



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de

LICENCIADO EN QUÍMICA

SELECCIÓN DE BACTERIAS SIMBIOTES DE ALFALFA CON
ALTO POTENCIAL TECNOLÓGICO

Autor: Silvana Mariela Azcarate

Director: Dra. Ana Lía Ronchi

Codirector: Lic. Patricia García

SANTA ROSA (LA PAMPA)

2011



"Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química, durante el período comprendido entre 6 de noviembre de 2009 y 4 de noviembre de 2011, bajo la dirección de la Dra. Ana Lía Ronchi; y bajo la codirección de la Lic. Patricia García."

4 de noviembre de 2011

Silvana Mariela Azcarate

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



AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de La Pampa, y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, donde realicé mis estudios.
- A toda la gente del Departamento de Química, personal docente y no docente, por su buena predisposición durante mi trabajo de tesis.
- A los investigadores del IBBM (Instituto de Bioquímica y Biología Molecular) por el aporte en los análisis de identificación.
- A la Dra. Ana Lía Ronchi y la Dra. Alicia Grassano, por la dedicación de todos estos años, en los cuales me brindaron su experiencia, paciencia y tiempo pero sobre todo mucho cariño y comprensión.
- A la Lic. Patricia García, por su constante apoyo y colaboración en este trabajo, por sus consejos y afecto.
- Al Dr. José Camiña, por su asesoramiento en la realización del análisis estadístico de los resultados.
- A Sebastián, quien fue mi apoyo incondicional durante todos estos años, acompañándome con amor e insistencia durante toda mi carrera.
- A mis hijos, Amparo y Alejo, que por su simple existencia alegran cada día de mi vida y lo hacen todo posible.
- A mis papás y a mis hermanas, por estar siempre compartiendo cada momento de mi vida.
- A mi abuela y a mis primos, que cuando los necesité, estuvieron.
- A las amigas que me dejó este paso por la Facultad, Kati, Mari, Aguito y Anto, que lejos o cerca siempre están.
- A mis amigas de la vida, simplemente por ser mis amigas.
- A mis amigas y compañeras de hockey, por todos los momentos compartidos a lo largo de este año y por ser como son.
- A todos aquellos que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de la tesis.

A todos...



RESUMEN

En los últimos años, con el aumento de la población mundial se ha observado una creciente preocupación por la necesidad del desarrollo de sistemas agrícolas sustentables, dando especial importancia al incremento de la producción agrícola junto con la preservación de los recursos naturales y del ambiente como un todo.

La capacidad productiva de los suelos, en lo que a fertilidad se refiere, está muy relacionada con la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio, nutrientes más extraídos por la mayoría de los cultivos. Mantener altos niveles disponibles de nitrógeno y fósforo continúa siendo un desafío. Las principales formas de mantener suficiente nitrógeno es mediante la aplicación de fertilizantes nitrogenados y las formas de fijación biológica.

Cuando los suelos a sembrar, tienen deficiencia en la cantidad y calidad de bacterias con efectos PGPR, es necesario agregarlas mediante inoculación. La industria de inoculantes para leguminosas ha sido y es una enorme contribución a la economía de los países. La formulación y producción de inoculantes requiere la integración de parámetros físicos, químicos y biológicos.



ABSTRACT

In recent years, with increasing world population, there has been a growing concern about the need to develop sustainable agricultural systems, with particular attention to rising agricultural production with preservation of natural resources and the environment.

The productive capacity of soils, in regard to fertility, is closely related to the availability of nitrogen, phosphorus and potassium, nutrients extracted by most crops. Maintain high levels of nitrogen and phosphorus available remains a challenge. The main ways to preserve sufficient nitrogen is by nitrogen fertilizer application and biological fixation.

When the soils to cultivate, are deficient in quantity and quality of bacteria with PGPR effects, is necessary to add them by inoculation. The legume inoculants industry has always been a huge contribution to the economy of countries. The formulation and production of inoculants requires the integration of physical, chemical and biological agents.



ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Importancia agronómica del nitrógeno. Ciclo del elemento	1
1.2. Agricultura Sustentable	3
1.3. Las leguminosas	4
1.4. Importancia y características del cultivo de alfalfa	5
1.4.1. Requerimientos edafoclimáticos	7
1.4.2. Requerimientos nutricionales	7
1.5. Biodiversidad bacteriana y taxonomía	8
1.5.1. La importancia del gen ARNr 16S en taxonomía bacteriana	9
1.5.2. Caracterización fenotípica	10
1.6. Caracterización del microorganismo	11
1.7. Fijación Biológica de Nitrógeno	12
1.7.1. Señalización entre la planta y <i>Rhizobium</i>	13
1.7.2. Invasión y formación del canal de infección	15
1.7.3. Activación del ciclo celular e iniciación del nuevo órgano en la planta	17
1.7.3.1. Estructura de los nódulos	17
1.7.3.2. Desarrollo del nódulo indeterminado	17
1.7.4. Funcionamiento del nódulo	18
1.7.5. Infectividad y efectividad	20
1.8. Producción de inoculantes	21
1.8.1. Tipos de inoculante	23
1.8.2. Efectividad y competitividad entre poblaciones microbianas naturalizadas e introducidas.	24
2. Hipótesis y objetivo	26
3. Materiales y métodos	27
3.1. Relevamiento de cultivo de alfalfa	27
3.2. Características de los suelos	27
3.2.1. Conductividad	27
3.2.2. pH	27
3.2.3. Materia orgánica	27
3.2.4. Nitrógeno (método Kjeldhal)	27
3.3. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno	28
3.4. Metodología de aislamiento de microorganismos	28
3.5. Conservación de los microorganismos	29
3.6. Caracterización de los aislamientos	30
3.6.1. Observación microscópica	30
3.6.2. Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio LMA	30
3.6.3. Tinción de GRAM	30
3.6.4. Por perfiles de esterasas	30
3.6.5. Desarrollo en medio de cultivo líquido y determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de los aislamientos	32
3.6.6. Amplificación, secuenciación y análisis del 16S	33



3.7. Ensayo en cámara climatizada	35
3.7.1. Recuento de nódulos	36
3.7.2. Peso seco	36
3.7.3. Contenido de nitrógeno total. Método KJELDHAL	37
3.7.4. Índice de eficiencia relativa (IER)	37
3.8. Obtención de inoculantes	37
3.8.1. Obtención de cultivos de alta concentración celular	37
3.8.2. Material soporte	38
3.9. Control de calidad de inoculantes	38
3.9.1. Recuento de rizobios viables mediante la técnica de recuento en placa por extensión en superficie en medio LMA	38
4. Resultados y discusión	40
4.1. Características de los suelos utilizados	40
4.2. Aislamiento de los microorganismos	40
4.3. Características de los aislamientos de nódulos	41
4.3.1. Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio LMA	41
4.3.2. Tinción de GRAM y observación microscópica	42
4.3.3. Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E)	42
4.3.4. Desarrollo en medio de cultivo líquido y determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de los aislamientos	44
4.3.5. Amplificación, secuenciación y análisis del 16S	47
4.4. Ensayo en cámara climatizada con alfalfa	50
4.4.1. Recuento de nódulos	50
4.4.2. Peso seco	50
4.4.3. Contenido de nitrógeno total	52
4.4.4. Análisis estadístico	53
4.4.5. Índice de eficiencia relativa (IER)	55
4.5. Obtención y control de calidad de inoculantes	56
4.5.1. Obtención de cultivo de alta concentración celular	56
4.5.2. Material soporte	56
4.5.3. Recuento de rizobios viables	57
5. Conclusiones	61
6. Bibliografía	62



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años la agricultura ha sufrido una revolución tecnológica que ha desembocado en una mecanización generalizada, en el uso creciente de fertilizantes y agroquímicos para conseguir un aumento de la productividad agrícola. Se ha convertido en una “agricultura intensiva” provocando problemas de contaminación por el uso abusivo de los mismos. Esto ha producido mayores rendimientos en los cultivos, pero ha repercutido muy negativamente sobre los ecosistemas agrarios, contribuyendo también al desequilibrio energético (combustibles fósiles) y medio ambiental. Como alternativas a la agricultura intensiva las biotecnologías basadas en el uso de los microorganismos del suelo como activadores del crecimiento, están adquiriendo un especial relieve (de Felipe Antón, 2002). Dentro del concepto de agricultura sostenible surgen tecnologías limpias como es la biofertilización con bacterias fijadoras de nitrógeno, la cual se plantea como una alternativa segura, efectiva y, sobre todo, económica para recuperar la productividad de los suelos (Mahecha, 2002; Sylvia *et al.*, 2005).

1.1. Importancia agronómica del nitrógeno. Ciclo del elemento.

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes para las plantas, y su disponibilidad condiciona en gran medida la productividad de los cultivos. Es componente de moléculas esenciales para la vida de las plantas condicionando la calidad de las estructuras y los procesos en los que éstas intervienen. Está presente en los ácidos nucleicos (ADN y ARN), en las vitaminas y en las moléculas de almacenaje de energía. Forma parte de los aminoácidos, bases de las proteínas, las que son parte constitutiva de todas las células vivas. El nitrógeno es elemento constituyente de la clorofila e interviene en su síntesis, por lo que está involucrado en la fotosíntesis (captación y eficiencia de uso de la radiación). Sin nitrógeno y clorofila, el cultivo no utilizará la luz del sol como fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones esenciales para la planta como la absorción de nutrientes. Mejoras en la disponibilidad no sólo permiten el logro de altos rendimientos sino también de mayores concentraciones de proteínas en los forrajes y granos producidos (Fernández-Canigia, 2003).

El nitrógeno, al igual que todos los elementos biológicamente importantes, pasa por cambios cíclicos, de modo que puede ser utilizado y a la vez repuesto dentro de lo que se conoce como ciclo biogeoquímico del nitrógeno, por medio del cual un átomo de nitrógeno pasa del estado orgánico al inorgánico y viceversa, en una secuencia de procesos que



implican actividades de organismos vivos y conversiones no biológicas (Rodríguez Barrueco *et al.*, 1984).

Dentro de los ciclos biogeoquímicos, el del nitrógeno (Figura 1) es especialmente complicado por encontrarse, en condiciones naturales, en distintos estados de oxidación (de +5 a -3) formando compuestos estables (Olivares, 2008).

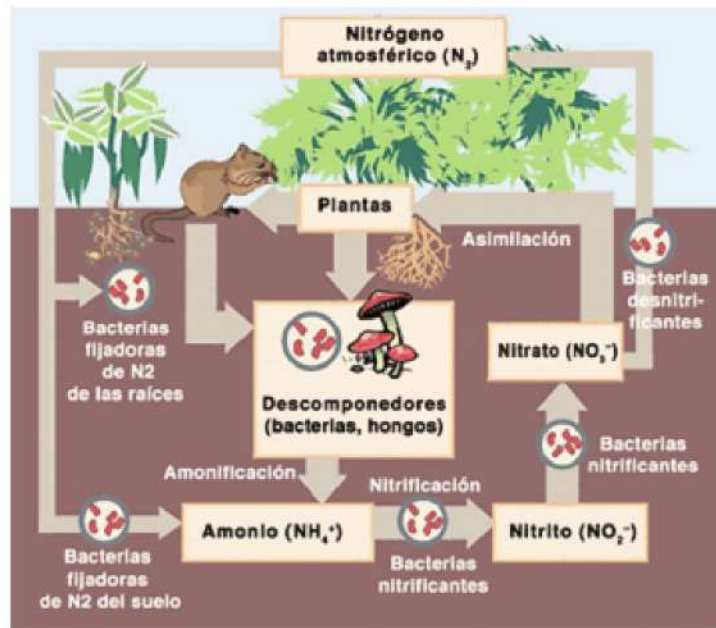


Figura 1: Ciclo del nitrógeno. http://ecologia118.blogspot.com/2011_05_01_archive.html

La ciencia ha demostrado que la vía normal de ingreso de nitrógeno es del suelo hacia las plantas, y para que pueda ser absorbido por éstas, se debe encontrar mineralizado, como nitrato y amonio. Sin embargo, debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización del nitrógeno, para dejarlo disponible para las plantas (Urzúa, 2000b).

El nitrógeno ingresa al suelo a través de las lluvias, de los abonos orgánicos e inorgánicos y de la fijación biológica. Los compuestos orgánicos (excreciones animales, rastros, o abonos orgánicos) son degradados por los organismos del suelo produciendo la mineralización del nitrógeno que los compone (conversión del nitrógeno orgánico en nitrógeno mineral) formando amonio (amonificación), nitritos y nitratos (nitrificación).

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es la transformación del nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio a partir de procesos en los que intervienen microorganismos de vida libre o en simbiosis con plantas superiores. Parte de los compuestos de nitrógeno inorgánico del suelo se inmovilizan en células bacterianas y fúngicas (conversión del nitrógeno mineral en



nitrógeno orgánico) o son utilizados por bacterias como fuente de oxígeno (desnitrificación) reduciéndose los nitratos a N_2 que se pierde hacia la atmósfera. Las plantas también absorben formas minerales de nitrógeno, que luego de ser incorporadas en su composición, son exportadas en los productos de cosecha o forrajeros. Los excesos hídricos favorecen a otros procesos de pérdida del nitrógeno del suelo: lavado hacia capas profundas fuera del alcance de las raíces de las plantas y escurrimiento superficial (Fernandez-Canigia, 2003).

Todos los procesos del ciclo actúan de forma que en condiciones normales las diferentes actividades microbianas están equilibradas y las pérdidas son compensadas por las ganancias. La masiva utilización de fertilizantes nitrogenados está actuando sobre el ciclo con claros resultados negativos.

La FBN, en cuanto al aporte de nitrógeno a las plantas, presenta un gran interés debido a que contribuye globalmente de forma importante al suministro de este elemento requerido por las mismas. Hoy día la FBN cobra más valor, si cabe, dentro del contexto de la agricultura sustentable, ya que puede evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio (Olivares, 2008).

1.2. Agricultura sustentable

La agricultura hace uso de recursos naturales, como el agua y el suelo, para proveer al ser humano de servicios, tales como alimento y ropa. Es una de las actividades antropogénicas más importantes, y su correcta y eficiente realización es crítica para el desarrollo socioeconómico de un país, por lo que constituye un aspecto clave en el proceso del desarrollo sustentable. Teniendo esto en cuenta, se crea el concepto de agricultura sustentable, que es aquella en la que el sistema mismo genera los recursos necesarios para mantenerse a largo plazo. En otras palabras, es la actividad que permite tener una producción de alimentos y de fibras vegetales, sin poner en riesgo la conservación de recursos naturales ni la diversidad biológica y cultural para las futuras generaciones. Es decir, la agricultura sustentable debe abarcar las dimensiones económicas, sociales y ambientales (www.micromacro.tv).

El procedimiento Haber-Bosch para la obtención de amoníaco, introducido en el primer cuarto de siglo, supuso la disponibilidad de fertilizante nitrogenado sintético, alternativo al natural y a un precio relativamente bajo. Su uso masivo se manifestó, de forma evidente, en los cultivos básicos en la llamada revolución verde cuando se combinó su aplicación



con la utilización de variedades adecuadas de plantas. Sin embargo, su utilización tiene limitaciones impuestas, de un lado, por su costo de producción dependiente de las vicisitudes de los combustibles fósiles y, de otro, por su contribución al deterioro del medio por la contaminación de las aguas superficiales y acuíferos, que en muchos casos llega a ser alarmante (Olivares, 2008). Este uso masivo de fertilizantes nitrogenados ha generado toda una serie de problemas de contaminación ambiental, que junto a una creciente preocupación social por la conservación del medio ambiente han provocado que el objetivo de conseguir una agricultura sostenible sea más atractivo que el conseguir incrementos de productividad. En el contexto de un desarrollo sustentable y, particularmente de la agricultura sustentable, cualquier acción encaminada a disminuir el uso de fertilizante nitrogenado cobra una gran importancia. De ahí el interés por sistemas agrícolas que acumulan alto contenido de nitrógeno, entre los cuales, la simbiosis entre plantas leguminosas y rizobios tiene cuantitativamente el mayor potencial y el mayor impacto en agricultura y en el ciclo del nitrógeno.

Todo ello conduce a una “Nueva Agricultura” sostenible con capacidad de mantenerse o prolongarse en la agricultura del futuro (de Felipe Antón, 2002). Esto se logrará, en gran medida favoreciendo la FBN, lo que permite una excelente nutrición nitrogenada, y ahorros importantes en fertilizantes nitrogenados con evidentes ventajas económicas. La Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) resulta ser entonces, una tecnología limpia de producción y una forma concreta de proteger el medio ambiente (Montañez et al., 2004; Urzúa, 2005).

1.3. Las leguminosas

Las leguminosas son hierbas, arbustos o árboles, anuales o perennes, que forma una de las mayores familias de angiospermas; con cerca de 700 géneros y 18.000 especies, distribuidas por todo el mundo, incluyendo plantas acuáticas, trepadoras y fuertemente xerófitas, aunque son más frecuentes en las regiones tropicales y sub-tropicales.

En la actualidad, muchas de las especies de la familia *Leguminosae* tienen una gran importancia económica. Algunas son importantes especies forrajeras que se pueden cultivar bien en terrenos pobres en nitrógeno o bien emplearse también como abonos verdes, es el caso de los tréboles (*Trifolium*), la alfalfa (*Medicago sativa*), entre otros (Sitter et al., 2004).

Una característica importante de destacar en las leguminosas es su capacidad de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno formando unos órganos en las raíces



llamados nódulos, lo que permite que sean capaces de crecer en terrenos con baja humedad, pobres en nitrógeno o calcáreos, siendo las primeras colonizadoras tras la degradación de ecosistemas, incrementando la fertilidad de los suelos.

El hecho de que este cultivo de leguminosas enriquece el terreno es conocido desde hace mucho tiempo, habiéndose derivado del mismo la técnica de alternar cultivos de año a año siguiendo rotaciones en las que obligadamente interviene una leguminosa. Este proceso de fijación de nitrógeno en el suelo es una consecuencia de un proceso simbiótico entre las plantas y ciertas bacterias del género *Rhizobium* (Cerdeja Castillo, 2008).

Son utilizadas en distintas formas en la agricultura y la silvicultura: como alimentación, forraje, leña y fertilizante (Giller et al., 1994). Un aspecto común de todas las leguminosas, independientemente de si son capaces de fijar nitrógeno o no, es la alta concentración del mismo en sus tejidos (Mc Key, 1994). Por lo cual su principal uso, como fuente importante de proteínas para humanos y animales, depende de la adquisición de nitrógeno y de su acumulación en altas concentraciones en el follaje y en las semillas (Giller et al., 1994).

1.4. Importancia y características del cultivo de alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa L.*) es la forrajera más importante de la Argentina, donde se cultivan alrededor de 5 millones de hectáreas, ubicadas principalmente en la región pampeana. Su gran adaptabilidad a condiciones ambientales y sus elevados rendimientos de forraje de excelente calidad, la han convertido en la base de la producción de carne y leche (Basigalup and Rossanigo, 2007). Comparada con otras forrajeras, la alfalfa tiene, además de su elevado potencial de rendimiento y de la estabilidad de su producción, un mayor contenido de proteínas, sales minerales y vitaminas (Conrad and Klopfenstein, 1988). Todas estas características la llevan a tener requerimientos nutricionales que se consideran de los más altos entre numerosos cultivos, superando en sus necesidades de N, P, K, Mg y S al trigo, maíz, sorgo, soja y girasol (Culot, 1986). En la mayoría de las regiones de Argentina la adopción de la alfalfa en los sistemas ganaderos, y en particular los lecheros, surge como consecuencia de sus altos rendimientos de materia seca, su elevada calidad desde el punto de vista de digestibilidad y contenido proteico, su utilización durante todo el año y su bajo costo por kilo de materia seca. Todo esto la convierte en el alimento más adecuado y barato para la alimentación de los ruminantes (Comerón and Romero, 2007). Sin embargo, la dimensión real de su valor surge cuando se considera, además, el rol de esta leguminosa en la sustentabilidad de los sistemas de



producción, por su función en la recuperación de la fertilidad y estabilidad edáfica (Crookston, 1984; Panigatti, 1992).

En cuanto a su botánica, se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto. La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada, con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos. Los mismos son delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega (Infoagro, 2005). Las hojas son trifoliadas (Figura 2), aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas, los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados.



Figura 2: Hojas trifoliadas de *Medicago sativa*. <http://naturvida.blogspot.com/2008/02/la-alfalfa-medicago-sativa.html>

La flor característica de la subfamilia *Papilionoidea*, es de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas del primordio foliar (Figura 3).



Figura 3: Inflorescencias de *Medicago sativa*. <http://terapiasnaturalesmaria.blogspot.com>



Por último, su fruto, es una legumbre indehisciente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas de 1-2 mm de longitud por 1-2 mm de ancho y 1 mm de espesor. (Rodríguez and Spada, 2007).

1.4.1. Requerimientos edafoclimáticos: La radiación solar es un factor muy importante que influye positivamente en el cultivo de la alfalfa, pues el número de horas de radiación solar aumenta a medida que disminuye la latitud de la región. Otro factor importante es la temperatura, la semilla germina a temperaturas de 2-3°C siempre que las demás condiciones ambientales lo permitan; a medida que se incrementa la temperatura la germinación es más rápida hasta alcanzar un óptimo a los 28-30°C. Temperaturas superiores a 38°C resultan letales para las plántulas. Las bajas temperaturas también afectan las plantas, las cuales al comenzar el invierno, detienen su crecimiento hasta la llegada de la primavera cuando comienzan a rebrotar, aunque existen variedades de alfalfa que toleran temperaturas muy bajas (-10°C) (Infoagro, 2005). Para una alta producción de forraje, la alfalfa requiere suelos de reacción neutra (pH 6,5 a 7,5). En muchos casos, la acidez puede cubrirse con enmiendas cálcicas (Basigalup and Rossanigo, 2007). Otro factor a considerar es la salinidad, la alfalfa es muy sensible a ésta, pues si bien tolera suelos de hasta 8 mmho/cm, esto lo hace a costa de una reducción del 50% de la productividad (Aragón et al., 1986; Moschetti et al, 2007). En cuanto al tipo de suelo, requiere suelos profundos y bien drenados, aunque se cultiva en una amplia variabilidad de éstos. La falta de drenaje y el exceso de humedad en el perfil son considerados factores adversos, dado que no sólo favorecen el excesivo desarrollo vegetativo, sino que también pueden producir la muerte de las plantas por asfíxia radicular y/o desarrollos de enfermedades en raíz (Cabral et al, 1985). Con respecto a los requerimientos hídricos, es morfológica y fisiológicamente apta para resistir a las sequías, pero no es resistente al anegamiento. Esta tolerancia es intrínseca y a ella se suma el efecto benéfico del profundo sistema radical que, en caso de necesidad, permite a la planta explorar para sus requerimientos hídricos capas profundas del subsuelo. La sensibilidad al anegamiento se da sobre todo en aguas estancadas y es debido a la falta de oxigenación a nivel radicular. La magnitud de los daños que puede sufrir debido a esta causa depende tanto del estado fisiológico de la planta como de la temperatura (Aragón et al., 1986).



