

ANZUAY, MARIA SOLEDA  
Estudios bioquimicos

2014

73215



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Ciencias Naturales

Tesis para aspirar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

**“ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y GENETICOS DE  
BACTERIAS NATIVAS SOLUBILIZADORAS DE  
FOSFATO DEL AREA MANISERA DE LA  
PROVINCIA DE CORDOBA”**



21887

Mic. María Soledad Anzuay

Directora: Dra. Tania Taurian

Co-Directora: Dra. Adriana Fabra

Río Cuarto

Marzo, 2014

73215

73215

<b>MFN:</b>
<b>Clasif:</b>
T. 877

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto bajo la dirección de la Dra. Tania Taurian y la co-dirección de la Dra. Adriana Fabra, para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas.

Dra. Tania Taurian  
Directora

Dra. Adriana Fabra  
Co-Directora

Aprobado por el Tribunal de Tesis:

Dra. Elena Mercedes Fernandez    Dr. Daniel Horacio Grasso    Dr. Luis Gabriel Wall

Río Cuarto, 28 de Marzo de 2014

A MI FAMILIA

## AGRADECIMIENTOS

---

- ⊕ A la Dra. Tania Taurian, porque desde hace 9 años además de formarme y acompañarme profesionalmente; ha confiado siempre en mí, es una persona que está siempre y que me ha apoyado y aconsejado en cada paso que he dado a nivel personal.
- ⊕ A la Dra. Adriana Fabra, por su acompañamiento a lo largo de tantos años, por sus críticas constructivas y excelentes conocimientos; siendo un ejemplo a nivel profesional.
- ⊕ A la Dra. Stella Castro, por su gran calidez.
- ⊕ Al Dr. Jorge Angelini, por ayuda y apoyo en todo lo que está a su alcance.
- ⊕ A los Dres. Laura Tonelli, Eliana Bianucci y Fernando Ibañez, excelentes compañeros de laboratorio, siempre dispuestos a escuchar y colaborar no solo en lo académico, sino también en lo personal.
- ⊕ A Lili, mi gran compañera, con la que compartimos temas de investigación, excelentes momentos en el laboratorio, juntadas extra laborales y largas charlas. En un comienzo era una compañera más y con el paso del tiempo se ha convertido en una de mis mejores amigas.
- ⊕ A mis compañeros de laboratorio: Ana, Lucio, Vani, Sole F. ...., quienes junto con el resto de los chicos, me alegran el día con su compañerismo, amistad y hermosos momentos compartidos que nunca voy a olvidar.
- ⊕ A los chicos de los laboratorios 22 y 10, quienes en más de una oportunidad me han cebado unos mates charlando de la vida misma...jajajaj
- ⊕ A mis abuelos, que no están físicamente conmigo, pero sé que me están cuidando y acompañando siempre.
- ⊕ A mis papás. Gracias por su apoyo constante, por cuidarme y ahora cuidar de mis hijas.
- ⊕ A mi hermano y su flia., los quiero mucho, gracias por estar siempre a mi lado.
- ⊕ A Juan, Valentina y Josefina, mis amores. Simplemente gracias por ser lo más importante de mi vida y estar conmigo todos los días.
- ⊕ A Maricel, mi “amigacha”, quien es una persona divina, con la que me encanta compartir cada etapa de mi vida.

- ⊕ A mis amigos de la vida, siempre presentes desde hace muuuuuuuuchos años...jajaja los quiero!!! Meli, Paula, Luli, Flor, Mica, Belén, Carlota, Marina, Euge, Silvi, Vero, Guille, Ali, Vale.....Pika, Fer, Fabio, Lucas, Lauchín, Cristian.....
- ⊕ A los miembros del jurado, quienes han realizado importantes aportes a lo largo del desarrollo de esta tesis.
- ⊕ A la UNRC, por haberme brindado la educación y el espacio físico necesario para la realización de esta tesis.
- ⊕ A todos los que en determinados momentos o siempre, me han apoyado.....

Gracias!!!

## RESUMEN

---

En el presente trabajo de tesis se realizaron estudios bioquímicos y genéticos de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato del área manisera de la provincia de Córdoba. Los mismos se abordaron con el objeto de evaluar los mecanismos involucrados en la solubilización de fosfato y estudiar el efecto de la aplicación de agroquímicos sobre dicha población.

En este estudio fueron empleadas 18 bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de plantas de maní de la región manisera de la provincia de Córdoba. Estas bacterias fueron seleccionadas a partir de una colección de 433 aislamientos solubilizadores de fosfato por producir los mayores halos de solubilización de fosfato en medio sólido conteniendo fosfato tricálcico como única fuente de fósforo (P). A los fines de identificar taxonómicamente a las bacterias solubilizadoras de fosfato seleccionadas fueron obtenidas sus secuencias parciales del gen ARNr 16S. El análisis de dichas secuencias permitió determinar que las bacterias pertenecen a los géneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Enterococcus*. El análisis cuantitativo de la capacidad solubilizadora de fosfato de las bacterias consistió en determinar los niveles de P solubilizado en el medio en presencia o ausencia de soluciones tampón y se analizaron las variaciones de pH del medio. Asimismo, se determinaron los niveles de ácido glucónico producidos por las bacterias, principal ácido asociado al proceso de solubilización de fosfato, y la presencia del gen *pqqE* en el genoma de las mismas. Los niveles de P solubilizado por las bacterias y la disminución significativa de los valores de pH del sobrenadante del cultivo observados en la mayoría de las bacterias, sugieren que el mecanismo mediante el cual las bacterias de la colección solubilizan fosfato involucraría la acidificación del medio, probablemente como consecuencia de la producción de ácidos orgánicos. Las bacterias produjeron diversas cantidades de ácido glucónico, sin que exista correlación entre dichos valores y los niveles de P solubilizado por la mayoría de los aislamientos analizados. La presencia del gen *pqqE* se evaluó con el fin de establecer una posible relación entre ésta y la capacidad de producir ácido glucónico de las bacterias. Se confirmó su presencia en todas las bacterias Gram negativas de la colección y en cepas de referencia con capacidad solubilizadora de fosfato.

Los efectos benéficos de la inoculación de las bacterias de la colección en plantas de maní se evaluaron en microcosmo, observándose que promovió el crecimiento vegetal e incrementó el contenido de P soluble tanto en el tejido de las plantas como en el soporte utilizado para su crecimiento.

La evaluación del efecto de la aplicación de agroquímicos en los suelos maniseros de la provincia de Córdoba sobre la abundancia y diversidad genética de bacterias solubilizadoras de fosfato indicó que no se afectó la abundancia pero sí la estructura de la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato cultivables, determinándose un aumento de la diversidad genética de dicha población y modificación de la frecuencia del gen bacteriano *pqqE*. Además, se determinó una mayor diversidad del gen *pqqE* en la población solubilizadora de fosfato no cultivable en la parcela tratada con agroquímicos respecto de la control.

La presencia del gen *pqqE* fue confirmada en la mayoría de las bacterias solubilizadoras de fosfato Gram negativas aisladas de este ensayo y en todas las bacterias Gram negativas de la colección. Por lo tanto, se sugiere que este gen sería un potencial marcador molecular de bacterias solubilizadoras de fosfato Gram negativas.

## SUMMARY

---

In this thesis biochemical and genetic studies of native phosphate solubilizing bacteria obtained from the groundnut producing area in the province of Córdoba were developed. The aims were to evaluate the mechanisms involved in bacterial phosphate solubilization and to study the effect of agrochemicals application on soil phosphate solubilizing bacteria.

Eighteen native phosphate solubilizing bacteria isolated from peanut plants cultivated in central and southern region of Córdoba, Argentina were used in this study. They were selected from a collection of 433 phosphate solubilizing strains because they produce the highest phosphate solubilization halos on solid medium containing tricalcium phosphate as the sole source of phosphorus (P). Bacteria were taxonomically identified by determining 16SrRNA gene partial sequences and the analysis of these sequences allowed us to determine that the bacteria belonging to the genera *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Enterococcus*. Quantitative analysis of the phosphate solubilizing capacity was performed by determining the levels of P solubilized in the growth medium containing tricalcium phosphate and in presence or absence of buffers. Variations of pH's growth medium at the end of the experiment were analyzed. Also, levels of gluconic acid produced by bacteria, main acid associated to phosphate solubilization mechanism, as well as the presence of *pqqE* gene in their genome were determined. The levels of P solubilized by the bacteria and a significant decrease in the pH values of the culture supernatant were observed in the majority of the bacterial cultures. These results suggest that the mechanism by which bacteria collection solubilized phosphate involve the acidification of the medium, probably as a result of the production of organic acids. Levels of gluconic acid produced by the bacteria varied and no correlation between these values and the levels of P solubilized was observed. The presence of the gene *pqqE* was evaluated in order to establish a possible relation with gluconic acid production by the bacteria. It was possible to determine its presence in all Gram-negative bacteria of the collection and reference strains with phosphate solubilizing capacity.

The beneficial effects of bacterial inoculation in peanut plants was evaluated in microcosm assay and it was possible to observe plant growth promotion, increased in P content of plant tissue and in the soil used for plant growth.

Effect of agrochemicals application in soils of Córdoba indicated that the abundance of phosphate solubilizing soil bacteria was not affected. On the other hand, it produced changes in the community structure of culturable phosphate solubilizing bacteria because an increase in the genetic diversity of this population and changes in the frequency of bacterial gene *pqqE* were observed. Adding to that, more diversity was observed on *pqqE* gene sequence on non-cultivable phosphate solubilizing bacteria obtained from soil samples treated with agrochemicals compared to control samples.

The presence of the gene *pqqE* was confirmed in most Gram-negative phosphate solubilizing bacteria isolated in this study and in all Gram-negative bacteria of the collection analyzed. Considering that, it is suggested that this gene would be a potential molecular marker of solubilizing in Gram-negative solubilizing bacteria.

## INDICE

---

	Pág.
Indice de tablas .....	XV
Indice de figuras .....	XVII
Abreviaturas .....	XX
<b>Capítulo</b>	<b>Pág.</b>
1 <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Importancia del fósforo en los cultivos vegetales.....	1
2. El cultivo de maní .....	3
2.1. Importancia del cultivo de maní en la provincia de Córdoba.....	5
2.2. Niveles de fósforo en los suelos maniseros de la provincia de Córdoba.....	6
3. Bacterias solubilizadoras de fosfato.....	7
3.1. Cofactor pirroloquinolina quinona y su rol en la capacidad solubilizadora de fosfato.....	12
4. Uso de agroquímicos en las prácticas agrícolas y su impacto sobre la comunidad microbiana.....	14
5. Herramientas moleculares empleadas en los estudios de diversidad microbiana .....	17
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	20
<b>Capítulo</b>	
2 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
1. Cepas bacterianas utilizadas.....	21
1.1. Aislamientos bacterianos nativos de plantas de maní con capacidad solubilizadora de fosfato .....	21
1.2. Cepas de referencia .....	22

2. Medios de cultivo y conservación de las bacterias.....	22
3. Identificación taxonómica de los aislamientos solubilizadores de fosfato.....	23
4. Caracterización del mecanismo involucrado en la solubilización de fosfato de los aislamientos bacterianos.....	23
4.1. Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato en medio sólido.....	23
4.2. Cuantificación del fosfato solubilizado en medio líquido NBRIP-BPB.....	23
5. Cuantificación de ácido glucónico secretado por las bacterias solubilizadoras de fosfato.....	24
6. Condiciones generales de PCR y electroforesis .....	25
7. Análisis del efecto de la inoculación en plantas de maní de bacterias solubilizadoras de fosfato y de su supervivencia en ensayos en microcosmo.....	27
7.1. Desinfección y germinación de las semillas de maní.....	27
7.2. Propiedades del suelo empleado como soporte.....	27
7.3. Inoculación y condiciones de cultivo de las plantas.....	28
7.4. Determinación del efecto de la inoculación de los aislamientos sobre el crecimiento de plantas de maní.....	28
7.5. Análisis de supervivencia de las bacterias inoculadas.....	30
8. Análisis del efecto de la aplicación de agroquímicos en el cultivo de maní sobre bacterias solubilizadoras de fosfato .....	31
8.1. Aislamiento de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato provenientes de las parcelas control y tratada con agroquímicos.....	33
8.2. Análisis genotípico de las bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato provenientes de las parcelas control y tratada con agroquímicos.....	33
9. Detección del gen <i>pqqE</i> en los aislamientos cultivables solubilizadores de fosfato .....	34

9.1. PCR- <i>pqqE</i> .....	34
10. Análisis de la variabilidad del gen <i>pqqE</i> en las poblaciones bacterianas no cultivables solubilizadoras de fosfato obtenidas de las parcelas control y tratada con agroquímicos asociadas al cultivo de maní.....	35
10.1. PCR- <i>pqqE</i> -suelo.....	36
10.2. Obtención de células competentes químicas.....	37
10.3. Transformación/obtención de clones.....	37
10.4. Digestión del fragmento del gen <i>pqqE</i> .....	38
11. Análisis de los datos.....	39
11.1. Análisis estadístico.....	39
11.2. Programas informáticos empleados.....	39
11.3. Índices de diversidad.....	39

## CAPÍTULOS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Capítulo

3

MECANISMOS DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE BACTERIAS NATIVAS DEL ÁREA MANISERA DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA.....	41
1. Identificación taxonómica.....	41
2. Caracterización de la capacidad solubilizadora de fosfato.....	44
2. 1. Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato en medio sólido.....	44
2. 2. Cuantificación del fosfato solubilizado en medio líquido NBRIP-BPB.....	44
2. 3. Análisis de la capacidad solubilizadora de fosfato de las bacterias en medio líquido NBRIP-BPB con soluciones tampón.....	51

	3. Cuantificación de ácido glucónico secretado por las bacterias solubilizadoras de fosfato.....	55
	4. Detección del gen <i>pqqE</i> en los aislamientos solubilizadores de fosfato de la colección.....	58
Capítulo	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN EN PLANTAS	
4	DE MANÍ DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO Y DE SU SUPERVIVENCIA EN ENSAYOS EN MICROCOSMO.....	60
	1. Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento de plantas de maní.....	61
	1. 1. Longitud aérea y radical.....	61
	1. 2. Biomasa aérea y radical.....	61
	1. 3. Relación peso seco aéreo/peso seco radical.....	63
	1. 4. Número de cajas.....	63
	1. 5. Peso seco y número de nódulos.....	63
	1. 6. Contenido de fósforo en tejidos aéreos de la planta y en el soporte.....	67
	1. 7. Análisis de supervivencia de las bacterias inoculadas.....	70
Capítulo		
5	EFECTO DE LA APLICACIÓN DE AGROQUÍMICOS EN EL CULTIVO DE MANÍ SOBRE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO .....	73
	1. Análisis de la abundancia de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato .....	74
	2. Análisis de la diversidad genotípica de las bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato.....	76
	3. Frecuencia y variabilidad del gen <i>pqqE</i> en las bacterias cultivables y no cultivables solubilizadoras de fosfato .....	83
	3. 1. Presencia del gen <i>pqqE</i> en las cepas de referencia y en las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección.....	83

	3. 2. Presencia del gen <i>pqqE</i> en los aislamientos cultivables solubilizadores de fosfato provenientes de las parcelas control y tratada con agroquímicos.....	84
	3. 3. Análisis de la variabilidad de gen <i>pqqE</i> en las poblaciones no cultivables solubilizadoras de fosfato.....	86
Capítulo		
6	CONCLUSIONES.....	93
Capítulo		
7	BIBLIOGRAFÍA.....	95

## INDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Aislamientos bacterianos solubilizadores de fosfato nativos de maní utilizados en este trabajo.....	21
2	Agroquímicos empleados en la parcela tratada .....	32
3	Identificación taxonómica de las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección mediante análisis de la secuencia del ADNr 16S.....	43
4	Diámetro del halo de solubilización de fosfato en medio sólido NBRIP-BPB, cantidad de fósforo solubilizado por los aislamientos nativos asociados a maní y <i>P. fluorescens</i> y valores de pH del sobrenadante en medio líquido NBRIP-BPB a las 24, 48, 72 y 168 horas de crecimiento.....	45
5	Valores máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ), tiempo de incubación, pH y unidades formadoras de colonia (UFC/ml) producidas por los aislamientos nativos asociados a maní y <i>P. fluorescens</i> .....	50
6	Producción de ácido glucónico y niveles máximos de fósforo solubilizado en medio NBRIP-BPB por los aislamientos nativos asociados a maní y <i>P. fluorescens</i> .....	55
7	Longitud aérea y radical, peso fresco y seco de tallos, hojas, aéreo total y raíz, relación peso seco aéreo/peso seco radical (PSA/PSR), número de cajas y número y peso seco de nódulos de plantas de maní inoculadas con los aislamientos solubilizadores de fosfato y la cepa <i>P. fluorescens</i> a los 120 días postinoculación.....	66
8	Contenido de fósforo y nitrógeno de los órganos aéreos de plantas de maní inoculadas con los aislamientos nativos seleccionados, contenido de fósforo y valor de pH del soporte al finalizar el ensayo.....	68

9	Perfil de resistencia a antibióticos y supervivencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato en el soporte al finalizar el ensayo en microcosmo .....	71
10	Número de aislamientos bacterianos solubilizadores de fosfato, coloración de Gram, número de perfiles BOX y ERIC-PCR e índices de Simpson y Shannon-Wiener obtenidos de las parcelas control y tratada con agroquímicos en los tres tiempos analizados.....	81
11	Presencia del gen <i>pqqE</i> y capacidad solubilizadora de fosfato en las cepas de referencia.....	84
12	Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas a partir de muestras de suelo manisero que mostraron presencia del gen <i>pqqE</i> en su genoma y su frecuencia en la población de bacterias Gram negativas.....	85
13	Perfiles de digestión obtenidos del análisis RFLP- <i>pqqE</i> con las enzimas <i>CfoI</i> , <i>MspI</i> y <i>NdeII</i> a partir de ADN proveniente de suelo de las parcelas control y tratada con agroquímicos de la muestra M2.....	89
14	Patrones obtenidos del RFLP- <i>pqqE</i> con la enzimas <i>CfoI</i> , <i>MspI</i> y <i>NdeII</i> de ADN obtenido de suelo proveniente de las parcelas control y tratada con agroquímicos de la muestra M2.....	90
15	Número de patrones, porcentaje de cobertura, e índices de Simpson y Shannon-Wiener de los clones obtenidos de suelo proveniente de las parcelas control y tratada con agroquímicos de las muestras M2.....	91

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Ciclo biogeoquímico del fósforo en agroecosistemas.....	1
2	Planta de maní.....	4
3	Distribución del cultivo de maní en Argentina.....	6
4	Factores del suelo y su influencia en raíces de las plantas y microorganismos del suelo.....	7
5	Esquema de la oxidación directa no-fosforilativa de la glucosa a ácido glucónico y 2-cetoglucónico.....	11
6	Operones que codifican para la proteína PQQ en diferentes especies bacterianas.....	13
7	Vía de síntesis del cofactor PQQ.....	14
8	Esquema de análisis de diversidad bacteriana mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.....	18
9	Esquema de trabajo para la recolección de las muestras de las parcelas control y tratada con agroquímicos.....	33
10	Esquema del trabajo realizado para el estudio de la variabilidad del gen <i>pqqE</i> en las poblaciones no cultivables solubilizadoras de fosfato obtenidas de suelo con y sin agregado de agroquímicos.....	35
11	Mapa físico del vector plasmídico pGEM-T.....	36
12	Niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y <i>P. fluorescens</i> y valores de pH en medio líquido NBRIP-BPB.....	46
13	Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y <i>P. fluorescens</i> en medio líquido NBRIP-BPB y el halo de solubilización de fosfato (mm) producido en medio sólido NBRIP-BPB .....	47

14	Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y <i>P. fluorescens</i> en medio líquido NBRIP-BPB y pH del sobrenadante en medio NBRIP-BPB sin buffer .....	48
15	Niveles de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y <i>P. fluorescens</i> en medio líquido NBRIP-BPB en los diferentes tiempos analizados. A: “solubilizadores tempranos” y B: “solubilizadores tardíos”. .....	49
16	Niveles máximos de P soluble ( $\mu\text{g/ml}$ ) (A) y valores de pH (B) en los medios de cultivo de los aislamientos nativos asociados a maní y <i>P. fluorescens</i> en medio NBRIP-BPB sin solución amortiguadora, con buffer Tris-HCl y MES.....	52
17	Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y <i>P. fluorescens</i> en medio líquido NBRIP-BPB y pH del sobrenadante en (A) medio NBRIP-BPB suplementado con Tris-HCl y (B) suplementado con MES.....	54
18	Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y <i>P. fluorescens</i> y valores de ácido glucónico ( $\mu\text{g/ml}$ ) liberado al sobrenadante en medio líquido NBRIP-BPB .....	57
19	Producto de amplificación de PCR correspondiente al fragmento del gen <i>pqqE</i> (700 pb) de los aislamientos nativos solubilizadores de fosfato Gram negativos asociados a plantas de maní y <i>P. fluorescens</i> .....	58
20	Perfiles ERIC-PCR de ADN obtenidos de las colonias aisladas del ensayo de supervivencia del tratamiento inoculado con <i>Serratia</i> sp. J21.....	72
21	Abundancia de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato obtenidas de suelos maniseros crecidas en medio NBRIP-BPB en las muestras M1, M2 y M3.....	74

22	Morfología celular y coloración de Gram de las bacterias cultivables solubilizadoras de fosfatos obtenidas de suelos maniseros (parcelas control y tratada con agroquímicos) en las muestras M1, M2 y M3.....	75
23	Dendrogramas-UPGMA (coeficiente de similitud Dice) obtenidos de BOX-fingerprints de bacterias Gram positivas solubilizadoras de fosfato de parcelas control (C) y tratada (T) de suelos maniseros de la provincia de Córdoba de las muestras M1 (A), M2 (B) y M3 (C).....	77
24	Dendrogramas-UPGMA (coeficiente de similitud Dice) obtenidos de ERIC-fingerprints de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato de parcelas control (C) y tratada (T) de suelos maniseros de la provincia de Córdoba de las muestras M1 (A), M2 (B) y M3 (C).....	79
25	Porcentaje de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato PCR- <i>pqqE</i> positivas obtenidas de las parcelas control y tratada con agroquímicos en los tres tiempos analizados.....	85
26	Producto de amplificación por PCR de un fragmento de 700 pb correspondiente al gen <i>pqqE</i> a partir de ADN extraído de muestras de suelo.....	87
27	Producto de amplificación de “colony-PCR” correspondiente a una colonia que presentaba el inserto del gen <i>pqqE</i> .....	88
28	Dendrogramas-UPGMA (coeficiente de similitud Dice) obtenidos del análisis RFLP- <i>pqqE</i> con las enzimas <i>CfoI</i> (A), <i>MspI</i> (B) y <i>NdeII</i> (C) a partir de ADN proveniente de suelo de las parcelas control y tratada con agroquímicos de la muestra M2.....	89

## ABREVIATURAS

---

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	<i>adenosinetriphosphate</i> (adenosina trifosfato)
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
cm	centímetro(s)
DGGE	<i>denaturing gradient gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante)
dNTP	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DOPG	<i>direct oxidation pathway of glucose</i> (vía de oxidación directa de la glucosa)
Dpto.	departamento
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERIC	<i>enterobacteria repetitive intergenic sequences</i> (secuencias intergénicas repetitivas de las enterobacterias)
E.S.	error estándar
FBN	fijación biológica de nitrógeno
GADH	gluconato deshidrogenasa
GDH	glucosa deshidrogenasa
g	gramo(s)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPAGRO	Instituto de Pesquisas Agronómicas
M	molar
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
min	minuto(s)
mg	miligramo(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
NADPH	dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato
NBRIP-BPB	National Botanical Research Institute's phosphate grown medium

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	no determinado
P	fósforo
pb	par(es) de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
Pi	fósforo inorgánico
PGPB	<i>plant growth promoting bacteria</i> (bacterias promotoras del crecimiento vegetal)
PLFA	<i>phospholipid fatty acids analysis</i> (análisis de los perfiles de ácidos grasos)
PQQ	pirroloquinolina quinona
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
rep	<i>repetitive extragenic palindromic sequences</i> (secuencias extragénicas repetitivas palindrómicas)
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
SDS	<i>sodium dodecil sulfate</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
UNRC	Universidad Nacional de Río Cuarto
UV	luz ultravioleta
V	volts
y col.	y colaboradores
μg	microgramo(s)
μl	microlitro(s)
μM	micromolar

## CAPÍTULO 1

---

---

### INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1. IMPORTANCIA DEL FÓSFORO EN LOS CULTIVOS VEGETALES

El fósforo inorgánico (Pi), después del nitrógeno, es el segundo macronutriente requerido para el crecimiento de las plantas, ya que es un componente esencial de moléculas de gran importancia como los ácidos nucleicos, fosfolípidos y el ATP (Coyne, 2000). Este nutriente cumple un rol importante en la división celular, fotosíntesis, desarrollo de raíces y utilización de carbohidratos (White y Hammond, 2008). El Pi también está involucrado en el control de reacciones enzimáticas clave y en la regulación de vías metabólicas (Goldstein, 1986). En las interacciones simbióticas rizobio-leguminosas, el Pi es el principal factor nutricional que limita la fijación biológica del nitrógeno (FBN) debido a la elevada demanda energética de este proceso (Freire, 1984; Dey y col., 2004).

En el suelo, el fósforo (P) se encuentra tanto en formas orgánicas (30-70%) como inorgánicas (Marschner, 1995) (Figura 1).

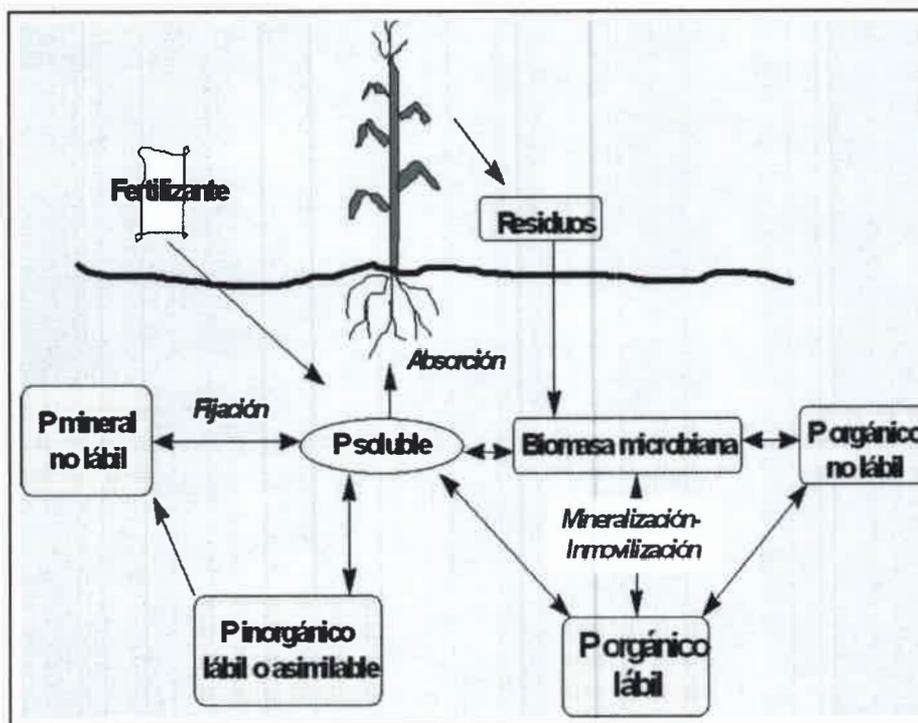


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del fósforo en agroecosistemas (IPNI, 2009).

Entre las principales formas orgánicas del P se encuentran (Rodríguez y Fraga, 1999):

- ⊕ Esteres de fosfatos: estos compuestos corresponden a la fracción lábil de P y provienen de residuos animales y vegetales.
- ⊕ Fitatos: son componentes menos lábiles que los ésteres de fosfatos y corresponden a la fracción mayor de fósforo orgánico en el suelo.
- ⊕ Organofosfonatos: son compuestos orgánicos que contienen enlaces P-C. Los mismos pueden ser naturales o artificiales y son componentes de muchos agroquímicos.

Por otro lado, existen tres formas de Pi en los suelos (Busman y col., 2009):

- ⊕ Fósforo en solución: generalmente se encuentra como ortofosfato, el cual es aprovechado por las plantas bajo las formas de ión fosfato monoácido ( $\text{HPO}_4^-$ ) e ión fosfato diácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ).
- ⊕ Fósforo activo: el fosfato inorgánico se adsorbe en el suelo a elementos tales como el calcio o el aluminio dependiendo del tipo y pH del suelo. El fósforo activo, si bien es insoluble en solución, se puede liberar por acción de microorganismos.
- ⊕ Fósforo fijado: constituye aquellos compuestos de fosfato inorgánico que son muy insolubles. Estos fosfatos pueden permanecer en el suelo durante años pero no pueden ser asimilados por las plantas.

La concentración de P varía con el órgano, la edad y la especie vegetal. En general, solo el 10% del total es absorbido en la fase vegetativa; mientras que un 39% y 51% es incorporado en las etapas de reproducción y maduración, respectivamente.

Si bien la concentración de P en el suelo es alta, un bajo porcentaje se encuentra disponible para las plantas (P en solución) y a menudo limita el crecimiento de las mismas debido a su baja solubilidad y fijación en el suelo (Gulati y col., 2008). La baja disponibilidad de este elemento es atribuido a que, como se mencionó anteriormente, el P soluble reacciona con iones de calcio, hierro o aluminio lo que provoca su precipitación o fijación (Rodríguez y Fraga, 1999; Khan y col., 2007; Sashidhar y Podile, 2010). La fijación de P y su precipitación en el suelo es dependiente del pH y tipo de suelo. El P forma complejos metálicos insolubles con hierro y/o aluminio en suelos ácidos (Whitelaw, 2000) o con carbonato de calcio en suelos alcalinos (Gyaneshwar y col., 1998). La deficiencia de P es uno de los factores químicos más importantes que limitan la

producción de los cultivos en muchos suelos del mundo (Arcand y Schneider, 2006). Gran parte de los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y, como consecuencia, no es aprovechado por los cultivos (Richardson, 1994; Peix y col., 2001; Podile y Kishore, 2006; Takahashi y Anwar, 2007). Se ha estimado que hasta un 75% de los fertilizantes fosforados aplicados pueden estar no disponibles para las plantas debido a la precipitación de la fase mineral (Goldstein, 1986; Sundara y col., 2002).

