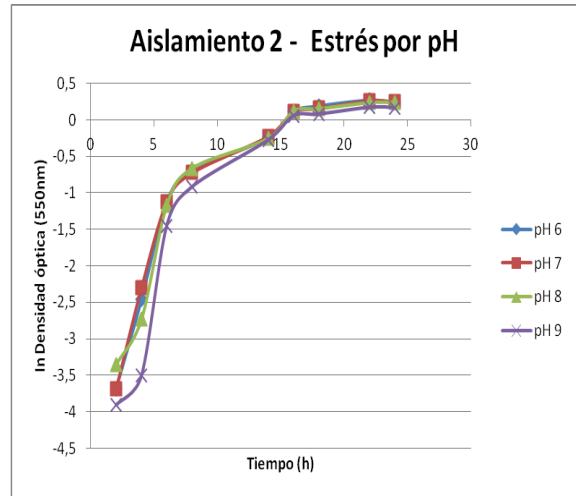
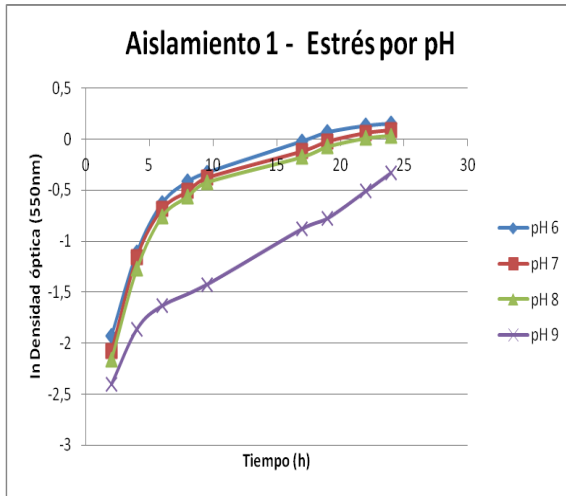
31	0,191	0,340	3,631	0,167	0,478	4,158	0,169	0,338	4,103	0,315	0,448	2,203
32	0,145	0,358	4,777	0,152	0,365	4,571	0,223	0,511	3,114	0,387	0,643	1,789
33	0,170	0,388	4,078	0,211	0,255	3,286	0,289	0,641	2,396	0,256	0,455	2,702
34	0,166	0,512	4,170	0,174	0,337	3,981	0,220	0,475	3,145	0,142	0,181	4,874
36	0,184	0,471	3,773	0,179	0,539	3,873	0,214	0,626	3,233	0,183	0,255	3,783
37	0,146	0,498	4,762	0,160	0,607	4,336	0,151	0,526	4,580	0,230	0,469	3,009
38	0,446	0,558	1,555	0,405	0,535	1,713	0,552	0,672	1,257	0,594	0,693	1,167
39	0,151	0,532	4,585	0,197	0,474	3,517	0,225	0,549	3,083	0,306	0,579	2,267
40	0,142	0,432	4,895	0,128	0,368	5,401	0,174	0,365	3,982	0,124	0,313	5,600
41	0,343	0,624	2,018	0,172	0,326	4,028	0,407	0,757	1,703	0,343	0,537	2,018
42	0,372	0,564	1,862	0,325	0,466	2,134	0,405	0,689	1,710	0,438	0,676	1,582
43	0,240	0,516	2,890	0,213	0,488	3,258	0,226	0,504	3,064	0,226	0,467	3,073
44	0,297	0,593	2,334	0,259	0,523	2,681	0,367	0,768	1,888	0,656	0,861	1,056
45	0,260	0,450	2,661	0,223	0,263	3,113	0,304	0,308	2,280	0,335	0,360	2,070
48	0,173	0,297	4,011	0,160	0,275	4,323	0,150	0,228	4,610	0,213	0,290	3,250
51	0,266	0,580	2,608	0,251	0,458	2,758	0,310	0,693	2,236	0,253	0,646	2,741
53	0,332	0,511	2,086	0,350	0,545	1,983	0,376	0,572	1,843	0,258	0,516	2,689
55	0,229	0,329	3,026	0,212	0,321	3,272	0,270	0,455	2,564	0,347	0,558	2,000
56	0,201	0,521	3,449	0,189	0,621	3,669	0,187	0,327	3,716	0,205	0,620	3,379