1.4.2. Requerimientos Nutricionales: Para sus requerimientos nutricionales, la alfalfa depende principalmente de la parte superficial del suelo, pues allí se localiza la mayor parte de la actividad absorbente del aparato radical (Aragón et al., 1986). Bajo cualquier sistema de aprovechamiento hay una demanda continua de nutrientes durante todo el ciclo de producción (Culot, 1986). Esta demanda no es idéntica para todas las variedades. En términos generales, la intensidad de la misma se corresponde con el ritmo de crecimiento, pero es mayor al iniciarse el rebrote, mostrando los tejidos jóvenes una mayor concentración de nutrientes (Smith, 1969). En cuanto a el requerimiento de fósforo es muy importante en el año de establecimiento del cultivo, pues asegura el desarrollo radicular; el de potasio es muy importante, la alfalfa requiere grandes cantidades de este elemento, pues de él depende la resistencia al frío, sequía y almacenamiento de reservas; también hay que tener en cuenta la carencia de boro ya que ocasiona la detención del crecimiento, amarillamiento de las hojas terminales y crecimiento entre nudos escaso, y la de molibdeno, que afecta al funcionamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Infoagro, 2005). Pero el principal rasgo nutricional de la alfalfa es el alto contenido de nitrógeno total que, casi exclusivamente en forma de proteínas y aminas se ubica principalmente en las hojas. Normalmente, la alfalfa satisface gran parte de sus requerimientos nitrogenados por medio de la FBN, a través de su relación simbiótica con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* (Racca et. al., 2001). Esta capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis la convierte también en un importante componente de la sustentabilidad de los sistemas productivos (Basigalup and Rossanigo, 2007).

1.5. Biodiversidad bacteriana y taxonomía

Se sabe muy poco sobre la biodiversidad de los microorganismos que constituyen los sistemas naturales. La imposibilidad de cultivar la gran mayoría de los microorganismos que existen en la naturaleza mediante las técnicas estándar ha constituido una de las principales limitaciones en el estudio de la diversidad microbiana. Sin embargo, las nuevas técnicas de identificación y clasificación moleculares han permitido superar muchas de estas barreras, haciendo posible el estudio ecológico de las comunidades microbianas (Stahl, 1995).

La taxonomía se define como la ciencia que se ocupa de los principios, métodos y fines de la clasificación biológica. La clasificación de la gran diversidad de organismos vivos



existentes en el planeta en grupos establecidos en función de sus semejanzas es imprescindible para poder trabajar con ellos y comunicarnos de forma eficiente, organizar los conocimientos existentes sobre los mismos, y hacer predicciones y formular hipótesis para nuevas investigaciones (Cerdeja Castillo, 2008).

La taxonomía bacteriana se divide en tres partes independientes pero interrelacionadas: clasificación, nomenclatura e identificación. La clasificación es la estructuración de los microorganismos en grupos (taxones), en función de sus similitudes o parentesco evolutivo. La nomenclatura es la asignación de nombres a los grupos taxonómicos de acuerdo con las reglas internacionales (International Code of Nomenclature of Bacteria) (Sneath and Socal, 1973). La identificación es el lado práctico de la taxonomía, consiste en determinar la identidad de un aislado como miembro de un taxón establecido.

1.5.1. La importancia del gen ARNr 16S en taxonomía bacteriana: El desarrollo de herramientas de identificación basadas en la detección de secuencias específicas para grupos taxonómicos logró un punto de inflexión en la determinación de la evolución filogenia de las procariontas. Los genes ribosómicos son los más estudiados y los más abundantes en las bases de datos de secuencias debido a su importancia taxonómica (Cerdeja Castillo, 2008). La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio and Mendoza, 2004). El operón ribosómico que se transcribe en un pre-ARN incluye los siguientes componentes en el orden (5'→3'): ARNr 16S, ARNr 23S y el ARN 5S. Se comenzó estudiando la molécula ARNr 5S y, tras los estudios de Woese and Olsen (1986) sobre evolución de microorganismos, se empezó a utilizar el gen ARNr 16S y el gen ARNr 23S para el estudio de la taxonomía y filogenia bacteriana. Sin embargo el ARNr 5S se ve limitado por su pequeño tamaño a la hora de establecer relaciones filogenéticas (120 nucleótidos), mientras que los 3000 pares de bases del ARNr 23S dificultan su manejo. Así la molécula intermedia (1500 pares de bases) que resulta más adecuada como cronómetro evolutivo es el ARNr 16S. Esta molécula presenta una serie de características adecuadas para esta función: gran cantidad de ARN de las células, amplificación en una sola etapa, funcionalidad constante, un rango muy conservado y gran disponibilidad de bases de datos para el análisis comparativo de la



secuencia (Cerdeja Castillo, 2008). Una de las técnicas utilizadas para la secuenciación de 16S se basa en amplificar los genes de ARNr, es decir un trozo de DNA que codifica el ARNr por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando como moldes cebadores sintéticos complementarios de secuencias conservadas del ARN. La amplificación mediante la PCR del ADN que codifica el ARNr requiere menos material celular que la secuenciación directa de ARNr y es más rápida. El ADN amplificado se secuencia luego directamente. La última etapa será la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos (Rodicio and Mendoza, 2004). Actualmente la taxonomía de los rizobios se desarrolla rápidamente y durante los últimos 20 años se han descrito muchas especies y géneros nuevos. La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico (Gillis et al., 2001) que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras. El uso del enfoque polifásico ha conferido a la taxonomía una base más natural y más confiable. El análisis de secuencias de los genes 16S ARNr se ha usado como uno de los principales criterios para la descripción de los géneros y las especies de rizobios. Se considera que las cepas cuyas secuencias del gen de 16S ARNr son similares en un 97% o más, probablemente pertenecen a la misma especie. No obstante, cuando las secuencias de 16S ARNr son muy parecidas, no sirven para distinguir especies cercanamente relacionadas y esto ocurre debido a que este gen está muy conservado entre todos los organismos vivos. En estos casos, es necesario incluir otros métodos como electroforesis (SDS-PAGE) de proteínas, electroforesis de enzimas metabólicas (MLEE) y otros, para definir todas las especies descritas. El análisis de proteínas totales en electroforesis en una dimensión permite agrupar a los rizobios con base en las similitudes de los patrones (Wang et al., 2001). La distinta movilidad electroforética de las enzimas nativas es un indicador de polimorfismo en los genes codificantes de las mismas (Selander et al., 1986). En esta técnica, las proteínas son separadas mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes y su actividad enzimática es revelada posteriormente mediante tinciones apropiadas, obteniéndose así perfiles de isoenzimas.

- 1.5.2. Caracterización fenotípica: Los métodos fenotípicos comprenden aquellos métodos que no están directamente relacionados con los ácidos nucleicos. Mientras que los datos genotípicos son utilizados para la localización de un determinado taxón en un



árbol filogenético, así como para el diseño general de un sistema taxonómico, los datos fenotípicos generan una clasificación práctica que permite la identificación de un determinado taxón. Las pruebas fenotípicas clásicas estudian las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la bacteria. El estudio morfológico incluye una dimensión celular de aspectos como forma, presencia de flagelos, tinción de Gram, etc., y una dimensión colonial, color, brillo, tamaño, etc. Los estudios fisiológicos y bioquímicos aportan información sobre el crecimiento del microorganismo sometido a diferentes condiciones de temperatura, valores de pH, concentración de sales, presencia de determinadas sustancias químicas como agentes microbianos; así como presencia o actividad de diversas enzimas, y capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno (Cerdeja Castillo, 2008).

1.6. Caracterización de microorganismos

En la rizósfera, interactuando con los vegetales se encuentra un gran número de microorganismos tales como bacterias, hongos, actinomicetes, algas y protozoos; de éstos las bacterias son las más abundantes (Paul and Clark, 1989; Basham and Levanony, 1990; Lynch, 1990). Estas bacterias se denominan rizobacterias, las mismas pueden tener efectos deletéreos, neutros o beneficiosos sobre la planta; en este último caso, algunas pueden establecer una relación simbiótica y otras ejercer su acción benéfica sin asociación (vida libre), mediante la liberación de distintos tipos de metabolitos que actúan promoviendo el desarrollo vegetal (PGPR) (Kloepper, 1996). Dentro de las que establecen una asociación simbiótica podemos encontrar las bacterias fijadoras de nitrógeno noduladoras de leguminosas denominadas colectivamente rizobios (Frioni, 1999).

Los rizobios tienen morfología normalmente bacilar y no son formadores de esporas. El aspecto de las colonias depende del medio de cultivo y de la especie, las colonias tienen un aspecto mucilaginoso debido a la presencia de polisacáridos extracelulares y su forma varía desde plana a convexa, su color puede ser blanco opaco por gomosa, a blanco lechosa traslucida, según la cantidad de polisacáridos. Son aerobios, sin embargo, son capaces de crecer a una tensión de oxígeno menor de 0,001 atm (Frioni, 1999; Azcón – Bieto and Talón, 2000).

Hasta la fecha se han descrito más de 40 especies, divididas en 6 géneros, para las bacterias que forman nódulos en leguminosas: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Lodeiro et al., 2005).



En la definición taxonómica de estas bacterias se incluyen características distintivas tal como la descripción del rango de huéspedes, las características del crecimiento en determinados medios de cultivo, la forma de fijación de nitrógeno. Así, algunos rizobios tienen un rango más amplio de plantas huéspedes que otras, *B. japonicum* y *S. fredii* son capaces de nodular un gran número de leguminosas, mientras que *S. meliloti* ha sido aislado principalmente de las plantas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* son bacterias que crecen rápido (colonias mayores a 2mm después de 3 a 5 días de incubación) y producen ácido en medio LMA (Wang and Romero-Martinez, 2005).

1.7. Fijación Biológica de Nitrógeno

Supuestas las necesidades de agua cubiertas, el nitrógeno es el factor limitante más importante para el desarrollo de las plantas (Olivares, 2008), ya que forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, necesiéndose principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento (Urzúa, 2000b).

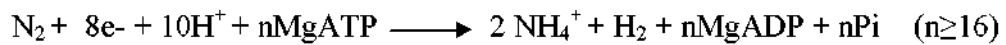
En la atmósfera el nitrógeno ocupa aproximadamente el 80%, en la forma molecular, sin embargo, debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que hace a la molécula casi inerte, no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetes. Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio o nitrato. El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Parsons, 2004).

Este proceso microbiano es llevado a cabo por organismos procarióticos en vida libre o en simbiosis (en asociación mutualista con las plantas), denominándose en este último caso, Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) (Olivares, 2008).

Las leguminosas fijan nitrógeno del aire mediante simbiosis con bacterias del suelo de las familias: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Bradyrhizobiaceae* (géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*) en unas estructuras llamadas nódulos (de Felipe Anton, 2002). Los nódulos son órganos vegetales que se producen en la raíz de la planta huésped al ingresar los rizobios, son pequeñas tumoraciones dentro de las que las bacterias se transforman en bacteroides, los cuales llevan a cabo la fijación de nitrógeno (Fernández Canigia, 2003).



La FBN es mediada por el complejo enzimático nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ bajo la reacción general:



Ésta requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones como mínimo de un mol de H_2 producido por mol de N_2 reducido (Halbleib and Ludden, 2000, Mayz-Figueroa, 2004).

Antes de llegar a la consecución del nódulo, tanto la planta como la bacteria han de seguir un protocolo, de tal manera que, si cualquiera de ellos incumple alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo abortará. Dicho protocolo se puede resumir en:

- Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo.
- Activación del ciclo celular en células del córtex e iniciación del nuevo órgano en la planta.
- Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados.
- Diferenciación de la bacteria a forma especializada.

1.7.1. Señalización entre la planta y *Rhizobium*: Se puede definir como rizosfera a la porción de suelo íntimamente asociada a las raíces de plantas en crecimiento con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo y con una estructura extraordinariamente compleja en la que inciden gran número de variables y en la que se establecen multitud de relaciones biológicas. De hecho, las características físico-químicas de dicha región hacen de ella un lugar muy adecuado para el crecimiento de microorganismos (Bazin et al., 1990). Entre el 10% y el 30% de los fotosintatos de la planta son secretados en los exudados radiculares (Bowen and Rovira, 1999) abarcando carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos. Entre dichos compuestos se encuentran los flavonoides (derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona), cuya composición va a variar dependiendo de la especie, y que además de ser metabolizados, desencadenan una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes. En el caso de la alfalfa la semilla produce luteolina y crisoeriol, mientras que la raíz produce liquiritigenina, 7,4'-dihydroxiflavona y 4,4'-dihydroxi2'-metoxichalcona (Harsh et al, 2002). Así,



algunos de estos flavonoides a concentración micromolar, activan en los rizobios los genes responsables de la nodulación (genes *nod*) (Wang et al., 2001; Azcón – Bieto and Talón, 2000). Todos los factores Nod (conocidos también por su composición como lipoquitooligosacáridos -LCOs-) caracterizados tienen una estructura básica común que consiste en un oligómero de N-acetil-D-glucosamina que lleva unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor (Azcón – Bieto and Talón, 2000). Por su parte los rizobios secretan polisacáridos que se unen a ciertas proteínas de la planta (lecitinas), encontradas en los extremos de los pelos radicales sobre los que se adhieren. Cada rizobio expresa constitutivamente un grupo de factores de transcripción, conocidos como NodD cuyo número y regulación va a depender de la especie de rizobio. En *Sinorhizobium meliloti* hay tres copias de NodD, siendo dos de ellas, NodD1 y NodD2, activadas por flavonoides, mientras que NodD3 es activada por SyrM (Symbiotic Regulator), induce la síntesis de exopolisacárido (EPS) independientemente de la presencia de flavonoides (Swanson et al., 1993). NodD se encuentra normalmente unida a unas regiones de ADN de 49 pb conocidas como “nod boxes”, que se encuentran en las regiones promotoras de muchos genes implicados en la nodulación, sólo se produce la inducción de estos genes cuando NodD se une a sus activadores (Schultze and Kondorosi, 1998). Entre los genes activados por NodD se encuentran los genes *nod*, que codifican todo un paquete de enzimas encargadas de la producción de los factores Nod. Éstos están compuestos por un esqueleto de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β -1,4 sintetizado por NodA, NodB y NodC, que presenta una serie de modificaciones dependiendo de la estirpe de *Rhizobium* y que van a otorgar cierta especificidad al proceso de nodulación (Spaink, 2000). La Figura 4 presenta esquemáticamente este intercambio de señales entre los dos componentes de la simbiosis. La planta libera flavonoides, de distinta naturaleza según la especie de que se trate, que se unen al producto del gen *nodD* que se activa de esta forma para inducir la transcripción del resto de los genes *nod* que conlleva la síntesis del LCO correspondiente (Givares, 2008).



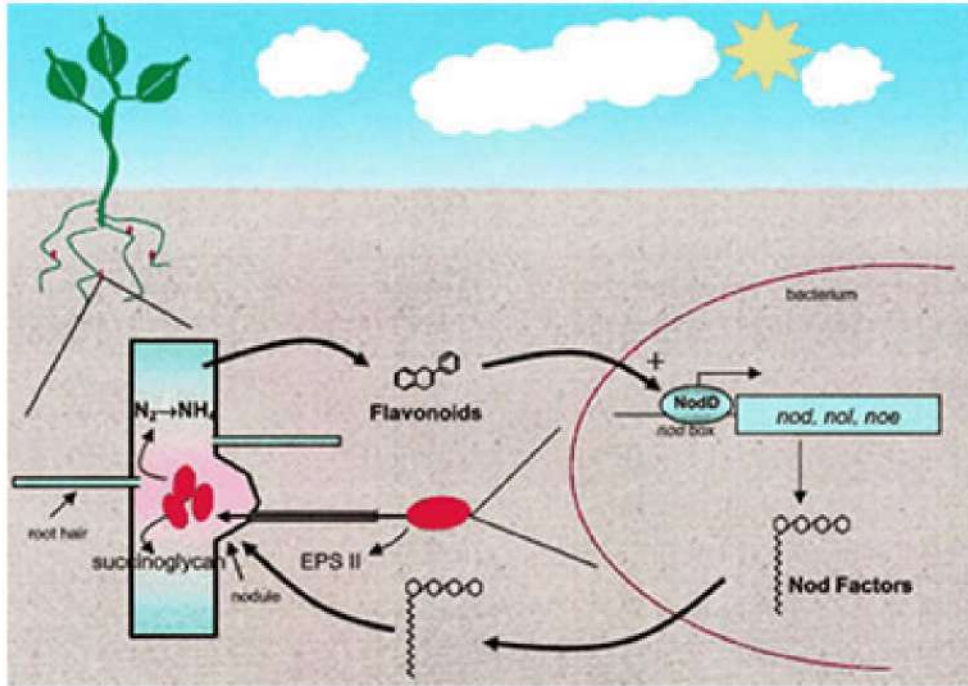


Figura 4: Representación esquemática del intercambio de señales entre la planta y el rizobio. <http://www.utdallas.edu/nsm/images/departments/biology/misc/gonzalez-image.jpg>

Aunque todos los LCOs (Figura 5) son de naturaleza similar, difieren en los radicales (representados por R) del esqueleto de quitosina (3 a 5 N-acetil glucosaminas) que son propios para cada especie bacteriana. De esta forma y simplificando, a cada flavonoide corresponde un LCO concreto lo que determina la especificidad de la simbiosis (*S. meliloti*-alfalfa, *B. japonicum*-soja, etc.). Estos restos ligados a la quitosina pueden ser acetilo, fucosa, sulfato, etc., y siempre en el extremo no reductor (R 1) una cadena alifática de 12 a 18 carbonos más o menos insaturada (Olivares, 2008).

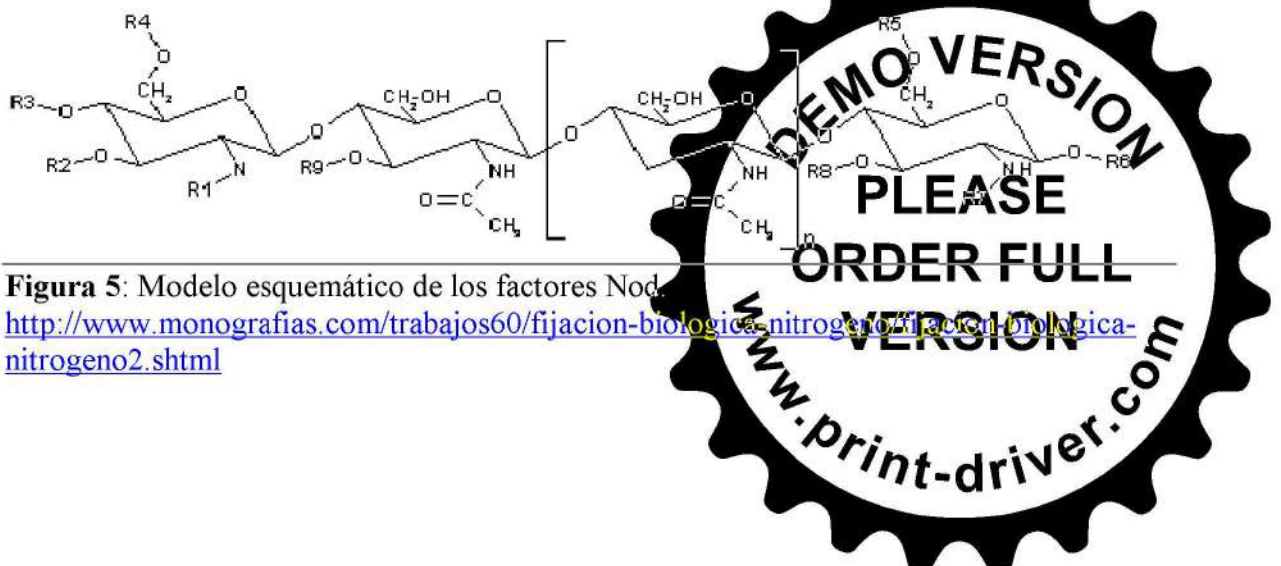


Figura 5: Modelo esquemático de los factores Nod. <http://www.monografias.com/trabajos60/fijacion-biologica-nitrogeno/fijacion-biologica-nitrogeno2.shtml>

1.7.2. Invasión y formación del canal de infección: Los factores Nod son los que determinan modificaciones en los pelos radicales, la formación del canal de infección y la división de células del córtex, que conducen a la formación del nódulo en cuyo interior, perfectamente estructurado, se va a llevar a cabo la fijación (Olivares, 2008). Estos factores provocan que el ápice del pelo radicular se curve sobre sí mismo, formando una especie de “cuchara” sobre la que pueden asentarse y multiplicarse las bacterias. Ahora las bacterias inician su penetración en el pelo radicular y cuando lo consiguen, inducen la formación de un canal en el interior del pelo llamado canal de infección (Figura 6). Una vez que las bacterias alcanzan las células de la raíz, los factores Nod provocan el crecimiento y multiplicación de estas células, dando lugar a la formación del nódulo.