Ha sido reportado que, por efecto de la actividad microbiana, la disponibilidad del P en un suelo puede aumentar marcadamente (Thien y Myers, 1992). Numerosos trabajos han demostrado que la aplicación en diferentes cultivos de microorganismos que poseen capacidad solubilizadora de fosfato, tanto en inóculos simples como en inóculos mixtos, produce un incremento significativo del rendimiento de los mismos (Goldstein, 1995; De Freitas y col., 1997; Pal, 1998; Young y col., 1998; Richardson y col., 2001; Fasim y col., 2002; Dey y col., 2004; Babana y Antoun, 2006; Trivedi y Sa, 2008; Vyas y Gulati, 2009; Mohammadi y col., 2011). En el caso particular de maní (*Arachis hypogaea* L.), la inoculación de esta leguminosa con bacterias solubilizadoras de fosfato ha mostrado resultados alentadores (Mudalagiriappa y col., 1997; Dey y col., 2004; Taurian y col., 2010, 2013).

## 2. EL CULTIVO DE MANÍ

La planta de maní (*Arachis hypogaea* L.) (Figura 2) pertenece al orden *Fabales*, familia de las *Fabaceas*, subfamilia *Papilionoideae* (Leguminosa), tribu *Aeschynomeneae*, subtribu *Stylosanthinae*, género *Arachis* (Stalker, 1997). Es una planta herbácea anual que alcanza una altura de 20 a 60 cm y, según la variedad, el desarrollo de las ramas laterales puede ser erecto, semierecto o rastrero. Es una planta geocárpica, y por lo tanto la infrutescencia (carpóforo) se introduce en el suelo después de la floración y luego el fruto madura dentro de la tierra (Moss y Ramanatha Rao, 1995).



**Figura 2.** Planta de maní.

El suelo ideal para el crecimiento de maní es aquél bien drenado, liviano, de textura franco arenosa, libre de sales, con alto contenido de calcio así como de fósforo y potasio lo que le permite un buen desarrollo del sistema radicular produciendo vainas de buen tamaño. El pH óptimo es entre 6 y 6.5 (Giandana, 1997). Requiere de un régimen de precipitaciones de 600 a 1200 mm anuales y la temperatura debe ser superior a 20°C. La temperatura y la precipitación son los limitantes climáticos en cuanto a crecimiento, producción y extensión del cultivo en el mundo (Fiant y col., 2013).

Los cultivares comerciales de maní son clasificados en dos tipos botánicos: *Arachis hypogaea* subespecie *hypogaea* (variedad de tipo Virginia y Runner) y *Arachis hypogaea* subespecie *fastigiata* (variedad de tipo Español y Valencia). Los nuevos cultivares, como Alto oleico, Redskin y Asem 485 entre otros, provienen de cruzamientos de las variedades Virginia y Runner y se han obtenido con el objetivo de satisfacer demandas tales como ciclos cortos, resistencia a sequía y alto contenido de ácido oleico (INSA-INDELMA, 2005; Derka y Sánchez, 2006; Criadero El Carmen, 2007). Los cultivares con alto contenido de oleico son ampliamente requeridos por los mercados compradores, ya que la elevada relación oleico/linoleico otorga al fruto de maní mayor perdurabilidad de los caracteres organolépticos deseables (Pedelini, 2012). Los cultivares disponibles en el mercado argentino pertenecen a la variedad Runner (Florman INTA, Tegua, Nahuel, Florunner y Granoleico). De acuerdo al lugar y a la fecha de siembra es posible elegir entre

cultivares de ciclo completo (150-160 días a cosecha) o de ciclo corto (140-150 días a cosecha).

### 2.1. Importancia del cultivo de maní en la provincia de Córdoba

Argentina es el séptimo productor mundial de maní y se ha convertido, en los últimos años, en el primer exportador mundial de maní. La producción argentina es reconocida internacionalmente por su alta calidad, satisfaciendo la demanda de los consumidores más exigentes (Fundación Maní Argentino, 2011). La industria manisera exporta el 80% de su producción y alrededor del 65 % de las exportaciones tiene como destino principal la Unión Europea, siguiéndole en orden E.E.U.U., Canadá, México, Emiratos Arabes, Sudáfrica, Brasil, Australia, Chile, Rusia, Argelia, Ucrania, China, India, Jordania, Taiwan, Japón, Tailandia y otros países (Cámara Argentina del Maní, 2012; Fiant y col., 2013). Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2012) aproximadamente el 70% de la producción total del país se destina a maní confitería, un 10% se utiliza como grana y el 20% restante se emplea para la extracción de aceite. La parte aérea también es aprovechada como alimento para cerdos y ganado, siendo muchas veces económicamente más significativa que las semillas en épocas de escasez de alimento para ganado en áreas de Asia y Africa (Arora y Ramanatha Rao, 1995).

Desde hace unos años la producción manisera tiene lugar principalmente en la provincia de Córdoba y en las provincias de San Luis y La Pampa. En la campaña 2012/2013 la producción nacional se estimó en 1.016.149 toneladas y abarcó 380.479 has sembradas. Aproximadamente el 92% de esta producción tuvo lugar en la provincia de Córdoba (Fiant y col., 2013) (Figura 3). En esta provincia se encuentra instalada la mayor infraestructura de procesamiento y exportación de maní, agrupando a más de mil productores, 20 empresas procesadoras y generando 10 mil puestos de empleo (Cisneros, 2001; Vidal, 2007). Si bien en los últimos 40 años los principales departamentos cordobeses vinculados con la producción de maní han sido San Martín, Juárez Celman, Río Cuarto, Río Segundo y Tercero Arriba, actualmente su cultivo se ha desplazado hacia el sur de la provincia (Departamentos Río Cuarto, Pte. Roque Saenz Peña y General Roca) (Fiant y col., 2013). Este desplazamiento, se debe principalmente al deterioro de los suelos de la región como consecuencia de las prácticas agrícolas tales como el monocultivo, laboreo intensivo,

empleo excesivo de agroquímicos y a la gran incidencia de enfermedades que afectan a este cultivo (Comisión Royal en Polución Medioambiental, 1996; Doran y Zeiss, 2000; Tilman y col., 2002).

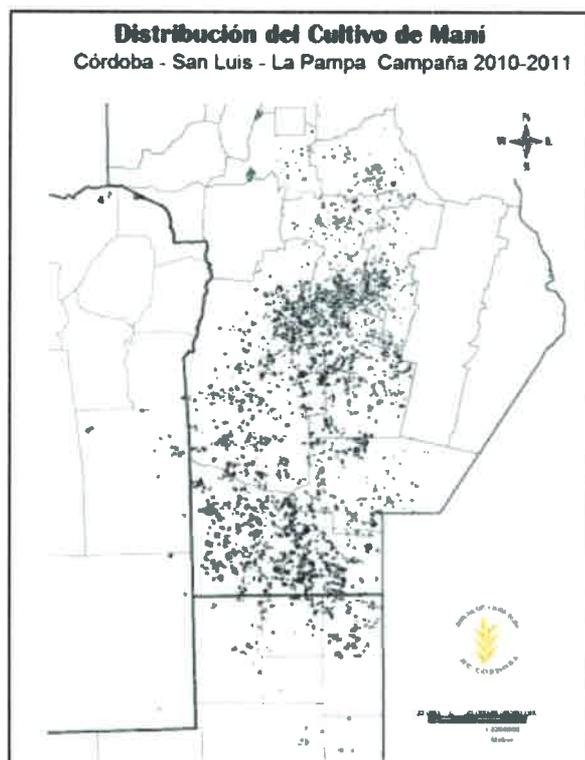


Figura 3. Distribución del cultivo de maní en Argentina (Bolsa de cereales de Córdoba, 2011).

## 2.2. Niveles de fósforo en los suelos maniseros de la provincia de Córdoba

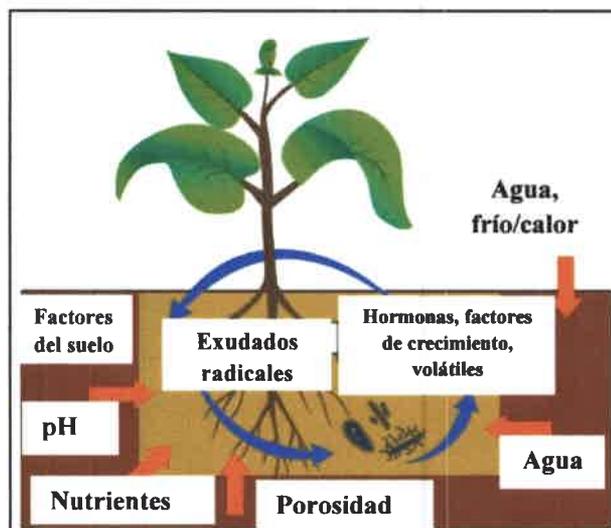
El suelo agrícola es el recurso más importante de la economía argentina. La falta de una fertilización balanceada, los bajos niveles de reposición de nutrientes del suelo, sumados a la pérdida de materia orgánica, han conducido a una disminución considerable de la fertilidad de los suelos y, por lo tanto, de la sustentabilidad física, ecológica y económica de las explotaciones agrícolas (Puig, 2004). El monocultivo de maní produce un gradual deterioro del suelo, principalmente por pérdida de estructura y favorece la incidencia de enfermedades (Pedelini, 1997). Algunos estudios revelaron un bajo contenido de materia orgánica (1%) en suelos con cultivo continuo de maní (más de 50 años) comparado con suelos no cultivados (3.5%) (Giayetto y col., 1998). Con respecto al contenido de minerales del suelo, se ha determinado déficit de los macronutrientes N, P y K. En particular para el P, se han informado bajos niveles en su forma asimilable para las plantas. Sobre la base de

datos de suelos productores de maní de distintas partes del mundo, Cope y col. (1984) sugirieron que los niveles críticos para este nutriente oscilan en alrededor de 10  $\mu\text{g/g}$ . En suelos asociados a la producción de maní en Córdoba se han determinado contenidos de P en el orden de 5-15  $\mu\text{g/g}$  (Bonadeo y col., 1997,1998; Bosch y da Veiga, 2002; Fernández y Giayetto, 2006; Severina, 2006; Ascheri, 2007, Sainz Rozas y col., 2012).

El hecho de que este nutriente sea el segundo factor limitante para el crecimiento vegetal, y el principal factor nutricional que limita la FBN, sumado a que maní no responde a la fertilización directa de P (Pedelini, 2008), promueve estudios tendientes a la búsqueda de alternativas para aportar este nutriente a estos suelos.

### 3. BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

La planta, el suelo y los microorganismos trabajan en conjunto para mediar e influir en diversos intercambios que contribuyen a la salud y productividad vegetal (Figura 4).



**Figura 4.** Factores del suelo y su influencia en raíces de las plantas y microorganismos del suelo (modificado de Chaparro y col., 2012).

La rizósfera es la interfase suelo-raíz constituida por el suelo adherido a la raíz así como el suelo que la rodea (Babalola, 2010). También, es definida como el volumen de suelo que rodea a la raíz y donde se establecen interacciones con los microorganismos y las raíces de las plantas (Ngoma y col., 2012). La rizósfera es un entorno ecológico versátil y dinámico de intensas interacciones microorganismos-planta para aprovechar micro y macronutrientes (Jeffries y col., 2003). Los diversos componentes liberados por las plantas, como exudados

radicales que incluyen azúcares, aminoácidos, flavonoides, ácidos alifáticos, proteínas y ácidos grasos, crean un medioambiente único en la rizósfera (Badri y col., 2009). Estos compuestos podrían actuar como moléculas señal para atraer microorganismos específicos o ser usados como fuentes de carbono para la nutrición microbiana (Antoun y Prevost, 2006).

Los microorganismos del suelo son muy importantes ya que llevan a cabo numerosas funciones, tales como descomposición y mineralización de materia orgánica, liberación y transformación de nutrientes inorgánicos, participación en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, mantenimiento de la salud y calidad de los suelos, etc. (van Elsas y Trevors, 1997; Jeffries y col., 2003; Ngoma y col., 2012). Un considerable número de especies bacterianas, la mayoría asociadas con la rizósfera de las plantas, son capaces de ejercer un efecto beneficioso para el crecimiento de las mismas y han sido denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (“plant growth promoting bacteria” o PGPB) (Bashan y de Bashan, 2005). Algunas de estas bacterias colonizan los tejidos vegetales internos (endófitas), otras se localizan sobre las plantas usándolas como soporte (epífitas) y otras se ubican en la zona rizosférica. Las PGPB pueden ser agrupadas de acuerdo al tipo de interacción que establecen con la planta huésped, entre las que se encuentran bacterias de vida libre o aquellas capaces de establecer interacciones simbióticas específicas (Bécquer y col., 2008; Rojas y col., 2009; Glick, 2012).

Las PGPB se asocian en el nicho rizosférico con plantas de interés agronómico y pueden producir efectos directos sobre su crecimiento y nutrición. Así, constituyen una alternativa económica y ecológica para aumentar la producción de alimentos (Díaz-Zorita y Fernández, 2008; Naiman y col., 2009). Estas bacterias que habitan en el suelo, la rizósfera, e incluso en los tejidos vegetales, benefician el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos los cuales se clasifican en directos e indirectos (Glick, 1995). Los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal pueden implicar síntesis de sustancias producidas por las bacterias o incremento de la disponibilidad de nutrientes del medio ambiente (Glick y col., 1999). Estos mecanismos incluyen (Kloepper y col., 1989; Glick, 1995; García de Salamone y col., 2001; Vessey, 2003; Saubidet y Barneix, 2004):

- ⊕ Fijación biológica de nitrógeno atmosférico.
- ⊕ Solubilización/mineralización de fosfatos.

- ⊕ Producción de sideróforos.
- ⊕ Producción de moléculas tipo fitohormonas.

Por otro lado, los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal son aquellos que provocan una disminución o prevención de efectos deletéreos de patógenos de plantas por producción de sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural del huésped (Handelsman y Stabb, 1996; Nehl y col., 1997; Cartieux y col., 2003). Según Weller y Cook (1986); Kloepper y col. (1989); Glick y col. (1999), los mecanismos de promoción indirecta incluyen:

- ⊕ Producción de antibióticos.
- ⊕ Producción de sideróforos.
- ⊕ Producción de enzimas líticas de la pared celular fúngica.
- ⊕ Competición por sitios en raíces.
- ⊕ Resistencia sistémica inducida.

Una cepa bacteriana en particular puede poseer uno o más de estos mecanismos, y expresarlos en momentos diferentes durante el ciclo de vida de la planta (Saleh-Lakha y Glick, 2007).

Las PGPB que poseen capacidad solubilizadora/mineralizadora de fosfato son de gran importancia ya que están asociadas a la nutrición de este elemento esencial para las plantas (Chen y col., 2006). La asociación entre bacterias solubilizadoras de fosfato y las raíces de las plantas juega un rol clave en la nutrición del P en muchos agroecosistemas, particularmente en suelos deficientes de este nutriente (Goldstein, 2007; Jorquera y col., 2008). Bacterias pertenecientes a diferentes géneros son incluidas dentro de este grupo, entre ellos encontramos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Acromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterococcus* y *Enterobacter* (Nahas, 1996; Rodríguez y Fraga, 1999; Kumar y col., 2001; Son y col., 2006; Ogut y col., 2010). La mayoría de las bacterias que poseen esta capacidad PGPB son efectivas en la liberación de P a través de la solubilización de las fuentes inorgánicas y/o mineralización de las formas orgánicas del fósforo total del suelo (Goldstein, 1995; Rodríguez y Fraga, 1999; Rodríguez y col., 2006). Este proceso bacteriano, que tiene lugar en la rizósfera, genera la liberación de mayor cantidad de P

soluble del requerido por estos microorganismos para su crecimiento y metabolismo, por lo que el exceso queda disponible para las plantas (Mehta y Nautiyal, 2001).

La liberación de P de los compuestos fosfatados orgánicos del suelo puede llevarse a cabo por la actividad de tres grupos de enzimas sintetizadas por los microorganismos:

- ⊕ Fosfatasas no específicas, las cuales efectúan la defosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhídros presentes en la materia orgánica.
- ⊕ Fosfatasas específicas, dentro de este grupo se encuentran las 3' - nucleotidasas, las 5' - nucleotidasas, las fosfatasas de hexosas y las fitasas, las cuales liberan el P del ácido fítico.
- ⊕ Fosfonatasas y liasas C-P, enzimas que llevan a cabo el clivaje del enlace C-P presente en los organofosfonatos.

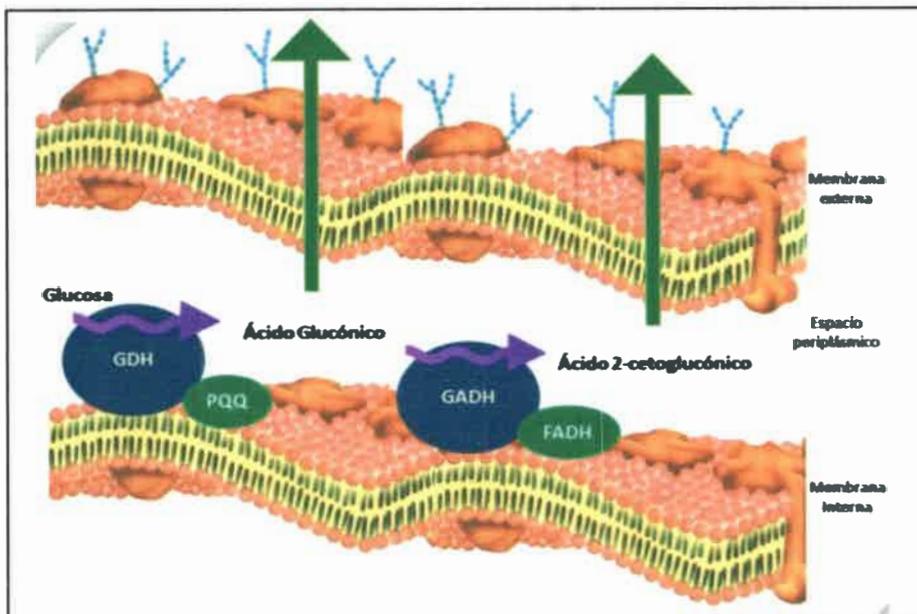
La mineralización microbiana de fosfato corresponde principalmente a la actividad de las fosfatasas ácidas no específicas y a las fitasas, debido a la presencia predominante en el suelo de los sustratos sobre los que actúan (Quiquampoix y Mousain, 2005; Rodríguez y col., 2006).

Por otra parte, la liberación de P de los compuestos fosfatados inorgánicos del suelo puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos (Rodríguez y Fraga, 1999; Yi y col., 2007):

- ⊕ Producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular.
- ⊕ Producción de ácidos inorgánicos (sulfhídrico, nítrico, carbónico).
- ⊕ Eliminación de protones fuera de la célula y su intercambio con cationes unidos al fósforo.
- ⊕ Producción de sustancias quelantes.

El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosforados inorgánicos (fosfatos) son solubilizados involucra la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular con la consecuente acidificación del medio circundante (Goldstein, 1995; Kim y col., 1997; Puente y col., 2004; Wan y Wong, 2004; Rodríguez y col., 2006). La eficacia del resto de los procesos mencionados ha sido cuestionada y, su contribución a la liberación de P en el suelo parece ser insignificante (Vázquez, 1996). Los ácidos orgánicos a través de sus grupos hidroxilos y carboxilos quelan los cationes ( $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Ca^{+2}$ ) unidos al fosfato convirtiéndolos en formas solubles (Kpombrekou y Tabatabai, 1994; Stevenson, 2005). Estos ácidos, también están relacionados a otras funciones en el suelo, como adquisición de

nutrientes por la raíz, solubilización mineral, quimiotaxis microbiana y detoxificación de metales (Jones y col., 2003). Algunos ácidos orgánicos como el láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, oxálico, malónico, cítrico y succínico son producidos por diferentes bacterias solubilizadoras de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999; Vázquez y col., 2000; Drouillon y Merckx, 2003; Hwangbo y col., 2003; Jones y col., 2003; Loganathan y Nair, 2004; Ahmed y Shahab, 2011). Sin embargo, los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico son los compuestos mayormente secretados por las especies bacterianas estudiadas (Rodríguez y Fraga, 1999; Deubel y col., 2000; Goldstein, 2000; Song y col., 2008). Estos últimos, son producidos en el periplasma de muchas bacterias Gram negativas a través de una oxidación directa no-fosforilativa de la glucosa (DOPG; direct oxidation pathway of glucose) cuyo rol fisiológico permanece desconocido (Anthony, 2001, 2004; Matsushita y col., 2002) (Figura 5). Whiting y col. (1976) y Goldstein (1995) consideran esta oxidación como una estrategia competitiva para transformar fuentes de carbono disponibles en productos menos utilizables por otros microorganismos.



**Figura 5.** Esquema de la oxidación directa no- fosforilativa de la glucosa a ácido glucónico y 2-cetoglucónico.

Las enzimas de la vía DOPG, glucosa deshidrogenasa (GDH) y gluconato deshidrogenasa (GADH), están orientadas hacia la cara externa de la membrana citoplasmática de manera que oxidan sus sustratos en el espacio periplásmico (Anthony, 2004). La glucosa se convierte en ácido glucónico y, después de dos oxidaciones sucesivas en el espacio periplásmico, en algunas bacterias, se convierte en ácido 2-cetoglucónico; consecuentemente, los ácidos orgánicos difunden libremente hacia el exterior de las células, quelan los cationes de los fosfatos y liberan grandes cantidades de P (Anderson y col., 1985).

### 3.1. Cofactor pirroloquinolina quinona y su rol en la capacidad solubilizadora de fosfato

La GDH membranal es una deshidrogenasa que requiere magnesio para su actividad y del cofactor redox pirroloquinolina quinona (PQQ) (Duine, 1991). Se ha descrito que bacterias que codifican para la enzima GDH pero carecen de la proteína PQQ son incapaces de producir ácido glucónico y no solubilizan fosfato (Magnusson y col., 2004). El grupo PQQ se sintetiza a partir de residuos de tirosina y ácido glutámico, es soluble en agua, termoestable y capaz de llevar a cabo de manera continua ciclos redox (Stites y col., 1999; Flores-Encarnación y col., 2004). Además de su participación en la solubilización de fosfatos, PQQ es un factor promotor del crecimiento para bacterias y plantas, tiene propiedades antioxidantes, antifúngicas, tiene un rol en la tolerancia frente al estrés oxidativo en bacterias y células animales y está relacionado en forma directa con la producción de sustancias antimicrobianas así como con la inducción de defensas sistémicas en plantas (He y col., 2003; Khairnar y col., 2003; Misra y col., 2004; Choi y col., 2008; Han y col., 2008; de Werra y col., 2009; Meyer y col., 2011).

La biosíntesis del cofactor PQQ involucra un operón *pqq* que consiste de al menos 5 genes (Figura 6). Así por ejemplo, fueron identificados 5 genes en *Acinetobacter calcoaceticus* (IV, V, I, II y III) (Goosen y col., 1989), en *Gluconobacter oxydans* (*pqqABCDE*) y en cepas de *Methylobacterium* (*pqqDGCBA*) (Biville y col., 1989; Morris y col., 1994); 6 genes en *Klebsiella pneumonia*, *Rahnella aquatilis* y *Enterobacter intermedium* 60-2G (*pqqA, B, C, D, E, F*) (Meulenberg y col., 1992; Kim y col., 1998, 2003); y 11 genes en *Pseudomonas fluorescens* B16 y *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (*pqqFABCDKJIH*) (Choi y col., 2008).

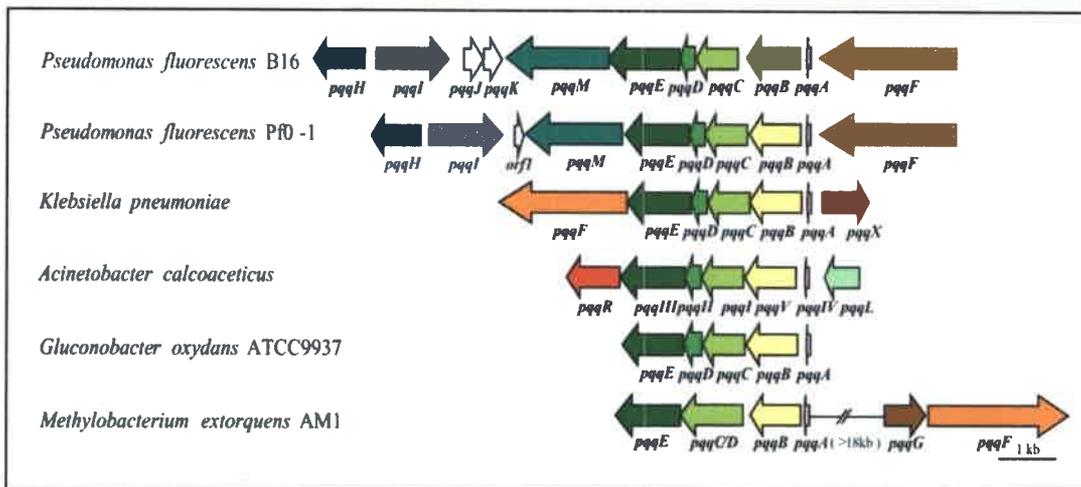


Figura 6. Operones que codifican para la proteína PQQ en diferentes especies bacterianas (Choi y col., 2008).

La clonación y expresión de los genes *pqq* involucrados en la síntesis del cofactor PQQ de las enzimas de la vía DOPG ha permitido demostrar la importancia de la producción de los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico en la solubilización de fosfatos (Goldstein y Liu, 1987; Liu y col., 1992; Kishnaraj y Goldstein, 2001; Kim y col., 2006; Rodríguez y col., 2006; Vikram y col., 2007; Han y col., 2008). Sin embargo, los pasos bioquímicos de la síntesis del cofactor PQQ y la función de cada uno de los genes involucrados en este proceso no están completamente dilucidados. Los genes *pqq* son altamente conservados en varias especies bacterianas (Yang y col., 2010). Si bien sólo ha sido dilucidada la función de la proteína PqqC codificada por el gen *pqqC*; se ha propuesto una función para cada uno de los productos génicos codificados en el operón, con la excepción del gen *pqqD* (Shen y col. 2012) (Figura 7):

- ⊕ *PqqA*; sintetizaría el precursor de la biosíntesis de PQQ.
- ⊕ *PqqB*; tendría una función de transporte de PQQ a través de la membrana plasmática.
- ⊕ *PqqC*; oxigenasa que cataliza el último paso de biosíntesis.
- ⊕ *PqqE*; reductasa que llevaría a cabo la reducción de 5-adenosilmetionina a 5'-deoxidenosina.
- ⊕ *PqqF*; proteasa dependiente de zinc que no sería esencial para la biosíntesis de PQQ.

El primer paso en la vía de formación del cofactor PQQ sería la expresión del precursor PqqA. El mismo sería reconocido por PqqE, el cuál uniría los átomos de carbono del glutamato y la tirosina. En un segundo paso, PqqF cortaría los aminoácidos vinculados. La siguiente reacción sería espontánea y catalizada por una enzima desconocida. Finalmente, PqqC facilitaría las etapas de ciclación y oxidación (Puehringer y col., 2008).

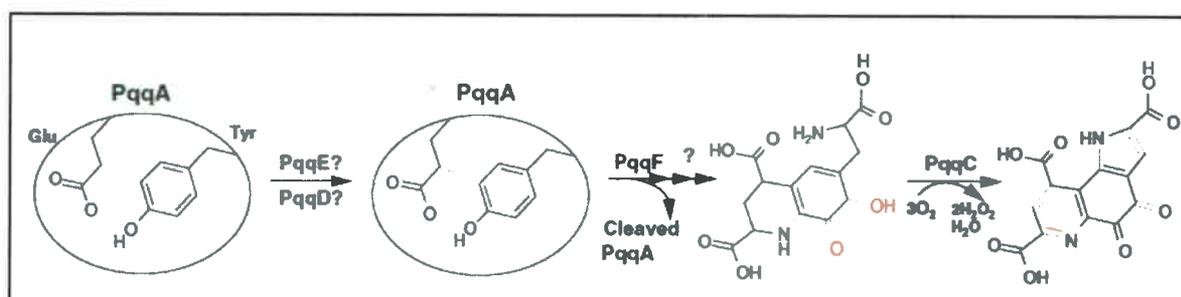


Figura 7. Vía de síntesis del cofactor PQQ propuesta por Yukl y Wilmont (2012).

#### 4. USO DE AGROQUÍMICOS EN LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS Y SU IMPACTO SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA

Los microorganismos del suelo son críticos para su funcionamiento, ya que están involucrados en procesos como mantenimiento de la estructura del suelo, descomposición de materia orgánica, participan en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre influyendo en la fertilidad del suelo y en la salud de las plantas (Gianinazzi y Schuepp, 1994; van Elsas y Trevors, 1997). A ello se suma que los microorganismos juegan roles clave en la supresión de enfermedades de plantas provenientes del suelo, en la promoción del crecimiento vegetal, etc. (Doran y col., 1996). En síntesis, la productividad de los sistemas agrícolas depende, en parte, de los procesos funcionales de las comunidades microbianas del suelo (Killham, 1994; O'Donnell y col., 1994; Pankhurst y col., 1997; Doran y Zeiss, 2000) y algunas prácticas agrícolas pueden poner en riesgo a estas comunidades.

La agricultura moderna depende de una amplia variedad de productos químicos sintéticos, incluyendo insecticidas, fungicidas, herbicidas y otros pesticidas (López y col., 2002). Se ha estimado que sólo el 0.1% de los plaguicidas aplicados llega a los organismos blanco y el resto (99.9%) se acumula en los suelos y afecta directa o indirectamente la densidad microbiana y las actividades enzimáticas (Pimentel, 1995; Singh y Singh, 2005; Das y



Debnath, 2006; Pal y col., 2006). Una gran parte de los agroquímicos aplicados se acumula en la capa superior del suelo (0-15 cm) donde se produce la mayoría de las actividades microbiológicas (Das y Debnath, 2006).

Los fertilizantes inorgánicos y pesticidas son costosos y perjudican el hábitat (Pretty y col., 2000, 2003), y a ello se suma que pueden provocar cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Gorlach-Lira y col., 1997; Boddington y Dood, 2000), suprimir o promover la actividad y el crecimiento microbiano (Boldt y Jacobsen, 1998; Haney y col., 2000). Los microorganismos del suelo son fisiológicamente variables, pudiendo degradar una gran variedad de sustancias químicas, incluyendo insecticidas (Stadnyk y col., 1971; Bhuyan y col., 1993) lo cual resulta en un incremento en la biomasa de los que utilizan dichos compuestos (Agnihotri y col., 1981; Das y Mukherjee, 1994; López y col., 2002). Por otro lado, existen algunos insecticidas que ejercen un efecto adverso en la proliferación de los microorganismos del suelo y en sus transformaciones asociadas (Moorman, 1989; Martinez-Toledo y col., 1992). Así, se ha reportado que el uso de insecticidas y de fertilizantes pueden producir modificaciones en la diversidad de la comunidad microbiana del suelo (Nicholson y Hirsch, 1998; Girvan y col., 2004; Sun y col., 2004; Barriuso y col., 2010). Algunos grupos microbianos son capaces de utilizar ciertos herbicidas como fuente de energía y nutrientes (por ejemplo, utilizan glifosato como fuente de P); mientras que pueden ser tóxicos o modificar actividades promotoras del crecimiento vegetal (como capacidad biocontroladora) en otros grupos (Wardle y Parkinson, 1990; Dick y Quinn, 1995; Haney y col., 2000; Kuklinsky-Sobral y col., 2005; Simonsen y col., 2008; Mijangos y col., 2009). Por su parte, se ha descrito que determinados fungicidas son capaces de modificar actividades promotoras del crecimiento vegetal (Ahemad y Khan, 2010).