57	0,194	0,490	3,577	0,215	0,680	3,228	0,345	0,654	2,009	0,281	0,805	2,467
58	0,486	0,996	1,426	0,455	0,805	1,525	0,436	0,702	1,591	0,242	0,268	2,867
59	0,277	0,389	2,500	0,342	0,490	2,027	0,282	0,490	2,457	0,163	0,215	4,240
60	0,144	0,488	4,820	0,187	0,626	3,704	0,195	0,663	3,550	0,204	0,725	3,394
61	0,156	0,438	4,441	0,284	0,401	2,441	0,201	0,616	3,450	0,230	0,255	3,011
62	0,285	0,272	2,435	0,339	0,779	2,046	0,361	0,837	1,921	0,313	0,478	2,214
63	0,347	0,705	1,997	0,296	0,458	2,344	0,351	0,576	1,974	0,411	0,661	1,685
64	0,272	0,445	2,549	0,215	0,375	3,231	0,504	0,504	1,375	0,336	0,573	2,065
66	0,164	0,323	4,223	0,201	0,331	3,444	0,217	0,339	3,189	0,237	0,405	2,930

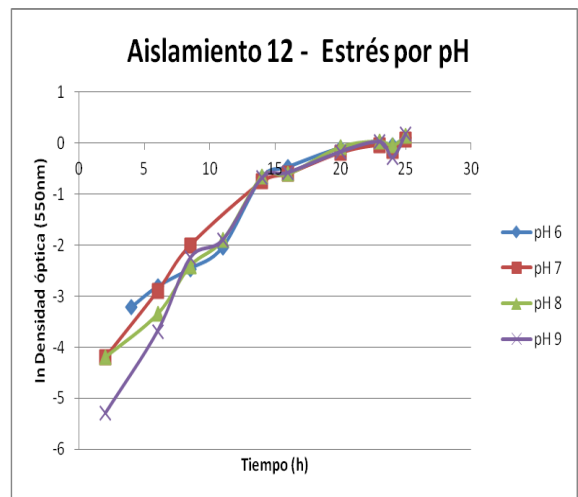
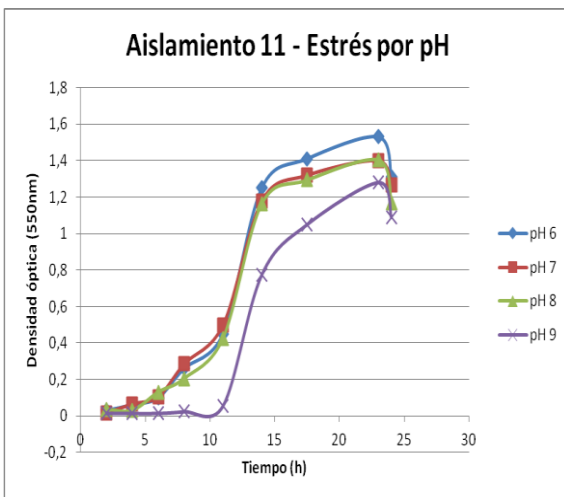
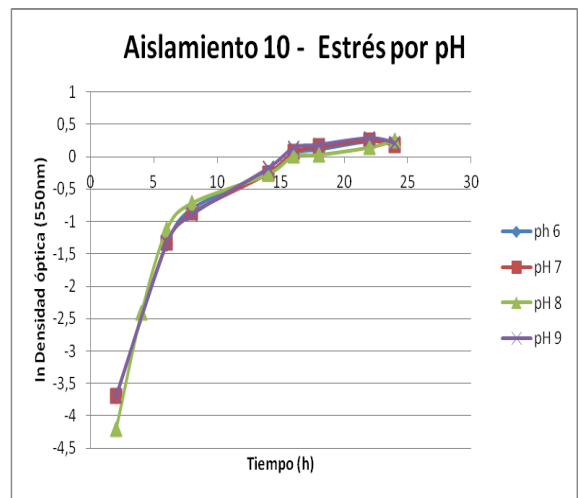
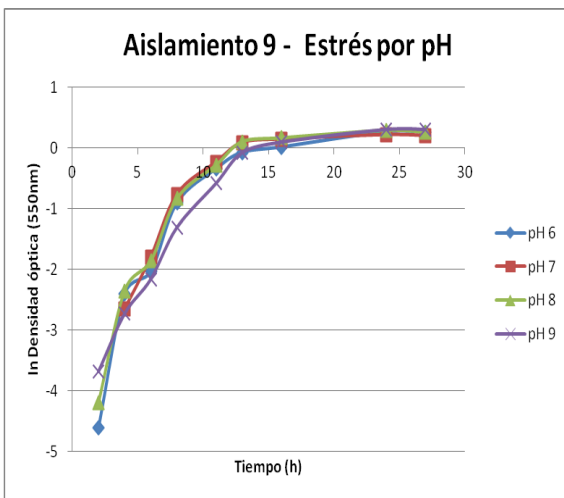
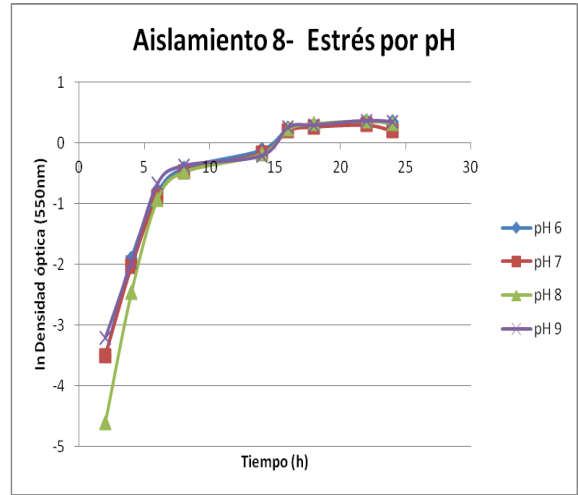
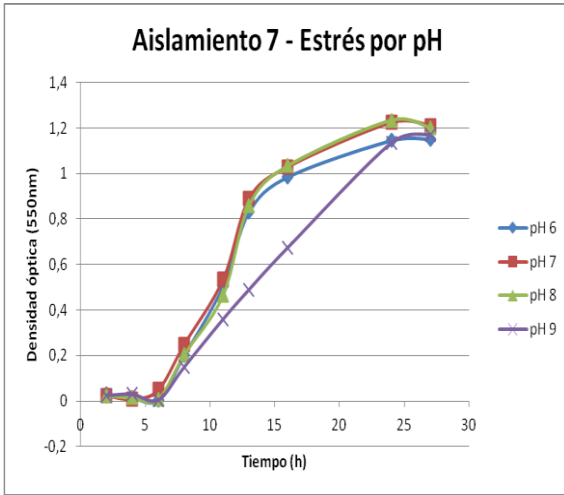
Aislamientos	Estrés osmótico											
	0mM NaCl			50 mM NaCl			100 mM NaCl			200 mM NaCl		
	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)
1	0,227	0,462	3,056	0,198	0,404	3,501	0,196	0,329	3,539	0,252	0,487	2,755
2	0,289	0,589	2,400	0,371	0,820	1,867	0,292	0,820	2,371	0,332	0,982	2,088
3	0,449	0,616	1,545	0,314	0,513	2,208	0,392	0,711	1,769	0,518	0,906	1,338
4	0,237	0,383	2,929	0,254	0,659	2,732	0,298	0,499	2,328	0,253	0,458	2,743
5	0,326	0,656	2,125	0,392	0,640	1,769	0,314	0,722	2,205	0,366	0,805	1,894
6	0,380	1,151	1,822	0,647	1,337	1,072	0,360	0,916	1,927	0,214	0,932	3,243