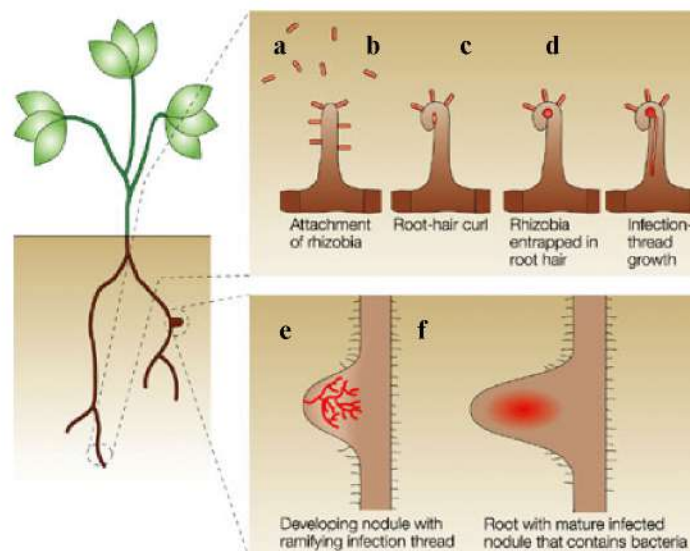


Figura 6: Esquema de la formación del nódulo en leguminosas. **a:** Adhesión de los rizobios al pelo radicular. **b:** Enrollamiento del ápice del pelo radicular. **c:** Inducción de la formación del canal de infección. **d:** Canal de infección formado. **e:** Infección de los espacios intercelulares de la raíz e inducción de la formación del nódulo. **f:** Nódulo formado (Oldroyd and Downie, 2004)

Cuando las bacterias alcanzan los nódulos en formación se produce la invasión de los mismos por parte de los rizobios que provienen del hilo de infección y la diferenciación de éstos en bacteroides capaces de fijar nitrógeno. Los rizobios que se descargan del hilo de infección invaden el citoplasma de ciertas células del nódulo, que se conocen como células infectadas. En estas células se observa que el citoplasma adquiere una posición central, gracias a una reorganización de los microtúbulos y el citoesqueleto. A medida que los rizobios ingresan al citoplasma de las células infectadas son envueltos por una membrana de origen vegetal, llamada membrana peribacteroidal. Una vez dentro de ésta, los rizobios pueden dividirse, algunas veces, y luego inician el proceso de diferenciación en bacteroides, que



consiste en general en un incremento de tamaño de las bacterias, que puede llegar a ser de diez veces el tamaño original. Los grupos de bacteroides así diferenciados y envueltos en la membrana peribacteroidal forman cuerpos distinguibles en el citoplasma de las células infectadas, dichos cuerpos reciben el nombre de simbiosomas y es en ellos donde se va a producir la fijación de nitrógeno (Lodeiro et al., 2003).

1.7.3. Activación del ciclo celular e iniciación del nuevo órgano en la planta:

1.7.3.1. Estructura de los nódulos: El tipo y estructura nodular es dependiente de la planta hospedera, así se tienen:

- Nódulos determinados: en los cuales la actividad meristemática cesa temprano en su formación y su aspecto final resulta del alargamiento de las células, este tipo de desarrollo origina nódulos esféricos o globosos, que pueden organizarse alrededor de la raíz para formar los denominados nódulos en collar.
- Nódulos indeterminados: los cuales presentan un meristema persistente, que pueden producir nódulos ramificados, puesto que constantemente se añaden nuevas células a la parte distal del nódulo. Este tipo de desarrollo da lugar a nódulos elongados o cilíndricos o ramificados (Hirsch, 1992; Mayz, 1997)

1.7.3.2. Desarrollo del nódulo indeterminado: Los nódulos indeterminados se dan en plantas como las del género *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*. En este tipo de nódulos son las células del córtex interior las que se reintroducen en el ciclo celular, además, tienen la característica de poseer un meristema permanente, lo que les otorga una forma cilíndrica con simetría radial en la organización de los tejidos. Así en la zona más exterior se hallan las células vacuoladas del córtex, y hacia el interior se encuentran la endodermis y el parénquima, en donde también aparecen los haces vasculares. Todo ello cubre una zona central en donde el rizobio se alberga y realiza la fijación de nitrógeno. Se ha comprobado que en plantas crecidas en deficiencia de nitrógeno, a las pocas horas de la inoculación se induce la actividad mitótica en las células del córtex interior, debido a la actividad de los factores Nod (Calvert et al., 1984; Dudley et al., 1987). Las primeras divisiones se producen en el plano anticlinal originando el primordio del nódulo. Desde el inicio se establece una polaridad en el primordio; así se mantiene la actividad meristemática en el ápice, causando un crecimiento del primordio hacia el exterior, mientras que las capas celulares inferiores se van diferenciando (Foucher and Kondrosi, 2000). Este proceso de



invasión y diferenciación define diferentes regiones dentro del nódulo indeterminado (Hirsch, 1992) (Figura 7):

- Zona I o meristemática: en el ápice del nódulo, corresponde a la zona de células en proliferación.
- Zona II o de invasión: inmediatamente por debajo de la zona meristemática, es la región en la que se produce la invasión bacteriana a través de los canales de infección. Los rizobios en esta zona aún poseen una forma cilíndrica y pueden dividirse. Para diferenciarlos se los denomina bacteroides tipo 1.
- Zona de prefijación: en esta región las células vegetales, que aún no han finalizado su diferenciación, están repletas de bacteroides de tipo 2 más alargados que los de tipo 1.
- Interzona II y III: en esta franja, las células vegetales finalizan su proceso de diferenciación, encontrándose bacteroides de tipo 3 los que presentan su tamaño final definitivo.
- Zona III o de fijación: región totalmente diferenciada en la que se realiza la fijación de nitrógeno propiamente dicha.
- Zona IV o de senescencia: región en la base del nódulo, comprendida por células vegetales y bacterianas en degradación.

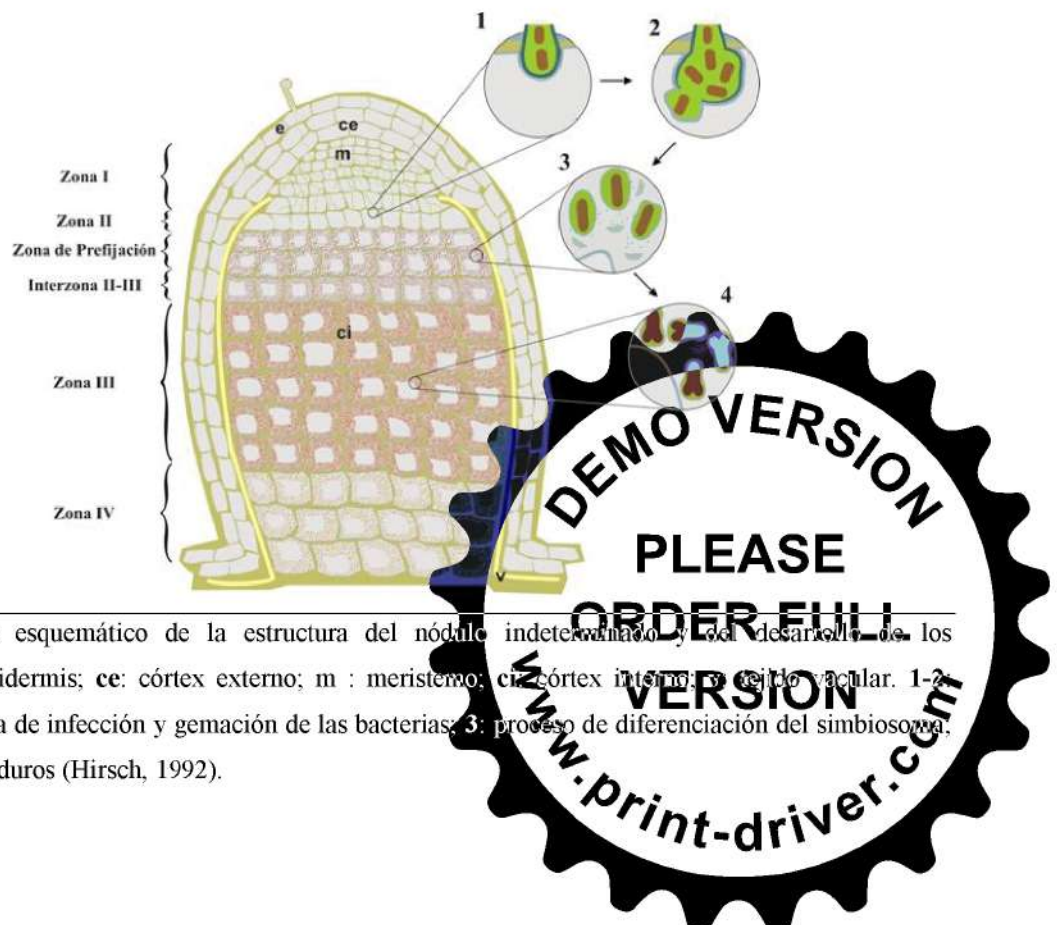


Figura 7: Modelo esquemático de la estructura del nódulo indeterminado y del desarrollo de los simbiosomas. e: epidermis; ce: córtex externo; m: meristemo; ci: córtex interno y tejido vascular. 1-2: formación de la gota de infección y gemación de las bacterias; 3: proceso de diferenciación del simbiosoma; 4: simbiosomas maduros (Hirsch, 1992).

1.7.4. Funcionamiento del nódulo: En la Figura 8 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de un nódulo. El nódulo comienza a fijar nitrógeno solo cuando termina el desarrollo de los bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Se sintetizan sustancias básicas para la fijación de nitrógeno, como la leghemoglobina, que regula el nivel de oxígeno dentro del nódulo, y la enzima nitrogenasa, responsable de la ruptura de la molécula de N_2 (Fernández-Canigia, 2003). La enzima nitrogenasa, que cataliza la reducción de N_2 a amonio está constituida por dos metaloproteínas, la ferroproteína o nitrogenasa reductasa, y la ferromolibdoproteína o nitrogenasa. Esta última contiene el cofactor conocido como FeMoco (cofactor hierro molibdeno) a nivel del cual ocurre la reducción del N_2 aunque se desconoce cómo y dónde se une al sustrato y es activado. La ferroproteína, activada por ATP-Mg, transfiere los electrones a la nitrogenasa que se utilizan en la reducción del N_2 y protones para dar amonio e hidrógeno. Esta reducción de protones es siempre concomitante con la producción de amonio. Supone una pérdida de eficiencia del proceso por la parte correspondiente de energía que consume (un 25%). Algunas especies y cepas microbianas están provistas de una actividad hidrogenasa que recicla en parte la energía perdida por la liberación de hidrógeno (Olivares, 2008).

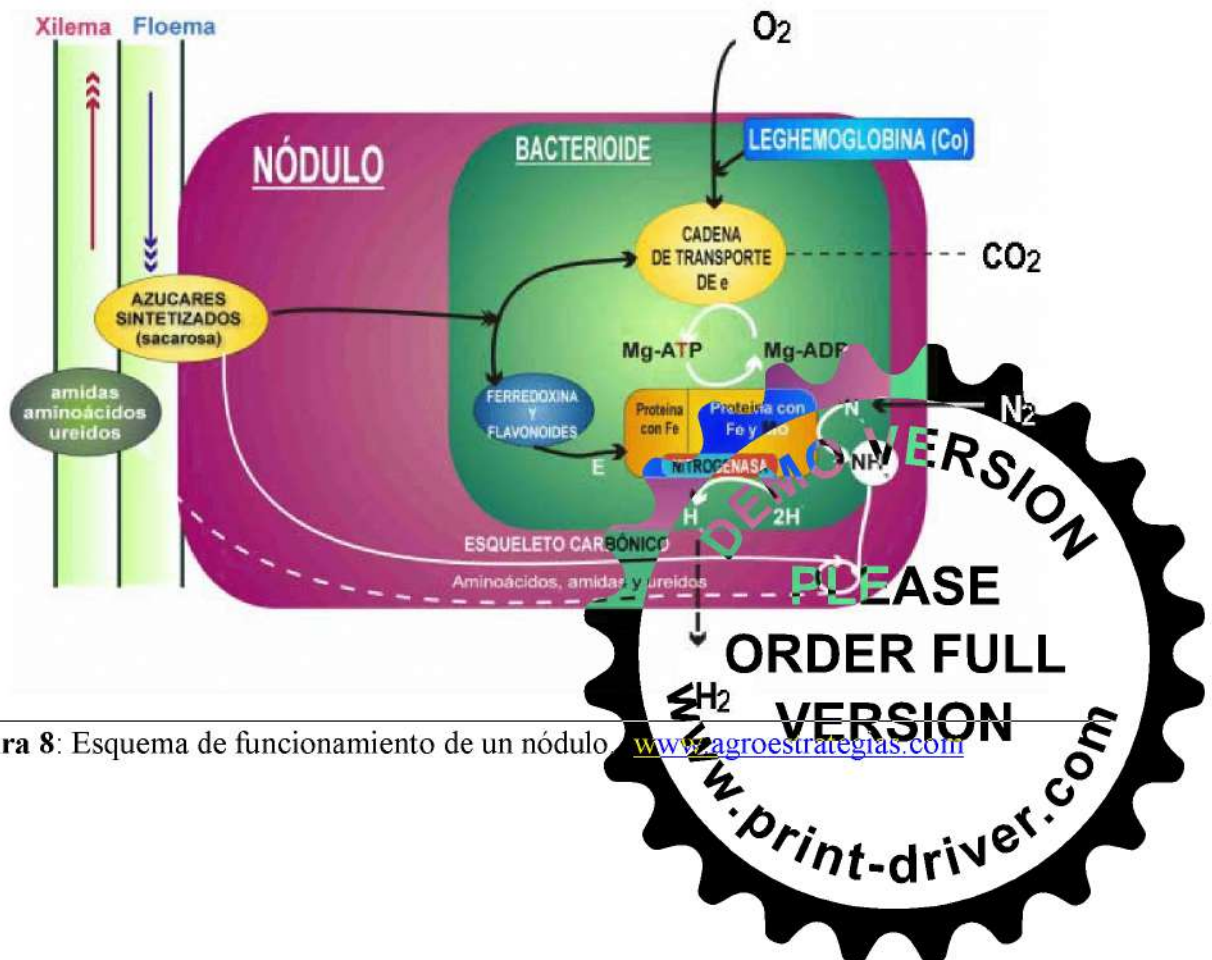


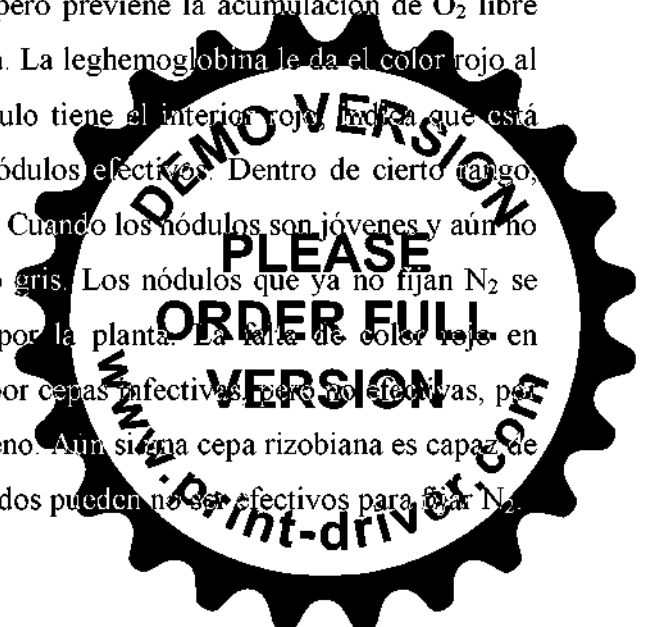
Figura 8: Esquema de funcionamiento de un nódulo www.agroestrategias.com

La actividad del complejo enzimático puede ser disminuida por el oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos (ej. alta tasa respiratoria, compartimentalizaciones o protección conformacional) que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de mantener la enzima funcionando (Ureta and Nordlund, 2002; Lee et al., 2004).

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la estructura del nódulo crea el ambiente microaerobio adecuado y la leghemoglobina facilita el transporte de oxígeno al bacteroide para soportar el metabolismo aerobio requerido para obtener la energía necesaria para la reducción del N_2 .

Al nódulo llega el fotosintetizado, en forma de sacarosa, la que servirá de fuente de energía, poder reductor y esqueleto carbonado para la incorporación del amonio resultante de la fijación, que será transportado por el xilema al resto de la planta en forma de amidas o ureidos, según el hospedador sea de origen templado o tropical. Aunque por mucho tiempo se ha creído que el amonio producido era transferido a la célula hospedadora por simple difusión pasiva, se ha descrito que tan pronto como el amonio aparece se convierte en alanina y de esta forma es transportado fuera de la bacteria. Se especula que esto impide la utilización del amonio por la propia bacteria. Una vez fuera este aminoácido es convertido rápidamente en glutamato para su transporte como amidas y/o ureidos al resto de la planta (Olivares, 2008).

- 1.7.5. Infektividad y efectividad: La actividad de la enzima nitrogenasa requiere baja concentración de oxígeno, que en los nódulos está regulada por la leghemoglobina. Esta es una proteína que contiene hierro con características similares a la hemoglobina animal, con capacidad para unirse al O_2 . Provee suficiente oxígeno para las funciones metabólicas del bacteroide, pero previene la acumulación de O_2 libre que destruiría la actividad de la nitrogenasa. La leghemoglobina le da el color rojo al interior de los nódulos activos. Si un nódulo tiene el interior rojo, indica que está fijando activamente N_2 y se consideran nódulos efectivos. Dentro de cierto rango, cuanto más rojo el nódulo, más efectivo es. Cuando los nódulos son jóvenes y aún no fijan N_2 , su coloración interna es blanca o gris. Los nódulos que ya no fijan N_2 se tornan verdes y pueden ser descartados por la planta. La falta de color rojo en nódulos maduros, indica que se formaron por cepas infectivas, pero no efectivas, por lo que nunca serán buenos fijadores nitrógeno. Aun si una cepa rizobiana es capaz de infectar una leguminosa, los nódulos formados pueden no ser efectivos para fijar N_2 .



- Cepas infectivas: son cepas con capacidad de infectar la leguminosa.
- Cepas efectivas: son cepas con capacidad de fijar N₂.

Tanto la efectividad, como la infectividad, están reguladas genéticamente, pero también están vinculadas con los factores ambientales que afecten a la planta (Fernández-Canigia, 2003).

1.8. Producción de inoculantes

Poco a poco las empresas del sector agrícola van interesándose por la producción de inoculantes de rizobios para transferir a la agricultura esta biotecnología. La sustitución de fertilizantes químicos por el uso de microorganismos que pueden cumplir una función similar, evita la contaminación ambiental que conlleva su utilización. El objetivo a perseguir es la utilización de inoculantes de rizobios mas eficientes y que compitan con las cepas nativas del suelo, adaptables de antemano a las condiciones ambientales, consiguiendo una mayor nodulación de las raíces (de Felipe Antón, 2002).

Esta simbiosis mutualista, que se puede tomar como paradigma de la aplicabilidad de la fijación de nitrógeno, es la que presenta mayor interés a la hora de hablar de biofertilización, término que se define como la utilización de microorganismos vivos para mejorar el crecimiento de las plantas, bien incidiendo sobre su nutrición a través de la puesta a su disposición de los nutrientes requeridos, bien actuando sobre su desarrollo por la producción de fitohormonas (Olivares, 2008).

A pesar de estas indiscutibles ventajas, los rizobios no siempre se encuentran en el suelo, están en poblaciones relativamente bajas o, si se encuentran presentes, muchas veces son de baja efectividad. Existe entonces la posibilidad de introducir artificialmente estos microorganismos en el suelo a través de la práctica de inoculación y favorecer así la simbiosis (Urzúa, 2005).

La inoculación es la tecnología desarrollada con la finalidad de incorporar rizobios altamente infectivos y altamente eficientes en las leguminosas de interés agropecuario. El proceso productivo comienza con una exhaustiva selección de las cepas de rizobios contemplando infectividad y efectividad en laboratorio, invernáculo y campo. (Perticari, 2006).

En el caso concreto de los rizobios, los inoculantes deben estar constituidos por cepas seleccionadas por su infectividad, competitividad (posibilidad para nodular en presencia de las cepas nativas), y capacidad para fijar nitrógeno en simbiosis con la especie vegetal correspondiente (Olivares, 2008). Además deben presentar las siguientes características:



- *Especificidad*: La inoculación de una leguminosa debe realizarse únicamente con la especie específica para esa leguminosa (por ej. *Sinorhizobium meliloti* para alfalfa y *Bradyrhizobium japonicum* para soja). No habrá nodulación si no se utiliza el inoculante correcto.
- *Número*: El número de bacterias vivas en el inoculante debe ser alto para competir con ventaja con las cepas naturalizadas del suelo. En nuestro país la legislación indica que un inoculante debe tener al menos 1×10^9 ufc.ml⁻¹ o g⁻¹ de inoculante al momento de la elaboración y no menos de 1×10^8 ufc.ml⁻¹ o g⁻¹ al vencimiento del inoculante (Fernández Canigia, 2003; Peticari, 2006; REDCAI, 2006).
- *Esterilidad*: La esterilidad es la ausencia de cualquier microorganismo. Cuando nos referimos a un inoculante, se habla de la esterilidad del soporte el cual se impregna con el rizobio específico. En nuestro país existen inoculantes sólidos formulados sobre turbas, caolines, dolomita, bentonitas e inoculantes líquidos oleosos o acuosos. Los microorganismos extraños compiten con los rizobios con ventaja, debido a que ya están adaptados a ese ambiente antes del agregado de los rizobios. Esta competencia deriva en un descenso en el número de rizobios vivos. En la actualidad gran parte de los inoculantes en base turba y todos los inoculantes acuosos son estériles, lo que elimina la competencia microbiana (Fernández Canigia, 2003).

De acuerdo con Somasegaran and Hoben (1994), las propiedades de un buen material soporte para la preparación de inoculantes sólidos son:

- no ser tóxico para el microorganismo utilizado,
- tener una buena capacidad absorción de la humedad,
- ser fácil de procesar y libre de materiales que formen grumos,
- fácil de esterilizar en autoclave o por irradiación gamma,
- disponible en cantidades adecuadas,
- de bajo costo,
- tener buena adherencia a las semillas,
- no ser tóxico para las plantas.

Otro criterio en la selección del soporte es el relacionado con la sobrevivencia de las bacterias en el mismo (Biofertilizer Manual, 2006). Ésta depende de las características físicas, químicas y biológicas del mismo, y de que cada microorganismo en particular puede ser más o menos tolerante a determinadas variables, pero se puede hablar en general que los suelos mas ricos en nutrientes serán más convenientes que aquellos mas pobres.



Sin embargo, existen casos especiales, se ha determinado que la sobrevivencia de cepas de *Rhizobium meliloti* como así también su número y distribución está más condicionada al pH de suelo que al contenido de materia orgánica. En razón de estas consideraciones la condición ideal sería tener un inoculante elaborado con un suelo, pero debido a que las características físicas, químicas y biológicas presentan grandes variaciones, es necesario utilizar otros materiales que ofrecen cierta afinidad, como la turba, que se presenta como uno de los mejores soportes para asegurar una buena sobrevivencia manteniendo plenamente las propiedades fisiológicas de los microorganismos. El uso de turba hoy en día se ha generalizado y probablemente sea el material mas utilizado a nivel mundial, en razón que ofrece seguridad en cuanto a las exigencias de las normas internacionales en lo referente a calidad de inoculantes. Sin embargo, en algunos países donde no existe turba o donde es muy cara ha obligado a utilizar algunos materiales que la reemplacen y que de alguna manera satisfagan las necesidades de los agricultores (Ronchi, 1994).