En el caso particular del cultivo de maní, el manejo que el productor manisero efectúa a lo largo del ciclo del cultivo puede incluir la aplicación de herbicidas pre-siembra, pre-emergencia y post-emergencia selectivos para el cultivo, a los cuales se suma el empleo de insecticidas y fungicidas (March y Marinelli, 2005). Algunos de los principios activos oficialmente aceptados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de los productos inscriptos utilizados para el control de malezas en maní según CASAFE (2001) se detallan a continuación (Daita, 2006):

- ⊕ Herbicidas pre-siembra: Dinitramina, Trifluralina.

- ⊕ Herbicidas pre-emergencia: Acetoclor, Clomazone, Diclosulam.
- ⊕ Herbicidas pos-emergencia: Fluazifop-Butil, Fluoroglicofen, Fomesafen, Haloxifop-R-Metil, Izametapir, MCPA, Propaquizafop, Quizalofop-P-Etil, Quizalofop-P-Tefuril, Setoxidim.

Otros herbicidas factibles de usar en el cultivo de maní, pero no registrados para su uso son 2,4-D, Glifosato, Sulfentrazone, Cletodím y Lactofen. Además, se emplean insecticidas, siendo los más utilizados gammacialotrina y lambdacialotrina, y fungicidas como Carboxin, Thiram, estrobilurinas y propinconazole (March y Marinelli, 2005).

Con el objetivo de mitigar el impacto ambiental negativo causado por el uso excesivo de insumos químicos en los cultivos agrícolas, una alternativa podría ser la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Las investigaciones se están focalizando en la evaluación de la diversidad genética y bioquímica de los microorganismos rizosféricos, su caracterización en relación a la FBN, solubilización de fosfatos, producción de hormonas vegetales y de sustancias capaces de captar hierro (sideróforos). También se incluye la selección de los microorganismos más eficientes en experimentos de inoculación en condiciones ambientales controladas de laboratorio, invernadero y de campo, al igual que el estudio de los costos de producción con la aplicación de microorganismos vs. fertilizantes químicos en cultivos de interés agrícola. Con esto se pretende transferir esta tecnología al sector productivo y contribuir a mejorar la calidad ambiental y producción sustentable de alimentos y biocombustibles, mediante un enfoque biológico e integrado basado en la importancia de la diversidad microbológica y su potencial de utilización biotecnológica (Pedraza y col., 2010).

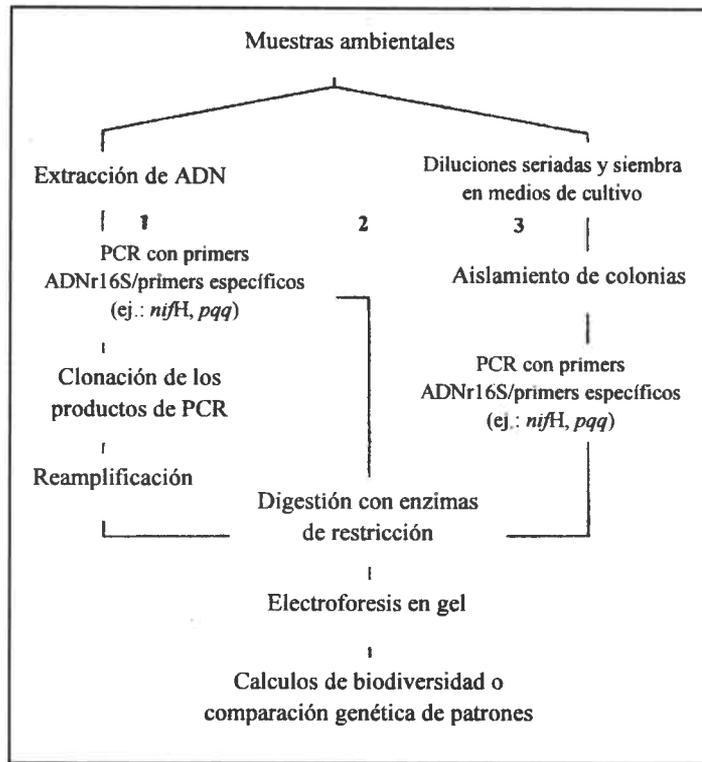
Considerando los impactos ambientales negativos que genera la aplicación de los agroquímicos y sus elevados costos, y por otro lado, que el incremento de la población mundial y de las prácticas agrícolas en suelos marginales de baja fertilidad aumentará a su vez la demanda de los fertilizantes fosfatados (Raghothama y Karthikeyan, 2005), el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato constituye un desafío tendiente a incrementar las prácticas agrícolas sustentables. El empleo de microorganismos benéficos solos o combinados con fertilizantes para mejorar la disponibilidad de nutrientes sería una estrategia económica y medioambientalmente “amigable” para mantener la fertilidad de los suelos. Por otra parte, el conocimiento de la sensibilidad de los microorganismos a las

diferentes prácticas agrícolas permitiría su potencial utilización como indicadores biológicos de calidad del suelo.

### 5. HERRAMIENTAS MOLECULARES EMPLEADAS EN LOS ESTUDIOS DE DIVERSIDAD MICROBIANA

El suelo es un importante reservorio de diversidad genética microbiana (Curtis y col., 2002). Sin embargo, si bien se ha diseñado una amplia variedad de medios de cultivo para maximizar la recuperación de los diversos grupos microbianas, estos métodos basados en cultivos son limitados ya que sólo una pequeña fracción de las células microbianas del suelo puede ser aislada para su estudio (Janssen y col., 2002). Se estima que sólo el 1% de la población bacteriana del suelo es cultivable por prácticas estándares de laboratorio (Amann y col., 1995; Torsvik y col., 1998).

A partir de la década de los ochenta se produjo una revolución en el conocimiento de la diversidad microbiana en los suelos debido a la incorporación de técnicas de estudio que no requieren del cultivo previo de los microorganismos (Insam, 2001; Kirk y col., 2004; Sarita y col., 2005). El uso de métodos independientes de cultivo elimina la parcialidad impuesta por técnicas basadas en el cultivo de organismos (Ellis y col., 2003). Estas técnicas se basan en el análisis de marcadores moleculares como ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) y ácidos nucleicos (ADN y ARN). Ambos tipos de marcadores se encuentran presentes en todas las células, se pueden extraer directamente de muestras de suelo sin necesidad de realizar cultivos previos y además permiten diferenciar distintos grupos de microorganismos. Utilizando estos marcadores no sólo se puede determinar la composición de las comunidades microbianas sino que también se puede cuantificar la abundancia de microorganismos específicos. Así, se utilizan diferentes técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas del suelo. Estas, generalmente se basan en PCR o RT-PCR utilizando ADN o ARN, respectivamente. Los productos de PCR pueden utilizarse en librerías de clones o en técnicas de fingerprinting (Heuer y col., 1997; Muyzer, 1999; Smith y col., 1999). Mediante el uso de cebadores universales para secuencias conservadas de ARNr 16S la comunidad bacteriana puede ser estudiada como un todo, mientras que se pueden utilizar cebadores más específicos para investigar subgrupos de la comunidad o grupos funcionales (Smit y col., 1997) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de análisis de diversidad bacteriana mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo. (1) análisis de clones, (2) patrones de restricción de toda la comunidad, (3) análisis (ARDRA/RFLP) de aislamientos bacterianos (modificado de Smit y col., 1997)

Por otra parte, la amplificación de secuencias repetitivas basadas en la reacción en cadena de polimerasa (rep-PCR), es una técnica utilizada en análisis de diversidad de especies estrechamente relacionadas, especialmente en diferenciación de cepas bacterianas dentro de una especie (Lupski y Weinstock, 1992; Versalovic y col., 1994). En comparación con otras técnicas de fingerprinting (como RFLP), la simplicidad, el bajo costo, la alta resolución y fiabilidad de la rep-PCR le confiere ventajas. El estudio de fingerprints genómicos obtenidos con cebadores rep se basa en que éstos son complementarios con secuencias genómicas del ADN repetitivas muy conservadas que se encuentran, generalmente, en muchas copias en los genomas de la mayoría de las bacterias Gram negativas y en algunas Gram positivas (Lupski y Weinstock, 1992). Se han identificado tres familias de elementos repetitivos, incluyendo la secuencia de 35-40 pb REP (secuencia extragenética repetitiva palindrómica), la secuencia de 124-127 pb ERIC (secuencia intergénica repetitiva de las enterobacterias) y el elemento BOX de 154 pb (secuencias

altamente conservadas repetitivas de ADN de BOXA, subunidad del elemento BOX) (Versalovic y col., 1994).

A principios del año 2005 se iniciaron estudios en el laboratorio tendientes a la selección de bacterias nativas de los suelos maniseros de Córdoba con propiedades solubilizadoras de fosfato. Los resultados obtenidos de dichos estudios (Anzuay y col., 2013; Taurian y col., 2010, 2013) demuestran que existe en la rizósfera del área manisera de Córdoba una fuente potencial de bacterias que presentan dicha propiedad promotora del crecimiento vegetal. La profundización del estudio de este grupo de bacterias podría conducir a la selección de cepas solubilizadoras de fosfato mejor adaptadas a las condiciones edafocológicas de la región para contribuir a paliar los problemas mencionados. Por otro lado, el estudio del efecto de los agroquímicos sobre la diversidad y abundancia de estas poblaciones bacterianas mediante técnicas cultivables y no cultivables permitirá realizar un análisis más exhaustivo de lo que ocurre en estas poblaciones en el suelo.

## HIPOTESIS

---

1. Las bacterias presentes en el suelo del área manisera, con capacidad solubilizadora de fosfato, constituyen una fuente para la selección de cepas que, por sus propiedades fisiológicas y metabólicas, permitan optimizar la producción de esta leguminosa en Córdoba.
2. La aplicación de agroquímicos en suelos maniseros de Córdoba afecta la abundancia y la diversidad de microorganismos solubilizadores de fosfato.

## OBJETIVOS GENERALES

---

1. Evaluar las características bioquímicas de la población de bacterias solubilizadoras de fosfato nativas de suelos cultivados con maní en la provincia de Córdoba.
2. Estudiar el efecto de la aplicación de agroquímicos sobre dicha población.

## Objetivos específicos

---

1. Evaluar la capacidad solubilizadora de fosfato de bacterias nativas cultivables del área manisera de Córdoba mediante un análisis cuantitativo.
2. Identificar los ácidos orgánicos secretados por las bacterias solubilizadoras de fosfato.
3. Analizar la supervivencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato así como el efecto benéfico de su inoculación en ensayos en microcosmo.
4. Evaluar el efecto de la aplicación de agroquímicos en los suelos maniseros de la provincia de Córdoba sobre la abundancia y diversidad genética de bacterias solubilizadoras de fosfato.

## CAPÍTULO 2

---

---

MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

### 1.1. Aislamientos bacterianos nativos de plantas de maní con capacidad solubilizadora de fosfato

La caracterización del mecanismo de solubilización de fosfato se realizó en una población constituida por 18 bacterias aisladas de plantas de maní cultivadas a campo de la región manisera de la provincia de Córdoba (Tabla 1). Las mismas fueron seleccionadas a partir de una colección de 433 bacterias (Taurian y col., 2010) por producir los mayores halos de solubilización de fosfato en medio sólido NBRIP-BPB (National Botanical Research Institute's phosphate grown medium) que contiene fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) como única fuente de P (Mehta y Nautiyal, 2001).

**Tabla 1.** Aislamientos bacterianos solubilizadores de fosfato nativos de maní utilizados en este trabajo.

Aislamientos	Morfología celular y tinción de Gram	Origen	Localidad, Departamento
L54	Bacilo Gram+	Epífita de tallo	Bengolea, Dpto. Juárez Celman
L55	Bacilo Gram+	Epífita de tallo	Bengolea, Dpto. Juárez Celman
J145	Bacilo Gram-	Nódulo	Charras, Dpto. Juárez Celman
J21	Bacilo Gram-	Nódulo	Santa Eufemia, Dpto. Juárez Celman
S57	Bacilo Gram-	Nódulo	Las Higueras, Dpto. Río Cuarto
J225	Bacilo Gram+	Nódulo	Bengolea, Dpto. Juárez Celman
L185	Cocos Gram+	Endófito de raíz	Charras, Dpto. Juárez Celman
J157	Bacilo Gram-	Nódulo	Santa Eufemia, Dpto. Juárez Celman
J255	Bacilo Gram+	Nódulo	Charras, Dpto. Juárez Celman
L177	Coco-bacilo Gram+	Epífita de tallo	Charras, Dpto. Juárez Celman
J49	Bacilo Gram-	Nódulo	Santa Eufemia, Dpto. Juárez Celman
J9	Bacilo Gram+	Nódulo	Charras, Dpto. Juárez Celman
L191	Coco-bacilo Gram+	Endófito de raíz	Charras, Dpto. Juárez Celman
L176	Bacilo Gram-	Epífita de tallo	Charras, Dpto. Juárez Celman
S119	Bacilo Gram-	Nódulo	Las Higueras, Dpto. Río Cuarto
J260	Bacilo Gram-	Nódulo	Charras, Dpto. Juárez Celman
S93	Bacilo Gram-	Nódulo	Ticino, Dpto. Gral. San Martín
J33	Bacilo Gram-	Nódulo	Charras, Dpto. Juárez Celman

### 1.2. Cepas de referencia

Se emplearon cepas de referencia solubilizadoras de fosfato pertenecientes a diferentes géneros bacterianos: *Pseudomonas* sp. NVAM24 y NCHA33, *Enterobacter* sp. NONC13; *Klebsiella* sp. NT31 y TT001 (Ibañez y col., 2009) y *P. fluorescens* CTR212 (Latour y col., 1996). A su vez, se incluyó una cepa de *P. fluorescens* empleada como biofertilizante fosforado en productos comerciales que se aplican para trigo y maíz en Argentina (cedida por Rizobacter; “RIZOFOS”®-RIZOBACTER). Por otro lado, también se utilizaron cepas de referencia que no presentaron capacidad solubilizadora de fosfato: *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis hypogaea* L.) SEMIA 6144 (IPAGRO, Brasil), *B. japonicum* USDA 110 (Lab. Dr. Mario Aguilar), *Azospirillum brasilense* Cd (EMBRAPA, Brasil), *Escherichia coli* HB101 y *P. corrugata* Pc5 (Achouak y col., 2000).

### 2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS

Las bacterias se mantuvieron en placas conteniendo medio YEMA (Vincent, 1970), TY (Beringer, 1974), TSA (agar tripticasa soya) (Britania) o LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972). Para su conservación a largo plazo, se transfirieron alícuotas de cultivos crecidos en medio YEM, TY, TSB o LB en fase logarítmica tardía a tubos Eppendorf de 1,5 ml que fueron suplementados con glicerol estéril en una concentración final de 20% y 40% (v/v). Las suspensiones así preparadas se conservaron a -80°C ó -20°C, respectivamente.

#### Medio YEM/YEMA

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
Manitol	10 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Rojo Congo	10 ml/l
pH	6.8-7
Agar	15 g/l

#### Medio TY

Tripteína	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5 g/l
Agar	15 g/l

#### Medio TSA/TSB

Tripteína	15 g/l
NaCl	5 g/l
Peptona de Soya	5 g/l
Agar	15 g/l

#### Medio LB

Tripteína	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

### 3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

La secuencia parcial del gen ARNr16S de los aislamientos bacterianos fue obtenida en los laboratorios de Macrogen Inc. (Corea). El análisis de las secuencias de dicho gen fue realizado empleando el algoritmo BLASTN (Altschul y col., 1997) y el software RDP Project (Cole y col., 2009). Las secuencias de las bacterias fueron depositadas en la base de datos del banco de genes (GenBank) de NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) (Tabla 3).

### 4. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO INVOLUCRADO EN LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS

#### 4.1. Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato en medio sólido

La capacidad de solubilizar fosfato inorgánico “*in vitro*” fue determinada inicialmente en medio sólido NBRIP-BPB. Diez  $\mu\text{l}$  de cultivo bacteriano fresco ( $10^8$  UFC/ml) fueron colocados en el interior de las placas y se incubaron en estufa a  $28^\circ\text{C}$  durante 7 días. El diámetro del halo transparente alrededor de la colonia bacteriana fue medido (cm) e indicó capacidad solubilizadora.

#### Medio NBRIP-BPB

Glucosa	10.0 g/l
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5.0 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5.0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/l
KCl	0.2 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 g/l
Azul de bromofenol	2.5 mg/l
pH	7
Agar	15.0 g/l

#### 4.2. Cuantificación del fosfato solubilizado en medio líquido NBRIP-BPB

Se determinó cuantitativamente el fosfato solubilizado mediante la técnica colorimétrica de Fiske y Subbarow (1925) modificada. Cien  $\mu\text{l}$  de cada cultivo (aproximadamente  $10^9$  UFC/ml) crecido en medio TY fueron transferidos a Erlenmeyers conteniendo 15 ml de medio NBRIP-BPB. Luego de 24, 48, 72 y 168 horas de crecimiento en agitación (150

rpm) a 30°C, se tomó asépticamente una alícuota de 1.5 ml de cada cultivo, que fue centrifugado a 10.000 rpm durante 12 min para sedimentar las bacterias y el P insoluble. Se determinó el P en el sobrenadante bajo la forma de ortofosfato soluble (asimilable) a una longitud de onda de 660 nm y como blanco de reacción se empleó medio de cultivo sin inocular. Paralelamente, se midió el pH del sobrenadante y se determinó el número de células viables (UFC/ml) mediante la técnica de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994). Para ello, de aquellas diluciones en las que crecían entre 3 y 30 colonias por gota, se sembraron 10 µl en un cuarto de una placa conteniendo medio TY. Se incubaron las placas a 28°C en estufa durante aproximadamente 1-3 días, hasta visualización de las colonias a simple vista.

Para la cuantificación de P soluble en medio de cultivo con soluciones tampón, las bacterias crecieron en medio NBRIP-BPB suplementado con el agregado de una de las siguientes soluciones amortiguadoras:

⊕ 100 mM de Tris-HCl, pH 7.

⊕ 100 mM de MES, pH 7.

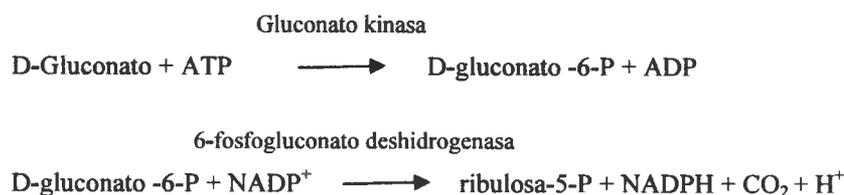
La metodología empleada fue la misma que la descrita anteriormente y como blanco de reacción se empleó medio sin inocular conteniendo la solución tampón correspondiente (Gyaneshwar y col., 1998). También se determinó en estos ensayos el pH del sobrenadante y el número de células viables (UFC/ml).

### **5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO SECRETADO POR LAS BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO**

Se determinó la producción de ácido glucónico en el tiempo en el cual se registraron los máximos niveles de P solubilizado por las bacterias en medio líquido NBRIP-BPB.

Para tal determinación se empleó el kit D-gluconic acid/D-gluconolactona (K-GATE, Megazyme), con un límite de detección de 20 µg/ml. El ácido glucónico producido y secretado al medio por las bacterias, en presencia de ATP, se convierte en D-gluconato-6P. Luego, en una segunda reacción, este compuesto reacciona con NADP<sup>+</sup> para dar como productos ribulosa 5-P, CO<sub>2</sub>, H<sup>+</sup> y NADPH, como se indica más abajo. La cantidad de NADPH que se forma es estequiométrica con la cantidad de ácido D-glucónico. La

reacción es del tipo colorimétrica midiendo el NADPH producido, por el aumento de absorbancia a 340 nm.



## 6. CONDICIONES GENERALES DE PCR Y ELECTROFORESIS

**6.1.** Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Eppendorf.

**6. 2.** Como molde de reacción se empleó ADN genómico el cual fue extraído mediante dos técnicas:

**Técnica descrita por Walsh y col. (1991):** una o dos colonias bacterianas crecidas en placas con medio YEMA, TY, TSA o LB fueron resuspendidas en 200 µl de NaCl 1M agitándose vigorosamente durante 1 minuto y centrifugadas a 12.000 rpm durante 6 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 200 µl de agua bidestilada estéril y luego centrifugado en las mismas condiciones descriptas anteriormente.

El pellet obtenido fue resuspendido en 150 µl de resina Chelex 100 (BioRad) al 6% y se realizó el siguiente tratamiento térmico:

- 56°C durante 20 min
- Agitación vigorosa
- 99°C durante 8 min
- Agitación vigorosa

El templado obtenido fue conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

**Metodología descrita por Meade y col. (1982):** a partir de cultivos bacterianos líquidos crecidos 12 hs en medio TY se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 2 min. El pellet se resuspendió en 750 µl de solución salina concentrada (SSC, 0.1X) y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células se

resuspendieron en 600 µl de Tris-HCl/Sacarosa al 20% (pH 8). Posteriormente, se agregó lisozima (2.5 mg/ml) y la suspensión se incubó a 37°C durante 3 horas. Luego de la adición del buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1% SDS y 200 mg/ml proteinasa K), se incubó a 37°C durante 30 min. Un volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) fue agregado y después de centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min, se extrajo la fase acuosa. El ADN se precipitó por adición de 0.1 volumen de Acetato de Sodio 3M (pH 4.8) y dos volúmenes de etanol frío (70%). Luego de 12 horas a -20°C, la suspensión se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril. El templado obtenido fue conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

**6. 3.** Para el análisis de las poblaciones solubilizadoras de fosfato no cultivables se empleó ADN extraído de suelo. Para la extracción se utilizó el kit comercial Ultra Clean soil DNA extraction (MoBio). Luego se realizó una purificación según lo indicado por Petric y col. (2011), mediante el empleo de columnas de PVPP (polivinilpolipirrolidona) para eliminar inhibidores de PCR.

**6. 4.** Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1-2% conteniendo TBE 0.5X (Sambrook y col., 2001), empleando buffer de siembra (Genbiotech). Las corridas electroforéticas se realizaron a 75 V en cubas de electroforesis de 10 x 21 cm (Bio-Rad) conteniendo TBE 0.5X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio o SYBR Green II (Molecular Probes) y visualizados en luz U.V. o transiluminador de luz azul (Safe imager<sup>TM</sup> Invitrogen), respectivamente. Se incluyeron marcadores de peso molecular de 100, 400 o 1000 pb (Productos Bio-Lógicos). Las imágenes de los geles fueron fotografiadas con una cámara digital Kodak DC290 o Nikon D3100.

#### Buffer TBE 5X

Tris-HCl	54 g/l
EDTA 0.5M	20 ml/l
Acido Bórico	27.5 g/l
pH	8

## 7. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN EN PLANTAS DE MANÍ DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO Y DE SU SUPERVIVENCIA EN ENSAYOS EN MICROCOSMO

Las 18 bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección y la cepa solubilizadora comercial *P. fluorescens* fueron inoculadas de manera individual en plántulas de maní crecidas en macetas que contenían suelo proveniente de un campo de la zona rural de La Aguada con bajo contenido de P asimilable. Se determinó también la capacidad de supervivencia de las bacterias inoculadas en el suelo al final del ensayo.

### 7.1. Desinfección y germinación de las semillas de maní

Semillas de *Arachis hypogaea* L. (Runner- Tegua) limpias, sanas y de tamaño uniforme, se desinfectaron y germinaron siguiendo el método de Vincent (1970):

- Tratamiento con etanol 96° durante 30 segundos
- Un lavado con agua destilada estéril
- Tratamiento con agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 15% durante 15 min
- Seis o siete lavados con agua destilada estéril

Las semillas fueron germinadas en placas de Petri conteniendo algodón con papel de filtro e incubadas en estufa a 28°C en oscuridad. Luego fueron transferidas a macetas de 30 cm de diámetro y 35 cm de alto que contenían como soporte suelo no estéril con bajo contenido de P asimilable. Transcurridos aproximadamente 7 días las plántulas (5 cm de altura) fueron inoculadas.

### 7.2. Propiedades del suelo empleado como soporte

El suelo empleado, cedido gentilmente por el Ing. Marcos Bongiovanni, proviene de un campo de la zona rural de La Aguada perteneciente al Departamento Río Cuarto. Sus características físico-químicas fueron determinadas en el Laboratorio Integral Agropecuario: materia orgánica: 1.48% (método de Walkley-Black), pH: 6.7 (Potenciometría 1:2.5), nitrógeno: 13.9 µg/g (Reducción de Cadmio), fósforo: 6.6 µg/g (método de Bray y Kurtz).

A cada maceta se le colocó aproximadamente 4.5 kg de suelo previamente tamizado.

### 7.3. Inoculación y condiciones de cultivo de las plantas

Previo al agregado del inoculante bacteriano, el suelo fue suplementadas con fosfato tricálcico al 0.2% (Rivas y col., 2007). La suspensión bacteriana se preparó a partir de una colonia aislada transferida a Erlenmeyers conteniendo medio TY, la que fue incubada a 28°C en agitación. Se tomaron 4 ml de cultivos crecidos hasta fase estacionaria ( $10^9$  UFC/ml) y se los depositó en la corona de la raíz de la plántula para evitar dispersión del inoculante. Como controles se emplearon plantas fertilizadas con P soluble ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM), plantas sin fertilizar y sin inocular y plantas inoculadas con la cepa comercial *P. fluorescens*. Las plántulas fueron mantenidas en cámara de cultivo con un ciclo de luz día/noche de 16/8 horas y regadas regularmente con agua y medio Hoagland sin fósforo (Hoagland y Arnon, 1950).

<u>Medio Hoagland modificado</u>		<u>*Solución de micronutrientes:</u>	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.64 g/l	$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.83 g/l
$\text{KNO}_3$	1.011 g/l	$\text{MnCl}_2$	1.81 g/l
$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.48 g/l	$\text{ZnCl}_2$	0.11 g/l
$\text{FeCl}_3$	0.01 g/l	$\text{CuSO}_4$	0.05 g/l
Solución de micronutrientes	2 ml/l*	$\text{NaMoO}_4$	0.025 g/l

### 7.4. Determinación del efecto de la inoculación de los aislamientos sobre el crecimiento de plantas de maní

Las plantas fueron cosechadas a los 120 días post-inoculación lo cual corresponde, de acuerdo a las condiciones de crecimiento empleadas, al estadio reproductivo R4 (Boote, 1982) y se determinaron los parámetros de crecimiento vegetal que se enumeran a continuación. Para el caso de los órganos aéreos de las plantas, los mismos fueron analizados tanto como parte aérea total como de manera separada (tallos y hojas) a los efectos de determinar si alguno de estos órganos vegetales es más influenciado por el tratamiento.

#### Longitud aérea (LA) y radical (LR):

Las plantas previamente lavadas con agua corriente fueron separadas en el punto en el que comienza el tallo. La LA se determinó midiendo desde la base del tallo hasta la última hoja y la LR desde la corona radical hasta el extremo de la raíz principal. Los datos fueron expresados en centímetros (cm).

### **Peso fresco aéreo (PFA) y radical (PFR):**

Fue determinado luego de cosechar las plantas utilizando balanza granataria con un error de 0.001 g. Los datos fueron expresados en gramos (g/planta).

### **Peso seco aéreo (PSA) y radical (PSR):**

Fue determinado luego de que las partes aéreas y radicales fueran colocadas en sobres de papel y se secaran en estufa a 70°C durante 10 días hasta peso constante, utilizando balanza granataria con un error de 0.001 g. Los datos fueron expresados en gramos (g/planta).

### **Relación peso seco aéreo/radical (PSA/PSR):**

Se determinó calculando el cociente entre el peso seco aéreo (g) y el peso seco radical (g) de las plantas de maní analizadas al momento de la cosecha.

### **Número de cajas**

Fue determinado a los 120 días postinoculación y los datos fueron expresados en número de cajas por planta.

### **Peso seco y número de nódulos:**

El peso seco de los nódulos fue determinado luego de que fueran colocados en sobres de aluminio y se secaran en estufa a 70°C durante 10 días hasta peso constante, utilizando balanza granataria con un error de 0.001 g. Los datos fueron expresados en miligramos (mg).

### **Contenido de P y N de la parte aérea:**

El contenido de P de la parte aérea fue determinado en los laboratorios de INTA Castelar mediante el método colorimétrico descrito por Murphy y Riley, (1962). La determinación de N se realizó mediante micro Kjeldhal (Muller, 1961) en los Laboratorios de Microbiología Aplicada de la Universidad Nacional de La Pampa. Los datos fueron expresados en miligramos (mg/planta).

### **Contenido de P y pH del suelo empleado como soporte:**

Los contenidos de P y pH del soporte fueron determinados al final del ensayo mediante los métodos de Bray y Kurtz 1, (1945) y potenciometría 1:2.5, respectivamente.

### 7.5. Análisis de supervivencia de las bacterias inoculadas

Para identificar las bacterias inoculadas, previamente se les realizó análisis del perfil de resistencia a antibióticos. Los antibióticos empleados y las concentraciones utilizadas fueron: streptomicina (30 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml), neomicina (200 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), ampicilina (100 µg/ml), ácido nalidíxico (1000 µg/ml), rifampicina (200 µg/ml), spectinomomicina (200 µg/ml), tetraciclina (20 µg/ml) y gentamicina (10 µg/ml). Se tomaron muestras del soporte (suelo rizosférico) al momento de la cosecha y se determinó el número de células viables mediante recuento en placa (UFC/g soporte) en medio NBRIP-BPB conteniendo los antibióticos correspondientes. Para confirmar que las colonias analizadas en el recuento corresponden a la cepa inoculada, se realizaron análisis de perfiles genéticos mediante la técnica de rep-PCR. Se realizó fingerprint de ADN total empleando los cebadores ERIC y BOX (de Bruijn, 1992; Versalovic y col., 1994, respectivamente).