7	0,499	0,805	1,390	0,512	0,805	1,355	0,453	1,176	1,530	0,256	0,549	2,704
8	0,265	0,733	2,616	0,702	1,320	0,987	0,691	1,221	1,004	0,300	1,126	2,309
9	0,305	0,518	2,272	0,408	0,549	1,700	0,338	0,478	2,053	0,276	0,693	2,508
10	0,286	0,590	2,422	0,364	0,826	1,906	0,289	0,617	2,396	0,361	0,789	1,918
11	0,364	0,733	1,905	0,288	0,530	2,403	0,313	0,405	2,216	0,447	0,805	1,550
12	0,223	0,359	3,109	0,250	0,345	2,777	0,242	0,273	2,870	0,239	0,505	2,903
13	0,218	0,454	3,173	0,263	0,714	2,631	0,207	0,475	3,357	0,241	0,702	2,878
14	0,183	0,338	3,797	0,196	0,280	3,538	0,211	0,297	3,285	0,235	0,318	2,954
15	0,183	0,347	3,795	0,194	0,424	3,578	0,213	0,402	3,248	0,315	0,556	2,204
17	0,306	0,620	2,265	0,241	0,549	2,881	0,322	0,896	2,151	0,309	0,916	2,243
18	0,280	0,775	2,474	0,254	0,490	2,726	0,284	0,668	2,442	0,330	0,589	2,097
20	0,152	0,277	4,571	0,161	0,277	4,314	0,147	0,283	4,705	0,223	0,299	3,114
21	0,349	0,431	1,988	0,356	0,644	1,945	0,296	0,530	2,340	0,382	0,438	1,814
22	0,300	0,843	2,314	0,362	1,080	1,915	0,472	0,595	1,468	0,543	0,741	1,277
24	0,349	1,099	1,988	0,233	0,674	2,970	0,154	0,294	4,493	0,220	0,438	3,158
26	0,284	0,973	2,443	0,284	0,693	2,439	0,466	1,073	1,489	0,223	0,347	3,112
27	0,393	0,668	1,762	0,395	0,645	1,753	0,614	0,665	1,129	0,385	0,733	1,802
28	0,254	0,388	2,731	0,239	0,372	2,902	0,304	0,507	2,278	0,281	0,409	2,463
29	0,201	0,438	3,450	0,153	0,213	4,520	0,200	0,434	3,468	0,172	0,260	4,028
30	0,119	0,232	5,823	0,082	0,236	8,428	0,097	0,313	7,111	0,076	0,232	9,175