Para la utilización de un material soporte se podría pensar que su composición de alguna manera podría decidir su elección para ser empleado como tal, sin embargo esto no es tan así, se ha llegado a determinar que la única manera de comprobar si un soporte puede ser utilizado como tal, es determinar dos parámetros fundamentales, por un lado la cinética de sobrevivencia y por otro lado el mantenimiento de las propiedades fisiológicas de los microorganismos.

Estas consideraciones condujeron al estudio de la perlita, como soporte alternativo, que es un silicoaluminato que se presenta al estado de polvo fino (200 mesh) de alta capacidad de retención de agua. La perlita actualmente se comercializa a nivel industrial para su aplicación como material filtrante, aislante y para incrementar la porosidad de algunos tipos de suelos con el objeto de mejorar el grado de aereación de los mismos (Ronchi, 1994; Ronchi et al., 2000).

1.8.1 Tipos de inoculantes: Los inoculantes pueden ser agrupados en las siguientes categorías principales en base al soporte utilizado:

- Polvos formulados en base turba: es el más conocido, la turba puede o no estar estéril. El inoculante molido se mezcla y adhiere a la semilla.
- Granulado: formulados en base a turba aglomerada en gránulos. Permite aplicar el inoculante dentro del surco de siembra junto con las semillas.
- Líquidos: En base oleosa (suelen tener fungicidas en la formulación) o acuosa. Esta última es la tecnología más avanzada. Se mezclan con la semilla o se aplican en el



surco junto con ella y se logra una adherencia mucho mayor que otras formulaciones sólidas (D'Onofrio and Alarcón, 2007).

1.8.2. Efectividad y competitividad entre poblaciones microbianas naturalizadas e introducidas: En el suelo hay tres tipos de poblaciones rizobianas según su origen:

- *Nativas*: poblaciones que evolutivamente se desarrollaron junto con leguminosas de una zona determinada.
- *Naturalizadas*: son poblaciones que ingresaron a lotes agrícolas por haber sido sembrados en campañas anteriores con una leguminosa inoculada con un inoculante comercial y que se adaptaron a las condiciones ambientales.
- *Introducidas*: son las cepas introducidas con un inoculante comercial.

Las cepas naturalizadas tienen que sobrevivir a diferentes tipos de estrés ambiental, (ej. desecación del suelo, altas temperaturas, heladas, etc). Las cepas que superan esas condiciones lo hacen por tener una mejor adaptación a las condiciones adversas, es decir, son competitivas, pero no necesariamente efectivas. Por el contrario, las cepas introducidas con un inoculante se desarrollaron bajo condiciones óptimas para su crecimiento en laboratorio. Son muy vulnerables a las condiciones de estrés y menos competitivas que las cepas naturalizadas. Las cepas introducidas son seleccionadas, entre otras características, por su capacidad de fijar nitrógeno. Por lo tanto, un inoculante de calidad está formado por cepas altamente efectivas. Si bien las cepas naturalizadas en el momento de ingresar al suelo, provenían de un inoculante seleccionado, sus características van variando a medida que transcurre el tiempo. Está demostrado que las cepas naturalizadas fijan menos nitrógeno que las introducidas, por lo tanto, las cepas naturalizadas son más competitivas y menos efectivas que las introducidas (Fernández Canigia, M.V., 2003).

La búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a disminuir los costos de la producción agrícola, cuidar el ambiente y por ende lograr un desarrollo sostenible obliga a estudiar la posibilidad de utilizar el potencial que tienen las bacterias que nodulan en las raíces de las leguminosas. El seleccionar cepas autóctonas con alta capacidad de competencia en lugar de introducir cepas que aunque competitivas provienen de nódulos o suelos ajenos al sitio en cuestión y que son la determinante influencia que tiene la población de rizobios autóctonos, la cual compite con las cepas introducidas y da lugar a un menor rendimiento, indica que puede ser



ventajoso a la hora de pensar en utilizar los rizobios aislados y propios como biofertilizantes. Esto constituiría una posible alternativa para el enriquecimiento de los suelos con vocación agrícola (Cuadrado et al., 2009).



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

En función de los antecedentes citados se plantea como hipótesis de este trabajo que el estudio de las bacterias con efecto PGPR, simbiotes de alfalfa, y sus formulaciones como inoculantes se traduce en un incremento en el rendimiento de este cultivo.

El objetivo del presente trabajo es seleccionar bacterias simbiotes de alfalfa con un alto potencial tecnológico para mejorar los cultivos de esta leguminosa.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Relevamiento de cultivos de alfalfa

Se realizó el relevamiento de cultivos de alfalfa de áreas con limitación en el contenido de nitrógeno, en la provincia de La Pampa, seleccionándose para esta tesina las zonas de Quemú-Quemú y Santa Rosa. Se tomaron de cada una de las localidades las siguientes muestras de suelos:

- Quemú-Quemú: muestra QA (suelo con un cultivar viejo de alfalfa no inoculada) y muestra QB (suelo con un cultivar nuevo de alfalfa no inoculada).
- Santa Rosa: muestra Agr (obtenida de una zona, con alfalfa no inoculada, del campo de la UNLPam)

3.2. Características de los suelos

A los suelos seleccionados se les realizaron las siguientes determinaciones físico-químicas:

3.2.1. **Conductividad**: Se pesaron 20 g de suelo en un vaso de precipitado y se agregaron 100 ml de agua destilada. Se agitó durante 15 minutos y se dejó en reposo durante 1 h. Se filtró con embudo y sobre el filtrado se determinó la conductividad eléctrica con un conductímetro de celda (SAMLA, 2004).

3.2.2. **pH**: Se pesaron 20 g de suelo seco al aire, tamizado por malla de 2 mm, en un vaso de precipitado y se agregaron 50 ml de agua destilada hervida. Se agitó durante 30 minutos y se determinó el pH (Thomas, 1996).

3.2.3. **Materia Orgánica**: Se pesó 1 g de suelo seco, tamizado por malla de 2 mm, en un enlermeyer de 500 ml y se añadieron exactamente 10 ml de solución de dicromato de potasio con pipeta de doble aforo, 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y se dejó enfriar durante 30 min. Paralelamente se preparó un blanco en idénticas condiciones. Una vez frío, se agregaron 170 ml de agua destilada, una pizca de fluoruro de sodio y 10 ml de ácido fosfórico concentrado. Se agitó y se agregaron 10 gotas de difenilamina y se tituló con sulfato ferroso amoniacal (Sal de Mohr). De esta manera se determinó el porcentaje de carbono orgánico de las muestras y a partir de este valor se calculó el contenido de materia orgánica (Nelson and Sommers, 1996).

3.2.4. **Nitrógeno (método de Kjeldhal)**: Se colocaron 0,5 g de suelo seco al aire, tamizado por tamiz de 2 mm, en tubos digestores Kjeldahl, se agregaron 25 g de la mezcla catalítica (sulfato de potasio y óxido mercurico amarillo) y 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calentaron los tubos en el digestor Tekator hasta la



oxidación completa de la materia orgánica. Se dejaron enfriar y se agregaron 80 ml de agua destilada. Posteriormente se realizó la titulación en equipo Tecator Kjeltec Auto 1030 Analyzer (Skoog et al., 2005).

3.3. Microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno

Se utilizaron dos cepas patrones de *Sinorhizobium meliloti*: B399, recomendada por INTA-Castelar para la producción de inoculantes y Lq51, cepa nativa aislada por docentes del Departamento de Química (Grassano et al., 1996) y los aislamientos obtenidos de los suelos en estudio.

3.4. Metodologías de aislamiento de microorganismos

El aislamiento de rizobios se realizó a partir de suelo rizosférico correspondientes a las regiones citadas, aplicando el método de la planta trampa (Vincent, 1970). Para ello se esterilizaron semillas de alfalfa (variedad Victoria-INTA), lavando las mismas sucesivamente con etanol 95% durante 30 segundos, 3 minutos con hipoclorito de sodio y con agua estéril (5 veces), luego se colocaron en cajas de Petri (previamente esterilizadas) con discos de papel de filtro humedecidos y se dejaron germinar a 30°C en oscuridad. Cuando las semillas habían desarrollado aproximadamente 5 mm de raíz, con ayuda de un ansa y en condiciones de esterilidad, se sembraron dos semillas por tubo conteniendo medio Jensen (Tabla 1) de modo que el extremo de la radícula quedara debajo de la superficie del agar.

Tabla 1. Composición del medio de Jensen (CIAT, 1988)

<u>Componentes</u>	<u>Concentración g.l⁻¹</u>
CaHPO ₄	1
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,2
FeCl ₃	0,1
Solución stock*	5 ml

* Solución stock (concentración g.l⁻¹): 1,24 H₃BO₃, 0,04 Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0,04 CuSO₄ · 5H₂O, 0,164 KCl, 0,004 CaCl₂.



Los tubos se colocaron en soportes de madera, ubicados en una cámara climatizada, de modo que la superficie del agar coincidiera con el borde del soporte, para proteger a las raíces de la luz. Se usó iluminación lateral empleando doble hilera de tubos GroLux por sus emisiones de λ entre 600-700 nm (favorecen fotosíntesis) y λ entre 400-500 nm (favorecen síntesis de clorofila). El fotoperiodo se controló con reloj automático de modo de tener 16 horas diarias de luz. La temperatura se mantuvo controlada en el rango de 22-25°C para las horas de luz y en el rango de 16-19°C para las horas de oscuridad. De cada uno de los suelos seleccionados se realizó una suspensión, colocando 1 g de suelo en 100 ml de agua estéril. Cuando las plántulas de alfalfa habían desarrollado las dos primeras hojas (alrededor de los 4 días), se inocularon con 1ml de dichas suspensiones, realizándose 10 repeticiones para cada muestra (Vincent, 1970), las que se distribuyeron totalmente al azar. Luego de cuatro semanas se levantó el ensayo y se retiraron los nódulos de las plantas, los cuales se esterilizaron siguiendo el mismo procedimiento usado para la esterilización de semillas. Posteriormente se depositó una gota de agua estéril en una caja de Petri con medio LMA (levadura -manitol - agar, Tabla 2), se colocó el nódulo en la gota, se maceró con una pinza estéril y se estrió su contenido en la placa con un ansa previamente esterilizada (CIAT, 1988). Las cajas de Petri se incubaron a 28°C en posición invertida por un período de 2-3 días.

Tabla 2. Composición de medio LMA.

<u>Componente</u>	<u>Concentración (g.l⁻¹)</u>
Manitol	10
Extracto de Levadura	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄	0,5
NaCl	0,1
FeCl ₃ .6H ₂ O (solución 10%)	1 gota
MnSO ₄ .4H ₂ O (solución 10%)	1 gota
Rojo Congo (solución 0,25%)	5 ml
Ágar	1g

Ajustar a pH 5,8

3.5. Conservación de los microorganismos

Los microorganismos se conservaron en tubos de ensayo con medio LMA (Tabla 2) en pico de flauta con y sin Rojo Congo, en heladera a una temperatura de 5°C



3.6. Caracterización de los aislamientos

La caracterización de los aislamientos se llevo a cabo por medio de:

- 3.6.1. Observación microscópica: Se realizó por contraste de fases utilizando un microscopio binocular modelo Janamed 2 Carl Zeiss Jena óptica planométrica con aumento de 100x de inmersión y luz verde.
- 3.6.2. Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio LMA: Transcurrido el tiempo necesario para observar crecimiento se evaluó: absorción de colorante Rojo Congo, textura, forma y apariencia de las colonias, según metodología para caracterización de rizobios propuesta en el manual de CIAT (1988).
- 3.6.3. Tinción de GRAM: Se realizó para elucidar el carácter GRAM positivo o GRAM negativo de los aislamientos obtenidos. Se utilizó el kit GRAM BRITANIA, siguiéndose la metodología indicada en el mismo.
- 3.6.4. Perfiles de esterazas: Con el objeto de realizar estas caracterizaciones se realizó:
 - Desarrollo de los microorganismos en medio TY: Los aislamientos obtenidos se desarrollaron en medio TY (Tabla 3) con el objetivo de poder determinar la concentración de proteínas y el perfil isoenzimático. Cada aislamiento fue desarrollado en erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio durante 24 hs en agitador rotatorio a 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad ubicado en un cuarto a 28°C. Luego se tomaron de cada suspensión de microorganismos 10 ml y se centrifugaron en Centrífuga Refrigerada Rolco CR 5150 a 7500 rpm y a 4°C, durante 30 minutos. Se volcó el sobrenadante y el precipitado obtenido fue resuspendido en 1 ml de solución de NaCl (0,85%). La suspensión se recogió en tubos eppendorff y se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 rpm en Eppendorf Centrifuge 5414. Se volcó nuevamente el sobrenadante y se recogió el precipitado en 0,5 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2; 5 mM de MgCl₂, 15% de glicerol y β-mercaptoetanol 0,1%), se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min., se volcó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0,5 ml del mismo tampón con 1 mg/ml de lisozima. La suspensión fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, transcurridos los cuales se centrifugó nuevamente. El sedimento fue resuspendido en tampón de sonicación (Tris-HCl 0,1 M y glicerol 15%, pH



8,8) e inmerso en baño refrigerante, sonificado en un sonicador KONTES Micro Sonic Cell Disrupter, realizándole seis ciclos de 30 segundos cada uno. Por último la solución fue centrifugada durante 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a -18°C .

Tabla 3. Composición de medio TY (Beringer, 1974)

<u>Componentes</u>	<u>Concentración (g.l⁻¹)</u>
Extracto de levadura	3
Triptona	5
Cloruro de Calcio	0,87
	pH 7,2

- Determinación de la concentración de proteínas: Se realizó por el método de Bradford (Alfenas et al, 1991), para el cual se determinó una curva patrón usando albúmina bovina cristalizada y reactivo Bradford (Azul-Brillante de Coomassie G-250), como colorante. Para realizar la misma, se prepararon las soluciones de albúmina en concentraciones de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1400 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ en tampón Tris-HCl, pH 6,8. En sendos tubos de ensayo se colocaron 5 ml de reactivo de Bradford y 0,1 ml de las soluciones patrones de albúmina. Previa homogenización se determinó la densidad óptica a 595 nm. Conjuntamente se determinó la densidad óptica de los extractos obtenidos a partir de las muestras en estudio.
- Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E): Para caracterizar el perfil isoenzimático presente en los extractos obtenidos, se utilizó un gel de poliacrilamida al 5% para el gel concentrador y al 10% para el gel separador (Tabla 4). La placa de electroforesis se colocó en cuba electroforética (Figura 9), la cual contenía solución reguladora de electrodos (0,012M Tris; 0,095M Glicina; pH 8,8). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford, se calculó el volumen de siembra correspondiente a cada una de las muestras, para sembrar el mismo contenido proteico en cada una de las calles, con el fin de obtener en el gel bandas de igual intensidad y facilitar así su posterior análisis. Con el volumen calculado se realizó la siembra de las muestras en las cavidades del gel con una microjeringa. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 200V y se utilizó azul de bromofenol como indicador de frente de corrida. Para la detección de las enzimas, los geles fueron tratados



con 100 ml de buffer fosfatos 0,1 M, pH 6,2, conteniendo 100 mg de Fast Blue RR, 60 mg de α -naftil acetato y 40 mg de β -naftil acetato, previamente disueltos en 0,5 ml de acetona, con agitación lenta y continua hasta que desarrollaron suficiente coloración en las bandas. Luego se lavaron los geles con solución decolorante (30% v/v de etanol, 5% v/v de ácido acético, 65% v/v de agua) (Grassano A. et al; 1996). Éstos fueron fotografiados y posteriormente se analizaron los perfiles isoenzimáticos mediante dendrogramas construidos por el método UPMGA (utilizando el sistema NTSYS-pc).

Tabla 4. Concentración de los geles de poliacrilamida concentrador (superior) y separador (inferior)

<u>Componentes</u>	<u>Gel concentrador 5%</u>	<u>Gel separador 10%</u>
Tris-HCl 2.25 M, pH 8.8;	2 ml	4,35 ml
Acrilamida –bisacrilamida 30:0,8%	1,33 ml	8,70 ml
Agua destilada	4,62 ml	12,71 ml
TEMED	20 μ l	25 μ l
Persulfato de amonio	100 μ l	200 μ l



Figura 9: Cuba de electroforesis

3.6.5. Desarrollo de cultivo líquido y determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de los aislamientos: Se sembraron con anza los microorganismos, conservados en heladera a 5°C en tubos con agar inclinado, en erlenmeyers de 250

ml de capacidad con 50 ml de medio inóculo para rizobios (Tabla 5). Se mantuvo esta relación de 1/5 de volumen, para conseguir una correcta aeración de los cultivos. Los erlenmeyers se colocaron en agitador rotatorio de 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad en cuarto estufa a 28°C. A las 24 hs de agitaciones se transfirieron 10 ml del inóculo al medio proceso (Tabla 5) contenido en un erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio. Se continuó el desarrollo, en las mismas condiciones, durante 48 horas. Se determinó, cada 3 hs el crecimiento celular de las suspensiones bacterianas en base a determinaciones de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, medida en un espectrofotómetro METROLAB 1700-UV-Visible, utilizándose agua destilada como blanco y realizando las determinaciones en celdas de vidrio. Paralelamente se determinó pH utilizando un pHmetro Water Quality Meter 850081 y se realizaron observaciones microscópicas para detectar posibles contaminaciones.

Posteriormente se determinaron los siguientes parámetros cinéticos:

- velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\max} = (\ln x/x_0) \cdot t^{-1}$)
- tiempo de generación (t_g) a partir de μ ($t_g = \ln 2 \cdot \mu^{-1}$)

Tabla 5. Composición de medios de cultivo para *S. meliloti* (Balatti and Jardim Freire, 1996).

<u>Componente</u>	<u>Concentración Inóculo (g/l)</u>	<u>Concentración Proceso (g/l)</u>
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,2
NaCl	0,1	0,1
MnSO ₄ ·4H ₂ O (solución 10%)	2 gotas	2 gotas
FeCl ₃ ·6H ₂ O (solución 10%)	2gotas	2 gotas
KNO ₃	0,8	0,8
Sacarosa	5	10
Extracto de Levadura	2	4
	Ajustar a pH 6,8	Ajustar a pH 6,8

3.6.6. Amplificación, secuenciación y análisis del 16S: Se realizó la extracción de ADN total a partir de cultivo sólido, para lo cual se tomaron bacterias con la punta de un tip y se resuspendieron en 100 µl de sarcosyl 0,1% en TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) en microtubo de polipropileno, se centrifugaron durante 2 minutos a 10000 rpm y se descartó el sobrenadante. A continuación el sedimento se resuspendió en 1 ml de NaCl 1 M, se centrifugó nuevamente durante 2 minutos a 10000 rpm y se descartó el sobrenadante. Luego al precipitado se adicionaron 250 µl de TE



conteniendo 20 % de sacarosa más 250 μl de TE conteniendo 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de lisozima, se incubó 1 hora a 37°C y se agregaron 50 μl de una solución de TE conteniendo 0,3% de sarcosyl y 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteinasa K, se agitó por inversión y se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se procedió a la unión del DNA a la sílica, para lo cual se agregó 10 μl de suspensión de sílica (2 g de sílica en 15 ml de agua, se lava 3 veces centrifugando a 2000 rpm, se estima por pesada el volumen de sílica y se resuspenden en dos volúmenes de agua) y se mezcló. Se sedimentó la sílica por centrifugación durante 10 s. a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se lavó la sílica 3 veces con 500 μl de solución de lavado (50 mM NaCl, 10 mM Tris, 2,5 mM EDTA), se resuspendió completamente, se centrifugó 10 s. y se descartó el sobrenadante en cada uno de los lavados. Luego para eluir el ADN de la sílica se resuspendió el precipitado en 25 μl de agua bidestilada, se calentó 5 min a 60°C y se centrifugó 2 min a máxima velocidad. Se tomó el sobrenadante conteniendo el ADN extraído de cada tratamiento.

Posteriormente se realizó la amplificación del ADN extraído, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleándose un ciclador térmico MyCycle (BioRad). La composición de las mezclas de reacción utilizadas por cada tratamiento fue: 2,5 μl de buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1,25 μl de MgCl_2 3 mM; 2,5 μl de dNTPs 200 μM ; 0,2 μl de la enzima Taq DNA polimerasa, 2,5 μl de cada uno de los cebadores (Tabla 6) 10 μM ; 8,55 μl de H_2O y 5 μl del ADN obtenido. Las condiciones de ciclado para la amplificación utilizadas fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización inicial a 25°C durante 1 minuto; 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, *annealing* a 53°C durante 20 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos. Como etapa final se incubó la muestra a 72°C durante 1 minuto (Pistorio, 2001).

Tabla 6: Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en reacciones de PCR.

<u>Denominación</u>	<u>Secuencia</u>
Y1	5'-TGGCTCAGAACCAACGCTGGCGGC-3'
Y2	5'-CCCACTGCTGCCITCCCGTAGGAGT-3'

Finalizada la reacción de PCR, 5 μl de cada uno de los productos obtenidos fueron sembrados en un gel de agarosa 0,8 % (P/V) (Tabla 7) conteniendo bromuro de etidio. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 60V y utilizando



TBE 0,5 X como solución reguladora de electrodos. Se utilizó como solución de siembra sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25%. El perfil de bandas obtenido fue observado y posteriormente fotografiado bajo iluminación ultravioleta.