#### 7.5.1. ERIC-PCR

Se emplearon los cebadores E1 (5'- ATGTTAGCTCCTGGGGATTAC - 3') y E2 (5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), el volumen de reacción de la PCR fue de 12 µl y contenía:

Cebadores E1, E2 10 µM	0.75 µl c/u
Buffer 10X	1.2 µl
dNTPs 2 mM	1.2 µl
ADN molde	3.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.44 µl
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	3.03 µl
Taq polimerasa (5 U/µl)	0.13 µl

Las amplificaciones se realizaron con el siguiente ciclo de temperaturas:

95°C	1 min	
94°C	1 min	} X35
52°C	1 min	
65°C	8 min	
68°C	16 min	

### 7.5.2. BOX-PCR

Se empleó el cebador BOX-AR1 (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), el volumen de reacción de la PCR fue de 25  $\mu$ l y contenía:

Cebador BOX-AR1 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Buffer 10X	2.5 $\mu$ l
dNTPs 2 mM	1.2 $\mu$ l
ADN molde	4 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	12.6 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l

Las amplificaciones se realizaron con el siguiente ciclo de temperaturas:

95°C	7 min	
94°C	1 min	} X35
52°C	1 min	
65°C	8 min	
68°C	16 min	

## 8. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE AGROQUÍMICOS EN EL CULTIVO DE MANÍ SOBRE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

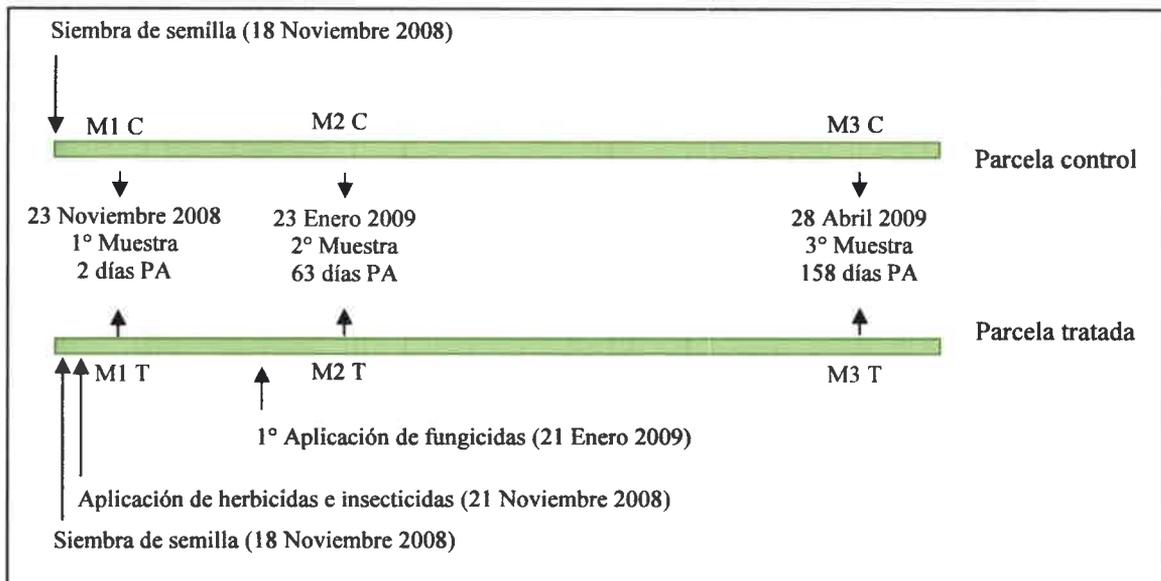
El estudio se llevó a cabo en un campo manisero de la provincia de Córdoba (campo experimental de la UNRC) ubicado a 33°07' de latitud sur, 64°14' de longitud Oeste de Greenwich y a una altitud de 421 m sobre el nivel del mar, con las características de un suelo Hapludol típico, el cual contiene principalmente fosfatos inorgánicos insolubles bajo la forma de fosfato tricálcico (Bonadeo y Moreno, 2006). Se cultivaron dos parcelas con plantas de maní, en una de las cuales no se aplicaron agroquímicos y se realizó desmalezado manual (parcela control), mientras que la otra fue tratada con diversos agroquímicos habitualmente empleados en el cultivo de maní (parcela tratada) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Agroquímicos empleados en la parcela tratada.

Agroquímicos	Nombre Común	Nombre químico	Fórmula química	Dosis empleada
Herbicidas pre-emergentes	S-metolaclor	2-chloro-6'-ethyl-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acetotoluidide		1 l/ha
	Diclosulam	N-(2,6-dichlorophenyl)-5-ethoxy-7-fluoro [1, 2, 4] triazolo [1,5-c] pyrimidine-2-sulfonamide		20 g/ha
Herbicidas pre y post-emergentes	Glifosato	N-(phosphonomethyl)glycine		3.5 l/ha
	Imazetapir	{2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazole-2-yl]-5-ethyl-3-pyridine carboxylic acid}		1 l/ha
	Imazapic	2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-5-methyl-3-pyridinecarboxylic acid		30 ml/ha
Insecticidas	Gamma-cialotrina + Lambda-cialotrina	{(S-α-cyano-3-phenoxybenzyl(1R,3R)-3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate)} {(S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (Z)-(1R,3R)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate and (R)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (Z)-(1S,3S)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate}		25 ml/ha
	Fungicidas	Azoxystrobin + Ciproconazol	(E)-2-{2-[6-(2-cyano-phenoxy) pyrimidin-4-yloxy] phenyl}-3-methoxyacrylate 3-chloro-4-[(2RS, 4RS, 2RS, 4SR)-4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) -1,3-dioxolan-2-yl] phenyl -4-chlorophenyl ether	

La aplicación de los herbicidas e insecticidas se realizó a los 3 días postsiembra y una sola vez durante el ciclo de cultivo; mientras que los fungicidas se aplicaron a los 61 días postsiembra y cada dos semanas. Se analizaron muestras de suelo a los 2, 63 y 158 días (M1, M2 y M3, respectivamente) posteriores a la aplicación de agroquímicos en las dos parcelas (Figura 9). Las mismas se obtuvieron con un calador (2 cm de diámetro) y a una profundidad de 10 a 15 cm. Fue seleccionada dicha fracción del suelo debido a que la semilla es sembrada a 7 cm de profundidad y a que la parte superficial del suelo contenía abundante barbecho del cultivo anterior debido a la práctica de siembra directa. De cada parcela y tiempo analizado se tomaron al azar 5 muestras de aproximadamente 50 g de

suelo compuestas cada una de ellas por una mezcla de 25 submuestras. Las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de su análisis.



**Figura 9.** Esquema de trabajo para la recolección de las muestras. C: parcela sin agroquímicos (control); T: parcela con agroquímicos (tratada); PA: post-aplicación de agroquímicos.

### 8.1. Aislamiento de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato provenientes de las parcelas control y tratada con agroquímicos

Para el aislamiento y cuantificación de las bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato tricálcico en los diferentes tiempos y en las dos condiciones experimentales analizadas, 5 g de suelo fueron suspendidos en 45 ml de pirofosfato de sodio 0.1% estéril y se agitó vigorosamente durante 30 min. Se realizaron diluciones seriadas y se determinó el número de colonias que formaban un halo transparente de solubilización en medio NBRIP-BPB. A su vez, muestras de suelo fueron secadas en estufa a 37°C durante 7 días y los resultados se expresaron como UFC/g suelo seco.

### 8.2. Análisis genotípico de las bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato provenientes de las parcelas control y tratada con agroquímicos

El análisis de la diversidad de las bacterias solubilizadoras de fosfato obtenidas de las muestras de suelo se realizó mediante la amplificación de las regiones genómicas repetitivas (rep- fingerprint) empleando los cebadores ERIC y BOX, como se indicó en los puntos 7.5.1. y 7.5.2.

## 9. DETECCIÓN DEL GEN *pqqE* EN LAS BACTERIAS CULTIVABLES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

La presencia del gen *pqqE* fue determinada por PCR en las bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a la colección, en aquellas colonias que mostraron capacidad de solubilización de fosfato obtenidas tanto de las parcelas control como tratada y en las cepas de referencia a las que previamente en nuestro laboratorio se les analizó su capacidad solubilizadora de fosfato. Para ello, se amplificó un fragmento de 700 pb de este gen usando los cebadores *pqqEF*-317 (5'TTYTAYACCAACCTGATCACSTC3') y *pqqER*-1019 (5'TBAGCATRAASGCCTGRCG3') diseñados en el laboratorio a partir del alineamiento de secuencias obtenidas en el banco de genes NCBI (*Pantoea agglomerans* gluconic acid gene, complete cds (M94448); *Enterobacter sakazakii* ATCC BAA 894 (CP000783); *Kluyvera intermedia* (AY216683); *Rahnella aquatilis* Hx2 (FJ868974); *Klebsiella pneumoniae* (X58778) y *Serratia marcescens* (DQ8685361).

### 9.1. PCR- *pqqE*

El volumen de reacción fue de 20  $\mu$ l y contenía:

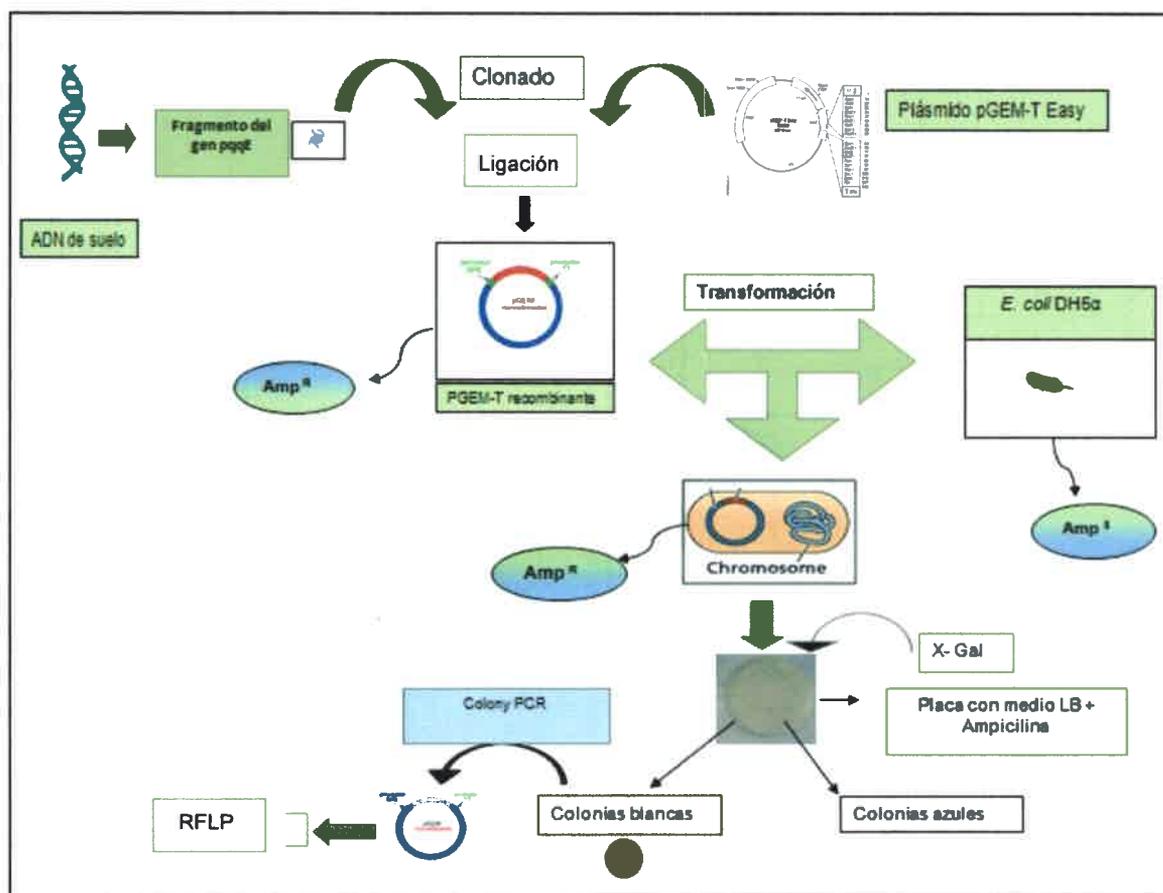
Cebadores <i>pqqEF/R</i> 10 $\mu$ M	2 $\mu$ l c/u
Buffer 10X	2 $\mu$ l
dNTPs 2 mM	2 $\mu$ l
ADN molde	2.4 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	7.4 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l

Las amplificaciones se realizaron con el siguiente ciclo de temperaturas:

95°C	1 min	} X35
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

**10. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL GEN *pqqE* EN LAS POBLACIONES BACTERIANAS NO CULTIVABLES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO OBTENIDAS DE LAS PARCELAS CONTROL Y TRATADA CON AGROQUÍMICOS ASOCIADAS AL CULTIVO DE MANI**

La variabilidad del gen *pqqE* en las poblaciones solubilizadoras de fósforo de suelo se analizó a partir de ADN extraído de suelo (punto 6.3). Se amplificó el fragmento de 700 pb del gen *pqqE* el cual fue clonado y posteriormente digerido con endonucleasas (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema del trabajo realizado para el estudio de la variabilidad del gen *pqqE* en las poblaciones no cultivables solubilizadoras de fósforo obtenidas de suelo con y sin agregado de agroquímicos.

### 10.1. PCR- *pqqE*-suelo

El volumen de reacción fue de 20 µl y contenía:

Cebadores <i>pqqEF/R</i> 10 µM	2 µl c/u
Buffer 10X	4 µl
dNTPs 2 mM	2 µl
ADN molde	1 µl
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	6.8 µl
Go Taq (Promega)	0.2 µl

Las amplificaciones se realizaron con el siguiente ciclo de temperaturas:

95°C	1 min	} X35
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

El producto de PCR obtenido fue clonado en el vector plasmídico pGEM-T Easy, empleando el kit comercial pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. El vector pGEM-T Easy posee una región (gen *LacZ*) que codifica para la β-galactosidasa y otra que le confiere resistencia a ampicilina (*Amp<sup>r</sup>*) (Figura 11).

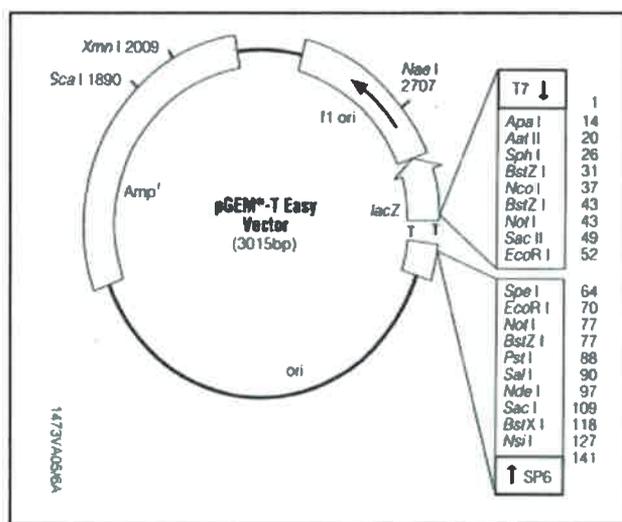


Figura 11. Mapa físico del vector plasmídico pGEM-T.

### 10.2. Obtención de células competentes químicas

Para la obtención de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , un volumen de 100 ml de medio LB glucosado (glucosa 1 g/l) fue inoculado con 1 ml de cultivo de 12 hs de crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  e incubado a 37°C con agitación vigorosa (150 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una DO<sub>660</sub> de 0.5-0.6 fueron centrifugados a 6.000 rpm durante 5 min a 4°C. El pellet celular fue resuspendido en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM (preparado en agua bidestilada estéril, calidad PCR y esterilizado por filtración) y enfriado en hielo durante 30 min. Las células fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C y el pellet celular fue luego resuspendido en 3.4 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM (0°C). Posteriormente se agregó un volumen de 0.6 ml de glicerol estéril a una concentración final de 15% y se conservó en alícuotas de 100  $\mu$ l a -80°C (Ausubel y col., 1991).

### 10.3. Transformación/obtención de clones

Las células competentes fueron transformadas con el plásmido pGEM-T Easy conteniendo el fragmento de 700 pb correspondiente al gen *pqqE*, según la metodología descrita por Huff y col. (1990). Estas bacterias son sensibles a ampicilina y se vuelven resistentes al ser transformadas con el vector pGEM-T Easy. Cuando se liga un inserto (ADN-*pqqE*) al vector se produce una disrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa, lo que impide la expresión de esta enzima. Dado que la acción de la  $\beta$ -galactosidasa sobre el X-Gal (sustrato) hace que se libere un compuesto de color azul, la inserción de un fragmento de DNA en el vector se evidencia por la ausencia de color azul. Las colonias blancas que mostraron crecimiento en medio LB con ampicilina fueron seleccionadas y para verificar que contengan el inserto buscado se realizó “colony PCR” empleando los cebadores T7 que tienen sitio de unión en el vector pGEM-T y amplifican un producto de aproximadamente 1000 pb.

“Colony PCR” : Consistió en una reacción de PCR utilizando como molde una ansada de cada colonia blanca obtenida. El volumen final de reacción fue de 20  $\mu$ l y contenía:

Cebadores T7P/T7R 10 $\mu$ M	1.5 $\mu$ l c/u
Buffer 10X	2 $\mu$ l
dNTPs 2 mM	1.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.6 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	12.75 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.15 $\mu$ l

Las amplificaciones se realizaron con el siguiente ciclo de temperaturas:

95°C	1 min	} X35
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

Aquellos clones en los cuales se amplificó un fragmento de aproximadamente 1000 pb se conservaron en glicerol 40% v/v a -20°C hasta su utilización.

#### 10.4. Digestión del fragmento del gen *pqqE*

Para analizar mediante RFLP el fragmento del gen *pqqE* se evaluó previamente *in silico* su digestión. A los fines de seleccionar endonucleasas que tuvieran sitio de corte en las secuencias del gen *pqqE* se utilizó el portal web JustBio y se analizaron secuencias del gen *pqqE* de diferentes géneros bacterianos depositadas en el banco de genes NCBI (*Serratia* sp. S119 (GQ165511), *Pantoea agglomerans* (M94448), *Ranbella aquatilis* HX2 (FJ868974), *Klebsiella pneumonia* (X58778), *Enterobacter hormaechei* Fs-11 (HE646883), *Pseudomonas fluorescens* (GQ202029), *Serratia marcescens* (DQ868536.1), *Pseudomonas putida* DOT-T1E (GQ506557.1), *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (CP000438.1). A partir de dicho análisis fueron seleccionadas tres endonucleasas: *CfoI*, *MspI* y *NdeII* (Promega).

El volumen de reacción de las digestiones fue de 11.8  $\mu$ l y contenía:

Producto de amplificación	10 $\mu$ l
Enzima	0.5 $\mu$ l
BSA	0.1 $\mu$ l
Buffer	1.2 $\mu$ l

Las reacciones se incubaron a 37°C durante aproximadamente 16 hs y los productos de digestión se conservaron a -20°C hasta su utilización. Mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% se realizaron las corridas electroforéticas. Los geles fueron teñidos con SYBR Green II y visualizados en transiluminador de luz azul. Se incluyó marcador de peso molecular de 100 pb y los perfiles de digestión obtenidos fueron analizados.

### 11. ANÁLISIS DE LOS DATOS

---

#### 11.1. Análisis estadístico

---

Los datos experimentales fueron analizados empleando el análisis de la varianza y la prueba de Tukey para las comparaciones múltiples y para las comparaciones entre dos muestras, el test “t” de Student, ( $p < 0.05$ ). Para los análisis de regresión se estimó el coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos fue utilizando el programa Infostat versión 2011.

#### 11.2. Programas informáticos empleados

---

Para el procesamiento de las imágenes digitales obtenidas de las corridas electroforéticas se utilizó el software ImageJ 1.46.

Para el análisis de los perfiles rep-PCR y perfiles obtenidos de las digestiones enzimáticas se construyeron dendrogramas utilizando el software FAMD 1.2 (Schlüter y Harris, 2006).

#### 11.3. Índices de diversidad

---

Los índices de diversidad de Simpson (Simpson, 1949) y de Shannon–Wiener (Margelef, 1958) fueron empleados para estimar cuantitativamente la diversidad de las bacterias cultivables y no cultivables.

El índice de diversidad de Simpson se basa en que un sistema es más diverso cuanto menos dominancia de especies hay, y la distribución es más equitativa. Este índice representa la probabilidad de que dos bacterias/clones, dentro de un hábitat, seleccionados al azar presenten idéntico perfil. El valor de este índice puede oscilar entre 0-1 y el valor 1 indica que no hay diversidad. En este estudio, el índice de Simpson representaría la probabilidad de que dos bacterias/clones, seleccionadas/os al azar muestren el mismo perfil.

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde  $S$  es el número de perfiles,  $N$  es el total de bacterias/clones y  $n$  es el número de bacterias que comparten un perfil genómico.

El índice de Shannon–Wiener se representa como  $H'$  y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0 y 1 pero no tiene límite superior. Este índice contempla la cantidad de bacterias/clones presentes en el área de estudio y la cantidad relativa de cada una de ellas/os. Las mayores limitaciones de este índice es que no tiene en cuenta la distribución de las especies en el espacio y no discrimina por abundancia.

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde  $S$  es el número de perfiles,  $p_i$  ( $n_i/N$ ) es la proporción de bacterias/clones que comparten un perfil genómico respecto al total de bacterias

---

MECANISMOS DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO Y  
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE BACTERIAS  
NATIVAS DEL ÁREA MANISERA DE LA PROVINCIA DE  
CÓRDOBA

Las bacterias que poseen capacidad solubilizadora de fósforo son de gran importancia ya que son capaces de aportar P a las plantas a partir de fuentes no disponibles para las mismas (Valverde y col., 2006). Diversos géneros bacterianos están involucrados en la solubilización de fósforo mineral, tales como *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, etc. (Gupta y col., 1998; Amellal y col., 1999; Goldstein y col., 1999; Joseph y Jisha, 2009).

Como se mencionó en el Capítulo 1, el principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosforados inorgánicos (fosfatos) son movilizados involucra la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, principalmente ácido glucónico (Goldstein 1995; Rodríguez y Fraga 1999; Rodríguez y col., 2006). La producción de ácido glucónico se produce en el espacio periplásmico de bacterias Gram negativas mediante oxidación de la glucosa. Este proceso se realiza a través de la vía quinoproteína-GDH que requiere del cofactor PQQ, cuya biosíntesis involucra los genes *pqq*.

En este trabajo la caracterización bioquímica y genética de la capacidad solubilizadora de fósforo se realizó en una población constituida por 18 bacterias aisladas de plantas de maní cultivadas a campo de la región manisera de la provincia de Córdoba, seleccionadas por producir los mayores halos de solubilización de fósforo, y en la cepa comercial *P. fluorescens*. Estas bacterias provienen de la zona rural de las localidades de Bengolea, Charras, Santa Eufemia, Las Higueras y Ticino. A su vez, fueron aisladas de diferentes tejidos vegetales (12 endófitas de nódulos, 4 epífitas de tallo y 2 endófitas de raíz) (Taurian y col., 2010).

## 1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

A los efectos de identificar taxonómicamente los 18 aislamientos bacterianos de la colección, las secuencias parciales del gen ARNr 16S obtenidas de cada una de las bacterias fueron analizadas. Se seleccionó este gen ya que es un excelente marcador filogenético (López, 2002):

- ⊕ Esta presente en todas las bacterias y cumple la misma función.
- ⊕ Su secuencia nucleotídica es altamente conservada en algunas regiones pero a su vez contiene regiones variables.
- ⊕ El porcentaje de mutación es relativamente bajo comparado con otros genes.

- ⊕ Es de gran tamaño, con lo cual contiene suficiente información en su secuencia para realizar comparaciones estadísticamente significativas.
- ⊕ Un gran número de secuencias se encuentran disponibles en bancos de genes (más de 2 millones de secuencias se encuentran depositadas en la base de datos del GenBank) y es posible alinearlas y compararlas gracias a la aplicación de diferentes softwares que ofrece el mercado.

Se utilizaron los softwares NCBI y RDP para analizar las secuencias de ARNr 16S. Para asignar un género a las bacterias analizadas, se consideró que la secuencia presentara una similitud mayor al 95% (Collavino y col., 2010) con las secuencias de referencia depositadas en las bases de datos de los softwares utilizados. A partir del alineamiento de las secuencias se observó que todos los aislamientos mostraron un porcentaje de identidad  $\geq$  a 97 y 96% empleando NCBI y RDP, respectivamente (Tabla 3). Los resultados obtenidos con ambos softwares coinciden; por lo que verifican la identificación taxonómica asignada a nivel de género.

Los análisis de alineamiento indican que 10 de las bacterias de la colección presentan un alto porcentaje de identidad con bacilos Gram negativos y 8 bacterias con bacterias Gram positivas (5 bacilos y 3 cocos). Las bacterias analizadas corresponden a los géneros *Serratia*, *Pantoea*, *Enterobacter* (enterobacteriales), *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Enterococcus* (Tabla 3) a los cuales pertenecen bacterias solubilizadoras de fosfato previamente descritas (Seong y col., 1996; Kim y col., 1998; Deubel y col., 2000; Chung y col., 2005; Herter y col., 2006; Ben Farhat y col., 2009). Fue inesperado observar que entre los aislamientos de la colección no se identificaron bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, ya que se han reportado gran cantidad de cepas de este género con propiedad solubilizadora de fosfato (Gulati y col., 2008; Jorquera y col., 2008; Collavino y col., 2010). Si bien la mayoría de las bacterias solubilizadoras de fosfato descritas son Gram negativas, el hallazgo de bacterias Gram positivas con esta capacidad ha sido reportado por Vázquez y col. (2000) y Ogut y col. (2010) en muestras de rizósfera de manglares y de rizósfera de maíz y trigo, respectivamente.

**Tabla 3.** Identificación taxonómica de las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección mediante análisis de la secuencia del ADNr 16S.

Aislamientos bacterianos	Similitud ADNr 16S (número de acceso) <sup>a</sup>	Identidad genética (%) <sup>b</sup>	Asignación taxonómica	Número de acceso
J21	<i>Serratia ureilytica</i> BM0512 (JQ680882)	97.0/99.8	<i>Serratia</i> sp.	JN091871
J145	<i>Serratia ureilytica</i> BM0561 (JQ680908)	99.0/99.8	<i>Serratia</i> sp.	JN091870
J260	<i>Serratia marcescens</i> ITBB B5-1 (JN896750)	99.0/100.0	<i>Serratia</i> sp.	JN969594
S93	<i>Serratia ureilytica</i> BM0525 (JQ680890)	98.0/98.9	<i>Serratia</i> sp.	JN173078
S119	<i>Serratia marcescens</i> ITBB B5-1 (JN896750)	99.0/100.0	<i>Serratia</i> sp.	GQ165511
J49	<i>Pantoea agglomerans</i> HK 14-1 (AY335552)	99.0/99.9	<i>Pantoea</i> sp.	GQ165512
J157	<i>Enterobacter</i> sp ydwtj-5 (EF028156)	99.0/99.7	<i>Enterobacter</i> sp.	JN104595
J33	<i>Enterobacter cowanii</i> BCC 009 (EU629163)	99.0/99.8	<i>Enterobacter</i> sp.	JQ304269
S57	<i>Enterobacter</i> sp JA07 (EU260124)	99.0/99.8	<i>Enterobacter</i> sp.	JN091872
L176	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BA60 (FJ263920)	99.0/100.0	<i>Acinetobacter</i> sp.	JN173077
J9	<i>Bacillus subtilis</i> 14 (JN794569)	99.0/100.0	<i>Bacillus</i> sp.	JN104596
J225	<i>Bacillus megaterium</i> 1287 (JN645941)	99.0/99.8	<i>Bacillus</i> sp.	JN104592
J255	<i>Bacillus megaterium</i> 1287 (JN645941)	99.0/99.8	<i>Bacillus</i> sp.	JN969593
L54	<i>Bacillus subtilis</i> 14 (JN794569)	99.0/99.0	<i>Bacillus</i> sp.	JN969591
L55	<i>Bacillus subtilis</i> RST1902 (JX185717)	99.0/99.5	<i>Bacillus</i> sp.	JN969592
L177	<i>Enterococcus faecalis</i> IJ-12 (EU547777)	100.0/99.1	<i>Enterococcus</i> sp.	JN104594
L185	<i>Enterococcus faecium</i> CE3.A (JN653465)	99.0/96.1	<i>Enterococcus</i> sp.	JN104593
L191	<i>Enterococcus faecium</i> CE3.A (JN653465)	99.0/97.3	<i>Enterococcus</i> sp.	JN173076

<sup>a</sup>: Secuencia con mayor porcentaje de identidad observada

<sup>b</sup>: Valor de similitud (porcentaje de identidad) con análisis NCBI/RDP

Por otro lado, resultó interesante el aislamiento de bacterias pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea* y *Bacillus* del interior de nódulos, órgano cuya formación es inducida cuando la leguminosa interacciona con especies rizobianas. Aunque cepas de *Serratia* sp., *Enterobacter* sp. y *Pantoea* sp. ya han sido previamente reportadas como endófitas de plantas, pocos trabajos indican que provengan del interior de nódulos (Ibañez y col., 2009). Diversos estudios muestran que la infección simultánea de rizobios con bacterias rizosféricas puede incrementar la nodulación y el crecimiento en una amplia

variedad de leguminosas (Grimes y Mount, 1984; Polonenko y col., 1987; Yahalom y col., 1988; Bolton y col., 1990). Asimismo, este estudio describe por primera vez el hallazgo de bacterias del género *Enterococcus* aisladas del interior de tejidos vegetales (raíz).

## 2. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD SOLUBILIZADORA DE FOSFATO

Como se mencionó anteriormente, en los suelos maniseros de la provincia de Córdoba se ha reportado déficit en el contenido de P disponible para las plantas. Estos suelos son del tipo Hapludol típico, los cuales contienen principalmente fosfatos inorgánicos insolubles bajo la forma de fosfato tricálcico. Si bien existen diferentes medios y criterios para la selección de bacterias solubilizadoras de fosfato, en este trabajo, y considerando las características del suelo mencionadas, las 18 bacterias de la colección y la cepa comercial *P. fluorescens* fueron analizadas en su capacidad solubilizadora de fosfato en medios sólidos y líquidos suplementados con fosfato tricálcico como fuente de P insoluble.

### 2. 1. Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato en medio sólido

Debido a que las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección habían sido obtenidas previamente, entre los años 2005-2006 y, que ha sido descrito que la capacidad de solubilizar fosfato puede constituir un fenotipo inestable que puede perderse luego de sucesivos repiques (Halder y col., 1990; Illmer y Schinner, 1992; Vazquez y col., 2000), los aislamientos fueron evaluados nuevamente en dicha propiedad.

Las 18 bacterias de la colección mantuvieron la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico en medio sólido. Los tamaños de sus halos de solubilización variaron entre 5 y 16 mm (Tabla 4). Por su parte, la cepa comercial *P. fluorescens* presentó un halo de solubilización de fosfato de  $15.0 \pm 3.2$  mm en medio sólido NBRIP-BPB.