31	0,167	0,478	4,158	0,150	0,375	4,634	0,159	0,360	4,363	0,151	0,408	4,589
32	0,152	0,365	4,571	0,155	0,383	4,471	0,155	0,503	4,480	0,148	0,381	4,676
33	0,211	0,588	3,286	0,216	0,430	3,209	0,264	0,500	2,622	0,259	0,488	2,673
34	0,174	0,337	3,981	0,234	0,499	2,958	0,121	0,324	5,714	0,188	0,312	3,692

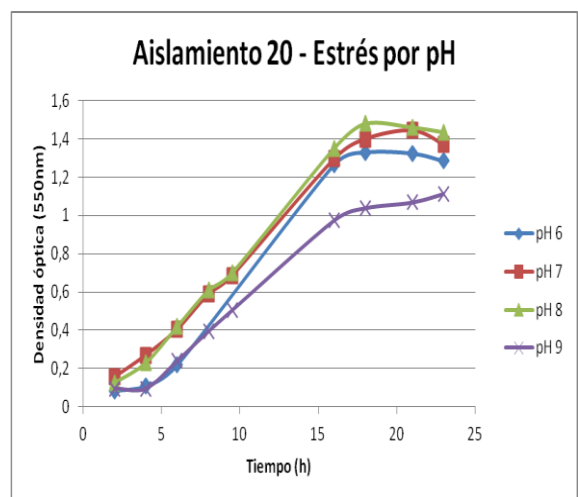
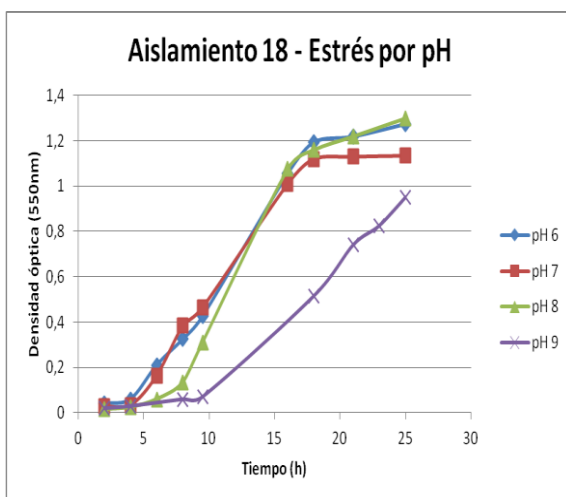
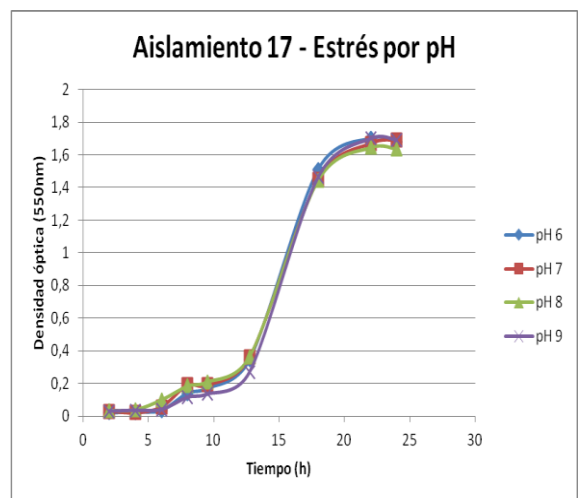
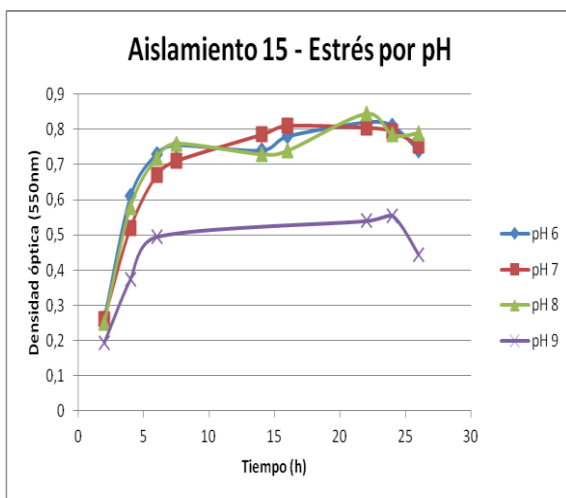
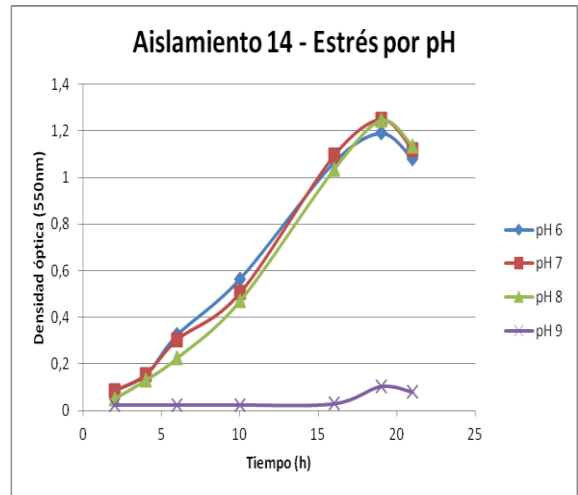
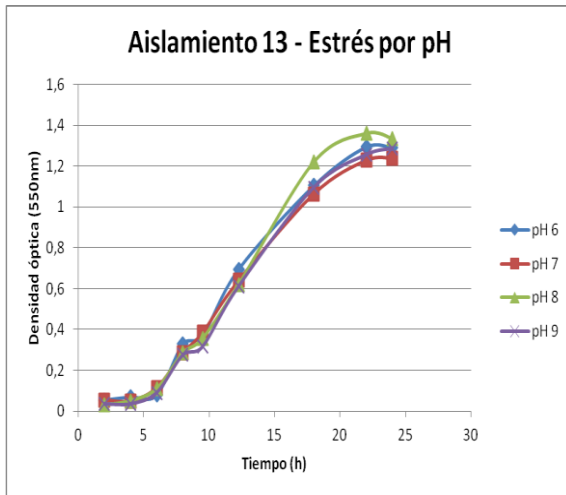
36	0,179	0,539	3,873	0,208	0,564	3,336	0,320	0,539	2,168	0,353	0,567	1,963
37	0,160	0,607	4,336	0,131	0,419	5,303	0,158	0,566	4,378	0,190	0,549	3,652
38	0,405	0,535	1,713	0,240	0,517	2,889	0,265	0,541	2,618	0,277	0,618	2,500
39	0,197	0,474	3,517	0,211	0,429	3,278	0,150	0,451	4,612	0,145	0,431	4,795
40	0,128	0,368	5,401	0,131	0,398	5,281	0,125	0,410	5,544	0,138	0,416	5,014
41	0,172	0,326	4,028	0,400	0,973	1,731	0,285	0,589	2,434	0,296	0,693	2,340
42	0,325	0,466	2,134	0,390	0,575	1,776	0,332	0,528	2,089	0,353	0,538	1,962
43	0,213	0,488	3,258	0,205	0,435	3,382	0,218	0,485	3,183	0,228	0,464	3,039
44	0,259	0,523	2,681	0,266	0,463	2,610	0,367	0,795	1,888	0,494	1,026	1,404
45	0,223	0,263	3,113	0,248	0,357	2,796	0,225	0,312	3,081	0,245	0,325	2,827
48	0,160	0,275	4,323	0,164	0,280	4,230	0,150	0,220	4,610	0,212	0,278	3,275
51	0,251	0,458	2,758	0,263	0,449	2,636	0,270	0,472	2,569	0,254	0,444	2,731
53	0,350	0,545	1,983	0,354	0,561	1,959	0,243	0,517	2,858	0,295	0,648	2,349