Tabla 7: Gel de agarosa 0,8%

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad (para 250ml)</u>
Agarosa	2 g
TBE 10 X	12,5 ml
Bromuro de etidio (10 mg.ml ⁻¹)	2,5 µl

Tabla 8: TBE 10 X

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad</u>
Ácido bórico	27,5 g
Tris	54,0 g
EDTA 0,5 M pH 8	20 ml
H ₂ O destilada	1000ml

Las muestras obtenidas de la PCR fueron secuenciadas utilizando un analizador ADN 3730xl, por Macrogen Inc. (Korea), y posteriormente comparadas con un banco de datos utilizando el programa BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.7. Ensayo en cámara climatizada

Con el fin de evaluar los parámetros de efectividad simbiótica de los aislamientos seleccionados se llevó a cabo un ensayo en cámara climatizada en condiciones de fotoperíodo y temperatura controladas, de acuerdo a la metodología indicada por Vincent (1970). Semillas de alfalfa, esterilizadas y pregerminadas (según metodología ya indicada) se sembraron en tubos con medio Jensen (Tabla 1). Luego de 48 hs de implantadas las semillas se inocularon agregando a cada tubo 1 ml de la suspensión bacteriana, desarrollada en medio de cultivo para *S. meliloti* (Tabla 5), cuya concentración era del orden de 10⁹ células viables.ml⁻¹. En el ensayo se mantuvieron las mismas condiciones de luz y temperatura mencionadas anteriormente en el inciso 3.4, (Figura 10). Se realizaron once tratamientos utilizando siete aislamientos de rizobios nativos y dos cepas patrones, se prepararon dos testigos, uno con el agregado de una solución al 0,05 % de nitrato de



potasio (N) y el otro sin el agregado de nitrógeno (T); por cada tratamiento se realizaron diez repeticiones, con dos plantas por tubo. La ubicación en los soportes de madera fue totalmente aleatoria e incluso durante el ensayo se fue rotando. A partir de la segunda semana de comenzado el ensayo se evaluó cualitativamente la aparición de nódulos en las raíces y el aspecto de las plántulas. Cuando se observó que el medio comenzaba a separarse de la pared del tubo se comenzó a regar con 1 ml de solución Jensen (Tabla 9) dos veces por semana.



Figura 10: Ensayo en cámara climatizada, realizado con plantas de alfalfa, en condiciones de fotoperíodo y temperatura controladas.

Tabla 9: Solución Jensen (CIAT, 1988)

<u>Componentes</u>	<u>Concentración (g.l⁻¹)</u>
CaHPO ₄	2,5
K ₂ HPO ₄	0,05
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05
NaCl	0,05
FeCl ₃	0,025

A las seis semanas de implantado el ensayo se cosecharon las plantas y se realizaron las siguientes determinaciones:

3.7.1. Recuento de nódulos: Se separaron las raíces y se contaron la cantidad de nódulos que poseían cada una de las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos, con



el fin de poder establecer una relación entre la infección de plantas y los parámetros de efectividad.

- 3.7.2. Peso seco: Se secó la parte aérea de las plantas en bolsas de papel, en estufa con circulación de aire a 65°C, hasta peso constante.
- 3.7.3. Contenido de nitrógeno total. Método de KJELDHAL: Para la determinación del porcentaje de nitrógeno se pesó 0,1 g de muestra de parte aérea molida, la cual se digirió durante una hora con 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 1,25 g de catalizador (24 g de sulfato de potasio y 1 g de óxido mercúrico amarillo). Luego se realizó la destilación y titulación en equipo automático TECATOR KJELTEC Auto 1030 Analyzer, utilizando ácido bórico 1% y HCl 0,10604 N. La determinación se realizó por duplicado. Obtenidos los valores se realizaron los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de nitrógeno y multiplicando este valor por el factor de conversión 6,25 se determinó el porcentaje de proteínas.
- 3.7.4. Índice de eficiencia relativa (IER): Este es un parámetro agronómicamente importante cuando se realiza la selección de aislamientos de rizobios para determinar en una primera etapa si los mismos pueden considerarse potencialmente buenos como futuros productos biotecnológicos. El mismo se calcula en función del porcentaje de eficiencia del tratamiento inoculado en relación al parámetro considerado (peso seco) obtenido del tratamiento fertilizado con nitrógeno y el tratamiento sin inocular.

$$IER = \left(\frac{\text{Trat inoc} - \text{Trat sin inoc}}{\text{Trat inoc con N} - \text{Trat sin inoc}} \right) \times 100$$

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

3.8. Obtención de inoculantes

- 3.8.1. Obtención de cultivos de alta concentración celular: Los inóculos fueron desarrollados a partir de repiques en tubos con agar inclinado conservados en heladera a 5°C, para ello se tomó con un anza estéril una pequeña cantidad de células y se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio inóculo para *Sinorhizobium meliloti* (Tabla 5) y se agitaron durante 24 horas en agitador rotatorio de 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad. Luego, 10 ml de la suspensión de microorganismos se transfirieron a 100 ml de medio proceso



para *Sinorhizobium meliloti* (Tabla 5) contenidos en erlenmeyer de 500 ml de capacidad y se agitaron durante 50 horas en agitador rotatorio de 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad a 28°C. En los medios inóculos y procesos el crecimiento celular fue evaluado en base a medidas de densidad óptica a 600 nm utilizando espectrofotómetro UV-Visible METROLAB VD 40; y la pureza de los medios de cultivo se controló mediante observación microscópica directa y determinación de pH.

- 3.8.2. Material soporte para la elaboración de los inoculantes: Se utilizó como soporte turba, perlita y mezcla de ambas en una proporción de 50 a 50. Estos soportes se caracterizaron en cuanto a su capacidad de retención de agua y su pH. La determinación de pH se realizó mezclando 10 g del material sólido a usar con agua destilada hasta obtener una pasta que se dejó en reposo durante 1 hora y al cabo de ese tiempo se midió el pH. La capacidad de retención de agua se estimó como la cantidad de agua que admite el soporte manteniendo sus características de polvo fino sin aglomerarse. Los soportes fueron molidos a malla tamiz 200 y secados hasta tener una humedad menor al 4 %. Posteriormente fueron esterilizados a granel en autoclave durante 3 horas a 121°C y colocados en bolsas de polipropileno esterilizándolos nuevamente en autoclave a 121°C durante 30 minutos (Ronchi, 1994). Una vez fríos se realizó la impregnación con la suspensión de microorganismos obtenida con los medios de cultivo mencionados. La cantidad de cultivo agregada por cada bolsa fue la necesaria para llegar a un contenido de humedad similar a su capacidad de retención. Las bolsas fueron selladas con selladora eléctrica y homogeneizadas manualmente. Estos inoculantes se mantuvieron a temperatura ambiente de laboratorio entre 20 y 25°C, evaluándose el número de células viables una vez por mes, durante 72 días de almacenamiento.

3.9. Control de calidad de inoculantes

- 3.9.1. Recuento de rizobios viables mediante la técnica de recuento en placa por extensión en superficie en medio LMA (Tabla 2), (REDCAL 2006).
- Preparación del homogenato para inoculantes sólidos: se homogenizó manualmente el producto con el envase cerrado durante 30 segundos. Mediante un corte realizado en el envase se extrajo en forma aseptica 1 g del producto, el envase fue nuevamente cerrado con selladora eléctrica. La muestra obtenida se colocó en 100



ml de agua estéril en erlenmeyer de 500 ml de capacidad y se colocó en agitador rotatorio de 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad durante 15 minutos.

- Preparación de las diluciones de trabajo: se retiró el erlenmeyer del agitador y de esta dilución 10^{-2} , con pipeta automática se tomó 1 ml de la suspensión y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua estéril, obteniendo la dilución 10^{-3} , se homogeneizó durante 20 segundos en vortex y se repitió el paso anterior hasta completar la dilución 10^{-8} .
- Siembra de las diluciones: se sembraron, por duplicado y extensión en superficie con espátula de Drygalski, sobre medio LMA contenido en placas de Petri, las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} . Comenzando por la mayor dilución se colocaron con pipeta automática, en el centro de la placa 0,1 ml de dichas diluciones y con la espátula previamente esterilizada se extendió el líquido hasta absorción completa. Se obtuvieron de esta manera las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} respectivamente. Posteriormente se incubaron las placas invertidas en estufa entre 28 y 30°C. La lectura de las placas se realizó a los 3 días y se verificó a los 5 días. Se contaron las placas que presentaban entre 30 y 300 colonias verificando la proporcionalidad entre las diluciones. El resultado se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de inoculante y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{ufc.ml}^{-1} = \text{N}^{\circ} \text{ colonias contadas} \times 10 \times \text{factor de dilución}$$

Donde:

N° de colonias contadas = promedio del número de colonias presentes en las tres placas de lectura.

Factor de siembra = es 10 si se utilizan 0,1 ml para la siembra en placa.

Factor de dilución = es la inversa de la dilución en la cual se realiza el recuento.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características de los suelos utilizados

Los resultados obtenidos a partir de los análisis físico-químicos, realizados a los suelos en estudio, en Quemú-Quemú y Santa Rosa, se consignan en la Tabla 10.

Tabla 10: Análisis físico-químico de los suelos

<u>Lugar</u>	<u>pH</u>	<u>Conductividad (mmho.cm⁻¹)</u>	<u>Materia Orgánica (%)</u>	<u>Nitrógeno (%)</u>
Quemú-Quemú A	7,22	1,01	2,19	0,105
Quemú-Quemú B	7,18	0,94	2,01	0,119
Santa Rosa	6,90	1,2	1,11	0,120

Con estos análisis se puede inferir que, en cuanto a los requerimientos edáficos, los suelos utilizados son aptos para el desarrollo de alfalfa, dado que la bibliografía señala que, el factor limitante para esta leguminosa es la acidez, siendo el pH óptimo del cultivo de 7,2, y pudiendo recurrir a encalados cuando el pH baje de 6,8 (Infoagro, 2005). En cuanto a los requerimientos nutricionales los análisis evidencian una carencia importante en el contenido de nitrógeno necesario para el progreso de este cultivo, si se tiene en cuenta un rango óptimo de 4,5-5 % de contenido nitrógeno para el desarrollo de los primeros 15 cm de parte aérea de alfalfa (Mills and Jones, 1996; Morón, 2000); sin embargo, dicha carencia puede suplirse gracias a la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Sinorhizobium* (Basigalup and Rossanigo, 2007).

4.2. Aislamiento de microorganismos

A partir de los suelos rizosféricos correspondientes a las zonas seleccionadas, se obtuvieron quince aislamientos, especificados en la Tabla 11.

Tabla 11: Aislamientos de microorganismos

<u>Suelos</u>	<u>Aislamientos</u>
Quemú-Quemú A	QA1,QA2,QA3,QA4,QA5,QA6
Quemú-Quemú B	QB1,QB3,QB4,QB5,QB6,QB7,QB8
Santa Rosa	Agr1,1,Agr1,2



Dos de ellos (Agr1,1 y QA4) se contaminaron durante su conservación y fueron desechados por no lograr su purificación. En la Figura 11 se muestran algunos de los aislamientos obtenidos.

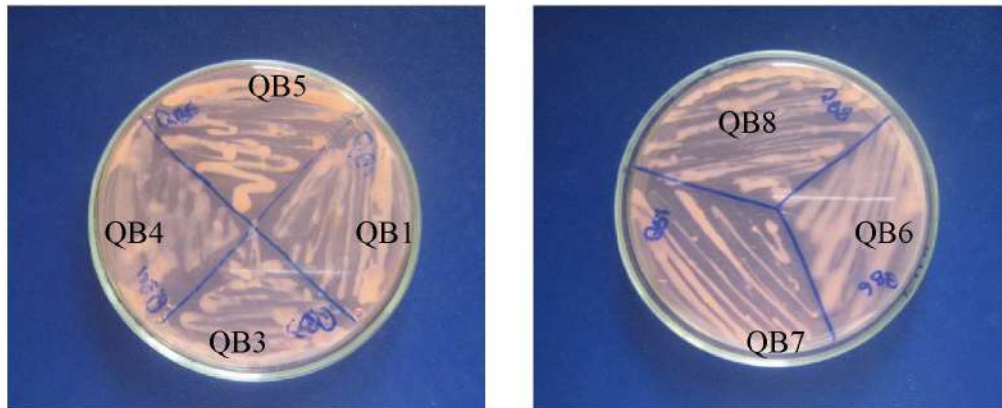


Figura 11: Aislamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno

4.3. Caracterización de los aislamientos de nódulos

4.3.1. Caracterización morfológica de las colonias desarrolladas en medio LMA: Para la caracterización de colonias típicas de este grupo de bacterias, un elemento esencial fue la falta de absorción del colorante rojo congo. Por lo general, las colonias de rizobios se observan blancas o ligeramente rosadas, debido a que no absorben este colorante (Sosa *et al.*, 2004). En la Figura 12 se pueden observar las características morfológicas de alguno de los aislamientos logrados.



Figura 12: Colonias desarrolladas por las bacterias aisladas

Estas bacterias aisladas se caracterizaron por presentar crecimiento entre 3 y 5 días mostrando colonias grandes de 2-5 mm, circulares, convexas, rosadas, semitraslúcidas y mucosas en medio LMA. Estas particularidades son comunes en

las especies de los géneros de crecimiento rápido *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae* (Anon, 1994; Wang et al., 2001; Kuykendall et al., 2005; Pérez et al., 2008).

- 4.3.2. Tinción de GRAM y observación microscópica: En este trabajo se observó, mediante la realización de la tinción de Gram y posterior observación microscópica, que la morfología de las células y sus características tintoriales se correspondían con las descritas para este grupo de bacterias: las células eran bacilos Gram negativos, de pequeño tamaño, finos y no formaban esporas. De forma general, estas características aparecen en los diferentes géneros de rizobios (Garrity and Holt, 2001).
- 4.3.3. Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E.): Mediante esta técnica se pudo distinguir si las bacterias aisladas eran diferentes o iguales entre si y respecto a las patrones. En la Figura 13 se observa el perfil de isoenzimas para α y β esterasas de los aislamientos obtenidos de la muestra A de Quemú-Quemú frente a las cepas patrones B399 y Lq51 y en la Figura 14 se muestra el correspondiente perfil para los aislamientos provenientes de la muestra B de Quemú-Quemú y de Santa Rosa. Las bandas marrones y moradas corresponden al precipitado coloreado producidos a partir del α -naftilacetato y del β -naftilacetato respectivamente, al ser escindidas estas moléculas por la esterasas y reaccionar posteriormente con el colorante Flast Blue RR.

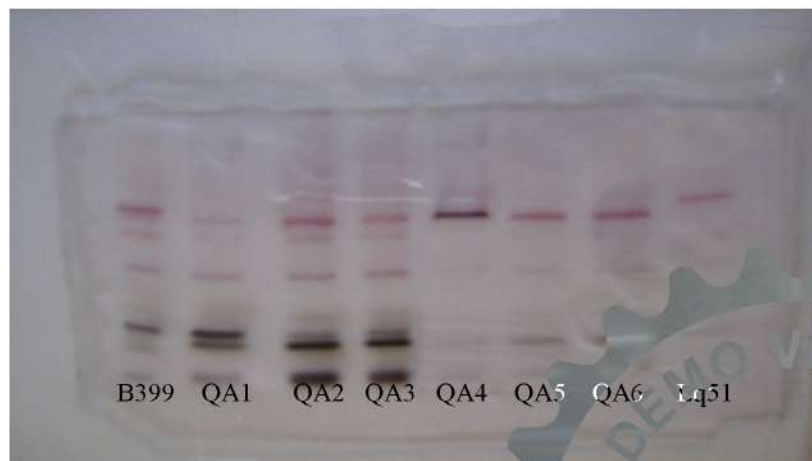


Figura 13: Corrida electroforética de patrones y de aislamientos correspondientes a la muestra A de Quemú-Quemú.



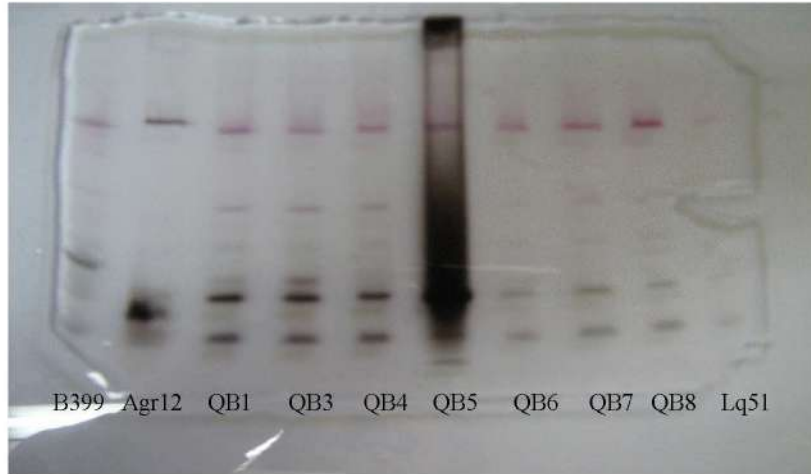


Figura 14: Corrida electroforética de patrones y de aislamientos correspondientes a la muestra B de Quemú-Quemú y de Santa Rosa.

Con el fin de comparar diferencias y similitudes entre los aislamientos de las distintas zonas, se realizó una nueva corrida electroforética que se muestra en la Figura 15.

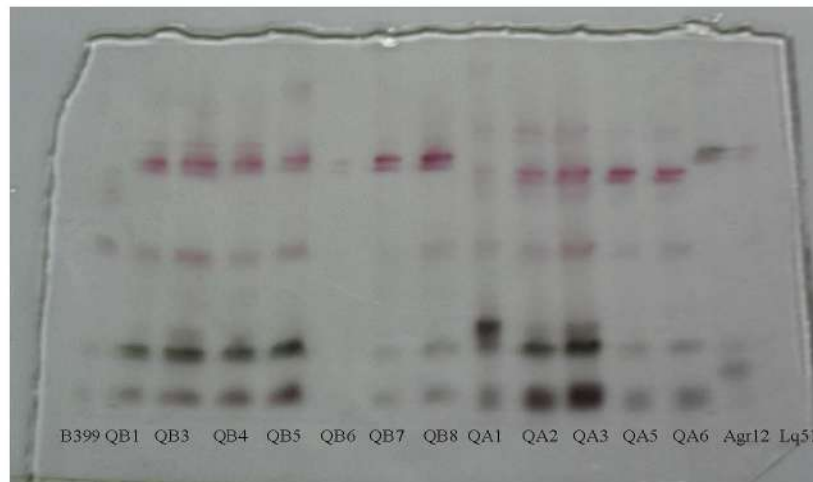


Figura 15: Corrida electroforética de todos los aislamientos y patrones.

El análisis de los perfiles, muestra un polimorfismo, para α y β esterasas, similar entre los perfiles isoenzimáticos de algunos aislamientos: QA1, QA2 y QA5; QA5 y QA6; QB1, QB4 y QB5; QB6, QB7 y QB8, lo que se corrobora con el dendrograma (Figura 16) construido por el método UPMGA (utilizando el sistema NTSYS-pc) que indica la relación entre los aislamientos en estudio respecto a sus perfiles de α y β esterasas.



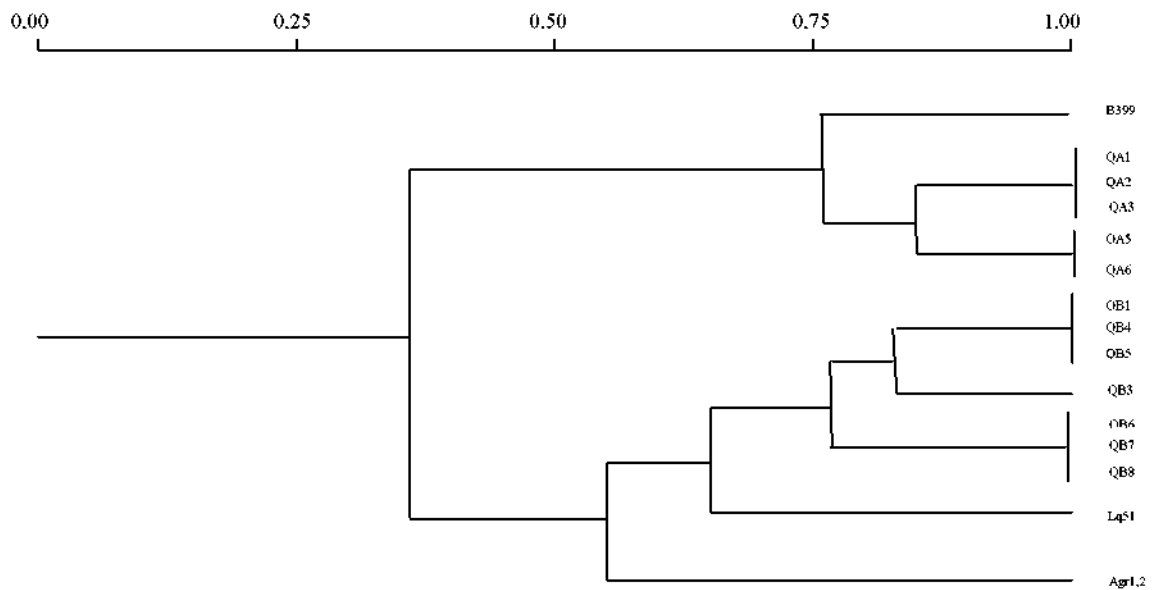


Figura 16: Dendrograma de los aislamientos en estudio en función de sus perfiles de α y β esterasas.

Analizando el dendrograma observamos una similitud con respecto al perfil isoenzimático de α y β esterasas del 100% entre los aislamientos: QA1, QA2 y QA3; QA5 y QA6, estos dos grupos de bacterias tienen entre sí un 86% de similitud, y además presentan un 76% con la cepa patrón B399.

Se observa también un 100% de similitud entre los aislamientos QB1, QB4 y QB5; y una similitud de este grupo con el aislamiento QB3 de un 83%; un 100% entre QB6, QB7 y QB8, presentando entre estos grupos un 77% de similitud. A su vez este grupo de bacterias tiene una similitud del 65% con la cepa patrón Lq51 y del 55% con el aislamiento Agr1,2.