### 2. 2. Cuantificación del fosfato solubilizado en medio líquido NBRIP-BPB

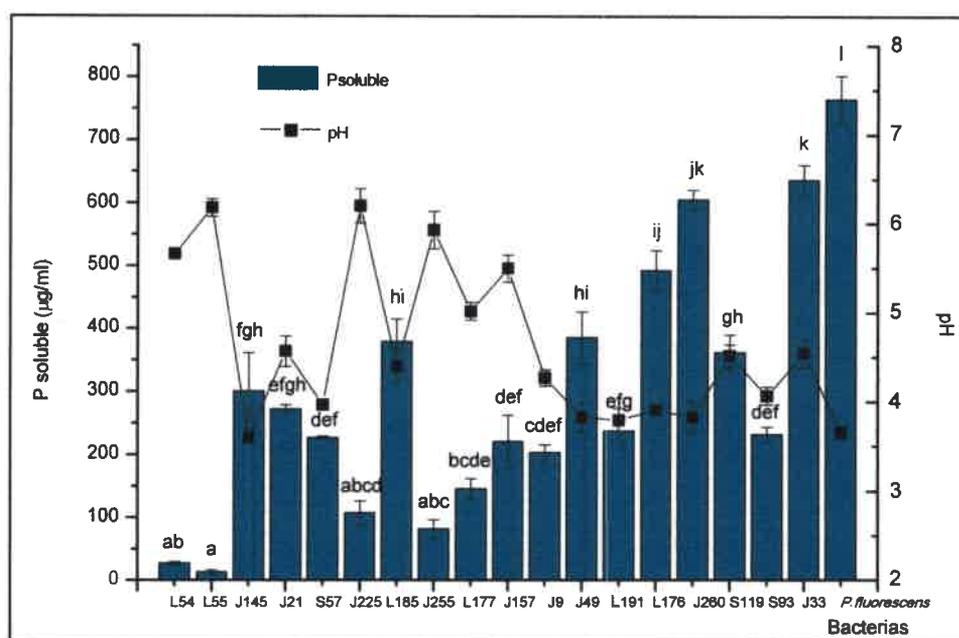
La cantidad de fósforo solubilizado por los aislamientos fue variable (aproximadamente entre 12 y 760  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tabla 4, Figura 12). Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores quienes encontraron diferencias importantes en la cinética bacteriana y la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico (Delvasto y col., 2006; Pérez y col., 2007).

**Tabla 4.** Diámetro del halo de solubilización de fosfato en medio sólido NBRIP-PBP, cantidad de fósforo solubilizado por los aislamientos nativos asociados a maní y *P. fluorescens* y valores de pH del sobrenadante en medio líquido NBRIP-BPB a las 24, 48, 72 y 168 horas de crecimiento.

Aislamientos	halo (mm) <sup>a</sup>	Solubilización de fósforo tricálcico en medio líquido NBRIP-BPB							
		24 horas		48 horas		72 horas		168 horas	
		P soluble (µg/ml)	pH	P soluble (µg/ml)	pH	P soluble (µg/ml)	pH	P soluble (µg/ml)	pH
<i>Bacillus</i> sp. L54	5.3±1.2	16.7±2.5	5.3±0.4	26.8±2.5	5.7±0.0	22.2±1.6	5.9±0.1	24.9±1.4	5.7±0.1
<i>Bacillus</i> sp. L55	5.3±0.3	12.9±1.0	6.2±0.1	11.2±1.7	5.9±0.2	12.0±2.8	5.4±0.2	19.2±6.2	5.0±0.1
<i>Serratia</i> sp. J145	5.3±0.3	300.6±51.4	3.6±0.0	397.8±81.0	3.7±0.1	366.7±34.4	4.0±0.1	373.8±69.6	5.0±0.1
<i>Serratia</i> sp. J21	5.7±1.3	224.4±11.8	3.7±0.1	272.1±6.7	4.6±0.2	199.5±7.7	5.3±0.1	140.7±9.3	5.6±0.1
<i>Enterobacter</i> sp. S57	6.0±0.3	119.4±3.0	4.7±0.1	157.2±9.2	4.6±0.1	227.0±2.3	4.0±0.0	190.0±17.8	3.6±0.1
<i>Bacillus</i> sp. J225	6.7±0.9	18.6±6.5	5.9±0.1	54.9±10.1	5.8±0.4	107.3±19.1	6.2±0.2	71.0±19.1	5.7±0.2
<i>Enterococcus</i> sp. L185	7.7±0.9	96.5±12.8	5.0±0.1	99.7±10.8	4.9±0.1	157.5±24.4	4.6±0.1	378.9±36.5	4.4±0.2
<i>Enterobacter</i> sp. J157	8.7±1.2	220.6±50.4	5.1±0.2	258.6±50.9	5.4±0.2	254.6±44.6	5.6±0.0	189.6±22.4	5.4±0.2
<i>Bacillus</i> sp. J255	9.0±1.7	44.2±7.4	6.1±0.1	82.0±14.7	5.9±0.2	77.3±12.8	5.8±0.2	78.6±7.3	5.4±0.1
<i>Enterococcus</i> sp. L177	9.3±1.8	80.6±25.2	5.2±0.2	145.4±17.9	5.0±0.1	154.8±9.5	4.9±0.1	173.0±13.9	4.7±0.1
<i>Pantoea</i> sp. J49	10.0±3.0	69.1±7.7	4.5±0.1	153.8±11.4	4.3±0.1	187.8±11.6	3.0±0.0	385.4±41.4	3.8±0.2
<i>Bacillus</i> sp. J9	10.3±2.7	154.3±8.5	4.1±0.1	202.7±12.6	4.3±0.1	175.6±7.6	5.2±0.0	124.1±5.3	5.7±0.0
<i>Enterococcus</i> sp. L191	11.0±1.0	158.0±17.1	4.5±0.1	237.1±20.7	4.0±0.0	265.5±15.1	3.9±0.0	384.0±18.2	3.8±0.1
<i>Acinetobacter</i> sp. L176	11.7±3.7	152.2±18.9	4.1±0.2	492.7±33.9	4.2±0.1	537.5±11.7	3.9±0.0	537.4±43.2	3.6±0.1
<i>Serratia</i> sp. S119	13.7±2.7	230.2±9.8	3.8±0.1	216.5±22.2	3.9±0.1	228.0±25.1	4.2±0.1	362.0±27.8	4.5±0.1
<i>Serratia</i> sp. J260	14.0±2.0	22.6±4.9	4.8±0.1	114.2±20.3	4.4±0.1	153.8±11.9	4.3±0.1	605.2±15.4	3.8±0.2
<i>Serratia</i> sp. S93	15.0±1.1	232.0±8.7	3.9±0.1	248.0±13.0	4.0±0.1	272.1±11.6	4.1±0.1	244.6±21.4	4.3±0.2
<i>Enterobacter</i> sp. J33	16.0±2.5	636.3±32.8	4.1±0.1	663.5±18.7	4.5±0.2	656.0±18.4	4.9±0.2	457.8±28.2	5.2±0.2
<i>P. fluorescens</i>	15.0±3.2	508.3±37.2	3.7±0.0	517.5±28.1	3.9±0.0	521.4±37.6	3.7±0.1	764.7±37.4	3.7±0.1

Los datos representan la media ± E.S. de 3-6 determinaciones (n=5-20)

<sup>a</sup>: diámetro del halo de solubilización de fosfato

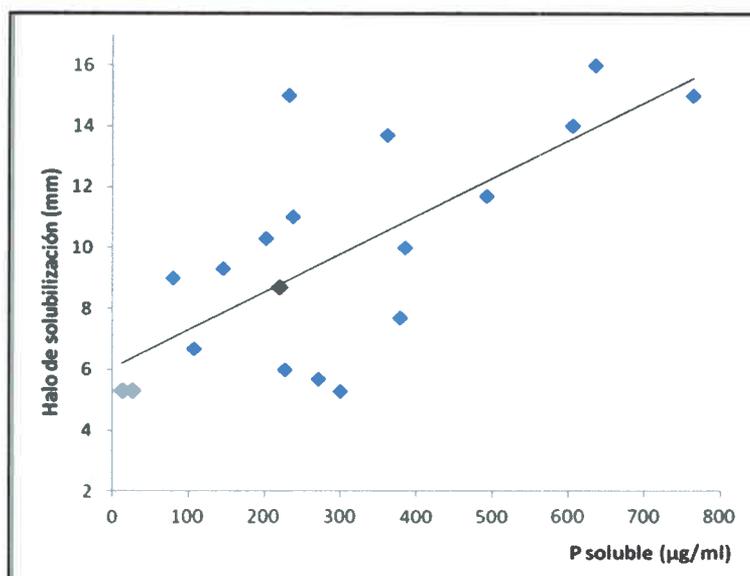


**Figura 12.** Niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y *P. fluorescens* y valores de pH en medio líquido NBRIP-BPB. Los datos representan la media  $\pm$  E.S. de 3-6 determinaciones ( $n=5-20$ ) ( $p<0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias entre los aislamientos.

El valor máximo de P soluble ( $764.7 \mu\text{g/ml}$ ) fue observado en el sobrenadante de la cepa *P. fluorescens* a las 168 horas de crecimiento, y el valor del pH del medio descendió a 3.7. Las bacterias de la colección que solubilizaron los mayores niveles de P fueron: *Enterobacter* sp. J33 ( $636.3 \mu\text{g/ml}$ ), *Serratia* sp. J260 ( $605.2 \mu\text{g/ml}$ ) y *Acinetobacter* sp. L176 ( $492.7 \mu\text{g/ml}$ ) a las 24, 168 y 48 horas de crecimiento, respectivamente. Por otro lado, los menores valores de fósforo soluble fueron determinados en los aislamientos *Bacillus* sp. L55, L54 y J255 ( $12.9 \mu\text{g/ml}$ ,  $26.8 \mu\text{g/ml}$  y  $82.0 \mu\text{g/ml}$  a las 24 y 48 horas de crecimiento, respectivamente).

Cabe destacar que los aislamientos que tuvieron mayor capacidad de solubilizar fosfato tricálcico ( $>400 \mu\text{g/ml}$ ) son bacilos Gram negativos, grupo ampliamente estudiado en esta propiedad; mientras que las bacterias que liberaron menores cantidades de P soluble ( $<200 \mu\text{g/ml}$ ) son bacilos Gram positivos (Tabla 4, Figura 12).

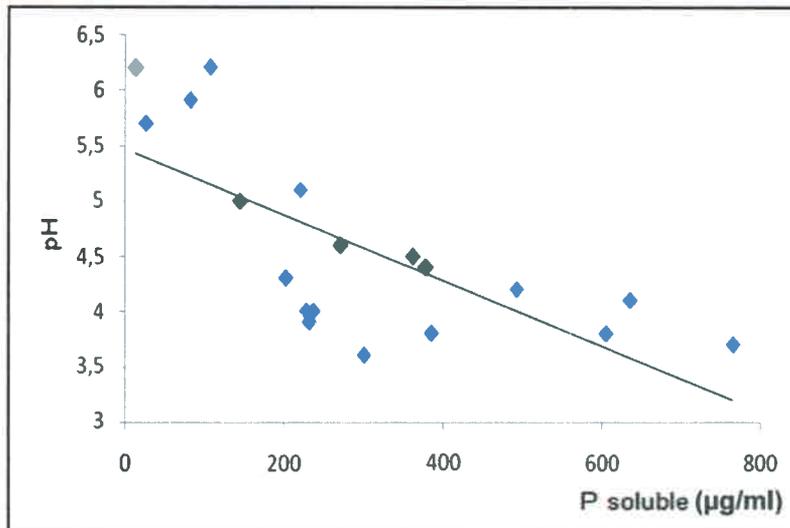
Los resultados indican que existiría correlación positiva entre el diámetro del halo de solubilización de fosfato de los aislamientos, determinado en medio sólido, y las cantidades de P liberado en medio líquido ( $r=0.71$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y *P. fluorescens* en medio líquido NBRIP-BPB y el halo de solubilización de fósforo (mm) producido en medio sólido NBRIP-BPB ( $r=0.71$ ).

Por otra parte, algunos aislamientos que presentaron halos de solubilización de fósforo pequeños mostraron mayor liberación de P soluble en el medio líquido NBRIP-BPB respecto a otros que presentaron halos de mayor tamaño. Resultados contradictorios entre el método de detección del halo en placas y la solubilización de fósforo en medio líquido también han sido informados por otros autores (Gupta y col., 1994; Nautiyal, 1999). Nautiyal (1999) identificó una colección de aislamientos que no producían halos en medio sólido pero que fueron capaces de solubilizar varias fuentes de fósforo inorgánico en medio líquido.

Por otro lado, la solubilización de fósforo tricálcico fue acompañada con un descenso en los valores de pH de los cultivos de todos los aislamientos de 7 hasta 3 (Tabla 4; Figura 12; Figura 14).

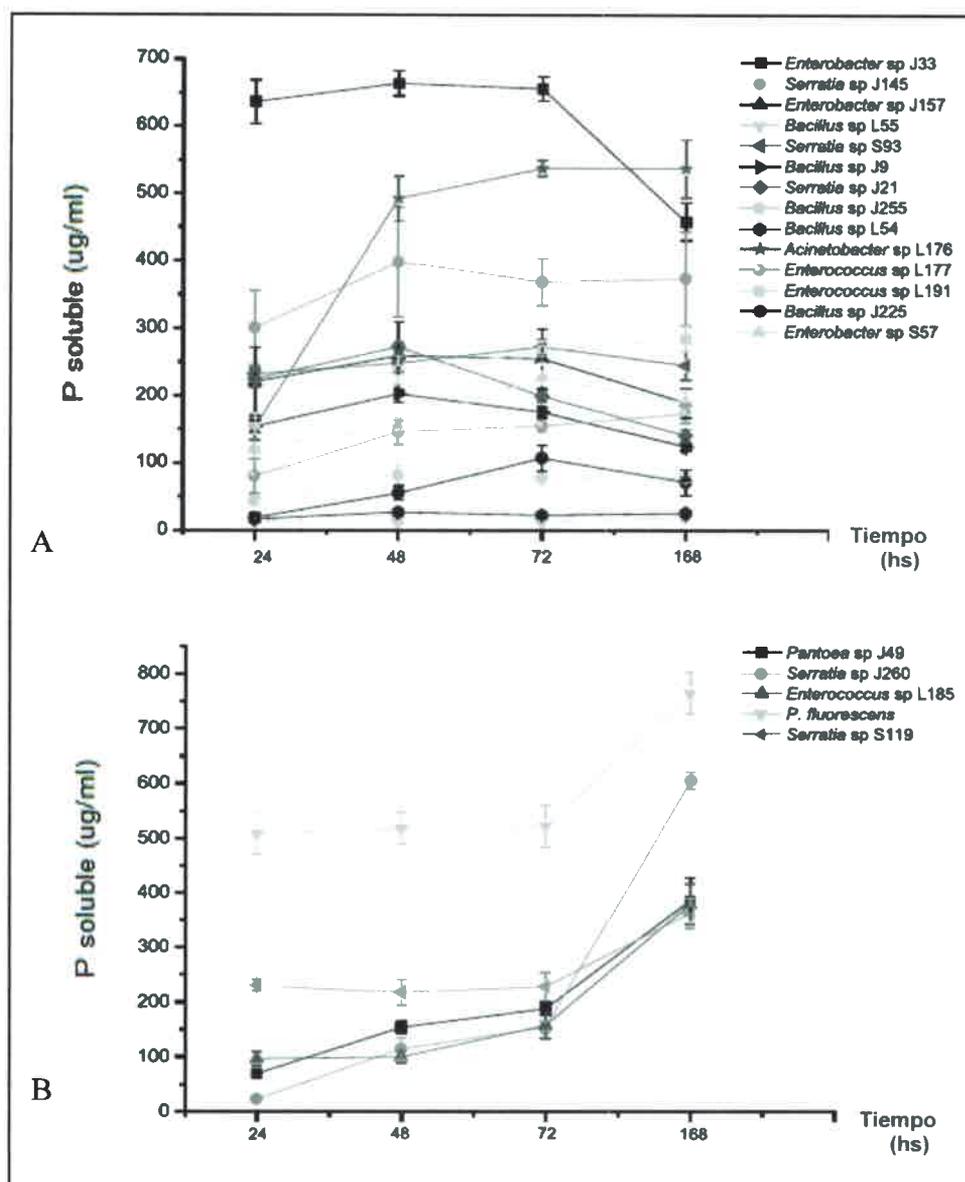


**Figura 14.** Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y *P. fluorescens* en medio líquido NBRIP-BPB y pH del sobrenadante en medio NBRIP-BPB sin buffer ( $r=-0.72$ ).

El análisis de correlación entre el P solubilizado por las bacterias crecidas en medio líquido NBRIP-BPB y los valores de pH del sobrenadante reveló valores negativos ( $r=-0.72$ ). La acidificación del medio de cultivo podría relacionarse con la producción y liberación de ácidos orgánicos, principal mecanismo de mineralización de fosfato insoluble. Este mecanismo concuerda con lo propuesto por otros autores quienes estudiaron la capacidad solubilizadora de fosfato en aislamientos provenientes de suelos de la región sojera argentina (Fernandez y col., 2005) y de suelos no cultivados en Taiwan (Chen y col., 2006) empleando también medio NBRIP-BPB.

Considerando la cinética de solubilización de fosfato, se clasificó a las bacterias en dos grupos, en función del tiempo en el cual los aislamientos liberaban la mayor cantidad de P soluble: a) solubilizadores “tempranos” (a los que liberaban niveles máximos de P soluble durante las primeras 72 horas), y b) solubilizadores “tardíos” (a los que lo hacían a las 168 horas). Más del 70% de las bacterias se ubican en el primer grupo (Figura 15 A, B).

Los aislamientos que liberaron los niveles máximos de P soluble pertenecen tanto a solubilizadores “tempranos” como “tardíos”. No se observó relación entre cinética de solubilización y niveles de P solubilizado al medio; como así tampoco entre estos parámetros y géneros bacterianos a los cuales pertenecen las bacterias analizadas.



**Figura 15.** Niveles de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y *P. fluorescens* en medio líquido NBRIP-BPB en los diferentes tiempos analizados. A: "solubilizadores tempranos" y B: "solubilizadores tardíos". Los datos representan la media  $\pm$  E.S. de 3-6 determinaciones ( $n=5-20$ ).

El análisis del número de células viables (UFC/ml) de los cultivos de las bacterias indicó que la viabilidad de las bacterias analizadas no se vió afectada a lo largo del ensayo; por lo tanto, las bacterias se encontraban metabólicamente activas en las condiciones y puntos analizados (Tabla 5).

**Tabla 5.** Valores máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ), tiempo de incubación, pH y unidades formadoras de colonia (UFC/ml) producidas por los aislamientos nativos asociados a maní y *P. fluorescens*.

Aislamientos	P soluble ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	Tiempo de incubación (hs) <sup>b</sup>	pH <sup>c</sup>	UFC/ml <sup>d</sup>
<i>Bacillus</i> sp. L55	12.9 $\pm$ 1.0 <sup>A</sup>		6.2 $\pm$ 0.1	4.10 <sup>7</sup>
<i>Serratia</i> sp. J145	300.6 $\pm$ 51.4 <sup>CD</sup>		3.6 $\pm$ 0.0	5.10 <sup>8</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. J157	220.6 $\pm$ 50.4 <sup>ABC</sup>	24	5.1 $\pm$ 0.2	4.10 <sup>9</sup>
<i>Serratia</i> sp. S93	232.0 $\pm$ 8.7 <sup>BC</sup>		3.9 $\pm$ 0.1	1.10 <sup>5</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. J33	636.3 $\pm$ 32.8 <sup>FG</sup>		4.1 $\pm$ 0.1	1.10 <sup>9</sup>
<i>Serratia</i> sp. J21	272.1 $\pm$ 6.7 <sup>CD</sup>		4.6 $\pm$ 0.2	4.10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus</i> sp. J255	82 $\pm$ 14.7 <sup>AB</sup>		5.9 $\pm$ 0.2	4.10 <sup>7</sup>
<i>Enterococcus</i> sp. L177	145.4 $\pm$ 17.9 <sup>ABC</sup>		5.0 $\pm$ 0.1	2.10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus</i> sp. J9	202.7 $\pm$ 12.6 <sup>ABC</sup>	48	4.3 $\pm$ 0.1	2.10 <sup>9</sup>
<i>Enterococcus</i> sp. L191	237.1 $\pm$ 20.7 <sup>BC</sup>		4.0 $\pm$ 0.0	7.10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus</i> sp. L54	26.8 $\pm$ 2.5 <sup>A</sup>		5.7 $\pm$ 0.0	1.10 <sup>8</sup>
<i>Acinetobacter</i> sp. L176	492.7 $\pm$ 33.9 <sup>EF</sup>		4.2 $\pm$ 0.1	6.10 <sup>6</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. S57	227.0 $\pm$ 2.3 <sup>BC</sup>	72	4.0 $\pm$ 0.0	7.10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus</i> sp. J225	107.3 $\pm$ 19.1 <sup>ABC</sup>		6.2 $\pm$ 0.2	1.10 <sup>8</sup>
<i>Enterococcus</i> sp. L185	378.9 $\pm$ 36.5 <sup>CDE</sup>		4.4 $\pm$ 0.2	1.10 <sup>8</sup>
<i>Pantoea</i> sp. J49	385.4 $\pm$ 41.4 <sup>DE</sup>		3.8 $\pm$ 0.2	2.10 <sup>8</sup>
<i>Serratia</i> sp. J260	605.2 $\pm$ 15.4 <sup>F</sup>	168	3.8 $\pm$ 0.2	7.10 <sup>8</sup>
<i>Serratia</i> sp. S119	362.0 $\pm$ 27.8 <sup>CDE</sup>		4.5 $\pm$ 0.1	2.10 <sup>7</sup>
<i>P. fluorescens</i>	764.7 $\pm$ 37.4 <sup>G</sup>		3.7 $\pm$ 0.1	2.10 <sup>7</sup>

Los datos representan la media  $\pm$  E.S. de 3-6 determinaciones (n=5-20) (p<0.05). Letras diferentes indican diferencias entre los aislamientos.

<sup>a</sup>: valores máximos de P solubilizado

<sup>b</sup>: tiempo de incubación en el cual liberaron los máximos niveles de P soluble

<sup>c</sup>: valores mínimos de pH alcanzados durante el tiempo de incubación

<sup>d</sup>: unidades formadoras de colonias en el tiempo en que se liberaron los niveles máximos de P soluble

### 2. 3. Análisis de la capacidad solubilizadora de fosfato de las bacterias en medio líquido NBRIP-BPB con soluciones tampón

Considerando la propiedad amortiguadora de pH que poseen los suelos, fue analizada la capacidad solubilizadora de fosfato de las bacterias seleccionadas en presencia de tampón en el medio de cultivo.

Para determinar el efecto de las soluciones amortiguadoras Tris-HCl y MES sobre la capacidad solubilizadora de fosfato de los 18 aislamientos de la colección y de la cepa comercial *P. fluorescens*, se compararon los datos de P solubilizado en estas condiciones con los valores obtenidos en el tiempo de máxima solubilización en medio líquido NBRIP-BPB en ausencia de buffer. El 53% de los aislamientos disminuyó significativamente los niveles de P solubilizado en medio NBRIP-BPB con buffer Tris-HCl (entre 6.5 y 510  $\mu\text{g/ml}$ ) con respecto a los alcanzados en ausencia del buffer (Figura 16A). Sin embargo, y contrariamente a lo esperado, todas las bacterias acidificaron el medio de cultivo, determinándose valores de pH que oscilaron entre 3 y 6.51 (Figura 16B).

Por otro lado, la incorporación de buffer MES al medio de cultivo disminuyó significativamente la capacidad de solubilización de P de todas las bacterias, determinándose valores de P soluble que variaron entre 3 y 74.5  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, y a diferencia de lo observado con buffer Tris-HCl, el pH del medio de cultivo no varió notablemente (5.74-8.06) respecto al inicial, manteniéndose en valores superiores a los obtenidos en medios sin buffer (Figura 16).

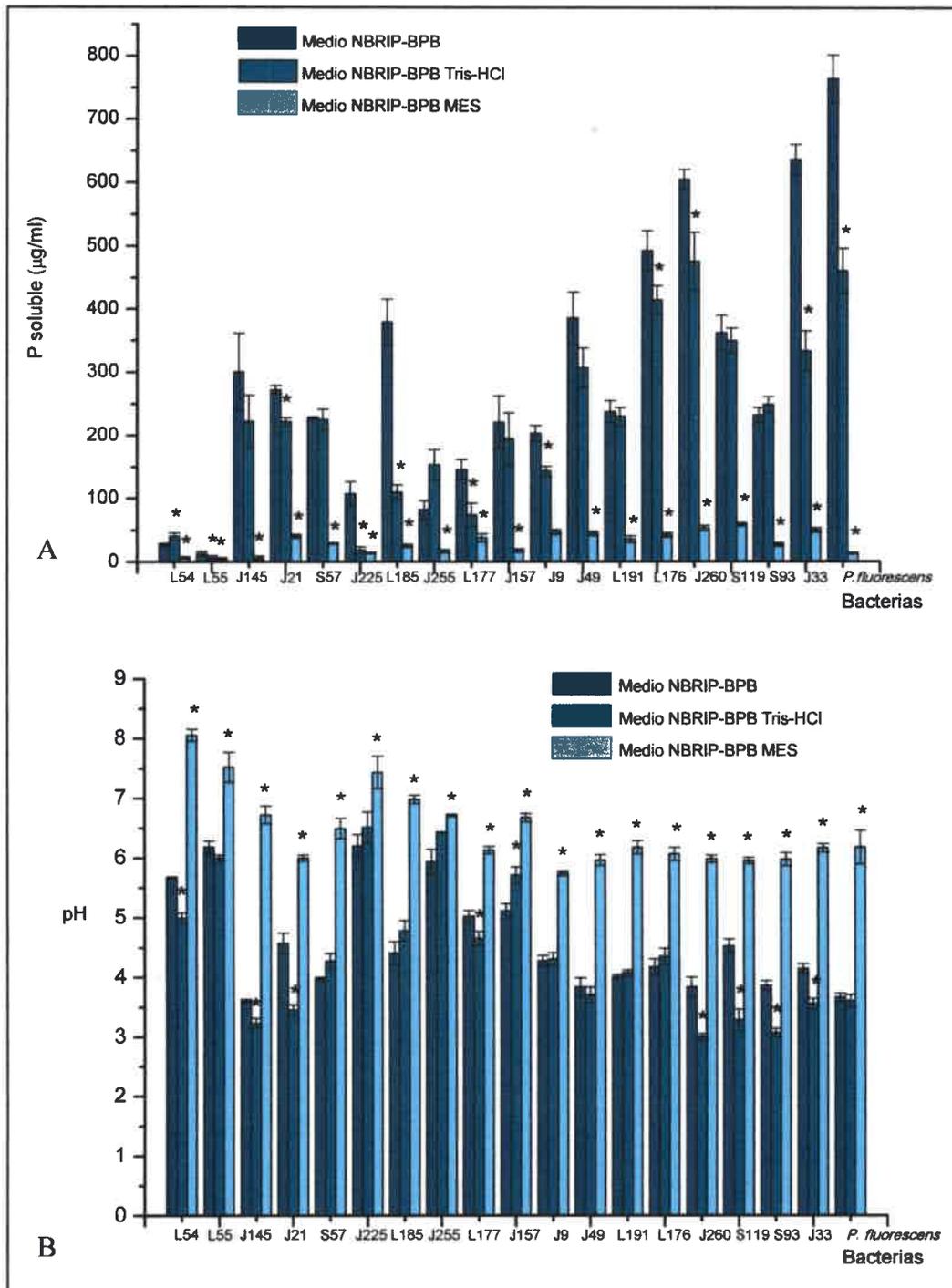
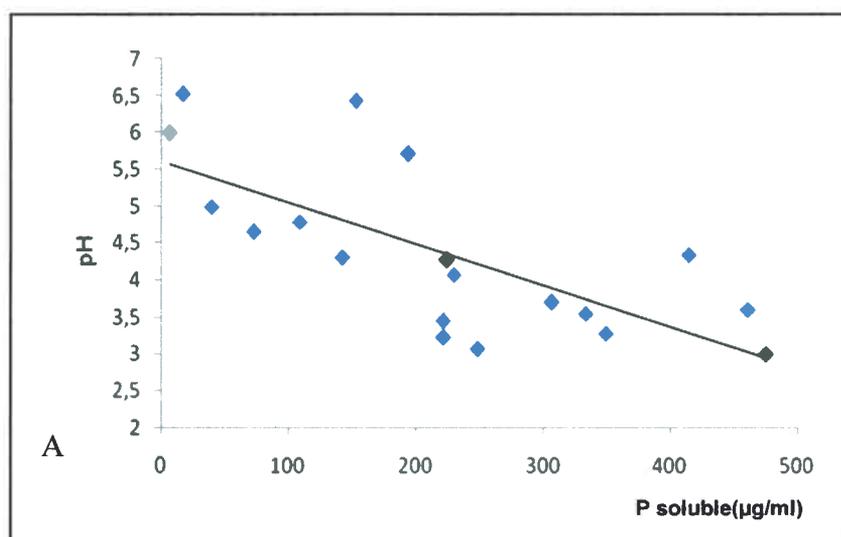


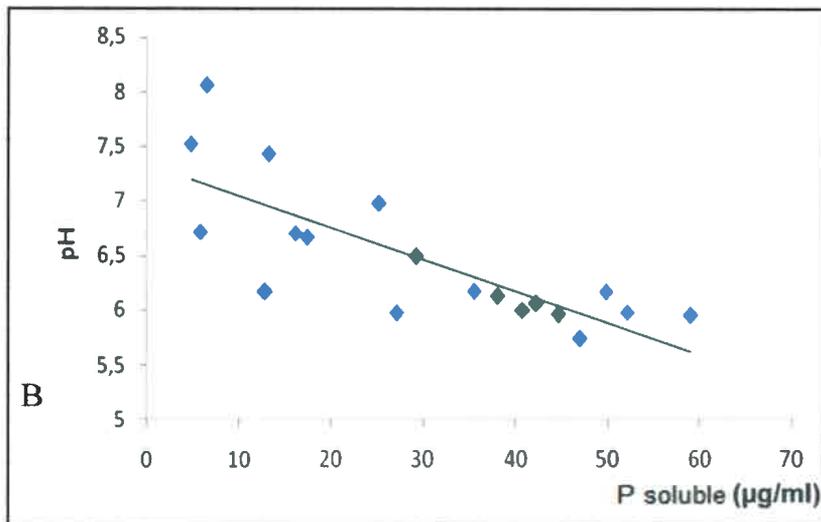
Figura 16. Niveles máximos de P soluble (µg/ml) (A) y valores de pH (B) en los medios de cultivo de los aislamientos nativos asociados a maní y *P. fluorescens* en medio NBRIP-BPB sin solución amortiguadora (barras azules), con buffer Tris-HCl (barras verdes) y MES (barras celestes). Los datos representan la media ± E.S. de 3-6 determinaciones (n=5-20) (p<0.05). \* indica diferencia significativa entre los valores de P solubilizado o valores de pH en el medio con soluciones tampón respecto al medio sin buffer.