55	0,212	0,321	3,272	0,192	0,295	3,620	0,200	0,288	3,472	0,242	0,409	2,865
56	0,189	0,621	3,669	0,188	0,549	3,693	0,168	0,622	4,132	0,198	0,458	3,508
57	0,205	0,680	3,389	0,345	0,707	2,007	0,316	0,682	2,191	0,411	0,763	1,687
58	0,455	0,805	1,525	0,485	1,040	1,429	0,363	0,589	1,908	0,276	0,451	2,509
59	0,342	0,490	2,027	0,288	0,347	2,410	0,392	0,560	1,769	0,260	0,661	2,662
60	0,187	0,626	3,704	0,301	0,651	2,302	0,189	0,738	3,673	0,235	0,479	2,950
61	0,212	0,468	3,277	0,200	0,432	3,474	0,172	0,478	4,031	0,210	0,387	3,306
62	0,339	0,779	2,046	0,301	0,672	2,306	0,249	0,549	2,789	0,267	0,318	2,599
63	0,296	0,458	2,344	0,354	0,562	1,958	0,408	0,885	1,698	0,349	0,521	1,988
64	0,215	0,375	3,231	0,239	0,420	2,895	0,232	0,401	2,989	0,255	0,441	2,722
66	0,201	0,331	3,444	0,211	0,384	3,281	0,220	0,373	3,152	0,328	0,867	2,115

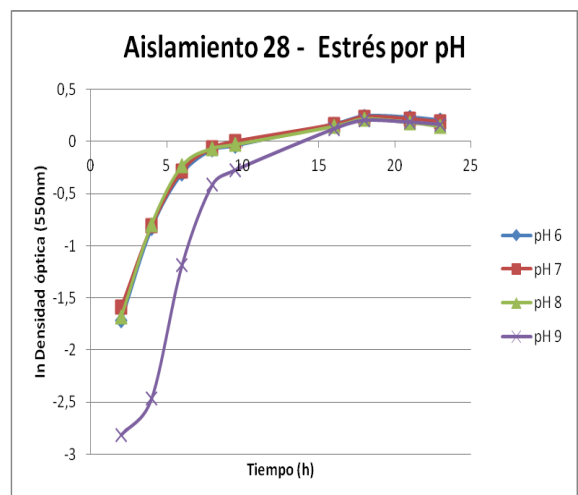
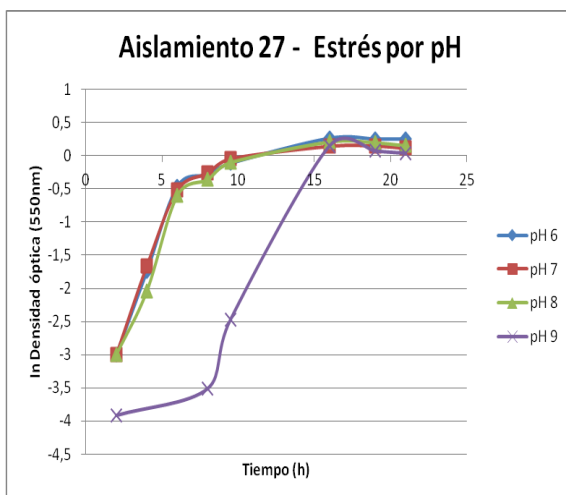
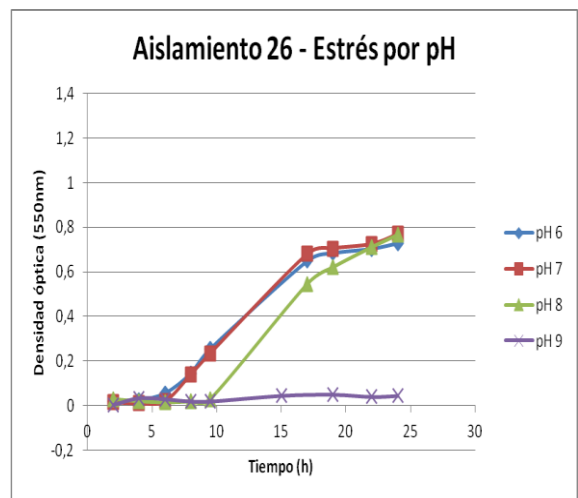
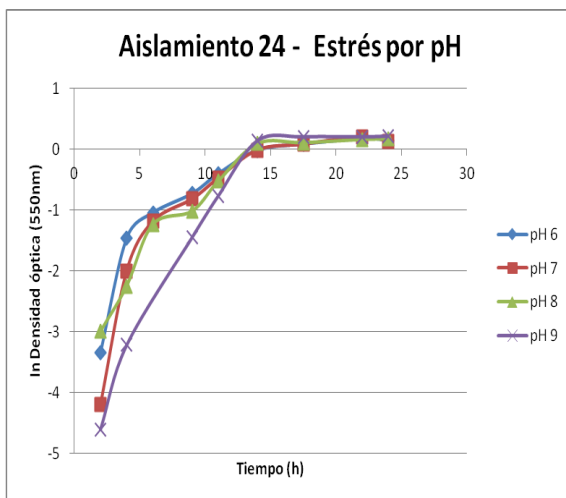
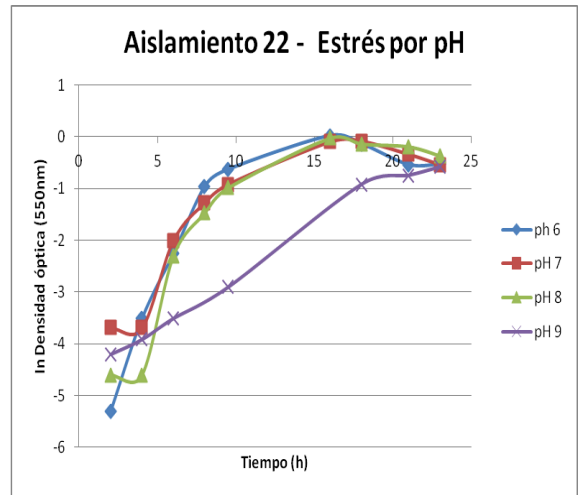
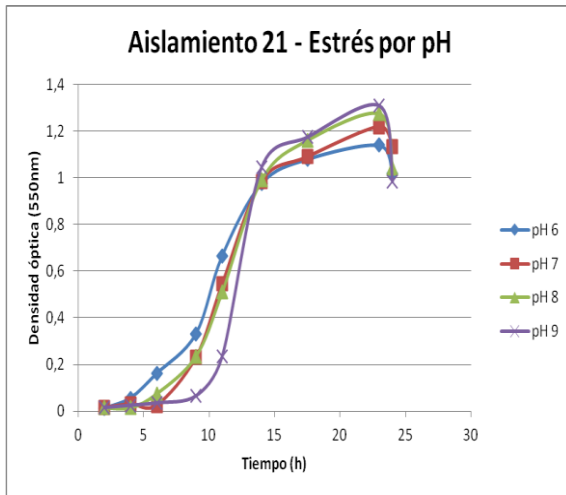


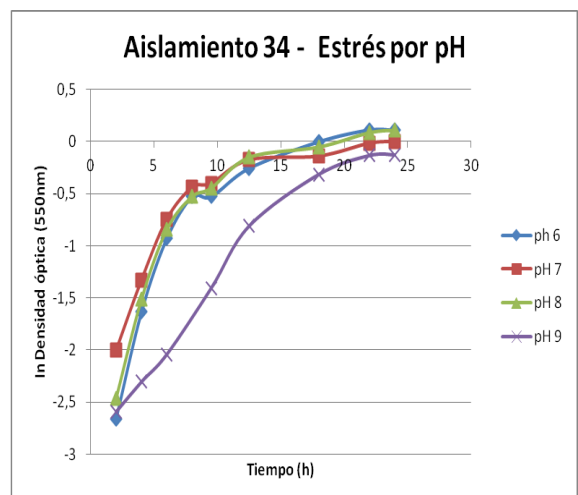
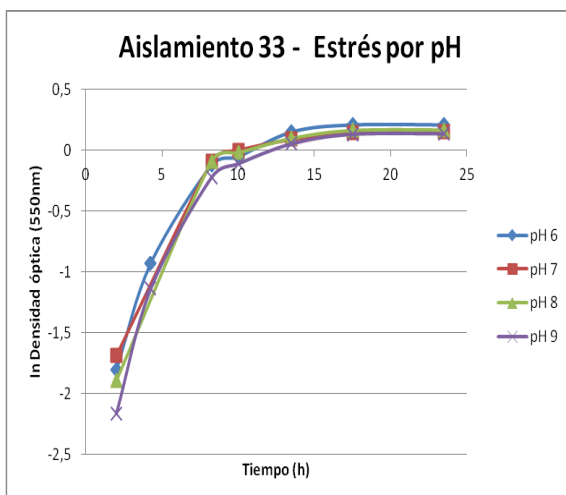
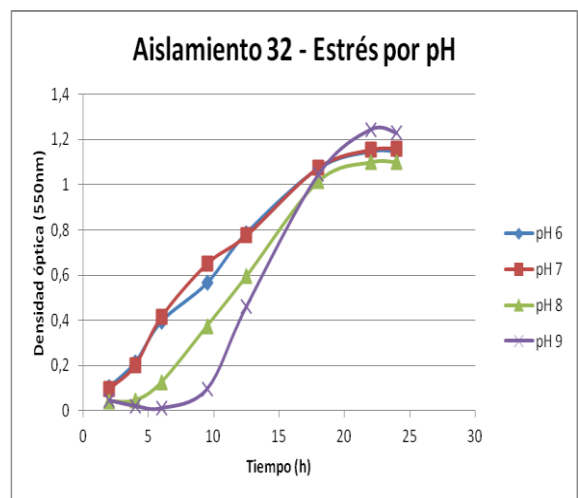
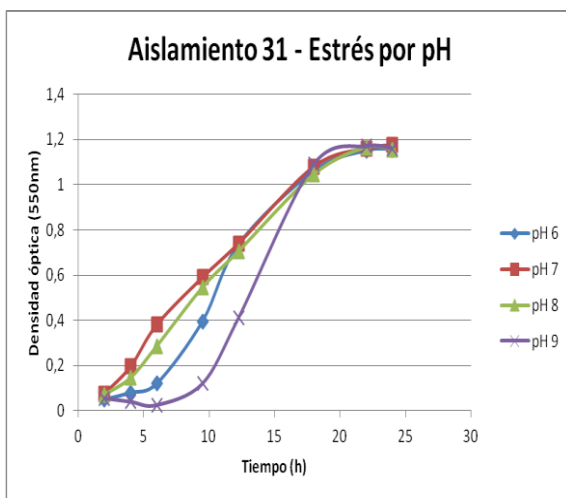
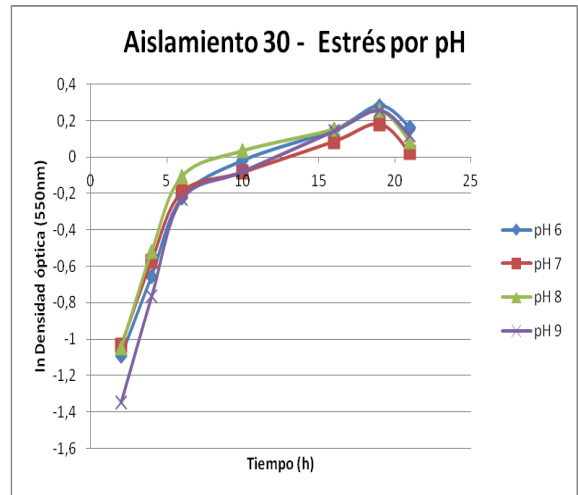
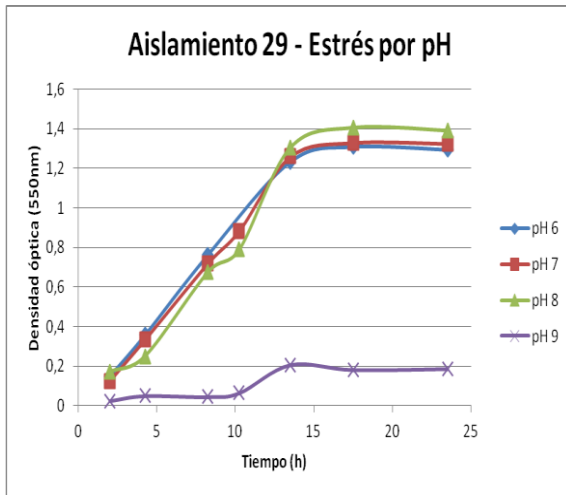
**ANEXO II:** Gráficos obtenidos para esta serie de ensayos correspondientes al crecimiento celular para cada uno de los aislamientos en diferentes condiciones de estrés por pH.