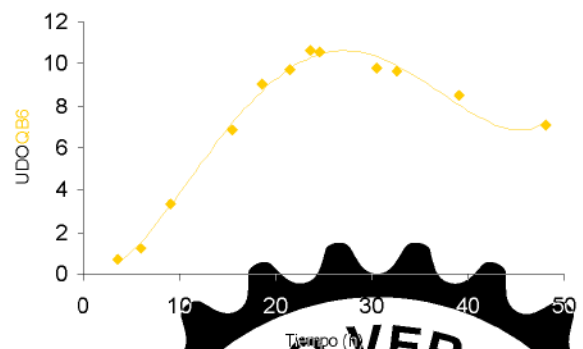
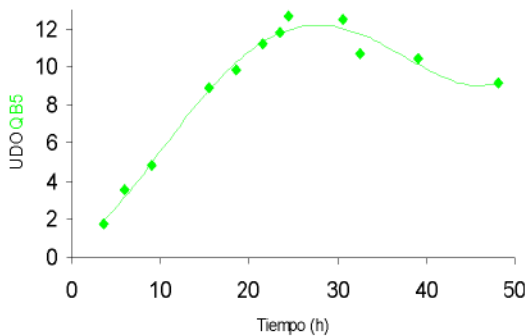
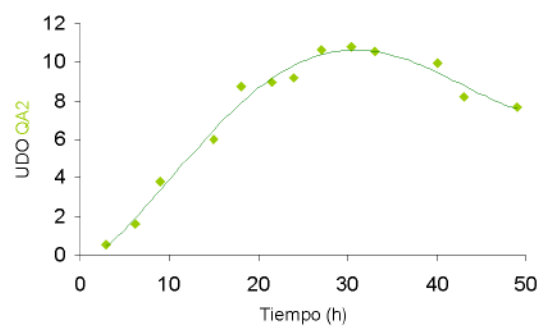
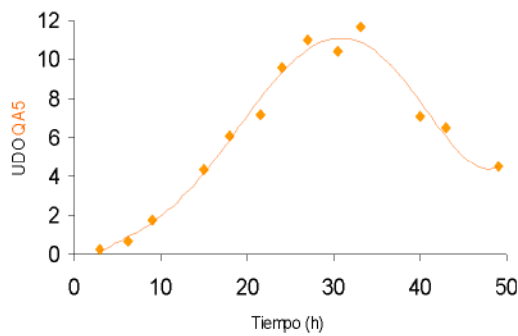
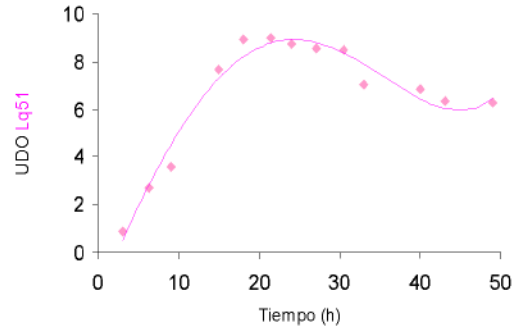
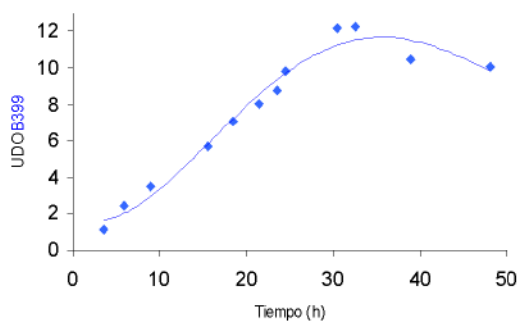
Además la cepa patrón y los aislamientos de la muestra A de Quemú-Quemú tienen un 36% de similitud con el resto de los aislamientos analizados.

Teniendo en cuenta este análisis se continuó trabajando con los aislamientos nativos Agr1,2; QA1; QA2; QA5; QB3; QB5 y QB6.

4.3.4. Desarrollo en medio de cultivo líquido y determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de los aislamientos: A los aislamientos seleccionados se les determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento con el fin de saber si éstos poseían las aptitudes biotecnológicas adecuadas, en comparación con cepas patrones, para la producción de inoculantes pensando en una futura transferencia a la industria. A partir del desarrollo de los microorganismos en el medio proceso de



la tabla 3, se obtuvieron las curvas de crecimiento que se muestran en la Figura 17. En todos los tratamientos el pH evolucionó cercano a la neutralidad (Figura 18), que en conjunto con observaciones microscópicas permitió descartar posibles contaminaciones.



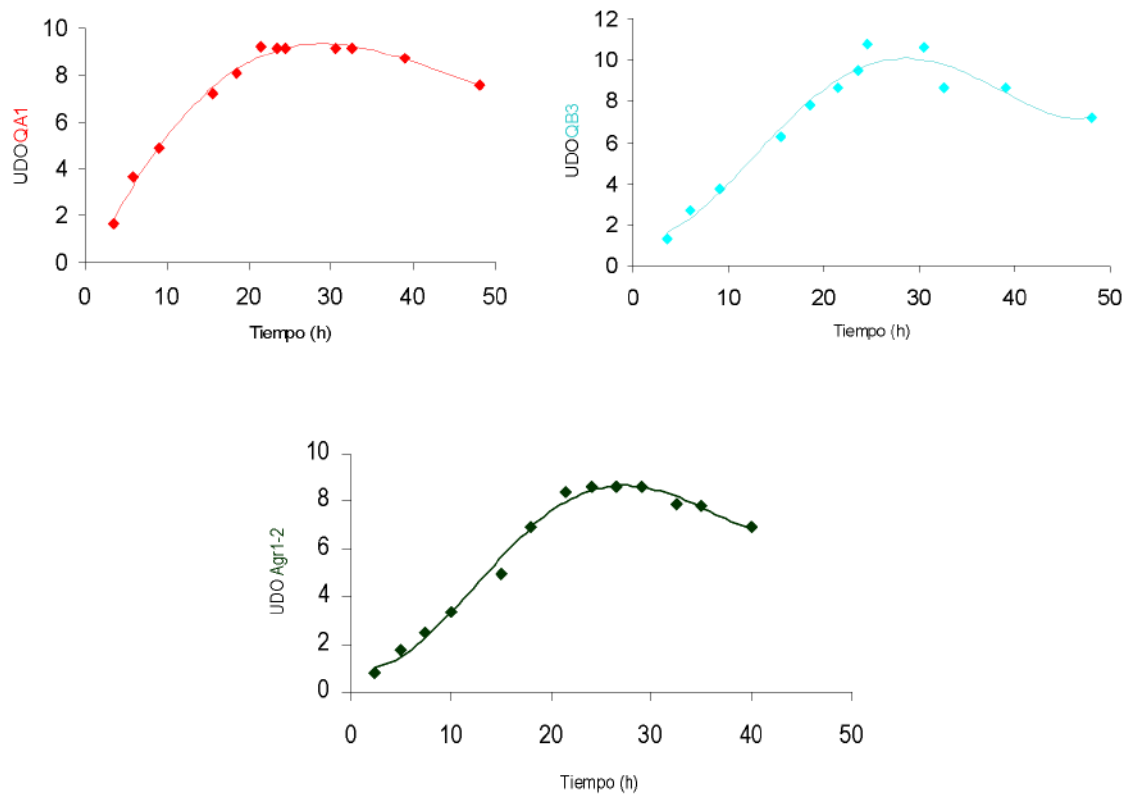


Figura 17: Curvas de crecimiento (UDO vs. tiempo) para los diferentes aislamientos seleccionados.

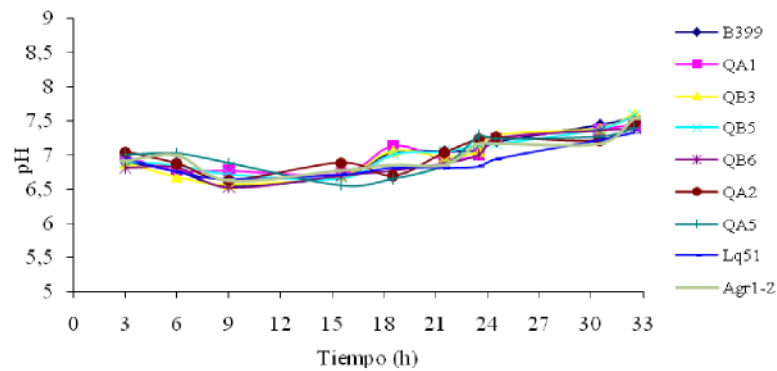


Figura 18: Curvas de pH (pH vs. tiempo) obtenidas a partir de mediciones realizadas a los cultivos líquidos durante el tiempo que se midió el crecimiento celular.

A partir de la información que brindan las curvas de crecimiento de la Figura 17 se calcularon los siguientes parámetros de crecimiento: velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) y tiempo de generación (t_g), obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 12.



Tabla 12. Parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias en estudio

Cepa/ aislamiento	μ máx (h^{-1})	t_g (h)
B399	0,298	2:19
Lq51	0,341	2:01
QA1	0,319	2:10
QA2	0,337	2:03
QA5	0,330	2:06
QB3	0,285	2:25
QB5	0,272	2:33
QB6	0,226	3:03
Agr1,2	0,326	2:07

Los valores de la velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) y el tiempo de generación (t_g) de las bacterias en estudio corresponden al rango señalado por la bibliografía para rizobios de crecimiento rápido (Ballati and Freire, 1996).

4.3.5. Amplificación, secuenciación y análisis del 16S: para la realización de esta técnica, se utilizaron los aislamientos QA5, QB5 y Agr1,2 seleccionados a partir del análisis de los parámetros simbióticos evaluados en cámara climatizada.

En la Figura 19 se muestra la electroforesis realizada en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR obtenidos.



Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo iluminación UV, donde se observan los productos de amplificación de la PCR. Las tres primeras calles corresponden a los aislamientos seleccionados para el análisis.

En las Figuras 20, 21 y 22 se muestran las secuencias obtenidas para los aislamientos analizados.

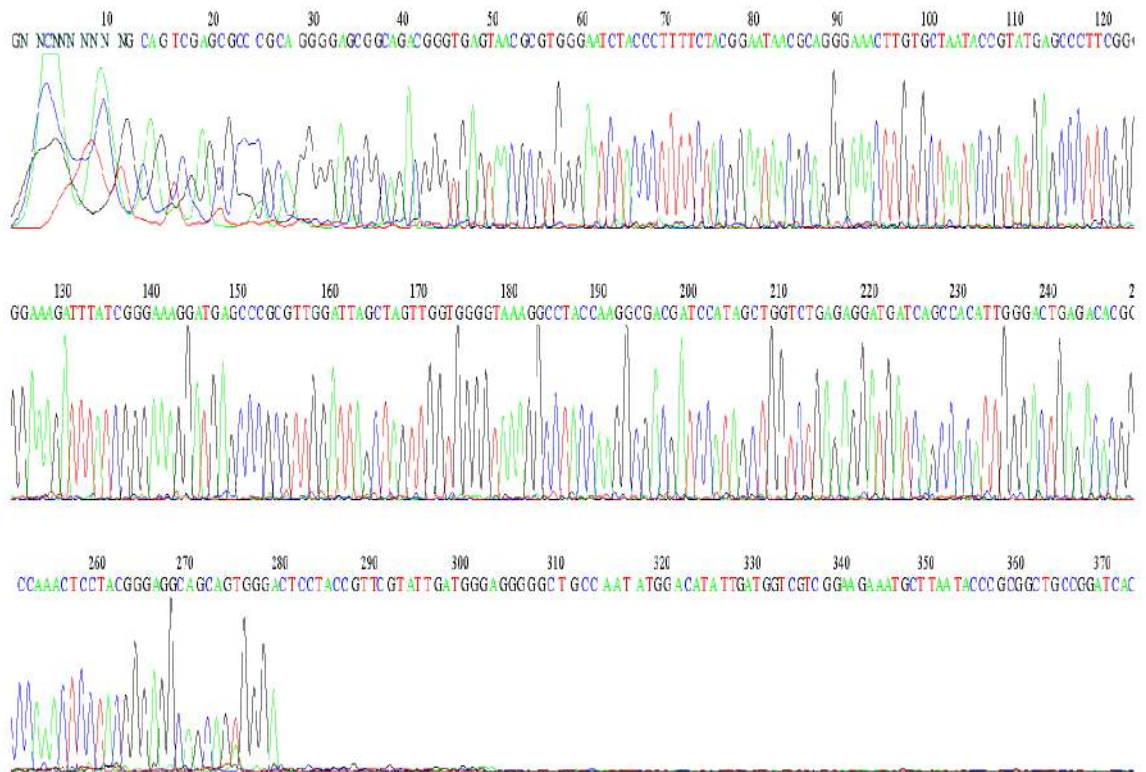


Figura 20: Secuencia de bases para el aislamiento QB5

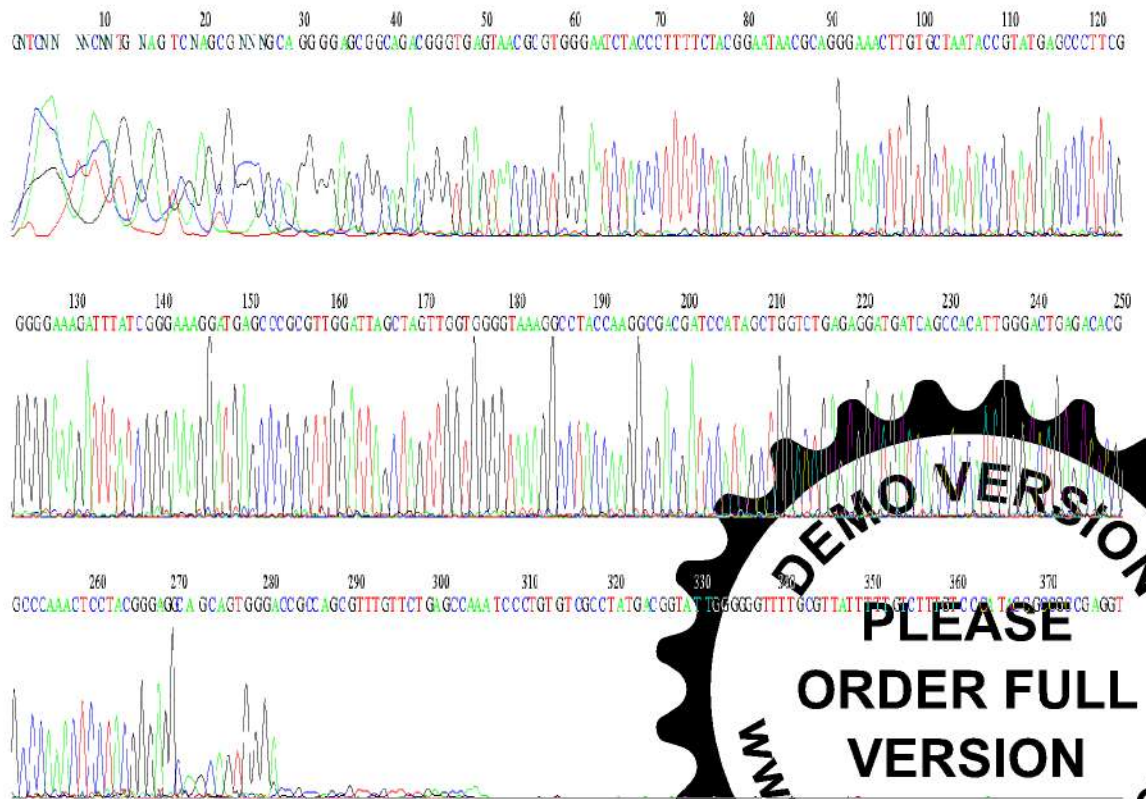


Figura 21: Secuencia de bases para el aislamiento QA5



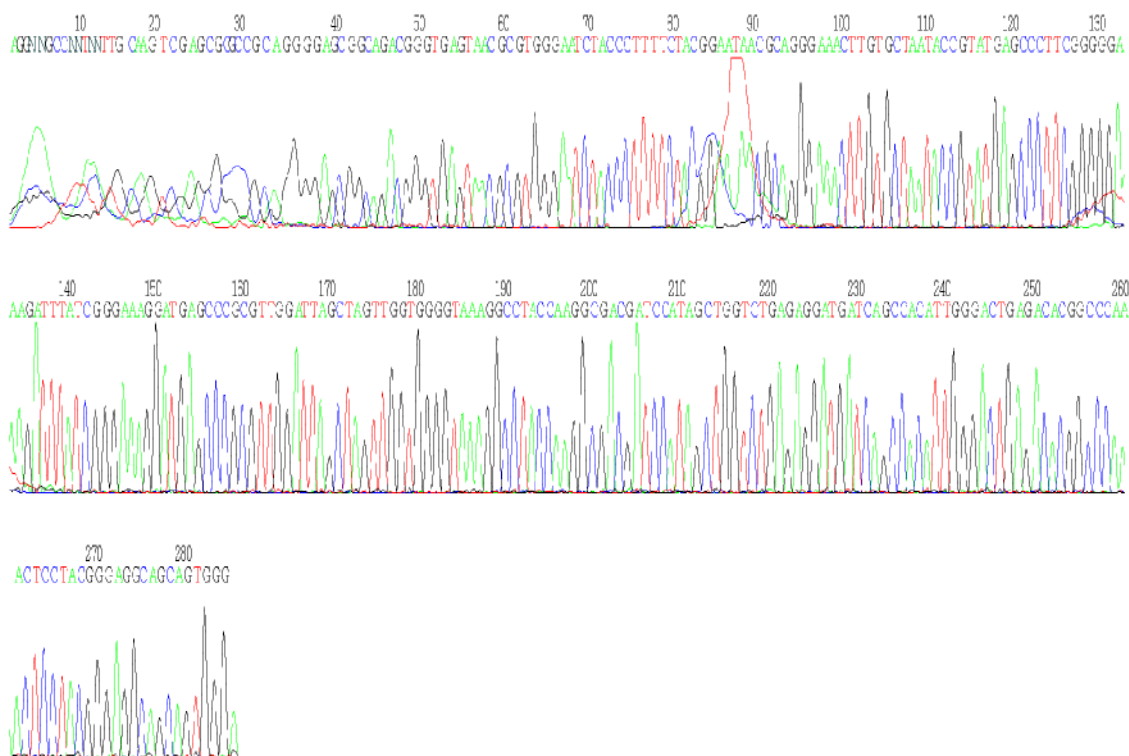


Figura 22: Secuencia de bases para el aislamiento Agr1,2

La comparación de las secuencias obtenidas con el banco de datos, arrojó los resultados que se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultados obtenidos a partir de las secuencias de 16S

<u>Aislamiento</u>	<u>Bp</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>	<u>Homología</u>
QB5	370	<i>Sinorhizobium</i>	<i>medicae, fredii meliloti</i>	99%
QA5	370	<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii, meliloti</i>	100%
Agr1,2	280	<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii, meliloti</i>	99%

Con los resultados obtenidos de la base de datos se comprobó una homología con el género *Sinorhizobium* del 99 % para los aislamientos QB5 y Agr1,2 y del 100 % para el aislamiento QA5. Esta identificación genética se corresponde con las caracterizaciones morfológicas y bioquímicas realizadas.

Por esta razón y por presentar además buenos parámetros tanto cinéticos como simbióticos, fueron estos tres los aislamientos seleccionados para la preparación de inoculantes.



4.4. Ensayo en cámara climatizada con plantas de alfalfa

Con los aislamientos seleccionados, en función de la electroforesis de isoenzimas y teniendo en cuenta los parámetros cinéticos, se realizó el ensayo en cámara climatizada con control de luz y temperatura, según un diseño totalmente aleatorizado con 10 repeticiones en tubos con medio Jensen con los siguientes tratamientos:

- Testigo sin inocular (T)
- Testigo suplementado con nitrógeno (N)
- Inoculado con la cepa B399 como patrón recomendada por INTA-Castelar
- Inoculado con la cepa Lq51 como patrón aislada de la región
- Inoculados con cada uno de los aislamientos: QB3, QB5, QB6, Agr12, QA1, QA2, QA5.

Durante el ensayo se contaminó el tratamiento nitrogenado (N), presentando nódulos en sus raíces y un bajo crecimiento, por lo cual se decidió no tenerlo en cuenta para el posterior análisis de los resultados.

4.4.1. Recuento de nódulos: En la Figura 23 se muestra la cantidad de nódulos por planta de cada uno de los tratamientos que resultaron efectivos en cuanto a la nodulación.

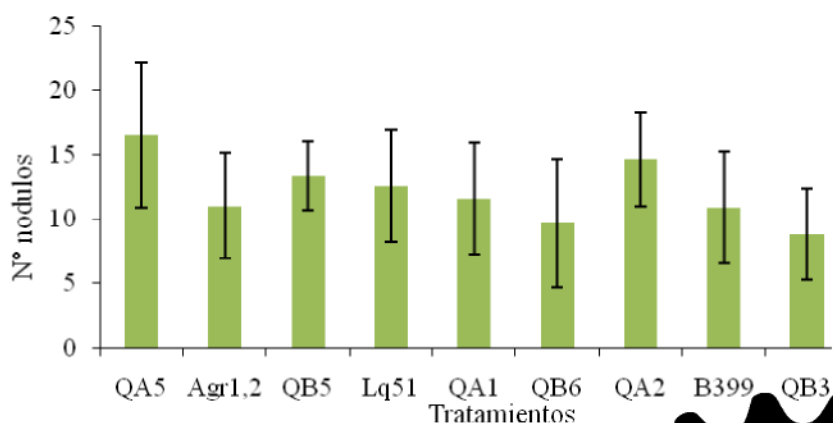


Figura 23: Valores medios de recuento de nódulos de las plantas de alfalfa y sus correspondientes desvíos estándares para cada tratamiento realizado en el ensayo en cámara climatizada.

4.4.2. Peso Seco: En las Figuras 24 y 25 se pueden observar las diferencias cuantitativas y cualitativas respectivamente, entre los tratamientos del ensayo, con respecto al peso seco por planta.



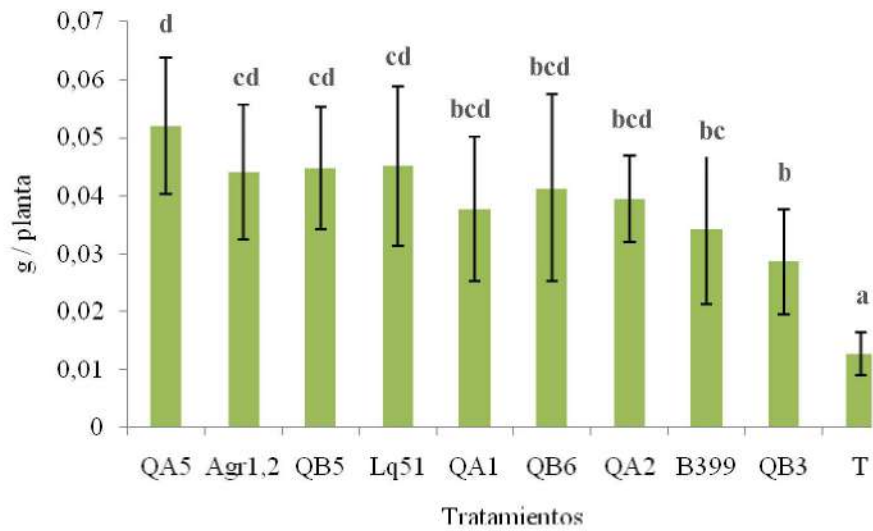


Figura 24: Valores medios de peso seco de parte aérea de las plantas de alfalfa y sus correspondientes desvíos estándares para cada tratamiento realizado en el ensayo en cámara climatizada. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,005$).