Una reducción de la capacidad de solubilización de fosfato de bacterias rizosféricas en presencia de buffer Tris-HCl y disminución del pH del sobrenadante también fue observada por Joseph y Jisha (2009). Por su parte, Gyaneshwar y col. (1998) informaron que bacterias creciendo en presencia de buffer Tris-HCl mostraron disminución en la capacidad solubilizadora de fosfato. Por otro lado, Fernandez y col. (2005) reportaron que aunque en presencia de este buffer los valores de pH no se modificaron, la capacidad solubilizadora de fosfato en bacterias aisladas de rizósfera de soja disminuyó.

La reducción de los niveles de P solubilizado por las bacterias en el medio suplementado con buffer MES, también fue informada por Espinosa-Victoria y col. (2009) para cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizósfera y rizoplano de maíz (*Zea mays* L.) creciendo en medio sólido.

Los análisis de correlación entre el P solubilizado por las bacterias en las tres condiciones analizadas (medio líquido NBRIP-BPB sin buffer, con el agregado de buffer Tris-HCl o MES) y valores de pH del sobrenadante indicaron una correlación negativa ( $r=-0,72$ ,  $r=-0,71$  y  $r=-0,78$ , respectivamente) (Figuras 14 y 17). Estos resultados indican que a medida que aumentan los niveles de P soluble los valores de pH disminuyen.





**Figura 17.** Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y *P. fluorescens* en medio líquido NBRIP-BPB y pH del sobrenadante en (A) medio NBRIP-BPB suplementado con Tris-HCl ( $r=-0,71$ ) y (B) suplementado con MES ( $r=-0,78$ ).

La relación entre la cantidad de P solubilizado y la disminución de los valores de pH podría vincularse con la liberación de ácidos orgánicos al medio de cultivo de los aislamientos. Se ha informado que la solubilización de fosfato mineral puede estar acompañada por un descenso en los valores de pH (Hwangbo y col., 2003; Tripura y col., 2007).

Los aislamientos cuya elevada capacidad solubilizadora no se vió significativamente disminuida en presencia de buffer Tris HCl (*Serratia* sp. J145, *Pantoea* sp. J49, *Enterococcus* sp. L191, *Serratia* sp. S119 y *Serratia* sp. S93) podrían ser considerados como los más eficientes solubilizadores y los más apropiados para ser aplicados en ensayos en plantas.

La determinación del número de células viables (UFC/ml), indicó que la adición de buffer Tris-HCl o MES al medio de cultivo no afectó la viabilidad de los aislamientos, la que se mantuvo en valores similares a los obtenidos en medio NBRIP-BPB sin buffer.

### 3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO SECRETADO POR LAS BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

Considerando que la producción de ácido glucónico es el mecanismo más eficiente en la solubilización de fosfatos inorgánicos y el observado con mayor frecuencia en bacterias, se determinó la producción y concentración de este ácido en el tiempo al cual se registraron los niveles máximos de solubilización de P en medio líquido NBRIP-BPB. Las cantidades de ácido glucónico liberadas al sobrenadante del cultivo bacteriano oscilaron entre 40 y 1200 µg/ml (Tabla 6).

**Tabla 6.** Producción de ácido glucónico y niveles máximos de fósforo solubilizado en medio NBRIP-BPB por los aislamientos nativos asociados a maní y *P. fluorescens*.

Aislamientos	Acido glucónico (µg/ml)	P soluble (µg/ml) <sup>a</sup>
<i>Serratia</i> sp. J21	263.5±19.0 <sup>ABC</sup>	272.1±6.7 <sup>CD</sup>
<i>Serratia</i> sp. J145	146.9±27.3 <sup>AB</sup>	300.6±51.4 <sup>CD</sup>
<i>Serratia</i> sp. J260	253.0±7.9 <sup>ABC</sup>	605.2±15.4 <sup>F</sup>
<i>Serratia</i> sp. S93	964.5±80.3 <sup>D</sup>	232.0±8.7 <sup>BC</sup>
<i>Serratia</i> sp. S119	304.3±55.0 <sup>ABC</sup>	362.0±27.8 <sup>CDE</sup>
<i>Pantoea</i> sp. J49	1213.6±27.7 <sup>D</sup>	385.4±41.4 <sup>DE</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. J157	1077.8±50.5 <sup>D</sup>	220.6±50.4 <sup>ABC</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. J33	240.9±50.4 <sup>ABC</sup>	636.3±32.8 <sup>FG</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. S57	376.8±107.3 <sup>BC</sup>	227.0±2.3 <sup>BC</sup>
<i>Acinetobacter</i> sp. L176	1181.0±51.2 <sup>D</sup>	492.7±33.9 <sup>EF</sup>
<i>Bacillus</i> sp. J9	556.1±47.9 <sup>C</sup>	202.7±12.6 <sup>ABC</sup>
<i>Bacillus</i> sp. J225	82.6±50.9 <sup>AB</sup>	107.3±19.1 <sup>ABC</sup>
<i>Bacillus</i> sp. J255	280.3±107.1 <sup>ABC</sup>	82±14.7 <sup>AB</sup>
<i>Bacillus</i> sp. L54	ND	26.8±2.5 <sup>A</sup>
<i>Bacillus</i> sp. L55	90.9±15.1 <sup>AB</sup>	12.9±1.0 <sup>A</sup>
<i>Enterococcus</i> sp. L177	ND	145.4±17.9 <sup>ABC</sup>
<i>Enterococcus</i> sp. L185	383.4±170.0 <sup>BC</sup>	378.9±36.5 <sup>CDE</sup>
<i>Enterococcus</i> sp. L191	41.1±6.3 <sup>AB</sup>	237.1±20.7 <sup>BC</sup>
<i>P. fluorescens</i>	244.9±71.1 <sup>ABC</sup>	764.7±37.4 <sup>G</sup>

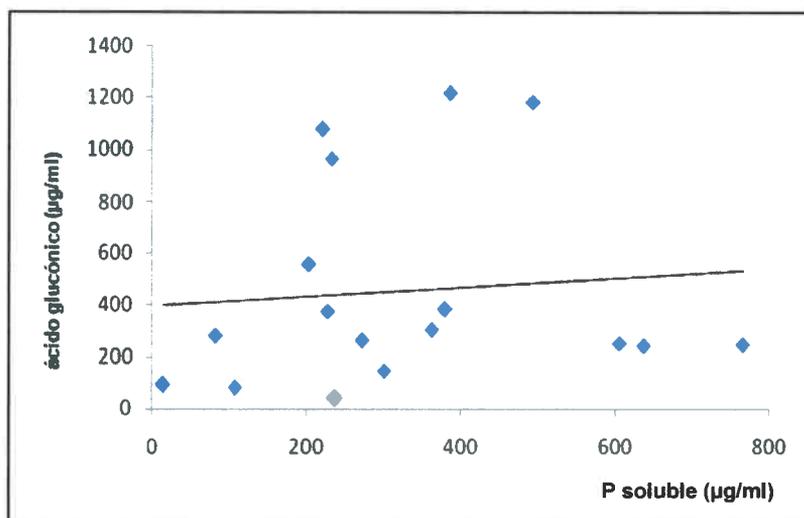
<sup>a</sup>: niveles máximos de fósforo solubilizado por los aislamientos en medio NBRIP-BPB; ND: no detectable. Los datos representan la media ± E.S. de 2-6 determinaciones (n=3-20) (p<0.05). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa entre los aislamientos

Los aislamientos que produjeron los niveles más elevados de este ácido fueron *Pantoea* sp. J49 ( $1213.6 \pm 27.7 \mu\text{g/ml}$ ), *Acinetobacter* sp. L176 ( $1181.8 \pm 51.2 \mu\text{g/ml}$ ) y *Enterobacter* sp. J157 ( $1077.8 \pm 50.5 \mu\text{g/ml}$ ), todas bacterias Gram negativas que pertenecen tanto al grupo de solubilizadoras “tempranas” como “tardías”. Bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecientes a estos géneros han sido reportadas por otros autores como importantes productoras de ácido glucónico (Chen y col., 2006; Kuldeep y col., 2010). Los menores valores de ácido glucónico ( $< 100 \mu\text{g/ml}$ ) fueron producidos por las bacterias Gram positivas *Enterococcus* sp. L191, *Bacillus* sp. J225, y *Bacillus* sp. L55. En los aislamientos *Enterococcus* sp. L177 y *Bacillus* sp. L54 no se detectó la producción del mencionado ácido. Se ha reportado que la producción de ácido glucónico en bacterias Gram positivas es menos frecuente (Puente y col., 2009) y que cepas de *Bacillus* producen principalmente mezclas de ácido láctico, isovalérico, isobutírico y acético (Rodríguez y Fraga, 1999). Resulta por lo tanto de gran interés indagar acerca del metabolismo de este grupo de bacterias en presencia de fuentes fosforadas insolubles.

El análisis entre niveles de fósforo soluble y cantidad de ácido glucónico indica que no existiría correlación entre estos parámetros en las condiciones analizadas en este estudio ( $r=0.09$ ) (Figura 18). Así, por ejemplo, la cepa de referencia *P. fluorescens* que presentó el valor más elevado de P soluble liberado al medio produjo niveles intermedios de ácido glucónico. Investigaciones realizadas por otros autores indican que no han encontrado una correlación entre la cantidad de P solubilizado y la concentración de un ácido orgánico particular, por lo que existen dudas razonables sobre si los ácidos orgánicos son, en estos casos, los únicos responsables de la solubilización de fosfato (Illmer y Schneider, 1995). A su vez, se ha reportado que en el proceso de solubilización, el tipo de ácido secretado por el microorganismo es más importante que la cantidad (Halder y col., 1990; Gyaneshwar y col., 1998).

Por otro lado, si se consideran además los valores de pH del medio, se observa que los sobrenadantes de los cultivos de aquellas bacterias que produjeron niveles bajos de ácido glucónico y de P soluble; presentaron valores de pH que se mantuvieron cercano al inicial (pH 7). Por el contrario, el sobrenadante se acidificó en cultivos de algunas bacterias que solubiliaron cantidades significativas de P, pero produjeron niveles bajos de ácido glucónico, lo cual sugiere que en estos casos el proceso de solubilización estaría mediado

por la producción de otros ácidos orgánicos o por algún otro mecanismo que provoque descenso en los niveles de pH del medio de cultivo.



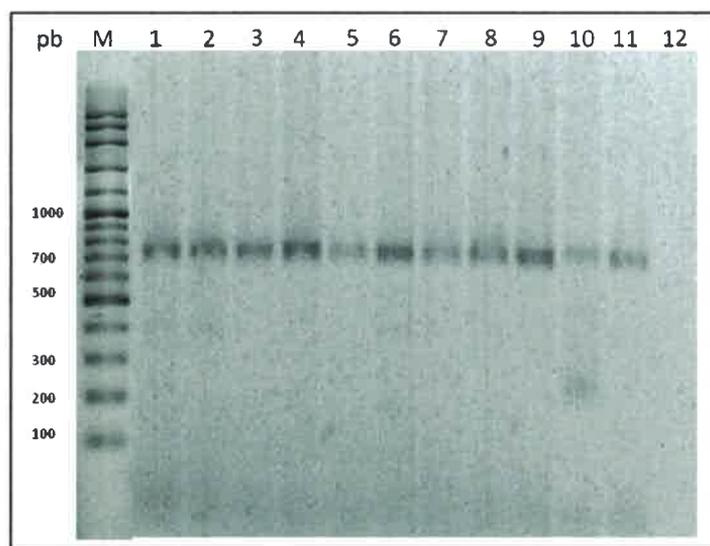
**Figura 18.** Correlación entre los niveles máximos de fósforo solubilizado ( $\mu\text{g/ml}$ ) por los aislamientos nativos asociados a plantas de maní y *P. fluorescens* y valores de ácido glucónico ( $\mu\text{g/ml}$ ) liberado al sobrenadante en medio líquido NBRIP-BPB ( $r=0.09$ ).

Considerando que la solubilización de fosfato y producción de ácido glucónico por los microorganismos están influenciados por las fuentes de carbono disponibles en el suelo, a la cual contribuyen los exudados vegetales, resulta interesante profundizar el análisis de este mecanismo en la interacción planta-microorganismo y en el sistema suelo. Se ha encontrado que la planta de maní libera en sus exudados azúcares tales como glucosa, fructosa y sacarosa, junto a los flavonoides y a una gran variedad de ácidos grasos, y que cuando la planta es inoculada con rizobios libera además de los azúcares mencionados, trehalosa (Fumero y col., 2010). Sería entonces de interés realizar ensayos tendientes a indagar más acerca de la propiedad solubilizadora de fosfato en el sistema suelo y en la interacción con la planta.

#### 4. DETECCIÓN DEL GEN *pqqE* EN LOS AISLAMIENTOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO DE LA COLECCIÓN

En este trabajo, la presencia del gen *pqqE* se evaluó con el fin de establecer una posible relación entre este gen en el genoma de las bacterias seleccionadas con la capacidad de producir ácido glucónico.

El análisis de los productos de amplificación obtenidos de la PCR-*pqqE* indicó que en aquellos moldes de ADN provenientes de todas las bacterias Gram negativas de la colección y *P. fluorescens* se observó la banda de interés correspondiente al fragmento de 700 pb del gen *pqqE* (Figura 19). Estas bacterias pertenecen a géneros diversos, tales como *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Si bien en la mayoría de las bacterias Gram positivas de la colección se observó producción de ácido glucónico, la ausencia del producto de amplificación sugiere que dicho ácido sería producido por otra vía oxidativa que no requiere del cofactor PQQ. Otra alternativa es que los cebadores empleados en el este estudio presenten divergencia en la región de apareamiento del gen *pqqE* en estas bacterias, por lo que no fue posible obtener el producto de amplificación esperado.



**Figura 19.** Producto de amplificación de PCR correspondiente al fragmento del gen *pqqE* (700 pb) de los aislamientos nativos solubilizadores de fosfato Gram negativos asociados a plantas de maní y *P. fluorescens*. Calles: M: Marcador de peso molecular 100 pb (productos-PBL); calles 1-11: aislamientos: *Serratia* sp. J145, *Enterobacter* sp. J157, *Serratia* sp. S93, *Enterobacter* sp. J33, *Serratia* sp. J21, *Acinetobacter* sp. L176, *Enterobacter* sp. S57, *Pantoea* sp. J49, *Serratia* sp. J260, *Serratia* sp. S119, *P. fluorescens*, 12: control negativo.

Otros autores han amplificado fragmentos de los genes *pqq*. Así, Pérez y col. (2007) obtuvieron el producto de amplificación esperado correspondiente al gen *pqqE* en bacterias pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Serratia* y *Ralstonia*. Por otro lado, Meyer y col. (2011) obtuvieron producto de amplificación, de un fragmento de aproximadamente 500 pb, correspondiente al gen *pqqC*, en *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato.

---

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN EN  
PLANTAS DE MANÍ DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS  
DE FOSFATO Y DE SU SUPERVIVENCIA EN ENSAYOS EN  
MICROCOSMO

La relación entre las bacterias solubilizadoras de fósforo y las plantas es sinérgica en la naturaleza; así, las bacterias proporcionan P soluble y las plantas suministran compuestos carbonados (principalmente azúcares), que pueden ser metabolizados para el crecimiento bacteriano (Pérez y col., 2007). El estadio fenológico, la especie y los exudados radiculares de las plantas tienen influencia sobre las comunidades microbianas (Neumann y Romheld, 2000; de Weert y col., 2002; Herschkovitz y col., 2005a y b). A su vez, los microorganismos tienen la capacidad de responder diferente dependiendo de las condiciones a las que son expuestos. Así, la expresión de una característica en particular, como la capacidad de solubilizar fósforo por bacterias cuando éstas se encuentran en el ecosistema suelo, depende de su interacción con la planta huésped, con otros microorganismos presentes en la rizósfera y con factores ambientales (Dey y col., 2004).

Los ensayos en microcosmo realizados en esta tesis permitieron establecer, acercándonos al sistema natural, si la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico observada *in vitro* por las 18 bacterias solubilizadoras seleccionadas y la cepa comercial *P. fluorescens* se traduce en un mayor crecimiento de las plantas y/o incremento en los niveles de P en el suelo, propiedades deseadas en bacterias para su selección como potenciales P-bioinoculantes. Cabe destacar que dichas bacterias provienen del área manisera de la provincia de Córdoba y, que el uso de cepas nativas es un aspecto importante cuando se pretende introducir bacterias al suelo debido a su superior adaptabilidad al medio ambiente respecto a cepas introducidas (Ramachandran y col., 2007). De este modo es posible seleccionar cepas solubilizadoras de fósforo mejor adaptadas a las condiciones edafocológicas de la región para contribuir a paliar los problemas mencionados.

El efecto de la inoculación de las bacterias seleccionadas sobre el desarrollo de las plantas de maní se midió al momento de la cosecha (120 días-estadio reproductivo R3) y se analizaron diversos parámetros de crecimiento de plantas. El contenido de P tanto en la parte aérea de las plantas como en el soporte al finalizar el ensayo se determinó en aquellos tratamientos que mostraron un efecto benéfico significativo en la mayoría de los parámetros de crecimiento evaluados.

## 1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE MANÍ

### 1.1. Longitud aérea (LA) y radical (LR)

De las 18 bacterias inoculadas, 15 (aproximadamente el 83%) incrementaron de manera significativa la longitud de al menos uno de estos dos parámetros en las plantas de maní. Aquellas inoculadas con 12 de estas bacterias incrementaron de manera significativa la longitud aérea y 9 la longitud radical respecto al control sin inocular y sin fertilizar (C-) (Tabla 7). Se observó que plantas inoculadas con 6 bacterias (*Serratia* sp. J145, *Serratia* sp. J260, *Pantoea* sp. J49, *Acinetobacter* sp. L176, *Bacillus* sp. J9 y *Bacillus* sp. J225) incrementaron ambos parámetros respecto al C-. Por otro lado, las bacterias *Serratia* sp. J21 y *Bacillus* sp. J9 promovieron la longitud aérea, y *Pantoea* sp. J49 la longitud radical, superando los valores obtenidos en plantas fertilizadas con P (C+).

El hecho de que plantas inoculadas con algunas de las bacterias seleccionadas promuevan el crecimiento radical es beneficioso ya que, la adquisición de nutrientes del suelo está gobernada por el crecimiento radical y su interacción con los componentes bióticos y abióticos del suelo. La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal constituye una alternativa que permite incrementar el crecimiento radical. Con ello se favorece la exploración del suelo y se mejora la accesibilidad al agua y nutrientes limitantes para los cultivos. Como consecuencia, se reducen procesos de pérdida de nutrientes móviles, se atenúan períodos de moderado estrés hídrico y se logra mantener tasas de crecimiento activo del cultivo mejorando su capacidad fotosintética (Díaz-Zorita y Fernández, 2008).

### 1.2. Biomasa aérea y radical

#### 1.2.1. Peso fresco aéreo (PFA) y radical (PFR)

La inoculación con 15 de las 18 bacterias analizadas produjo un incremento significativo del peso fresco aéreo total con respecto al C-. En las plantas inoculadas con la bacteria *Bacillus* sp. J9 dicho parámetro también presentó diferencia significativa respecto al C+ (Tabla 7).

La inoculación con las 15 bacterias incrementó significativamente el peso fresco del tallo respecto al C-, y las plantas tratadas con 2 de ellas (*Bacillus* sp. J9 y *Bacillus* sp. L55) mostraron también diferencia respecto al C+. Por otra parte, solamente 5 tratamientos aumentaron de manera significativa el peso fresco de hojas respecto al C- y, en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. J9 también se observó diferencia significativa respecto al C+. Por otro lado, el peso fresco radical de las plantas inoculadas con *Serratia* sp. J260 y *Bacillus* sp. J9 mostró un incremento significativo respecto a ambos controles (Tabla 7).

Las plantas que presentaron un aumento significativo en el peso fresco aéreo y/o radical también incrementaron la longitud aérea y radical, respectivamente.

### 1.2.2. Peso seco aéreo (PSA) y radical (PSR)

La biomasa seca de al menos uno de los órganos de las plantas se incrementó en aquellas inoculadas con 13 de las bacterias seleccionadas (aproximadamente el 72%). De los tratamientos realizados 10 incrementaron la biomasa aérea respecto al C-. En las plantas inoculadas con el aislamiento *Bacillus* sp. J9 también se encontró diferencia respecto al C+ (Tabla 7).

La inoculación con 7 de las bacterias seleccionadas (*Serratia* sp. J145, *Serratia* sp. J260, *Enterobacter* sp. J33, *Acinetobacter* sp. L176, *Bacillus* sp. J9, *Bacillus* sp. L55 y *Enterococcus* sp. L185) incrementó significativamente tanto el peso seco de tallo como de hojas respecto al C-. Por otro lado, 4 bacterias aumentaron el peso seco de sólo uno de los órganos aéreos evaluados. La inoculación con la bacteria *Pantoea* sp. J49 produjo un incremento significativo en el peso seco de tallo respecto al C-, mientras que las plantas inoculadas con las bacterias *Serratia* sp. S93, *Enterococcus* sp. L177 y *Enterococcus* sp. L191 presentaron incremento en el peso seco de hojas. Además, los resultados indican que la inoculación con *Bacillus* sp. J9 produjo un aumento significativo en el peso seco de ambos órganos aéreos con respecto al C+.

En lo que respecta al peso seco radical, la inoculación con 6 de las bacterias incrementó de manera significativa dicho parámetro de crecimiento vegetal respecto al C- (Tabla 7). Cuatro de esos 6 tratamientos (inoculados con *Serratia* sp. J260, *Pantoea* sp. J49, *Enterobacter* sp. J33 y *Bacillus* sp. L55) produjeron en las plantas un incremento significativo respecto al C+ así como un aumento de la biomasa seca aérea.

En la mayoría de las plantas inoculadas, el incremento de la biomasa seca se correlacionó con el aumento del peso seco aéreo, siendo las hojas el órgano más influenciado.

Por otro lado, y al igual que lo observado en los valores de biomasa fresca, aquellos tratamientos en los cuales el peso seco aéreo y/o radical se vio incrementado con respecto al C+, también presentaron un incremento en la longitud aérea y radical.

### 1.3. Relación peso seco aéreo/peso seco radical (PSA/PSR)

La relación PSA/PSR es una variable usada comúnmente para la evaluación del crecimiento de las plantas y brinda información acerca del balance hídrico en las mismas (Bernier y col., 1995). El mantenimiento de una relación PSA/PSR cercana al valor alcanzado cuando la planta crece en condiciones óptimas, es indicativo de su estado fisiológico. Las plantas inoculadas con los aislamientos analizados no presentaron diferencia respecto al control positivo, lo que indica un crecimiento equilibrado (Tabla 7).

### 1.4. Número de cajas

Al momento de la cosecha (120 días) se observó la presencia de cajas en todas las plantas de maní (Tabla 7). Sin embargo, sólo fue posible observar un incremento significativo en el número de cajas en las plantas inoculadas con la bacteria *Enterococcus* sp. L185 respecto al C-. Considerando que las plantas fueron analizadas en la etapa de floración, en la cual comienzan a formarse las primeras cajas, la ausencia de diferencias en este parámetro respecto a las plantas control, podría deberse a que aún no se formaron el número total de cajas.

### 1.5. Peso seco y número de nódulos

A los 120 días post-inoculación todas las plantas de maní presentaban nódulos radicales (Tabla 7) cuya formación fue inducida por la población rizobiana nativa del suelo. El análisis de número y peso seco de nódulos de las plantas de los diferentes tratamientos respecto al C- demostró que en las plantas inoculadas con 7 bacterias (*Serratia* sp. J260, *Serratia* sp. S93, *Pantoea* sp. J49, *Enterobacter* sp. J33, *Enterobacter* sp. S57, *Acinetobacter* sp. L176, y *Enterococcus* sp. L191) y el C+ se incrementó de manera significativa el número de nódulos formados. En 5 de estos tratamientos (plantas inoculadas con *Serratia* sp. J260, *Serratia* sp. S93, *Enterobacter* sp. J33, *Enterobacter* sp. S57,

*Acinetobacter* sp. L176) y en el C+, el peso seco de los nódulos también mostró valores significativamente mayores al C-.

Debido a que en la interacción leguminosas-rizobios, el P es el principal factor nutricional que limita la fijación biológica del nitrógeno (FBN), es posible inferir que el aumento en el número y peso seco de los nódulos, observado en algunos tratamientos, podría deberse a un mayor aporte de P por las bacterias inoculadas. Valverde y col. (2002) reportaron que en plantas actinorrhizas la producción de biomasa seca nodular es estimulada debido al aporte de P. Por otra parte, Dey y col. (2004) informaron que el incremento en el número de nódulos en las plantas inoculadas con PGPB podría atribuirse a un aumento en la longitud y crecimiento de la raíz, ya que así, se dispondría de un número mayor de sitios activos y acceso a la nodulación por rizobios del suelo. Sin embargo, en este estudio la longitud radical no mostró una correlación directa con este parámetro simbiótico ( $r=0.08$ ). Por otro lado, se observó una correlación positiva entre los parámetros número de nódulos y peso seco de los mismos ( $r=0.89$ ).

A partir de este ensayo se concluye que la inoculación de maní con todas las bacterias de la colección produjo incremento en al menos uno de los parámetros de crecimiento vegetal analizados respecto al C-. No fue posible establecer una relación entre efectos de la inoculación con las bacterias seleccionadas y su origen o clasificación taxonómica. En las plantas inoculadas con la cepa comercial *P. fluorescens* no se observó efecto benéfico en los parámetros de crecimiento vegetal evaluados, en coincidencia con lo informado por Fernández y col. (2007) en plantas de soja inoculadas con la misma cepa comercial.

La inoculación con más del 50% de las 18 bacterias solubilizadoras de fosfato (*Serratia* sp. J145, *Serratia* sp. J260, *Serratia* sp. S93, *Pantoea* sp. J49, *Enterobacter* sp. J33, *Enterobacter* sp. S57, *Acinetobacter* sp. L176, *Bacillus* sp. J9, *Bacillus* sp. L55, *Enterococcus* sp. L185 y *Enterococcus* sp. L191) produjo un incremento en la mayoría de los parámetros de crecimiento vegetal evaluados con respecto al C-. La inoculación con 5 de ellas (*Serratia* sp. J260, *Pantoea* sp. J49, *Enterobacter* sp. J33, *Bacillus* sp. J9 y *Bacillus* sp. L55) produjo incrementos superiores a los obtenidos en el C+.

Las bacterias inoculadas fueron seleccionadas por su capacidad de solubilizar fosfato inorgánico *in vitro*. Para poder correlacionar esta propiedad con el efecto benéfico

observado en el crecimiento de las plantas de maní inoculadas, se determinó el contenido de P soluble en los tejidos vegetales aéreos (tallos y hojas) y en el suelo empleado como soporte. Para este análisis fueron seleccionadas 8 de las bacterias por ser consideradas “altamente eficientes”. El criterio empleado para la selección fue el efecto de su inoculación en la promoción del crecimiento vegetal y las mismas fueron *Serratia* sp. J260, *Pantoea* sp. J49, *Enterobacter* sp. J33, *Acinetobacter* sp. L176, *Bacillus* sp. J9, *Bacillus* sp. L55, *Enterococcus* sp. L185 y *Enterococcus* sp. L191.

**Tabla 7.** Longitud aérea y radical, peso fresco y seco de tallos, hojas, aéreo total y raíz, relación peso seco aéreo/peso seco radical (PSA/PSR), número de cajas y número y peso seco de nódulos de plantas de maní inoculadas con los aislamientos solubilizadores de fosfato y la cepa *P. fluorescens* a los 120 días postinoculación.