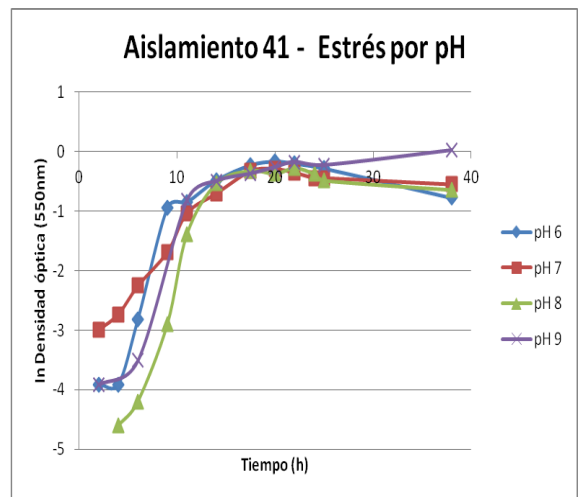
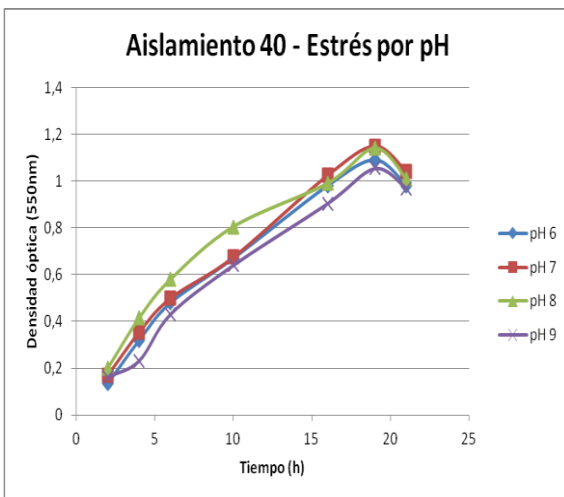
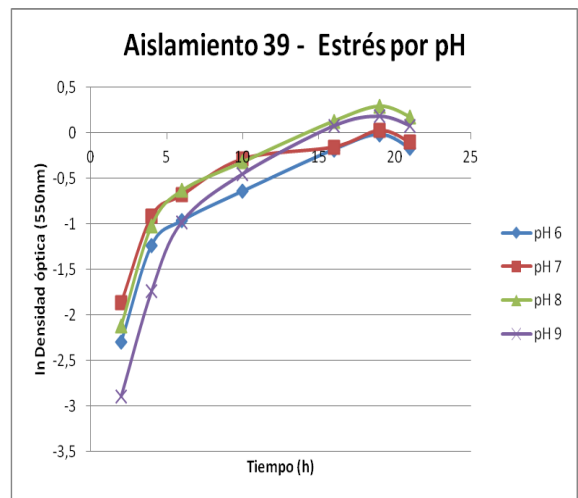
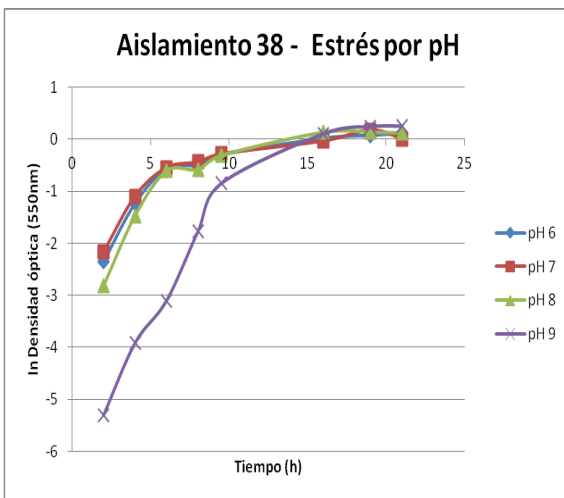
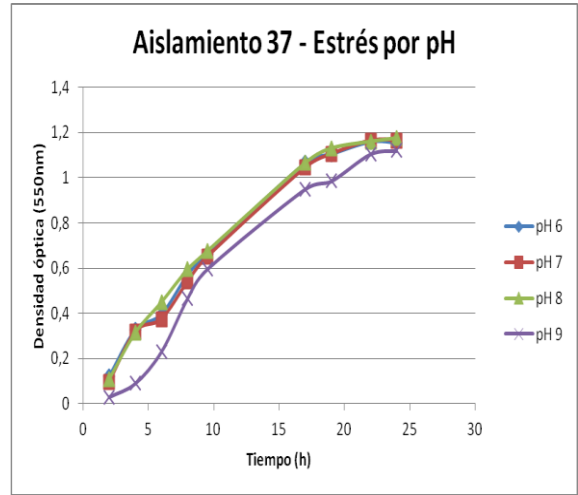
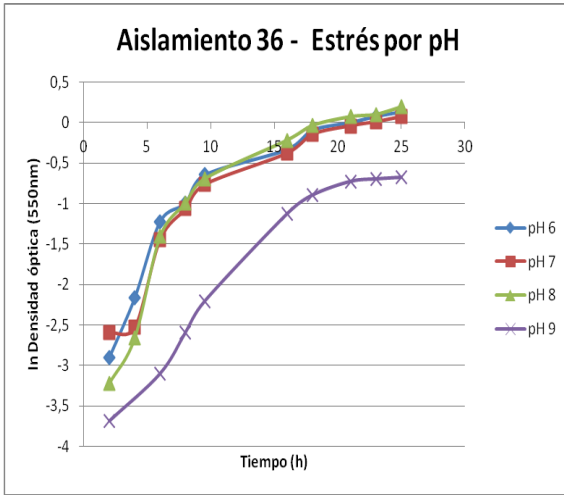


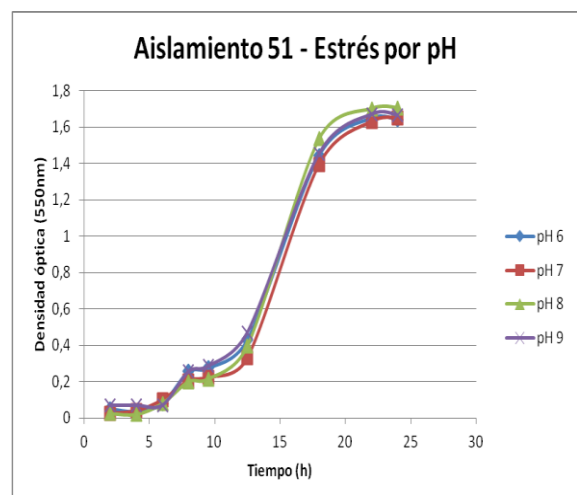
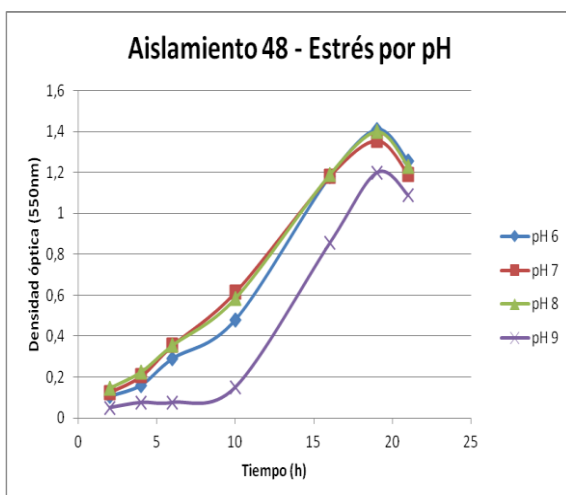
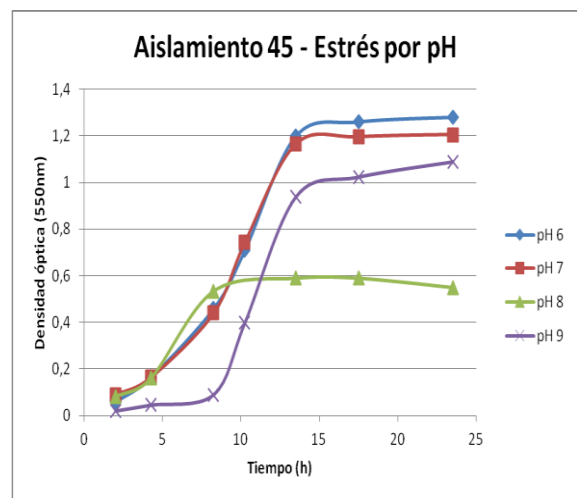
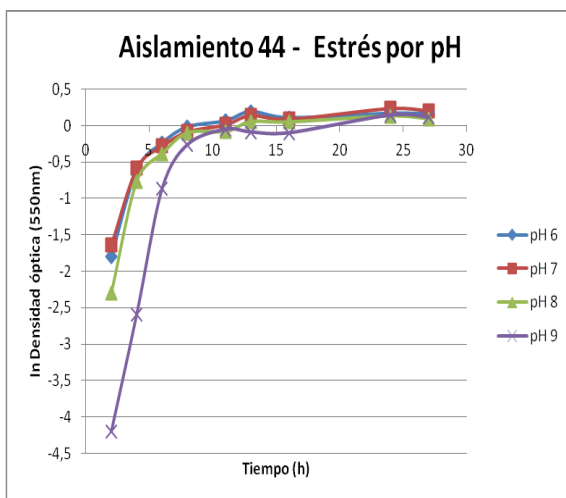