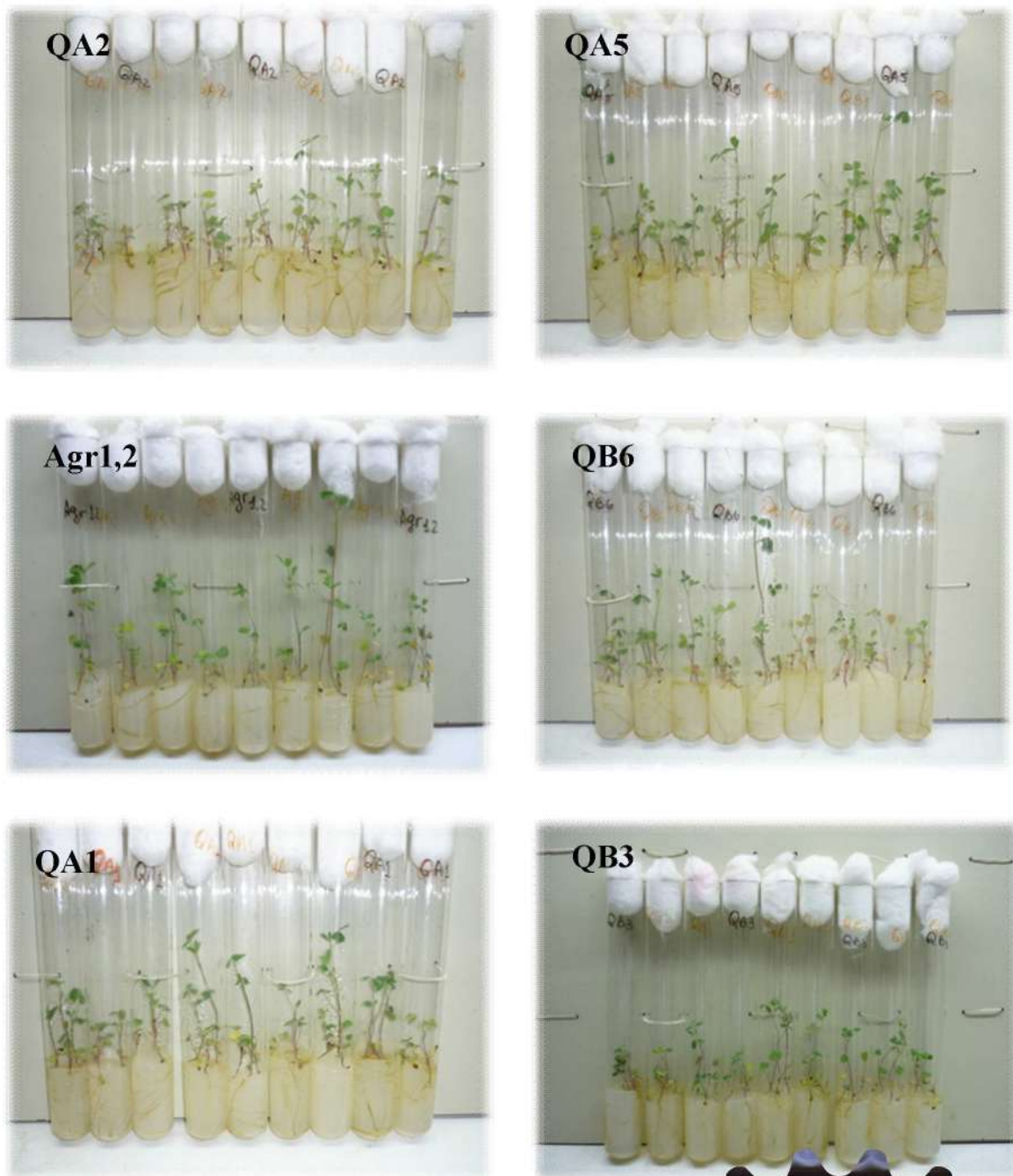


Figura 25: Comparación cualitativa de cada uno de los tratamientos realizados en el ensayo en cámara climatizada.

4.4.3. Contenido de nitrógeno total: En la Figura 26 se muestra el gráfico del contenido de nitrógeno de parte aérea de los diferentes tratamientos.



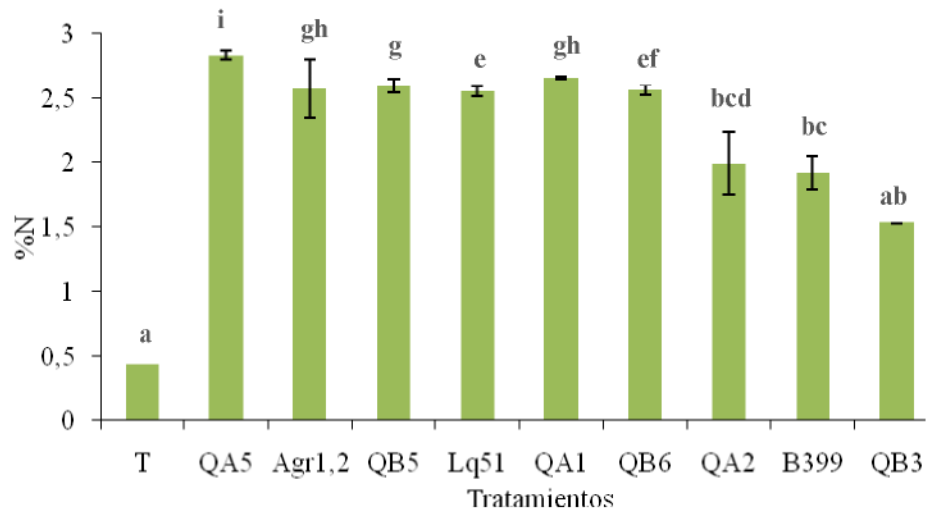


Figura 26: Valores medios del contenido de nitrógeno total de las plantas de alfalfa y sus correspondientes desvíos estándares para cada tratamiento realizado en el ensayo en cámara climatizada. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,005$).

4.4.4. Análisis estadístico: En la Tabla 14 se muestran los valores medios y sus desvíos estándares (DE) de los parámetros evaluados: peso seco de parte aérea (PS), porcentaje de nitrógeno (N), porcentaje de proteínas (P) y recuento de nódulos (RN) de los distintos tratamientos.

Tabla 14: Resultados de peso seco de parte aérea (PS), recuento de nódulos (RN), porcentaje de nitrógeno (N), porcentaje de proteínas (P).

Tratamiento	PS(g) ± DE	RN ± DE	N(%) ± DE	P(%) ± DE
QA5	0,052± 0,012 d	16,56± 5,64	2,840± 0,014 i	2,656± 0,044
Agr1,2	0,044± 0,012 cd	11,00± 4,09	2,650± 0,113 gh	17,750± 0,088
QB5	0,045± 0,011 cd	13,33± 2,65	2,605± 0,021 g	16,563± 0,707
Lq51	0,045± 0,014 cd	12,56± 4,36	2,565± 0,021 e	16,281± 0,133
QA1	0,038± 0,012 bcd	11,56± 4,33	2,645± 0,007 gh	16,031± 0,133
QB6	0,041± 0,016 bcd	9,67± 5,00	2,570± 0,014 ef	16,551± 0,044
QA2	0,040± 0,007 bcd	14,67± 6,67	1,905± 0,120 bcd	16,063± 0,088
B399	0,034± 0,013 bc	10,89± 4,34	1,965± 0,064 bc	11,906± 0,751
QB3	0,029± 0,009 b	8,78± 3,56	1,535± 0,007 ab	12,281± 0,398
T	0,013± 0,004 a		0,425± 0,007 a	9,594± 0,044

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,050$).

En el ensayo en cámara climatizada, todos los tratamientos inoculados con bacterias lograron simbiosis, con producción de biomasa y concentración de nitrógeno, con valores



equivalentes, en la mayoría de los casos, a los tratamientos inoculados con las cepas patrones. El análisis de varianza (ANOVA) realizado estableció que existen diferencias significativas entre los tratamientos. Para establecer las diferencias entre los valores medios se realizó un test no paramétrico (dado que los datos obtenidos del ensayo en cámara no tenían una distribución normal), la Prueba de Friedman, utilizando el programa INFOSTAT. Por medio de este test estadístico se determinó que los valores de peso seco de parte aérea (PS) y porcentaje de nitrógeno (N) de los tratamientos inoculados son significativamente mayores que los valores del testigo sin inocular (T). Además el test estableció diferencias entre tratamientos, mostrando para el aislamiento QA5 valores significativamente mayores, tanto en PS como en N, en comparación con la cepa patrón B399, usada comercialmente para la producción de inoculantes.

Teniendo en cuenta los 3 parámetros medidos (PS, N y RN) se plantearon gráficas de correlación entre PS-%N (Figura 27) y entre RN-%N (Figura 28).

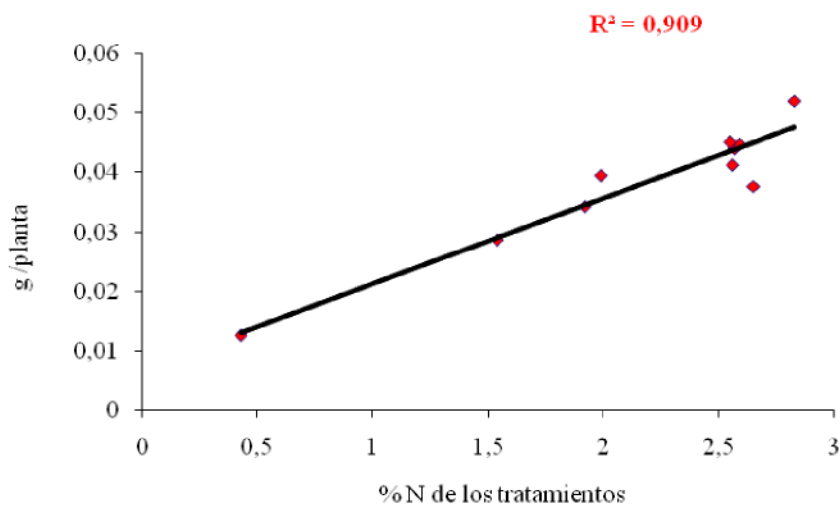


Figura 27: Correlación entre los valores de peso seco y porcentaje de nitrógeno

Analizando el gráfico, se puede observar que existe una correlación significativa entre el contenido de nitrógeno y los valores de peso seco obtenidos. Estos resultados indican que a mayor obtención de materia seca, mayor es el porcentaje de nitrógeno fijado y esto se traduce en un mayor contenido de proteínas en la planta.



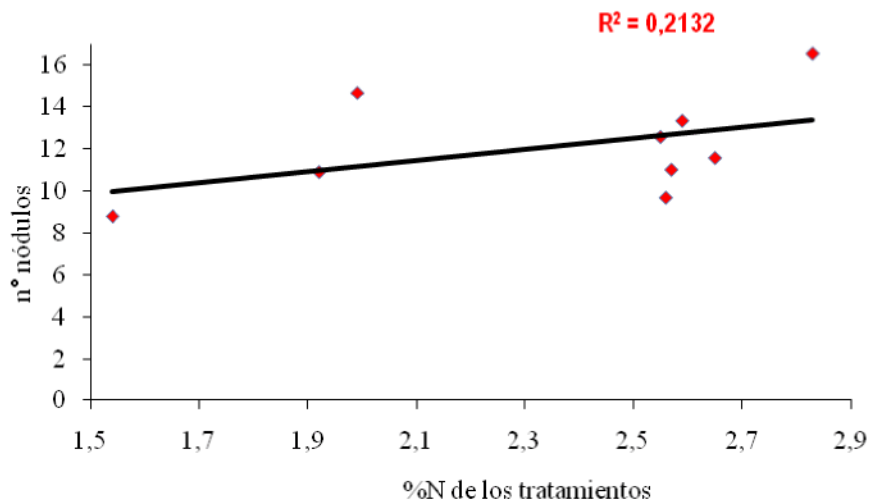


Figura 28: Correlación entre los valores de número de nódulos y porcentaje de nitrógeno

El análisis del gráfico muestra que no existe una correlación significativa entre la cantidad de nódulos y el contenido de nitrógeno de la planta. Se puede observar entonces que existen diferencias respecto a la efectividad de la simbiosis de algunos aislamientos nativos. En algunos casos, la leguminosa responde bien a la inoculación, pero en ocasiones, la inoculación es completamente inefectiva (Lascano, 1991).

Por otro lado, las bacterias varían en su infectividad y capacidad para fijar nitrógeno (Olivares, 2008), esto indica que, a pesar que hubo una buena formación de nódulos en todos los tratamientos inoculados, la fijación de nitrógeno no ha sido efectiva en todos ellos, demostrando de esta manera la existencia de nódulos inactivos.

4.4.5. Índice de eficiencia relativa (IER): Según lo descrito en Materiales y Métodos en el inciso 3.7.4. el cálculo de IER se debe calcular teniendo en cuenta el valor del tratamiento del testigo fertilizado con nitrógeno. Como se descartó dicho valor, se decidió determinar un IER con respecto a la cepa patrón B399 (Tabla 15), la cual es recomendada para la inoculación de alfalfa por IMYZA-JNTA, Castelar (Berticari, 2006). Para la realización de este cálculo se debió realizar una modificación en la ecuación quedando ésta de la siguiente manera:

$$IER = \left(\frac{\text{Trat inoc} - \text{Trat sin inoc}}{\text{Trat inoc con B399} - \text{Trat sin inoc}} \right) \times 100$$



Tabla 15: Valores de Índice de Eficiencia Relativa con Respecto a la cepa patrón B399

<u>Tratamientos</u>	<u>IER (%)</u>
QA1	145
QA2	126
QA5	235
QB3	75.5
QB5	156
QB6	132
Agr1,2	188
Lq51	152

Los valores de IER con respecto a la cepa patrón B399 de la Tabla 15 corroboran el análisis de los parámetros analizados anteriormente. Se puede observar que aquellos tratamientos inoculados con los aislamientos nativos QA1, QA2, QA5, QB5, QB6, Agr1,2 y la cepa patrón Lq51 presentan mayor eficiencia que la cepa patrón B399. Por el contrario resultó no efectiva con respecto al patrón la inoculación con el aislamiento nativo QB3.

4.5. Obtención y control de calidad de inoculantes

4.5.1. Obtención de cultivos de alta concentración celular: Se desarrollaron cultivos con alta concentración para impregnar los soportes seleccionados para la formulación de los inoculantes. Para el control del crecimiento celular y la pureza de los cultivos se realizaron medidas de densidad óptica (DO) y pH respectivamente, que se muestran en la Tabla 16, conjuntamente con observaciones microscópicas.

Tabla 16: Control de pureza de los cultivos

<u>Cepa</u>	<u>(DO)</u>	<u>pH</u>
B399	11.08	7.78
QA5	8.7	7.78
QB5	8.62	7.81
Agr1,2	8.56	7.85



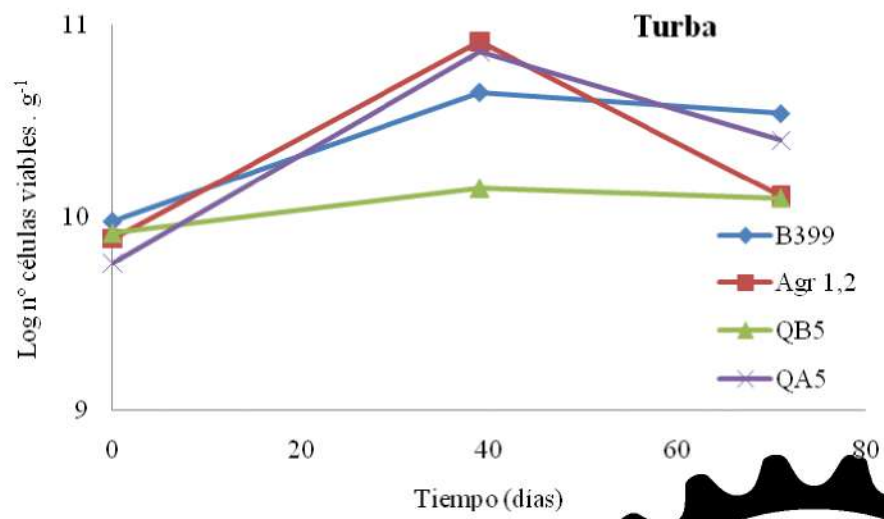
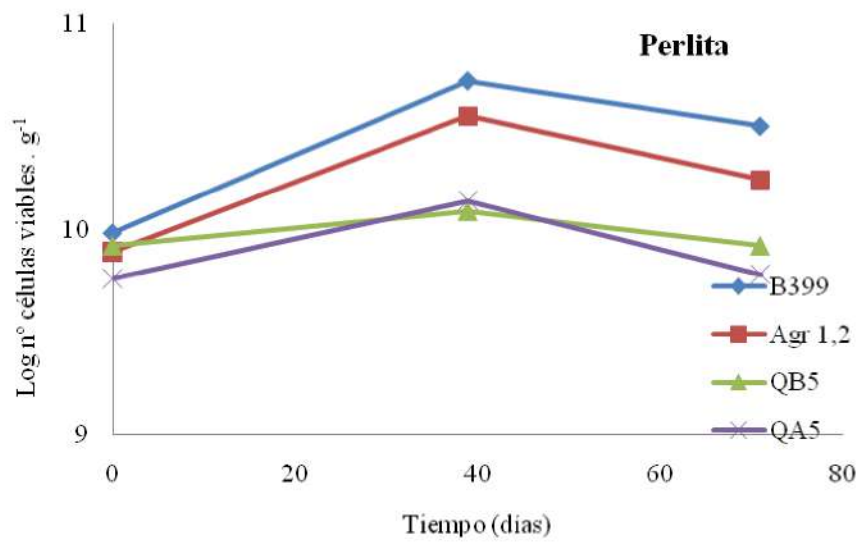
4.5.2. Material soporte: en la Tabla 17 se muestran las características de los soportes utilizados.

Tabla 17: Características fisico-químicas de los soportes utilizados

<u>%</u>	<u>Turba</u>	<u>Perlita</u>	<u>Perlita:Turba(50:50)</u>
Carbono	40	-	
Nitrógeno	6.3	-	
Cenizas	13.20	-	
SiO ₂	-	76	
Al ₂ O ₃	-	17	
Fe ₂ O ₃	-	0.3	
CaO	-	0.44	
MgO	-	0.04	
Na ₂ O	-	2	
K ₂ O	-	4.6	
Capacidad de retención de H ₂ O	60	180	90
pH	6.7	8.42	7.07

4.5.3. Recuento de rizobios viables: Se realizó por recuento en placas el control de calidad de los inoculantes preparados. En la Figura 29 se comparan los resultados de la evolución de la viabilidad de los aislamientos Arg1,2, QA5 y QB5 frente a la cepa patrón B399, en los soportes considerados (turba, perlita-turba 50:50- y perlita), hasta los 72 días de preparados los inoculantes.





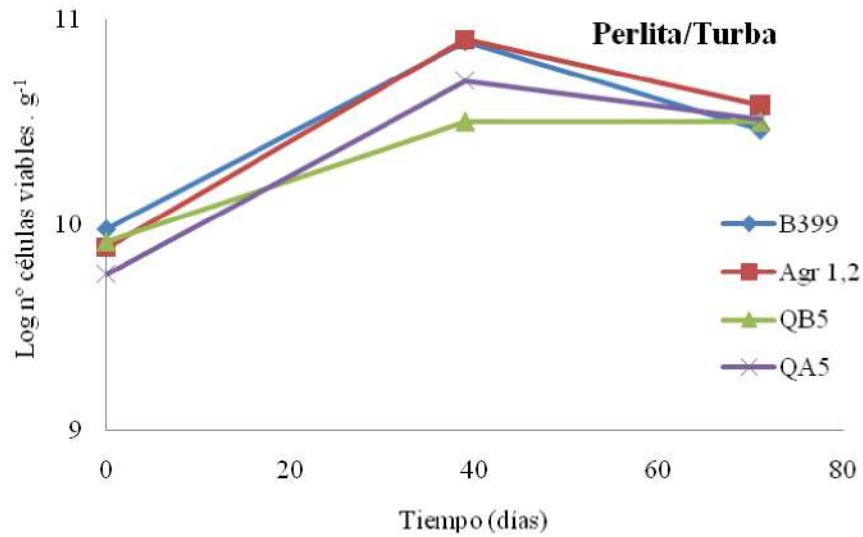
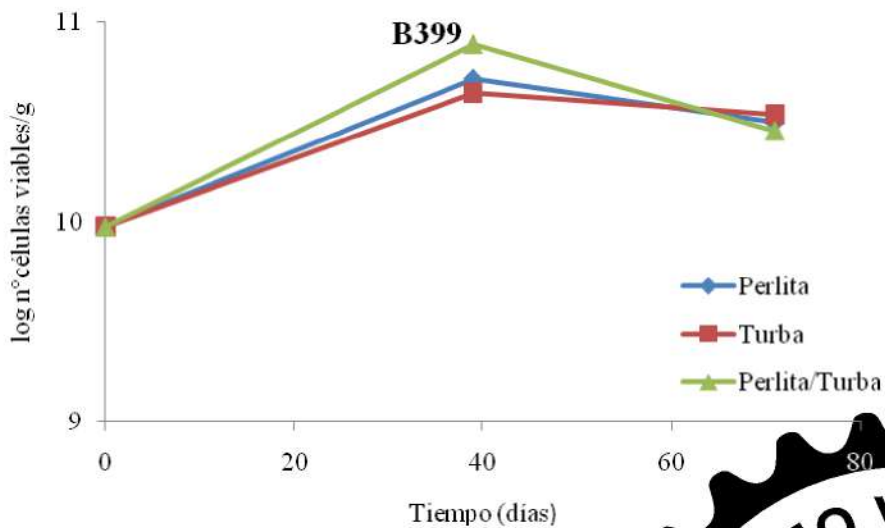


Figura 29: Supervivencia en función del tiempo de los aislamientos seleccionados frente a la cepa patrón B399, en cada uno de los soportes estudiados.

En la Figura 30 se comparan los resultados de supervivencia de de la cepa patrón B 399 y de cada aislamiento seleccionado en los distintos soportes en estudio durante el periodo de tiempo ya mencionado.