Tratamiento	Longitud aérea (cm)	Longitud radical (cm)	Peso fresco (g/planta)				Peso seco (g/planta)				PSA/PSR <sup>b</sup>	Número de cajas	Nódulos	
			Tallo	Hojas	Aéreo total (tallo + hojas)	Raíz	Tallo	Hojas	Aéreo total (tallo + hojas)	Raíz			número	peso seco (mg)
<i>Serratia sp.</i> J21	54.9±2.6**	14.7±1.0	6.3±0.8*	6.4±1.5*	11.5±2.4*	0.59±0.11	0.92±0.15	1.11±0.17	1.98±0.43	0.20±0.02	9.54±1.41	3.2±0.4	1.3±0.2	6.0±1.0
<i>Serratia sp.</i> J145	38.0±3.2*	20.7±1.5*	5.0±0.5*	2.6±0.4	6.9±0.7*	0.75±0.10	1.65±0.13*	1.26±0.14*	2.88±0.19*	0.30±0.04	10.91±2.23	2.7±1.0	2.7±0.5	15.0±2.0
<i>Serratia sp.</i> J260	40.4±1.4*	19.2±1.2*	7.0±0.9*	4.5±1.3	10.7±2.3*	1.31±0.15**	1.94±0.33*	1.47±0.16*	3.38±0.51*	0.51±0.05**	7.00±0.67	1.5±0.3	10.5±0.5*	70.0±6.0*
<i>Serratia sp.</i> S93	46.8±3.1*	12.7±0.7	5.2±0.5*	3.9±0.7	10.1±1.1*	0.88±0.07	1.15±0.15	1.26±0.13*	2.28±0.30	0.26±0.05	10.80±2.22	2.5±0.6	8.0±0.9*	51.0±10.0*
<i>Serratia sp.</i> S119	32.1±1.9	19.7±1.7*	2.8±0.2	2.3±0.4	5.1±0.3	0.53±0.05	0.78±0.04	0.69±0.08	1.44±0.11	0.26±0.03	6.83±1.43	2.2±0.4	2.2±0.5	12.0±3.0
<i>Pantoea sp.</i> J49	46.8±1.8*	23.4±1.8**	4.2±0.2*	3.3±0.2	7.3±0.3*	0.66±0.07	1.64±0.10*	0.88±0.05	2.44±0.14*	0.42±0.02**	7.29±1.44	2.6±0.4	5.2±1.0*	33.0±7.0
<i>Enterobacter sp.</i> J157	31.4±2.1	18.3±0.9*	5.7±0.4*	3.1±0.7	10.1±1.4*	0.62±0.07	0.97±0.14	0.82±0.10	2.00±0.23	0.27±0.02	7.03±0.45	3.0±0.4	1.4±0.2	15.0±6.0
<i>Enterobacter sp.</i> J33	36.6±1.6	17.6±1.4*	4.9±0.4*	3.9±0.6	8.0±0.9*	0.56±0.10	1.65±0.06*	1.36±0.19*	3.06±0.25*	0.41±0.05**	7.92±1.16	2.0±0.6	7.2±0.2*	47.0±7.0*
<i>Enterobacter sp.</i> S57	47.5±2.1*	15.5±0.8	6.4±0.5*	5.6±0.8*	11.7±0.6*	0.82±0.06	1.44±0.12	1.03±0.11	2.20±0.30	0.25±0.02	8.49±0.35	2.8±0.4	12.0±2.1*	166.0±78*
<i>Acinetobacter sp.</i> L176	41.2±0.4*	17.6±0.6*	5.1±0.7*	3.4±0.6	7.6±1.0*	0.82±0.06	1.69±0.16*	1.42±0.27*	2.66±0.46*	0.25±0.02	9.20±2.40	1.7±0.33	10.7±1.7*	68.0±17.0*
<i>Bacillus sp.</i> J9	54.6±4.0**	17.5±0.9*	10.3±1.1**	9.9±1.3**	18.7±2.5**	1.22±0.11**	2.24±0.32**	1.92±0.21**	4.66±0.63**	0.23±0.03	23.00±3.94*	4.0±0.6	1.5±0.3	7.0±3.0
<i>Bacillus sp.</i> J225	39.8±3.7*	18.7±1.8*	3.3±0.4	2.1±0.2	5.4±0.5	0.53±0.04	1.22±0.13	1.03±0.14	2.10±0.27	0.28±0.03	8.18±1.29	2.0±0.6	2.6±0.7	14.0±4.0
<i>Bacillus sp.</i> J255	34.5±1.3	14.1±0.8	3.8±0.2*	3.0±0.5	7.2±0.6*	0.85±0.10	1.32±0.14	1.06±0.13	2.40±0.16	0.39±0.05*	5.88±0.74	1.2±0.2	3.7±0.7	32.0±9.0
<i>Bacillus sp.</i> L54	33.7±2.6	16.0±1.0	4.4±0.5*	4.2±1.1	8.6±0.8*	0.89±0.11	1.16±0.26	0.82±0.11	1.98±0.32	0.32±0.04*	6.64±0.88	1.7±0.2	1.8±0.4	10.0±2.0
<i>Bacillus sp.</i> L55	41.1±1.7*	13.7±1.0	7.4±0.7**	6.3±1.1*	11.9±1.9*	0.68±0.13	1.97±0.38*	1.48±0.24*	3.84±0.58*	0.43±0.07**	9.69±1.84	1.2±0.2	1.7±0.2	9.0±4.0
<i>Enterococcus sp.</i> L177	36.1±1.3	15.6±0.3	3.8±0.3*	3.9±0.6	8.1±1.0*	0.81±0.10	1.46±0.37	1.37±0.36*	2.83±0.74*	0.30±0.04	10.43±3.82	1.5±0.3	1.2±0.2	8.0±2.0
<i>Enterococcus sp.</i> L185	48.8±4.4*	16.6±0.8	6.8±0.4*	7.1±0.3*	13.9±0.5*	0.62±0.04	1.88±0.13*	1.56±0.10*	3.42±0.15*	0.23±0.01	14.21±0.75*	4.5±0.6*	2.0±0.3	14.0±3.0
<i>Enterococcus sp.</i> L191	37.0±2.3*	16.2±0.8	3.6±0.4	3.1±0.3	6.7±0.6	0.64±0.05	1.34±0.26	1.55±0.36*	3.34±0.45*	0.21±0.03	17.47±1.61*	3.0±0.3	5.2±0.7*	30.0±6.0
<i>P. fluorescens</i>	29.6±2.8	16.2±1.5	2.8±0.5	1.6±0.3	4.7±0.3	0.55±0.06	0.99±0.17	1.03±0.08	2.06±0.23	0.23±0.02	9.30±1.43	2.0±0.6	4.0±0.6	23.0±5.0
C-	25.2±1.8	10.7±1.4	1.6±0.4	1.8±0.4	3.1±0.6	0.43±0.05	0.68±0.08	0.47±0.10	1.11±0.12	0.14±0.01	7.88±0.86	2.2±0.6	1.7±0.2	9.0±2.0
C+	37.7±2.6*	15.3±1.0	4.2±0.6*	3.4±0.5	7.7±1.3*	0.71±0.08	1.15±0.13	1.33±0.09*	2.46±0.17*	0.22±0.03	10.26±1.93	2.8±0.6	6.7±0.9*	50.0±12.0*

Los datos representan la media ± E.S. de 2 determinaciones n=5-7; C+: Plantas fertilizadas con P (PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub> 20 mM) y sin inocular; C-: Plantas sin fertilizar y sin inocular; \*: diferencia significativa respecto al C-, \*: diferencia significativa respecto al C+, <sup>b</sup>: relación peso seco aéreo/radical. Los valores sombreados indican efecto benéfico significativo respecto a las plantas control sin fertilizar y sin inocular y/o a las plantas fertilizadas con P

### 1.6. Contenido de fósforo en tejidos aéreos de la planta y en el soporte

La inoculación con 6 de las 8 bacterias seleccionadas para este análisis incrementaron significativamente el contenido de P en los tejidos aéreos de la planta o en el soporte. De esos tratamientos, 5 incrementaron significativamente el contenido de P en los tejidos aéreos respecto al C- (Tabla 8). En todos los casos este incremento fue mayor al 200% y en el caso particular de las plantas inoculadas con el aislamiento *Serratia* sp. J260 el aumento fue mayor al 400%. El análisis del contenido de P de hojas y tallos indicó que, a excepción del aislamiento *Enterobacter* sp. J33 que presentó diferencia significativa sólo en el contenido de P de hojas, la inoculación con cuatro bacterias (*Serratia* sp. J260, *Acinetobacter* sp. L176, *Enterococcus* sp. L185 y *Enterococcus* sp. L191) incrementó significativamente el contenido de P de ambos órganos. Cabe destacar que si bien las plantas suplementadas con fosfato soluble mostraron valores más elevados de P que los controles negativos, la diferencia no fue estadísticamente significativa en el contenido de dicho elemento en los tejidos vegetales, mientras que si se observó un incremento significativo en el contenido de P en el soporte.

Por otro lado, al analizar el contenido de nitrógeno de la parte aérea de las plantas inoculadas con las 8 bacterias “altamente eficientes” se observó que 6 de las mismas indujeron un incremento respecto al C-; mientras que en plantas inoculadas con 4 bacterias (*Serratia* sp. J260, *Bacillus* sp. J9, *Enterococcus* sp. L185 y *Enterococcus* sp. L191) dicho incremento superó a ambos controles (Tabla 8).

El contenido de P soluble en el soporte al finalizar el ensayo varió aproximadamente entre 9 y 26  $\mu\text{g/g}$  (Tabla 8) mostrando un incremento respecto al contenido inicial (6.6  $\mu\text{g/g}$ ). Los soportes en los que crecieron plantas inoculadas con la bacteria *Bacillus* sp. L55 y el C+ presentaron un incremento significativo (> 65%) en el contenido de P soluble respecto al C-

**Tabla 8.** Contenido de fósforo y nitrógeno de los órganos aéreos de plantas de maní inoculadas con los aislamientos nativos seleccionados, contenido de fósforo y valor de pH del soporte al finalizar el ensayo.

Tratamientos	P tallo (mg/planta)	P hojas (mg/planta)	P aéreo total (mg/planta)	N aéreo total (mg/planta)	P soporte (µg/g suelo)	pH soporte
<i>Serratia</i> sp. J260	5.72±0.34**	5.33±1.11**	11.05±1.45**	112.30±15.76**	21.35±1.9	7.21±0.14
<i>Pantoea</i> sp. J49	2.31±0.48	2.04±0.06	4.35±0.41	38.14±3.37	10.68±1.31	7.21±0.04
<i>Enterobacter</i> sp. J33	2.42±0.10	3.81±0.29**	6.22±0.19*	77.39±10.23	10.23±0.78	7.23±0.03
<i>Acinetobacter</i> sp. L176	3.64±0.77**	5.95±0.41**	8.82±1.11**	83.73±3.34*	14.6±1.04	7.23±0.08
<i>Bacillus</i> sp. J9	1.72±0.19	3.03±0.42	4.35±0.41	156.85±19.20**	15.08±2.18	6.98±0.08
<i>Bacillus</i> sp. L55	1.51±0.05	2.69±0.38	4.21±0.43	91.99±5.78*	25.12±1.46*	7.00±0.12
<i>Enterococcus</i> sp. L185	4.01±0.15**	3.84±0.33**	7.85±0.19**	119.61±9.69**	14.51±0.68	6.93±0.07
<i>Enterococcus</i> sp. L191	3.06±0.55**	5.39±0.14**	8.99±0.69**	116.33±6.17**	9.28±0.28	7.17±0.16
C-	0.64±0.03	0.93±0.14	1.57±0.17	26.19±6.96	15.15±1.75	7.17±0.03
C+	0.77±0.18	1.30±0.19	2.07±0.37	48.19±1.42	25.35±1.8*	7.13±0.03

Los datos representan la media ± E.S. de 2 determinaciones n=3-5; C+: Plantas fertilizadas con P (PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub> 20 mM) y sin inocular; C-: Plantas sin fertilizar y sin inocular; \*: diferencia significativa respecto al C-, a: diferencia significativa respecto al C+

Considerando que los niveles críticos de P en el cultivo de maní se encuentran en alrededor de 10 µg/g (Cope y col., 1984), el contenido de P presente en el soporte al finalizar el ensayo fue, en la mayoría de los casos, adecuado para el desarrollo de las plantas de maní. El aumento observado en el contenido de este nutriente en el soporte en el que crecieron plantas sin inocular podría deberse a la acción de sustancias presentes en los exudados de la planta ó a la actividad de otros microorganismos que se encontraron en el soporte durante el ensayo.

Por otra parte, el pH del soporte al final del ensayo, tanto en el que crecieron las plantas inoculadas como las sin inocular, se mantuvo cercano a la neutralidad con una ligera tendencia a la alcalinidad. Esto se debe a la naturaleza alcalina de la roca madre del suelo empleado para el ensayo y al efecto tampón del suelo (Ruda de Schenquer y col., 2004) (Tabla 8).

Estos resultados sugieren que las bacterias solubilizadoras de fosfato ejercen su efecto benéfico ya sea incrementando los contenidos de P de la planta o dejando este nutriente disponible en el suelo. Aún cuando el contenido de P en los órganos aéreos de algunas de las plantas inoculadas no fue modificado, se determinaron incrementos en los parámetros de crecimiento vegetal analizados. Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores (De Freitas y col., 1997; Fernández y col., 2007) quienes luego de la inoculación de plantas de canola y soja con bacterias solubilizadoras de fosfato observaron incrementos en el crecimiento vegetal, pero no en el contenido de P. Por otra parte, Chabot y col. (1996) reportaron que plantas de lechuga inoculadas con cepas solubilizadoras de fosfato que no afectaron el crecimiento de dichas plantas, sí lo hicieron al inocularlas en plantas de maíz. En las plantas de maní en las cuales la inoculación mostró incrementar significativamente algunos de los parámetros de crecimiento vegetal analizados pero cuyo contenido de P no aumentó significativamente la promoción del crecimiento vegetal observada podría atribuirse a otras propiedades PGPB que presentan algunas de estas bacterias, tales como la producción de sideróforos y/o la actividad antagonista frente a fitopatógenos de maní (Taurian y col., 2010).

Entre las 8 bacterias “altamente eficientes” se destacan *Serratia* sp. J260, *Acinetobacter* sp. L176, *Bacillus* sp. L55, *Enterococcus* sp. L185 y *Enterococcus* sp. L191 ya que su inoculación produjo un incremento en la mayoría de los parámetros de crecimiento vegetal y en los niveles de P del soporte o de las plantas de maní. Las bacterias *Serratia* sp. J260 y *Acinetobacter* sp. L176 solubilizan valores medios y elevados de P y ácido glucónico al medio. La producción de este ácido, y posiblemente de otros, estaría involucrada en el proceso de solubilización de P inorgánico observado en este estudio. Por su parte, la bacteria *Bacillus* sp. L55 libera pequeñas cantidades de ácido glucónico y P soluble cuando crece en presencia de fosfato tricálcico. Sin embargo, es conocido que bacterias pertenecientes a este género son capaces de mineralizar, por acción de enzimas fosfatasas, P insoluble orgánico, el cual podría estar presente en el sustrato usado en los ensayos que aquí se presentan. Cabe destacar que las bacterias *Serratia* sp. J260, *Bacillus* sp. L55 y *Enterococcus* sp. L185 además de solubilizar fosfato son capaces de producir sideróforos y, se ha reportado que la inoculación con bacterias que presentan ambas propiedades PGPB en cultivos de importancia agronómica producen aumento en su rendimiento (Klopper y col.,

1988; Glick, 1995). Por su parte, la bacteria *Enterococcus* sp. L191 no mostró capacidad productora de sideróforos; por lo que se sugiere que podría estar involucrado otro mecanismo PGP en la promoción del crecimiento observada en plantas de maní. Esta bacteria y *Enterococcus* sp. L185 fueron aisladas del interior de tejido radical de plantas de maní y se ha informado que bacterias endófitas pertenecientes a diferentes géneros tales como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Paenibacillus* y *Methylobacterium* pueden ejercer su capacidad beneficiosa directamente dentro de la planta (Ferreira y col., 2008). A su vez, el estado endofítico de una bacteria es un rasgo deseable cuando se buscan PGPB, ya que garantiza su supervivencia (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998) y efectos beneficiosos potenciales sobre el crecimiento de las plantas (Hardoim y col., 2008).

### 1.7. Análisis de supervivencia de las bacterias inoculadas

Para determinar la supervivencia de las bacterias inoculadas se analizó el número de UFC/ml en el soporte al final del ensayo. Para ello, previamente se analizó su perfil de resistencia a antibióticos a los efectos de poder aislarlas selectivamente a partir del suelo empleado como soporte (Tabla 9).

El análisis de supervivencia realizado a partir del recuento de las colonias obtenidas en medio NBRIP-BPB conteniendo los antibióticos correspondientes, indicó que todas las bacterias inoculadas se encontraban presentes en el soporte al finalizar el ensayo en un rango que varió entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC/g de soporte (Tabla 9). El análisis de los perfiles genéticos del ADN de las colonias analizadas en el recuento y de la cepa inoculada mediante ERIC/BOX-PCR, permitió confirmar la presencia de las bacterias en el soporte al final del ensayo (Figura 20).

Por otro lado, fue posible observar que bacterias de la colección con alta capacidad solubilizadora *in vitro* (*Serratia* sp. S119 y *Serratia* sp. J21) y la cepa solubilizadora comercial *P. fluorescens* no fueron altamente eficientes en la promoción del crecimiento de plantas de maní. Esto podría deberse a competencia con otros microorganismos que se encontraban presentes en el soporte o bien a que el número de células no haya sido suficiente para ejercer su efecto benéfico. La influencia de factores bióticos y/o abióticos en el ensayo podría haber afectado dicho mecanismo promotor del crecimiento vegetal. Reyes y col. (2008) reportaron que cada rizobacteria expresa un metabolismo diferente de acuerdo

a la relación bioquímica y ecológica que establece con la planta, debido posiblemente a la calidad y cantidad de exudados encontrados en la rizósfera.

**Tabla 9.** Perfil de resistencia a antibióticos y supervivencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato en el soporte al finalizar el ensayo en microcosmo.

Tratamientos	Resistencia intrínseca a antibióticos	UFC/g suelo <sup>a</sup>
<i>Serratia sp.</i> J21	Cm <sup>30</sup> Ap <sup>100</sup> Sp <sup>200</sup> Tc <sup>30</sup>	2.10 <sup>6</sup>
<i>Serratia sp.</i> J145	Str <sup>30</sup> Cm <sup>30</sup> Nm <sup>200</sup> Km <sup>50</sup> Ap <sup>100</sup> Sp <sup>200</sup> Tc <sup>20</sup> Gm <sup>10</sup>	2.10 <sup>4</sup>
<i>Serratia sp.</i> J260	Str <sup>30</sup> Cm <sup>30</sup> Ap <sup>100</sup> Sp <sup>200</sup> Tc <sup>20</sup>	2.10 <sup>6</sup>
<i>Serratia sp.</i> S93	Str <sup>30</sup> Cm <sup>30</sup> Ap <sup>100</sup>	6.10 <sup>5</sup>
<i>Serratia sp.</i> S119	Cm <sup>30</sup>	2.10 <sup>5</sup>
<i>Pantoea sp.</i> J49	NR	6.10 <sup>5</sup>
<i>Enterobacter sp.</i> J157	Str <sup>30</sup> Cm <sup>30</sup> Ap <sup>100</sup>	5.10 <sup>5</sup>
<i>Enterobacter sp.</i> J33	Ap <sup>100</sup>	1.10 <sup>5</sup>
<i>Enterobacter sp.</i> S57	Cm <sup>30</sup> Ap <sup>100</sup> Sp <sup>200</sup> Gm <sup>10</sup>	1.10 <sup>6</sup>
<i>Acinetobacter sp.</i> L176	Cm <sup>30</sup>	3.10 <sup>4</sup>
<i>Bacillus sp.</i> J9	NR	4.10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus sp.</i> J225	NR	2.10 <sup>5</sup>
<i>Bacillus sp.</i> J255	NR	4.10 <sup>5</sup>
<i>Bacillus sp.</i> L54	NR	2.10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus sp.</i> L55	Na <sup>1000</sup>	2.10 <sup>6</sup>
<i>Enterococcus sp.</i> L177	NR	6.10 <sup>5</sup>
<i>Enterococcus sp.</i> L185	Str <sup>30</sup>	4.10 <sup>5</sup>
<i>Enterococcus sp.</i> L191	NR	7.10 <sup>6</sup>
<i>P. fluorescens</i>	Cm <sup>30</sup>	2.10 <sup>4</sup>
C-	ND	1.10 <sup>6</sup>
C+	ND	7.10 <sup>4</sup>

Los datos representan la media ± E.S. de 2-3 determinaciones n=3-9; C+: Plantas fertilizadas con fósforo (PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub> 20 mM); C-: Plantas sin fertilizar y sin inocular; Str: Streptomina; Cm: Cloranfenicol; Nm: Neomicina; Km: Kanamicina; Ap: Ampicilina; Na: Acido nadilixico; Rif: Rifampicina; Sp: Spectinomina; Tc: Tetraciclina; Gm: Gentamicina; NR: no se observó resistencia a antibióticos ND: no determinado, <sup>a</sup>: UFC de bacterias solubilizadoras de fosfato crecidas en medio NBRIP-BPB por gramo de suelo rizosférico del soporte. Inóculo: 10<sup>9</sup> UFC/ml; bacterias presentes en el soporte luego de la inoculación: 10<sup>7</sup> UFC/g suelo rizosférico del soporte



**Figura 20.** Perfiles ERIC-PCR de ADN obtenidos de las colonias aisladas del ensayo de supervivencia del tratamiento inoculado con *Serratia* sp. J21. calle 1: perfil de *Serratia* sp. J21 obtenido de ADN de cultivo empleado como inóculo, calles 2, 3 y 4: perfil genómico de colonias obtenidas del soporte.

Resulta de gran interés la inoculación de microorganismos con actividad solubilizadora de fósforo en el suelo para incrementar la disponibilidad de P y reducir el uso de fertilizantes (Illmer y Schinner, 1992). Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que la inoculación en plantas de maní con bacterias solubilizadoras de fósforo pertenecientes a diferentes géneros (*Serratia*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Bacillus*) produjo un incremento significativo en al menos uno de los parámetros de crecimiento vegetal analizados y que las bacterias inoculadas fueron capaces de sobrevivir en el soporte hasta el final del ensayo. Los microorganismos con actividad solubilizadora de fósforo contribuyen considerablemente a incrementar la disponibilidad de este nutriente en el suelo, permitiendo que el mismo se incorpore a los tejidos vegetales y/o incremente el crecimiento de las plantas. El uso de estas bacterias como potenciales P-bioinoculantes sería interesante para incrementar los niveles de P asimilable por las plantas en el suelo.

## CAPÍTULO 5

---

---

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE AGROQUIMICOS EN EL  
CULTIVO DE MANÍ SOBRE BACTERIAS  
SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

La productividad de los sistemas agrícolas depende, en parte, de los procesos funcionales de las comunidades microbianas del suelo (Doran y Zeiss, 2000) y algunas prácticas agrícolas pueden poner en riesgo a estas comunidades. Entre estas, se utilizan diversos tipos de pesticidas, incluyendo insecticidas, fungicidas y herbicidas de fundamental importancia en la producción agrícola (Angelini y col., 2013). Los componentes de fertilizantes y pesticidas son costosos y pueden perjudicar el hábitat, así como alterar la estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana del suelo.

Los microorganismos son componentes fundamentales del ecosistema suelo, ya que participan en procesos como la degradación de la materia orgánica y las transformaciones biogeoquímicas de elementos (Lin y col., 2007). La calidad del suelo está fuertemente influenciada por los procesos microbianos que en él ocurren, y los cambios en la estructura de la comunidad microbiana pueden constituir indicadores tempranos de la degradación o empobrecimiento del suelo (Abril, 2003). Algunos grupos microbianos pueden utilizar un pesticida aplicado como fuente de energía y nutrientes, el que podría ser tóxico para otros organismos (Johnsen y col., 2001). Numerosos estudios muestran que diferentes manejos agrícolas modifican la biodiversidad y alteran la estructura de las comunidades microbiológicas del suelo (Kennedy y Smith, 1995; Kirk y col., 2004; García de Salamone y col., 2006). Con el objetivo de paliar el impacto ambiental provocado por el uso inadecuado de agroquímicos en los cultivos agrícolas mediante su reemplazo o complementación con la aplicación de PGPB, las investigaciones se están focalizando en la evaluación de la diversidad genética y bioquímica de este grupo de bacterias, empleando estudios taxonómicos polifásicos, los cuales incluyen abordajes fenotípicos, genéticos y filogenéticos (Vandamme y col., 1996).

Con el fin de analizar el efecto de la aplicación de agroquímicos sobre las bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato, se analizaron muestras de suelo provenientes del campo experimental de la UNRC. Las mismas fueron obtenidas de dos parcelas, en una de las cuales no se aplicaron agroquímicos y se realizó desmalezado manual (parcela control), y en otra parcela se emplearon los agroquímicos que habitualmente se emplean en el cultivo de maní (parcela tratada). Se analizaron muestras de suelo a los 2, 63 y 158 días (M1, M2 y M3, respectivamente) posteriores a la aplicación de agroquímicos. A partir de las muestras obtenidas se realizaron los siguientes estudios: 1. Análisis de la abundancia de bacterias

cultivables solubilizadoras de fosfato; 2. Análisis de la diversidad genotípica de las bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato; 3. Frecuencia y variabilidad del gen *pqqE* en las bacterias cultivables y no cultivables solubilizadoras de fosfato.

### 1. ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DE BACTERIAS CULTIVABLES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

La aplicación de agroquímicos no produjo efectos sobre el número de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato en las muestras en ninguno de los tiempos analizados (Figura 21). Otros autores observaron que la aplicación de pesticidas no afectó la abundancia de bacterias totales (Girvan y col., 2004; Nicholson y Hirsch, 1998). Por otra parte, Das y Mukherjee (1994) y Das y Debnath (2006) observaron que la adición de insecticidas y herbicidas al suelo incrementó el crecimiento (UFC) de bacterias solubilizadoras de fosfato.

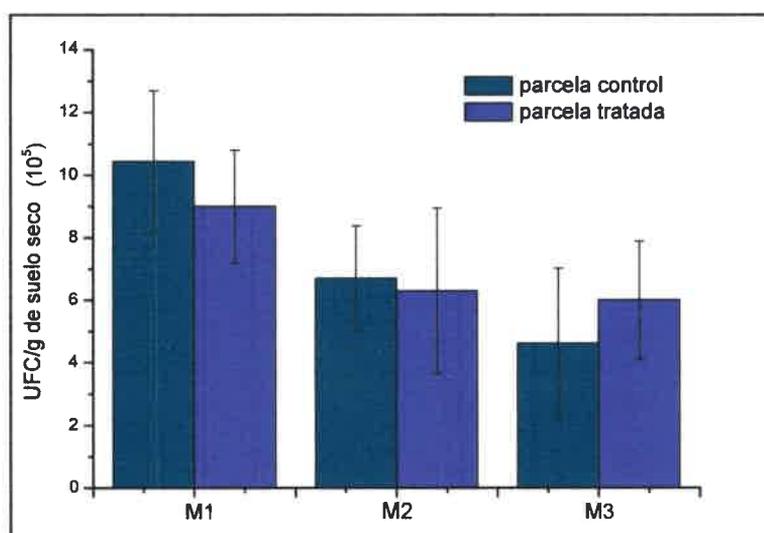


Figura 21. Abundancia de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfatos obtenidas de suelos maniseros crecidas en medio NBRIP-BPB en las muestras M1, M2 y M3. Los datos representan la media  $\pm$  E.S. de 2 determinaciones (n=6).

A partir de las colonias crecidas en medio NBRIP-BPB que produjeron halos de solubilización de fosfato provenientes de las parcelas control y tratada, se seleccionaron al azar aproximadamente 30 colonias de cada tiempo y tratamiento a las cuales se les analizó la morfología celular y coloración de Gram (Figura 22).

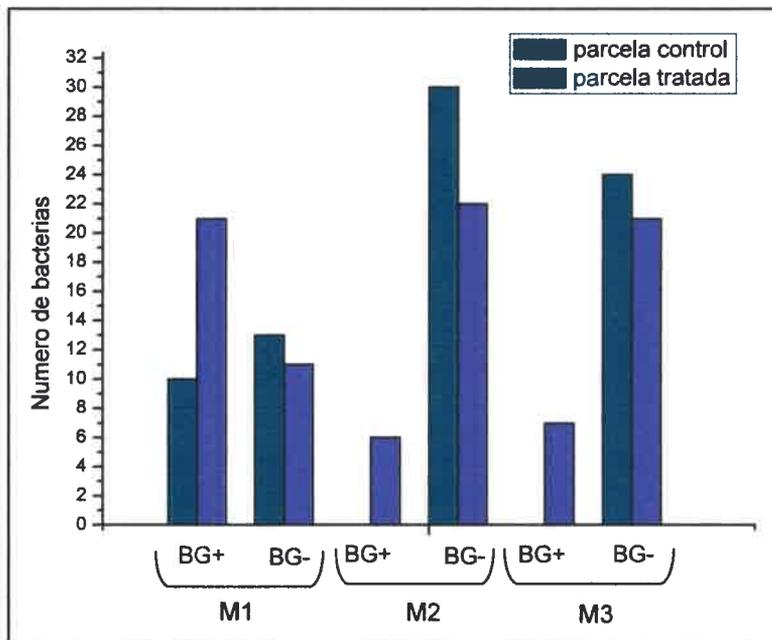


Figura 22. Morfología celular y coloración de Gram de las bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato obtenidas de suelos maniseros (parcelas control y tratada con agroquímicos) en las muestras M1, M2 y M3.

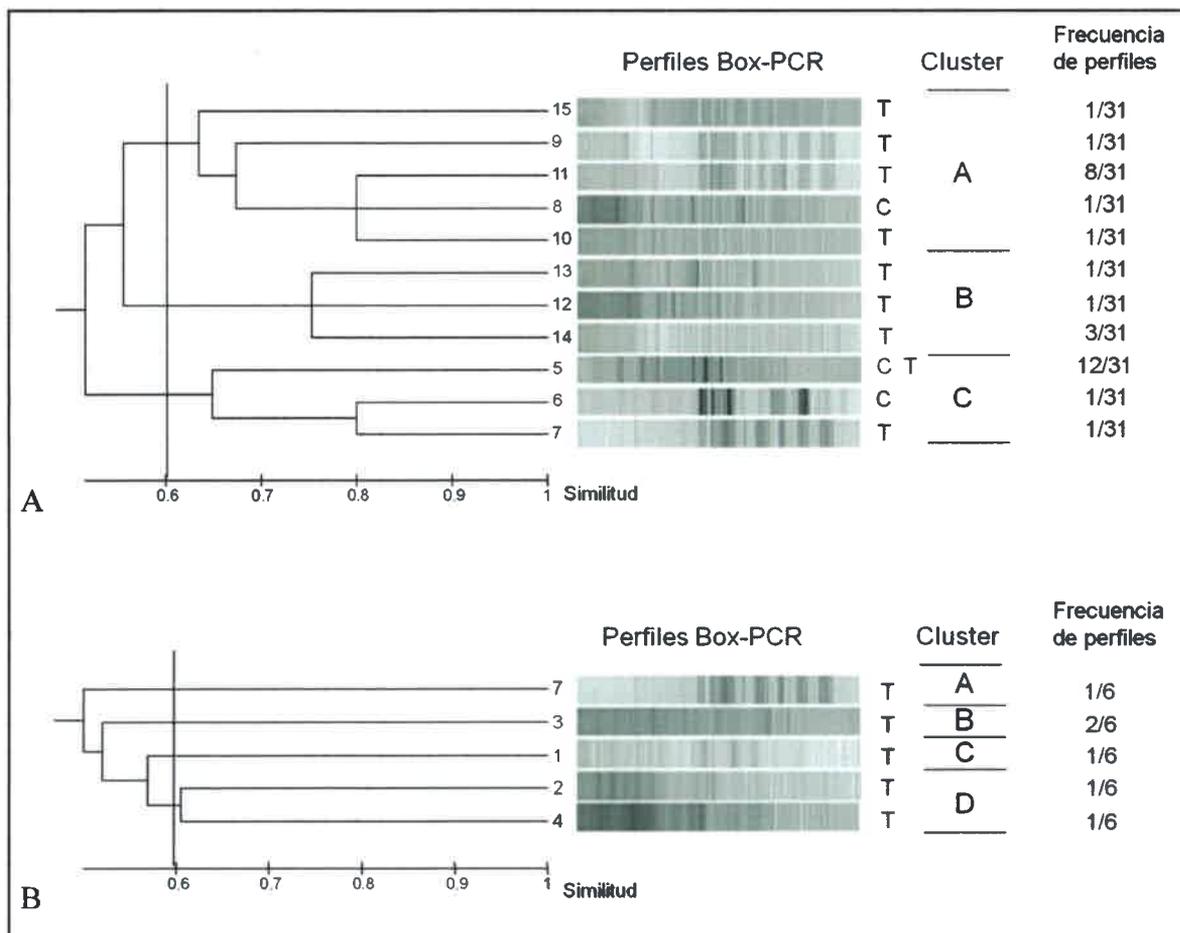
En las tres muestras analizadas se observó un incremento en el número de los bacilos Gram positivos obtenidos de la parcela tratada respecto a la parcela control. A su vez, no se identificaron bacterias Gram positivas en la parcela control en las muestras M2 y M3, lo que sugeriría que este grupo de bacterias no serían seleccionadas por la planta, aun cuando persisten a la aplicación de los agroquímicos empleados.