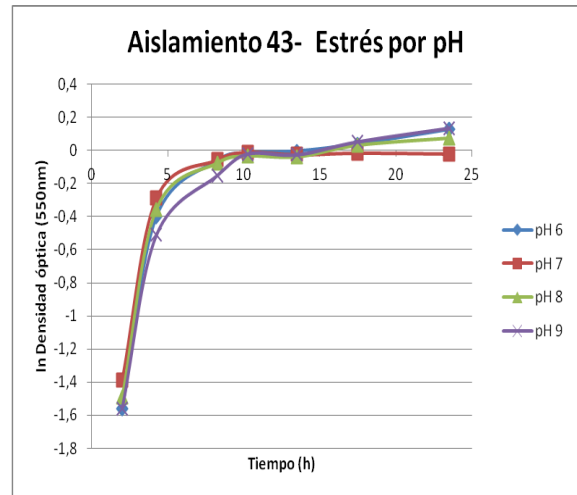
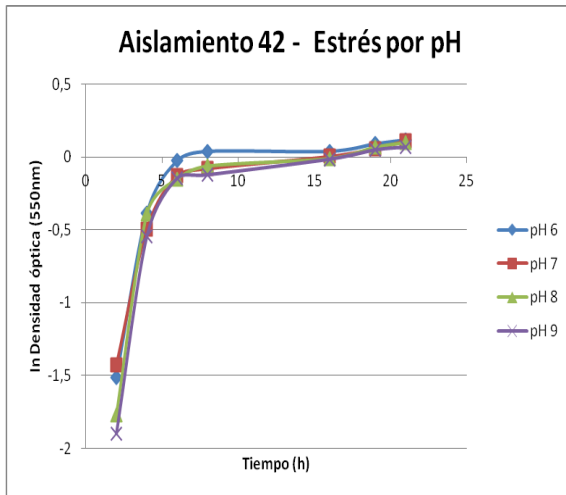


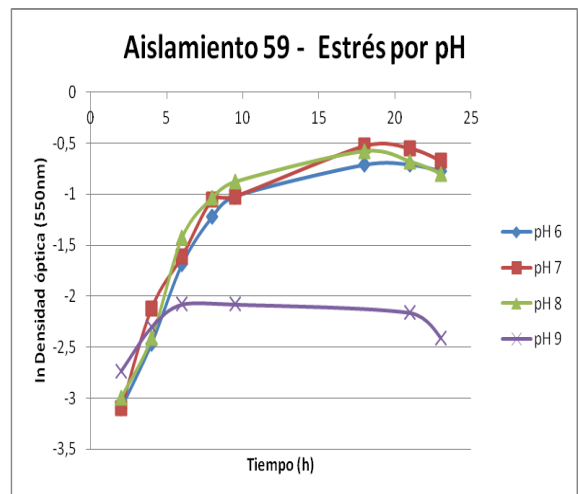
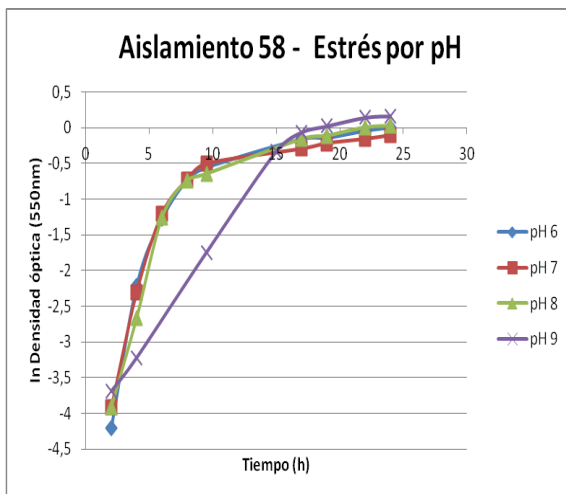
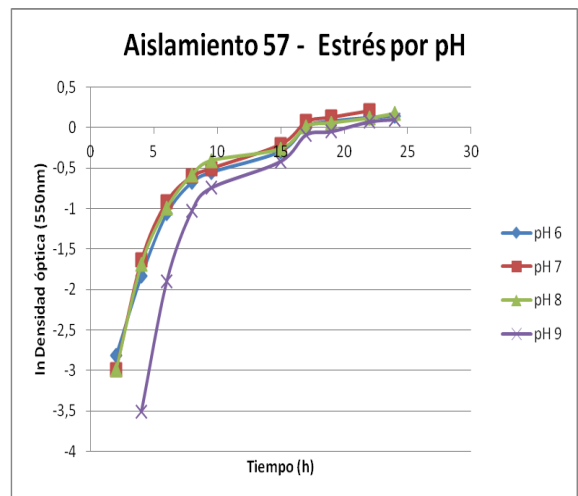
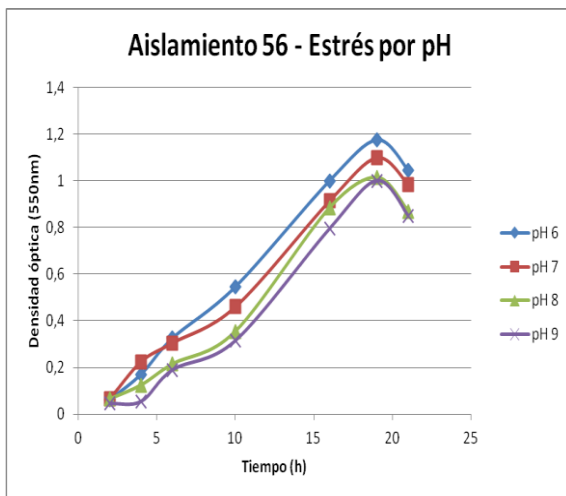
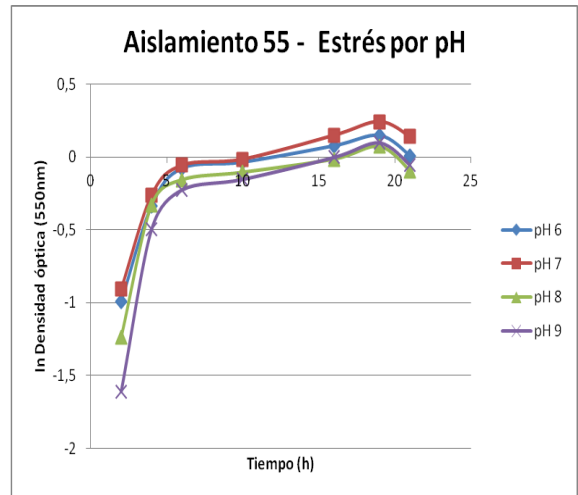
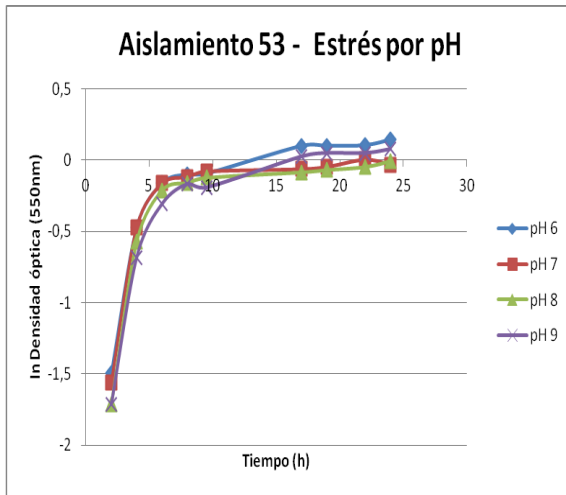




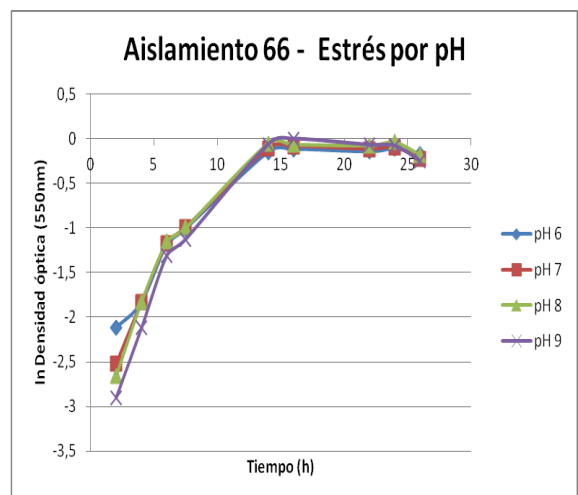