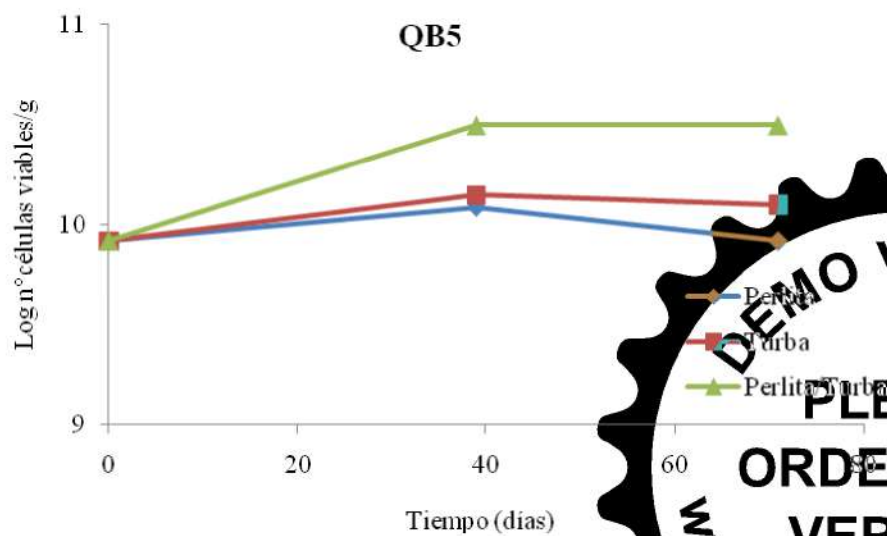
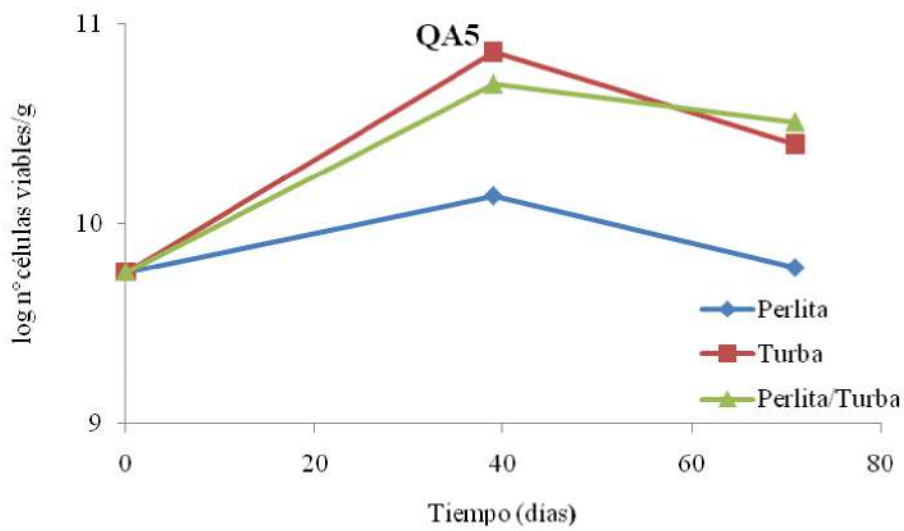
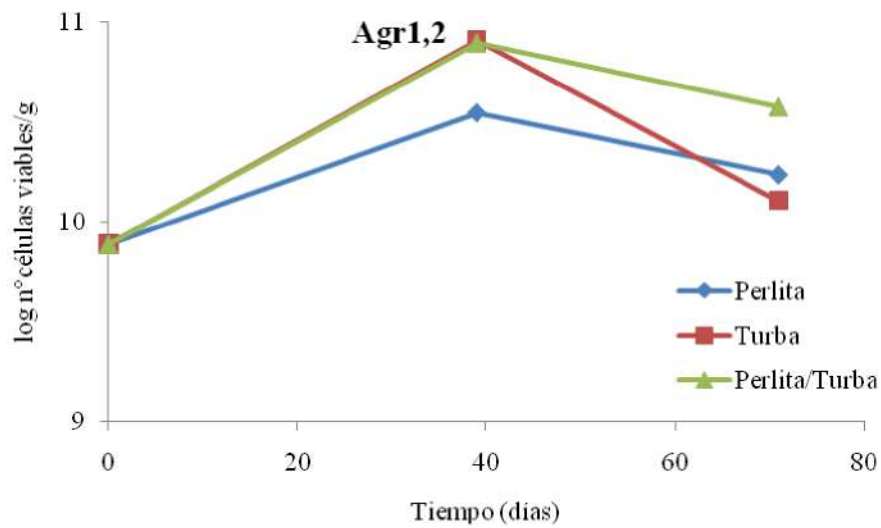


Figura 30: Supervivencia de la cepa patrón y de cada uno de los aislamientos en función del tiempo, en los tres soportes utilizados.



En nuestro país la legislación indica que un inoculante debe tener al menos 1×10^9 ufc.g⁻¹ a la elaboración y no menos de 1×10^8 ufc.g⁻¹ al vencimiento del inoculante (Fernández Canigia, 2003; Peticari, 2006; REDCAI, 2006). Es la resolución N° 310/94 del SENASA la que establece los parámetros a los que deben ajustarse los inoculantes para su comercialización. Los valores que se observan en los gráficos (Figura 29 y 30) muestran que el número de células viables por gramo de inoculante, en el transcurso de los 72 días de evaluación, están por encima de los requerimientos oficiales, comportándose de manera similar para cada microorganismo, los tres soportes en estudio, además también tienen un comportamiento similar cada aislamiento nativo frente a la cepa patrón. Sin embargo si tenemos en cuenta el uso de perlita como soporte alternativo, surge que si bien tiene un bajo costo y una alta capacidad de retención de agua, permite una mejor sobrevivencia cuando se le adiciona turba, comportamiento que se puede atribuir al aporte de nutrientes por parte de este último producto. De todos modos se seguirá con la evaluación de supervivencia de los microorganismos hasta completar los seis meses de control.



5. CONCLUSIONES

Los aislamientos provenientes de la Muestra A de Quemú-Quemú muestran una similitud respecto al perfil isoenzimático estudiado del 76% con la cepa de patrón B399. Mientas que los de la Muestra B de Quemú-Quemú y la de Santa Rosa se asemejan más a la cepa Lq51.

Algunos de los aislamientos estudiados (QA5, QB5, y Agr1,2) presentan mayor eficiencia respecto a la cepa de referencia B399, y sus parámetros cinéticos son similares a los de esta cepa, utilizada para la producción de inoculantes.

Mediante las técnicas de caracterización aplicadas se determinó que los aislamientos mencionados pertenecen al género *Sinorhizobium*.

En función de lo expresado se podrían utilizar los aislamientos seleccionados en la producción de inoculantes para alfalfa.

Los estudios de sobrevivencia de microorganismos en los distintos soportes avalan la posibilidad de utilizar la perlita sola o en mezclas con turba en la industria de inoculantes.

La perlita podría ser utilizada como soporte de inoculantes sólidos por su alto significado tecnológico en razón de que es un material de bajo costo y gran disponibilidad.



6. BIBLIOGRAFÍA

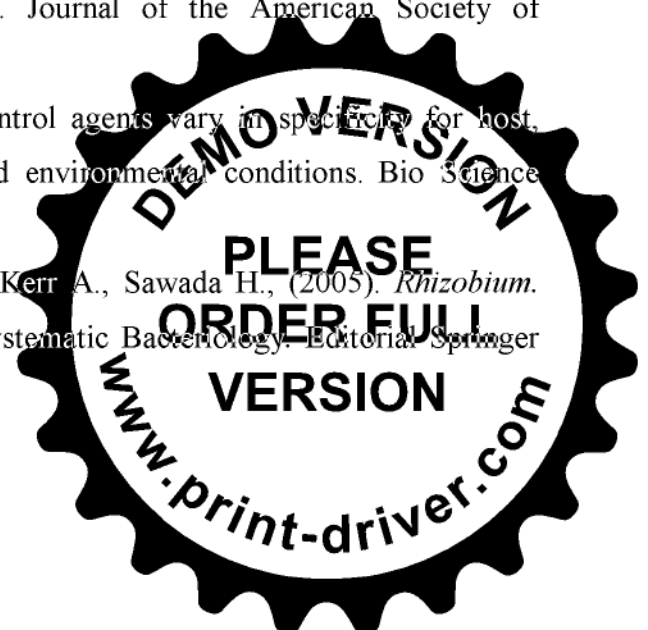
- Alfenas A.C., Peters I.; Brune W.; Passador G.C. (1991). Electroforese de Proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Universidade Federal de Vicosa M.G. Brasil. 242 pág.
- Anon. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9th edition. The William and Wilkins Co., Baltimore, USA. p. 78
- Aragón, J. R. et al. (1986). Investigación, tecnología y producción de alfalfa. Colección científica, tomo XXII.
- Azcón-Bieto, F. and Talón, M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. Mc. Graw-Hill. 16: 247-260.
- Ballati, A. P. and Freire, J. (1996). Legume Inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management. Ed. Kinggraf. La Plata, Argentina. p. 148.
- Basigalup, D. and Rossanigo, R. (2007). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Cap. 1:15-25. Ed: D.R. Basigalup. INTA.
- Bashan, Y. and Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology. *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36:591-608.
- Bazin, M.J.; Markham, P.; Scott, E.M. and Lynch, J.M. (1990). Population dynamics and rhizosphere interactions. In J.M. Lynch (ed.), *The rhizosphere*. John Wiley and Sons, New York. p. 99-127.
- Beringer J.E.R., (1974). Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*.
- Biofertilizer Manual, (2006). By FNCA Biofertilizer Project Group. Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA). Published by Japan Atomic Industrial Forum (JAIF). Chapter III:41-49.
- Bowen, G.D. and Rovira, A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66: 1-102.
- Cabral, D.R.; Pereyra J.A. y Ochoa, M.A. (1985). Alfalfa. Producción de semillas. INTA- Dirección Regional Mendoza (Argentina). Folleto N° 78. 24 pág.
- Calvert, H.E.; Pence, M.K.; Pierce, M.; Malik, N.S.A.; Bauer, W.D. (1984). Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Canadian Journal of Botany*, 62: 2375-2384.



- Cerda Castillo, M.E. (2008). Aislamiento de micromonosporas de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. Departamento de microbiología y genética.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), (1988). Simbiosis Leguminosa-rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. Rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación selección y manejo de la simbiosis leguminosa rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de microbiología de Suelos del Programa de Frijol (com.). Cali, Colombia.
- Comerón, E. A. and Romero, L. A. (2007). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Cap. 14:305-328. Ed: D.R. Basigalup. INTA.
- Conrad, H.R. and Klopfenstein, T.J. (1988). Role in livestock feeding-greenchop, silage, hay and dehy. In: Alfalfa and alfalfa improvement. Hanson, A.A., Barnes, D.K. and R.R. Hill eds. Agronomy N° 29. ASA-CSSA-SSSA.
- Crookston, R. K. (1984). The rotation effect. What causes is to boost yields? Crop & Soil 36;12-14.
- Cuadrado B., Rubio G., Santos W. (2009) Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1), 78-104, 2009.
- Culot, J. P. (1986). Nutrición mineral y fertilización en el ambiente de la región pampeana. In: Investigación, tecnología y producción de alfalfa. INTA. Buenos Aires. (Argentina)
- de Felipe Antón, M.R. (2002). Biotecnologías limpias en agricultura. En La salud, prioridad en el VI programa de medioambiente de la Unión Europea. Eds: Real Academia Nacional de Farmacia. Pp. 257-278.
- D'Onofrio, M. and Alarcón, A. (2007). Inoculación en Soja. Ediciones INTA. Revista N° 54, p. 7.
- Dudley, M.E.; Jacobs, T.W.; Long, S.R. (1987). Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. Planta, 171: 289-303.



- Fernández Canigia, M.V. (2003). Manual de Nodulación. 53 p.
- Foucher, F. and Kondorosi, E., (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. Plant Molecular Biology, **43**: 773-786.
- Frioni, L., (1999). Procesos microbianos. Colección manuales. Ed. De la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina. Vol. I y II.
- Garrity, G. M. and Holt, J. G. (2001). The road map to the manual. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edición. Volume I. Boone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. (eds.). pp. 119-166.
- Giller, J. E.; Mc Donagh, J. F. and Cadisch, G. (1994). Can biological nitrogen fixation sustain agriculture in the tropics. En: Soil Science and Sustainable Land Mangagement in the Tropics. (eds.: J. K. Syers and Rimmer, D. L.). CAB International, Wallingford.
- Gillis, M.; Bañadme, P.; De Vos, P.; Swings, J. and Kersters, K. (2001). Polyphasic Taxonomy. Pp. 43-48. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edición. Volume I. Boone, D. R., Castenholz, R. W. and Garrity, G. M. (eds.)
- Grassano, A.; Ronchi, A. y Balatti, A.P. (1996). Respuesta de la alfalfa a la inoculación en áreas de la Provincia de La Pampa. RIA-INTA. Vol 2 N°2:1-14.
- Halbleib, C. M. and Ludden, P.W. (2000). The Journal of Nitritrion. 1081-1084.
- Hirsch, A. M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. New phytol. 122: 211-237.
- Hirsch, A.; Lumm, M.R. and Downie, A. (2001). What makes the rhizobia-legume symbiosis so especial?. Plant Physiology. Vol 127, pp. 1484-1492.
- Infoagro. (2005). <http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/alfalfa.asp>
- Kiesselbach, T. A.; Russely, J. A. and Anderson, J. A. (1929). The significance of subsoil moisture in alfalfa production. Journal of the American Society of Agronomy 21(3): 241-268.
- Kloepper, J. W., (1996). Biological control agents vary in specificity for host, pathogen control, ecological habitat and environmental conditions. Bio Science 46:406-409.
- Kuykendall D., Young J., Martínez E., Kerr A., Sawada H., (2005). *Rhizobium*. Frank 1889,338. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Editorial Springer US. P. 325-340.



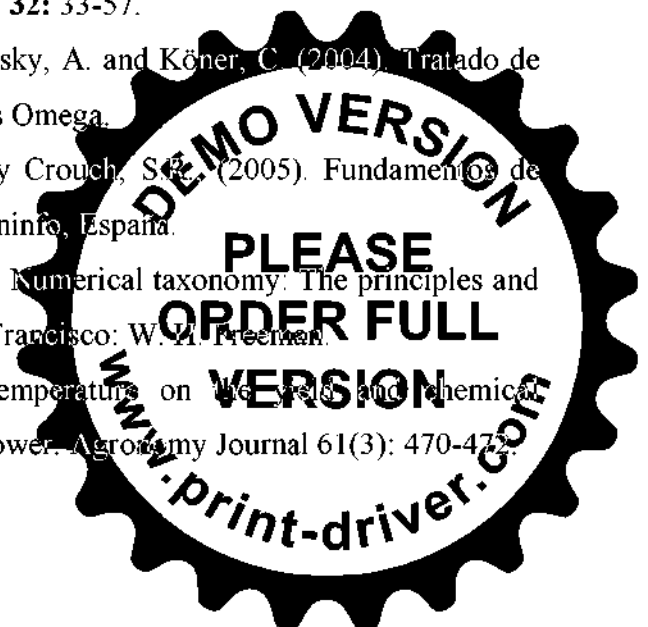
- Lascano, C.E. (1991). Establecimiento y renovación de pasturas: conceptos, experiencias y enfoque de la investigación, Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, Sexta Reunión del Comité Asesor. CIAT, 425 pág.
- Lee, S.; Flores-Encarnación, M.; Contreras-Zentella, M.; Garcia-Flores, L.; Escamilla, J.E. and Kennedy, C. (2004). Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.* 186(16):5384-5391.
- Lodeiro, A. R.; López García, S. L.; Mongiardini, E.; Quelas, J. I. and Peticari, A. (2003). Los Rizobios y la inoculación de las Leguminosas para la Fijación Simbiótica de Nitrógeno. Cap. 14. Microbiología Agrícola. Un aporte a la investigación argentina. Argentina. Ed. Ada Albanessi y col. UNSE. p. 275.
- Lynch, J. M. (1990). *The Rhizosphere*. John Wiley and Sons, New York. p. 458.
- Mahecha, L. (2002). El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15(2): 226-231.
- Mayz, J. (1997). Simbiosis Leguminosas-Rhizobia. Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IAPUDO. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Maturín: Venezuela. 113p.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica del nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 1-20.
- Mc Key, D. (1994). Legumes and nitrogen: The evolutionary ecology of a nitrogen demanding lifestyle. In: *Advances in Legume Systematics 5: the Nitrogen Factor* (Eds. J. I. Sprent and McKey, D.), Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 21-228.
- microMacro. Desarrollo sustentable-Definición de Agricultura Sustentable. www.micromacro.tv/saber_mas_desarrollo_sus-42.htm
- Mills, H. A. and Jones, J. B. (1996). *Plant analysis handbook II*. Micro - Macro Publishing, Inc. 422 p.
- Morón, A. (2000). Alfalfa: Fertilidad de suelos y estado nutricional en sistemas agropecuarios de Uruguay. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* N° 8. INPOFOS Cono Sur 8: 1-6.
- Moschetti, C.; Martínez, E.; Echeverría, E.; Ávalos, L.M. (2007). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Cap. 18:407-442. Ed: D.R. Basigalup. INTA.
- Montañez, A.; Labandera, C. and Solari, L. (2004). Fijación de nitrógeno a una escala nacional. *LEIZA, Revista de Agroecología (Uruguay)*: 19:33.



- Nelson, D.W. and Sommers L.E., (1996). Total carbon, organic carbon and organic matter. En: Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods. SSSA. Chapter 34, pp: 960-1007.
- Oldroyd, G.E. and Downie, J.A. (2004). [Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes](#). *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 566-576.
- Olivares, P. J. (2008). Fijación biológica de nitrógeno. Estación experimental de Zaidín, CSIC, Granada.
- Panigatti, J. L. (1992). Las rotaciones agrícolas con pasturas en la pampa húmeda Argentina Revista INIA de Investig. Agronómicas 1:215-225
- Parsons, R. (2004). Plant – Microbe Metabolism. Disponible en www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm
- Paul, E. A. and Clark, F.E. (1989). Soil microbiology and biochemistry. San Diego, Academic Press. p. 275.
- Perez, G.; Gómez, G.; Nápoles, M.C. y Morales, B. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. Pastos y Forrajes v.31 n.2, pp. 1-1.
- Peticari, A. (2006). Pasturas de alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. Segundo Congreso Nacional de Conservación y Uso de Forrajes. IMYZA-CICVyA - INTA Castelar.
- Peticari, A. [Uso de Biofertilizantes. Inoculación y fijación biológica del nitrógeno en el cultivo de soja](#). IMYZA- CICVyA - INTA Castelar. www.inta.gov.ar/imyza/info/doc/inoc/inocular.pdf
- Pistorio, M. (2001). Identificación y caracterización molecular de plásmidos transmisibles por conjugación en aislamientos locales de *Sinorhizobium meliloti*. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. p.131.
- Posso Duque, D. y Ghneim Herrera, T. (2008). Uso de marcadores moleculares para la estimación de la diversidad genética en plantas. Manual de Laboratorio. Ediciones IVIC. p. 75.
- Racca, R.; Collino, D.; Dardanelli, J.; Basigalup, D.; González, N.; Brenzoni, E.; Hein, N.; Balzarini, M. (2001) Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA. 56 pág.



- REDCAI, (2006). Red de Control de Calidad de Inoculantes. Documento de Procedimientos N° 1. Control de Calidad de Inoculantes para Leguminosas.
- Rodicio, M.R. and Mendoza, M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del RNAr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22 (4): 238-45.
- Rodríguez, N. E.; Spada M. C. (2007). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Cap. 2:29-43. Ed: D.R. Basigalup. INTA.
- Rodríguez Barrueco C., Sevillano García F., Subramaniam P., (1984). La fijación de Nitrógeno atmosférico, una biotecnología en la producción agraria. Temas de divulgación. 1ª edición.
- Ronchi, A. L. (1994). Selección de soportes para la producción de inoculantes para leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Pampa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. p. 178.
- Ronchi A.L., Grassano A.E., Balatti A.P, Scarone J.G., (2000). Respuesta a la inoculación de alfalfa con inoculantes a base de perlita. *Información tecnológica-* Vol. 11 N° 4.
- SAMLA -Sistema de apoyo metodológico a los laboratorios de análisis de suelos, agua, vegetales y enmiendas orgánicas- (2004). Métodos de laboratorio para determinación del contenido de sales solubles de los suelos. SAGyP, Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo. Versión en CD.
- Selander, R.; Caugant, D.; Ochman, H.; Musser, J.; Gilmur, M. and Whittan, T. (1986). "Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. *Appls. and Environ. Microbiol.* Sol 51, N° 5: 873-884.
- Schultze, M. and Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics*, 32: 33-57.
- Sitter, P.; Weiler, E.; Kadereit, J.; Bresinsky, A. and Köner, C. (2004). *Tratado de Botánica.* Barcelona (España), Ediciones Omega.
- Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. y Crouch, S.R., (2005). *Fundamentos de Química Analítica.* 8a. ed. Thomson Paraninfo, España.
- Sneath, P. H. A. and Socal, R. R. (1993). *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification.* San Francisco: W. H. Freeman.
- Smith, D. (1969). Influence of the temperature on the yield and chemical composition of "Vernal" alfalfa at first flower. *Agroonomy Journal* 61(3): 470-472.



- Somasegaran, P., Hoben, H.J., (1994). Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* Technology, Springer Laboratory, New York.
- Sosa, A.; Elías, A.; García, O.A. & Sarmiento, M. (2004). Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. Rev. cubana Cienc. agríc.38 (2):197
- Spaink, H.P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annual Review of Microbiology, **54**: 257-288.
- Stahl, D. A. (1995). Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. Molecular Ecology 4:535-542.
- Sylvia, D.; Hartel, P.; Fuhrmann, J.; Zuberer, D. (2005). Principles and Applications of Soil Microbiology. 2ª ed. New Jersey, Editorial Prentice Hall, 644p.
- Swanson J.A., Mulligan J.T.; Long S.R. (1993). Regulation of *symM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. Genetics, **134**: 435-444.
- Thomas, GW. (1996). Chapter 16: Soil pH and Soil acidity. En: Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods. SSSA. pp:475-490.
- Ureta, A. and Nordlund, S. (2002). Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. J. Bacteriol. 184(20):5805-5809.
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. Cien. Inv. Agr. 32(2) 133-150.
- Urzúa, H. (2000b). Fijación simbiótica de nitrógeno en Chile: importante herramienta para una agricultura sustentable. Proc. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Arequipa, Perú. P. 211-227.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook no. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Wang, T. and Romero-Martinez, J. (2005). Taxonomía de *Rhizobium*. Depto. De Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional y Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wang, E.T.; Martínez Romero, J. & López Lara, I. (2001). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. En: Microbios. (Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez Romero). Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México.



- Woese, C.R. and Olsen, G.J. (1986). Archaeobacterial phylogeny: Perspectives on the urkingdoms. *System. Appl. Microbiol.* 7, pp. 161-177.
- Yanagi, M. and Yamasato, K. (1993). Phylogenetic analysis of the Family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 107:115-120.