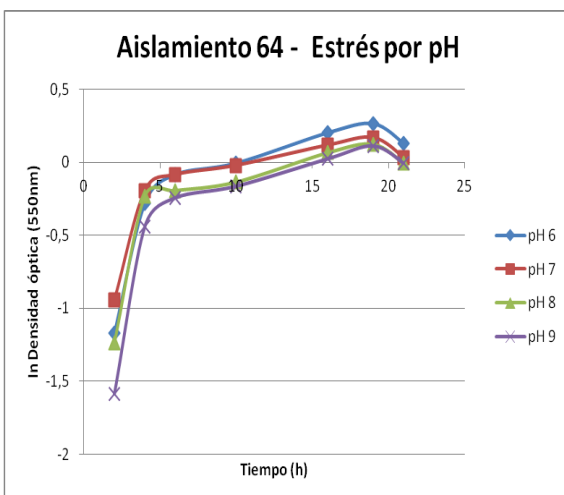
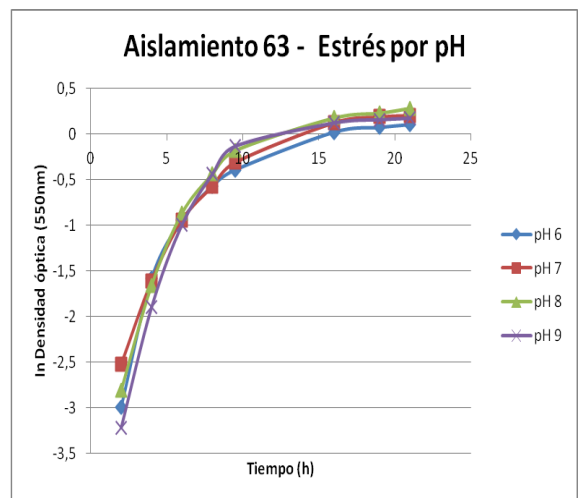
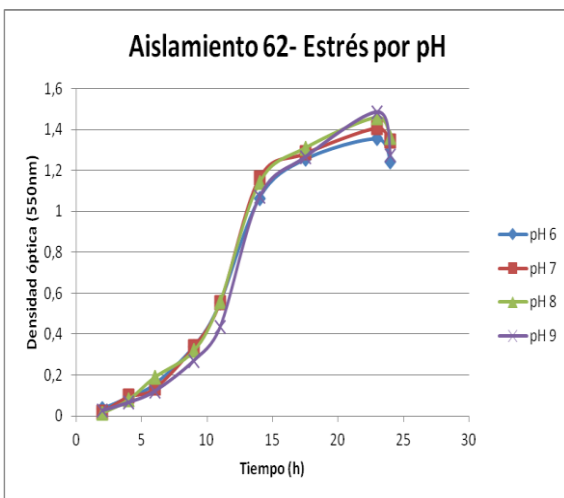
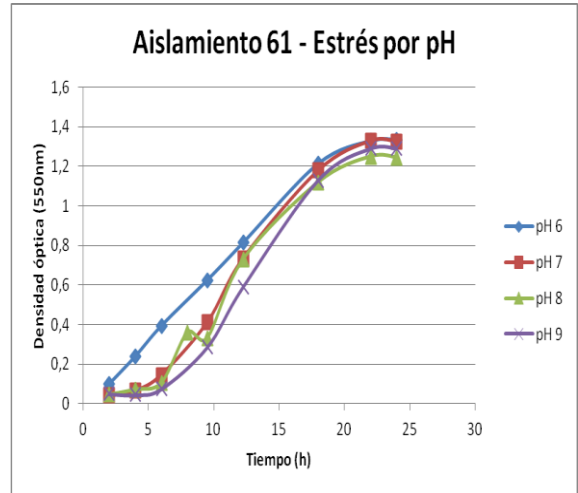
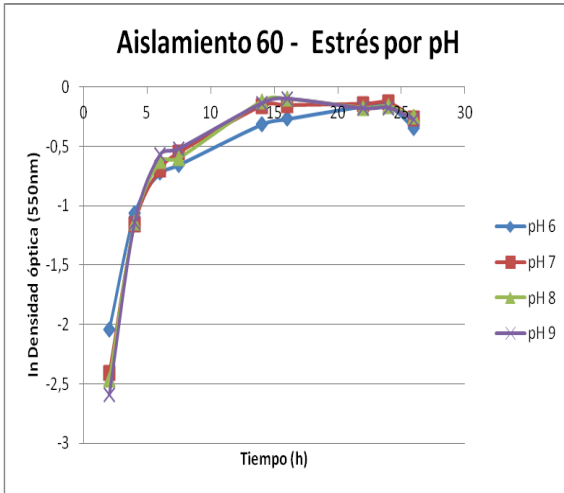












**ANEXO III:** Gráficos obtenidos para esta serie de ensayos correspondientes al crecimiento celular para cada uno de los aislamientos en diferentes condiciones de estrés osmótico.