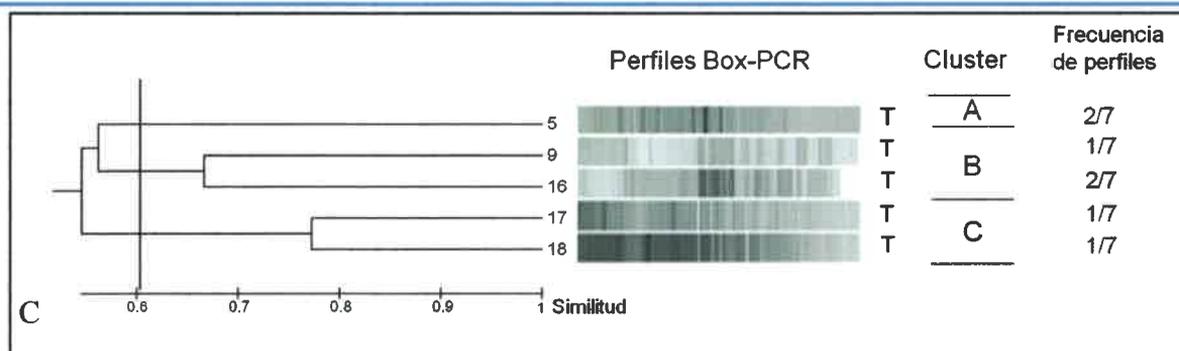
Los resultados indican que si bien el agregado de agroquímicos no afecta el número de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato, produce modificaciones en la estructura de esta población. Teniendo en cuenta que la capacidad solubilizadora es variable entre los diferentes géneros bacterianos, el cambio estructural observado podría estar acompañado con una variación cuantitativa en la solubilización de fosfato de los suelos analizados.

## 2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENOTÍPICA DE LAS BACTERIAS CULTIVABLES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

El análisis de la diversidad genotípica de las aproximadamente 30 colonias solubilizadoras de fosfato aisladas de las parcelas control y tratada en cada tiempo evaluado (en total 165 bacterias) se realizó mediante la amplificación de regiones genómicas repetitivas (rep-fingerprint) empleando los cebadores ERIC, para el análisis de aislamientos Gram negativos, y BOX para el análisis de los Gram positivos. Los perfiles obtenidos fueron identificados con números latinos y a partir de los dendrogramas construidos se consideró 0.6 como valor de corte.

El análisis de similitud entre los perfiles obtenidos en el grupo de bacterias Gram positivas indicó la presencia de 18 perfiles diferentes para el total de las bacterias analizadas (44) (Figura 23).



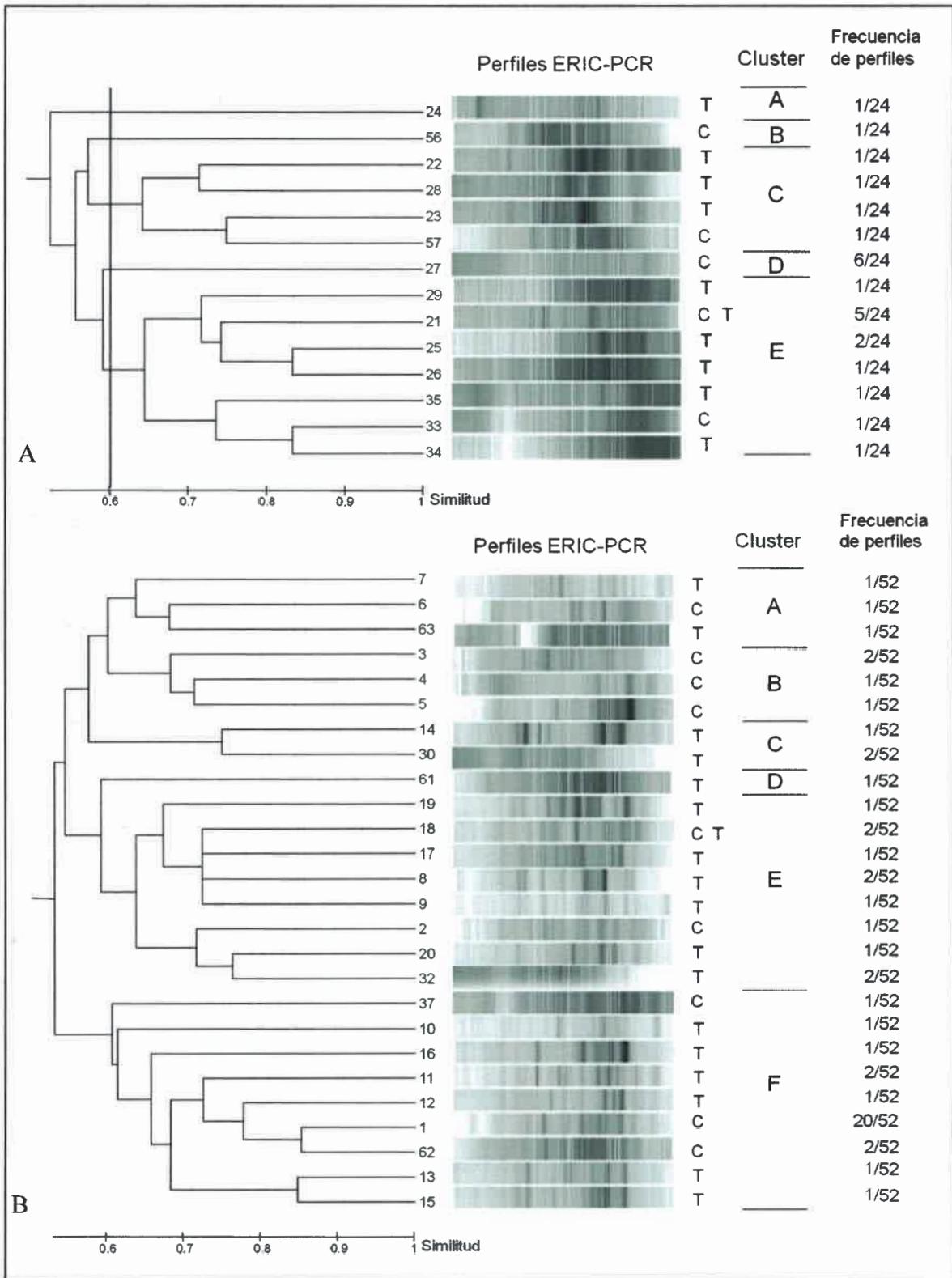


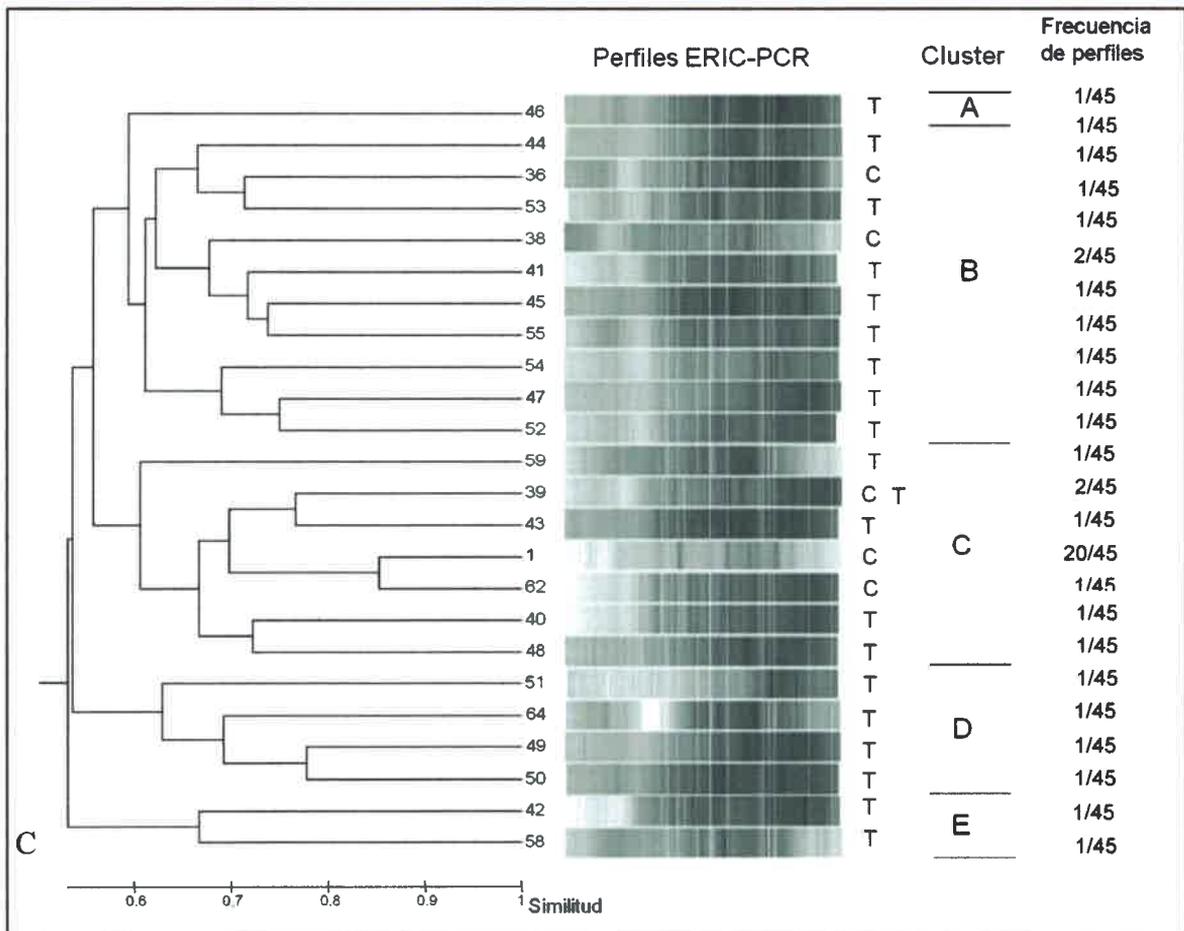
**Figura 23.** Dendrogramas-UPGMA (coeficiente de similitud Dice) obtenidos de BOX-fingerprints de bacterias Gram positivas solubilizadoras de fosfato de parcelas control (C) y tratada (T) de suelos maniseros de la provincia de Córdoba de las muestras M1 (A), M2 (B) y M3 (C).

Los dendrogramas obtenidos para cada tiempo de muestra permitieron agrupar a las bacterias en 3 a 4 clusters. Dos de los clusters obtenidos en la muestra M1 (A y C), comparten bacterias aisladas de ambas parcelas (control y tratada), mientras que en el cluster B sólo se encuentran bacterias aisladas de la parcela tratada. Por otro lado, las bacterias provenientes de las muestras M2 y M3 se agrupan en 4 y 3 clusters, respectivamente. En general, el análisis de la frecuencia de los diferentes perfiles indicó que en su mayoría estaban constituidos por un único representante.

El perfil número 5 fue el más predominante (31%) siguiéndole en orden decreciente el número 11 (18%). A su vez, bacterias que presentaron el perfil número 5 se encontraron tanto en M1 (parcelas control y tratada) como en M3 (parcela tratada). Estos resultados sugieren que bacterias con este perfil fueron capaces de persistir a través del tiempo y de resistir al efecto de la aplicación de los agroquímicos empleados. Una bacteria representativa del perfil 5 fue identificada taxonómicamente mediante determinación de la secuencia parcial del gen ARNr 16S, presentando un alto porcentaje de identidad (99%) con bacterias pertenecientes al género *Bacillus* (número de acceso JX675232). Se conoce que bacterias de éste género tienen la capacidad de persistir debido a la formación de estructuras de resistencia.

El análisis de los ERIC-fingerprints de los aislamientos Gram negativos analizados (121), indicó la presencia de 62 perfiles diferentes (Figura 24).





**Figura 24.** Dendrogramas-UPGMA (coeficiente de similitud Dice) obtenidos de ERIC-fingerprints de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato de parcelas control (C) y tratada (T) de suelos maniseros de la provincia de Córdoba de las muestras M1 (A), M2 (B) y M3 (C).

Los dendrogramas obtenidos para cada muestra permitieron agrupar a las bacterias en 5-6 clusters. En las tres muestras se observó al menos un cluster que sólo agrupa a bacterias provenientes de suelo tratado. Además, en M1 y M2 se obtuvieron clusters que sólo agrupan a bacterias aisladas de suelo control. Estos resultados indicarían un cambio en la diversidad de bacterias solubilizadoras de fosfato atribuible al agregado de agroquímicos. En M1 se observó que bacterias que presentaban los perfiles 27 y 21 se encontraron con mayor frecuencia (25 y 21%, respectivamente) y que, bacterias que mostraron este último perfil, se encuentran tanto en parcelas controles como tratadas. Una bacteria representativa del perfil 21 fue identificada taxonómicamente mediante determinación de la secuencia parcial del gen ARNr 16S, presentando un alto porcentaje de identidad (99%) con bacterias pertenecientes al género *Enterobacter* (número de acceso JX675234). Por otro lado, resultó

interesante que bacterias que presentaron el perfil 1, observado en las muestras M2 y M3 provenientes de parcelas control, representan el 38% de las bacterias solubilizadoras de fosfato analizadas. La identificación taxonómica de una bacteria representativa del perfil 1 reveló que la misma presentó un alto porcentaje de identidad (99%) con bacterias correspondientes al género *Enterobacter* (número de acceso JX675233). Si bien en la mayoría de los casos los perfiles observados sólo se encuentran en bacterias provenientes de parcelas control o tratada, los perfiles 18 y 39 se encontraron tanto en parcelas control como tratada en las muestras M2 y M3, respectivamente. Bacterias representativas de ambos perfiles fueron identificadas taxonómicamente mediante análisis de ARNr 16S y presentaron un alto porcentaje de identidad (99%) con bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter* (números de acceso JX675235 y JX675236, respectivamente). Por su parte, bacterias que presentaron el perfil 62 fueron encontradas en muestras M2 y M3 en ambos casos en parcelas control. Estos resultados sugieren la existencia de bacterias solubilizadoras capaces de persistir a través del tiempo y resistir al efecto de la aplicación de los agroquímicos. Los resultados indican que con el agregado de agroquímicos se observa un mayor número de perfiles en los tres tiempos de muestreo (M1, M2 y M3) (Tabla 10).

A su vez, cabe destacar que las bacterias identificadas taxonómicamente, ya sea por ser las más predominantes o por mantenerse pese a la aplicación de los agroquímicos empleados en este ensayo, pertenecen a géneros en los que ya se han identificado bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato (Subbarao, 1988; Kucey y col., 1989; Whitelaw, 2000) que comúnmente se encuentran asociados al cultivo de maní en la provincia de Córdoba (Taurian y col., 2010; Anzuay y col., 2013).

A los efectos de estimar cuantitativamente la diversidad de las bacterias solubilizadoras de fosfato en las diferentes muestras y frente a la aplicación de agroquímicos, se determinaron a partir de los diferentes perfiles, los índices de diversidad de Simpson y de Shannon-Wiener, muy utilizados en estudios de diversidad microbiana (Dunbar y col., 2000; Shen y col., 2008; Wei y col., 2008; Zhang y col., 2009; Partanen y col., 2010; Sudarma y Suprapta, 2011; Angelini y col., 2013).

**Tabla 10.** Número de aislamientos bacterianos solubilizadores de fosfato, coloración de Gram, número de perfiles BOX y ERIC-PCR e índices de Simpson y Shannon-Wiener obtenidos de las parcelas control y tratada con agroquímicos en los tres tiempos analizados.

	M1 (2 días)		M2 (63 días)		M3 (158 días)	
	C	T	C	T	C	T
Nº de aislamientos solubilizadores de P analizados	23	32	30	28	24	28
Bacterias Gram +	10	21*	0	6	0	7
Nº de perfiles BOX	3	9	0	5	0	5
Indice de Simpson	0.62	0.18	ND	0.07	ND	0.09
Indice de Shannon-Wiener	0.92	2.64	ND	2.25	ND	2.23
Bacterias Gram -	13	11	30	22	24	21
Nº de perfiles ERIC	5	10	9	18	5	20
Indice de Simpson	0.27	0.02	0.45	0.02	0.56	0.005
Indice de Shannon-Wiener	1.88	3.29	1.50	4.06	0.99	7.39
Indice de Simpson Total	0.19	0.08	0.45	0.01	0.56	0.008
Indice de Shannon-Wiener	2.03	3.69	1.50	4.47	0.99	4.62
Total						

C: parcela sin agroquímicos (control), T: parcela con agroquímicos (tratada), \*: Diferencia estadísticamente significativa, ND: no determinado

En lo que respecta a las bacterias Gram positivas, sólo fue posible analizar el efecto de la aplicación de agroquímicos en la muestra M1 ya que en las muestras M2 y M3 no se recuperaron tales bacterias de la parcela control. Los resultados obtenidos indican que dicha aplicación incrementa la diversidad de bacterias Gram positivas (Tabla 10). Por otro lado, si se analizan los cambios en la diversidad de este grupo de bacterias en función del tiempo, se observa un incremento en la misma en las muestras M2 y M3 provenientes de los suelos tratados, con respecto a la muestra M1. Por otro lado, los índices de diversidad indicaron que con el agregado de agroquímicos la diversidad de las bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato se incrementa. Con respecto a la parcela control, se observó que la diversidad de este grupo de bacterias disminuye en función del tiempo, posiblemente debido a que la planta durante su desarrollo seleccionaría un determinado grupo de bacterias. Por otro lado, en la parcela tratada los resultados sugieren que la diversidad de las bacterias solubilizadoras de fosfato Gram negativas aumentaría en función del tiempo. Cuando se analizaron todas las bacterias solubilizadoras de fosfato de cada muestra, independientemente del grupo de coloración de Gram al que pertenecen, fue posible

observar que la aplicación de los agroquímicos incrementó su diversidad. A su vez, en la parcela control se observó que la diversidad disminuye en función del tiempo, al igual que lo encontrado en el grupo de las bacterias Gram negativas. Por el contrario, en las parcelas tratadas la diversidad no variaría a medida que transcurre el tiempo.

En síntesis, los resultados indican que las bacterias solubilizadoras de fosfato que albergan los suelos maniseros de la provincia de Córdoba constituyen un grupo muy heterogéneo. Algunas de ellas, son capaces de sobrevivir al efecto de la aplicación de los agroquímicos habitualmente empleados en el cultivo de maní. Sin embargo, éstos modificarían la estructura de la comunidad bacteriana solubilizadora de fosfato del suelo, incrementando su diversidad.

Diversos autores, mediante análisis de PCR-DGGE, reportaron que la aplicación de agroquímicos provoca cambios en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo (Girvan y col., 2004; Sun y col., 2004). Una gran variedad de sustancias químicas, tales como insecticidas y herbicidas, pueden ser degradadas y utilizadas como fuente de energía y otros nutrientes por ciertos microorganismos (Stadnyk y col., 1971; Bhuyan y col., 1993; Debnath y col., 2002; Das y col., 2003). Das y Debnath (2006) observaron que la aplicación de ciertos herbicidas incrementa tanto el crecimiento como las actividades fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos de microorganismos asociados a suelo de arroz. Por otro lado, algunas sustancias químicas pueden ser tóxicas o modificar actividades promotoras del crecimiento vegetal en otros grupos bacterianos (Wardle y Parkinson, 1990; Dick y Quinn, 1995; Haney y col., 2000; Kuklinsky-Sobral y col., 2005; Simonsen y col., 2008). Así por ejemplo, Mijangos y col. (2009) demostraron que ciertos herbicidas son capaces de disminuir el crecimiento y las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de la bacteria *Klebsiella* sp. PS19.

### 3. FRECUENCIA Y VARIABILIDAD DEL GEN *pqqE* EN LAS BACTERIAS CULTIVABLES Y NO CULTIVABLES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

Con el fin de analizar el efecto de la aplicación de agroquímicos sobre las bacterias cultivables y no cultivables solubilizadoras de fosfato del suelo se analizó la variabilidad del gen bacteriano *pqqE*. Este gen participa en la biosíntesis del cofactor PQQ y su rol en la capacidad solubilizadora de fosfato resulta esencial en un gran número de bacterias.

Para ello, inicialmente y a los efectos de conocer si el gen *pqqE* podría constituir un potencial marcador de la población de bacterias solubilizadoras de fosfato del suelo, se determinó su presencia en bacterias pertenecientes a diferentes géneros bacterianos y en las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección.

#### 3.1. Presencia del gen *pqqE* en las cepas de referencia y en las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección

Como se mencionó en el Capítulo 2, para este análisis fueron incluídas cepas de referencia a las que previamente en nuestro laboratorio se les analizó su capacidad solubilizadora de fosfato. Las cepas de referencia que mostraron tal capacidad en medio NBRIP-BPB fueron: *Pseudomonas* sp. NVAM24, *Enterobacter* sp. NONC13; *Klebsiella* sp. NT31, *Pseudomonas* sp. NCHA33, *Klebsiella* sp. TT001 y *P. fluorescens* CTR212. Por otro lado, las cepas de referencia que no mostraron halo transparente de solubilización de fosfato y que fueron empleadas como “controles negativos” fueron: *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, *B. japonicum* USDA 110, *Azospirillum brasilense* Cd, *Escherichia coli* HB101 y *Ps. corrugata* Pc5. Los resultados del análisis de amplificación por PCR del gen *pqqE* en estas cepas indican que en las bacterias que presentaron un fenotipo no solubilizador, no fue posible observar el producto de amplificación esperado; mientras que en las cepas de referencia solubilizadoras de fosfato, con excepción de *Klebsiella* sp. TT001, si fue posible observar el producto de PCR correspondiente al fragmento de 700 pb del gen *pqqE* (Tabla 11).

**Tabla 11.** Presencia del gen *pqqE* y capacidad solubilizadora de fosfato en las cepas de referencia.

Bacterias	PCR- <i>pqqE</i>	Formación de halo transparente de solubilización de P
<i>Pseudomonas</i> sp. NVAM24	+	+
<i>Enterobacter</i> sp. NONC13	+	+
<i>Klebsiella</i> sp. NTI31	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. NCHA33	+	+
<i>Klebsiella</i> sp. TT001	BI	+
<i>P. fluorescens</i> CTR212	+	+
<i>P. corrugata</i> Pc5	-	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp SEMIA 6144	-	-
<i>Azospirillum brasilense</i> CD	-	-
<i>Escherichia coli</i> HB101	-	-

+: Presencia de producto de amplificación/formación de halo de solubilización de fosfato tricálcico;

-: Ausencia de producto de amplificación/ausencia de formación de halo de solubilización de fosfato tricálcico;

BI: Bando inespecífico

Como se mencionó en el capítulo 3 (Figura 19), fue posible observar producto de amplificación del gen *pqqE* en todas las bacterias solubilizadoras de fosfato Gram negativas de la colección y en la cepa comercial *P. fluorescens*.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que los cebadores empleados para la amplificación del fragmento del gen *pqqE* permitieron determinar la presencia de este gen en un elevado porcentaje de bacterias Gram negativas con capacidad solubilizadora de fosfato, pertenecientes a diferentes géneros bacterianos y alejados filogenéticamente entre sí.

### 3.2. Presencia del gen *pqqE* en los aislamientos cultivables solubilizadores de fosfato provenientes de las parcelas control y tratada con agroquímicos

El análisis de la presencia de este gen se realizó en todos los aislamientos solubilizadores de fosfato (165) obtenidos a partir del estudio del efecto de la aplicación de agroquímicos sobre la diversidad genética de este grupo de bacterias. El fragmento de 700 pb correspondiente al gen *pqqE* fue amplificado en un 85% (102/121) de los aislamientos Gram negativos analizados. En la muestra M1, se determinó la presencia del gen en el 25% de las bacterias analizadas, valor que alcanzó el 82% en la muestra M2 y el 79% en la M3 (Tabla 12). Las bacterias que mostraron el producto de amplificación esperado fueron todas

Gram negativas. Estos resultados permiten sugerir que *pqqE* sería un potencial marcador molecular de las bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato.

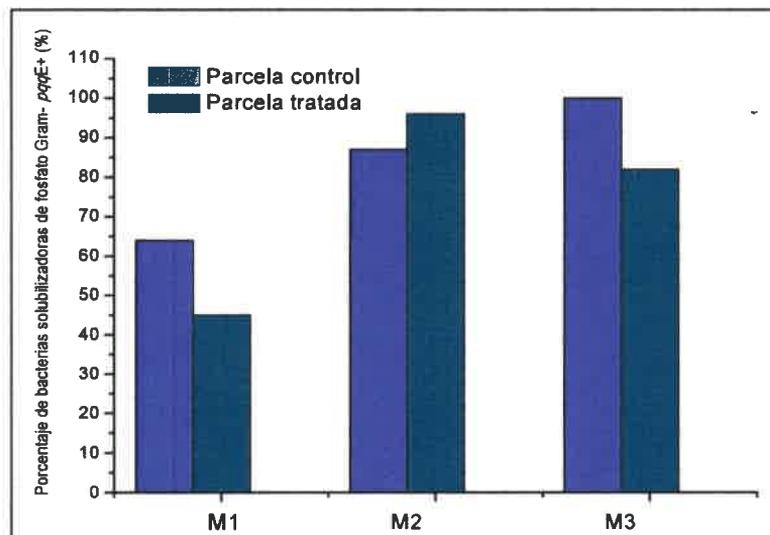
**Tabla 12.** Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas a partir de muestras de suelo manisero que mostraron presencia del gen *pqqE* en su genoma y su frecuencia en la población de bacterias Gram negativas.

	M1 (2 días)	M2 (63 días)	M3 (158 días)
N° de aislamientos solubilizadores de P analizados	55	58	52
% de aislamientos <i>pqqE</i> + *	25%	82%	79%
Frecuencia del gen <i>pqqE</i> **	13/24 (54%)	48/52 (92%)	41/45 (92%)

\*: Porcentaje de aislamientos que contienen el gen *pqqE* en el total de las bacterias analizadas en cada muestra;

\*\* : Frecuencia del gen *pqqE* en las bacterias Gram negativas analizadas

Cuando se analizaron los resultados teniendo en cuenta el efecto de la aplicación de agroquímicos sobre las bacterias solubilizadoras de fosfato se observó que en las muestras M1 y M3, hubo un menor porcentaje de bacterias que presentaron el gen *pqqE* en las muestras de la parcela tratada respecto a las muestras de la parcela control (Figura 25).



**Figura 25.** Porcentaje de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato PCR-*pqqE* positivas obtenidas de las parcelas control y tratada con agroquímicos en los tres tiempos analizados.

Si bien fue posible observar un aumento con el tiempo en el número de bacterias que presentaron el gen *pqqE*, en las bacterias obtenidas de las muestras tratadas dicho valor no alcanzó el 100%, a diferencia de lo observado en la parcela control de la muestra M3.

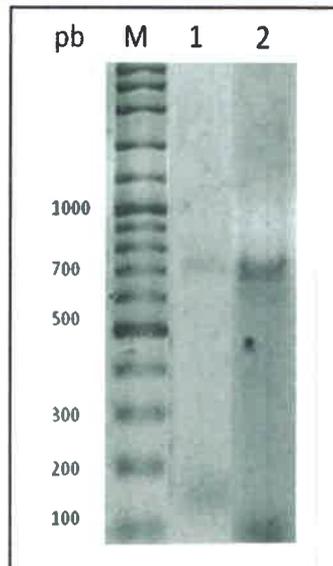
A partir de los resultados obtenidos, es posible inferir que, independientemente de la aplicación de agroquímicos, la población de bacterias que contiene el gen *pqqE* aumenta a medida que transcurre el tiempo; siendo mayor cuando la planta de maní alcanza su madurez reproductiva. Esta observación sugiere que la planta seleccionaría este grupo de bacterias en la rizósfera.

Por otro lado, la disminución en las muestras de la parcela tratada (M1 y M3) del número de bacterias en las que se determinó la presencia del gen *pqqE* respecto al control sugiere que el agregado de agroquímicos ejercería un efecto negativo sobre las bacterias solubilizadoras de fosfato que contienen el gen *pqqE*, provocando cambios en la estructura de la comunidad solubilizadora de fosfato cultivable. Estos resultados confirman lo encontrado en los ensayos anteriores.

La presencia del gen *pqqE* en todas las cepas de referencia solubilizadoras de fosfato Gram negativas, en todas bacterias Gram negativas de la colección y en la mayoría de las bacterias solubilizadoras de fosfato Gram negativas aisladas tanto de parcelas control como tratada, sugiere que este gen sería un potencial marcador molecular de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato. Estos resultados motivan a profundizar el estudio de dicho gen como una herramienta para el estudio de poblaciones bacterianas solubilizadoras de fosfato.

### 3.3. Análisis de la variabilidad del gen *pqqE* en las poblaciones no cultivables solubilizadoras de fosfato

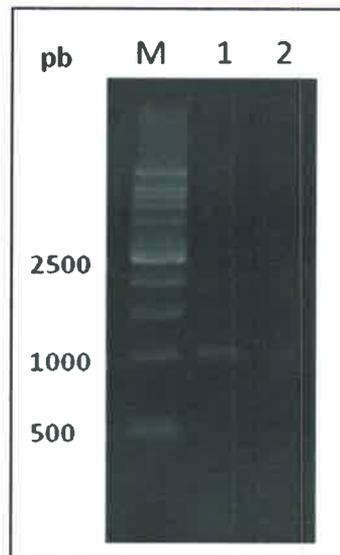
Se analizó a partir de ADN extraído de suelo la variabilidad del gen *pqqE* en las poblaciones no cultivables solubilizadoras de fosfato. Para ello, se realizaron extracciones de ADN de suelo de las parcelas control y tratada en los tres tiempos de muestra. Sin embargo, y aún cuando fueron ensayadas diferentes metodologías de extracción de ADN de suelo, se obtuvo el molde esperado sólo en las dos parcelas (control y tratada) correspondientes al tiempo de muestreo M2 (63 días). A partir de dicho ADN se procedió a amplificar el fragmento del gen *pqqE* de 700 pb (Figura 26).



**Figura 26.** Producto de amplificación por PCR de un fragmento de 700 pb correspondiente al gen *pqqE* a partir de ADN extraído de muestras de suelo. Calles: M: Marcador de peso molecular 100 pb (productos-PBL); 1: muestra M2 parcela control, 2: muestra M2 parcela tratada.

Los productos de amplificación fueron clonados en el vector plamídico pGEM-T Easy y el producto de ligación fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para confirmar la presencia del inserto en las colonias blancas obtenidas se realizó colony-PCR empleando los cebadores T7 que tienen sitio de unión en el vector pGEM-T y amplifican un producto de aproximadamente 1000 pb.

Fue posible obtener producto de amplificación en un total de 72 clones, 35 de los cuales provienen de la parcela control y los 37 restantes de la parcela tratada con agroquímicos (Figura 27).



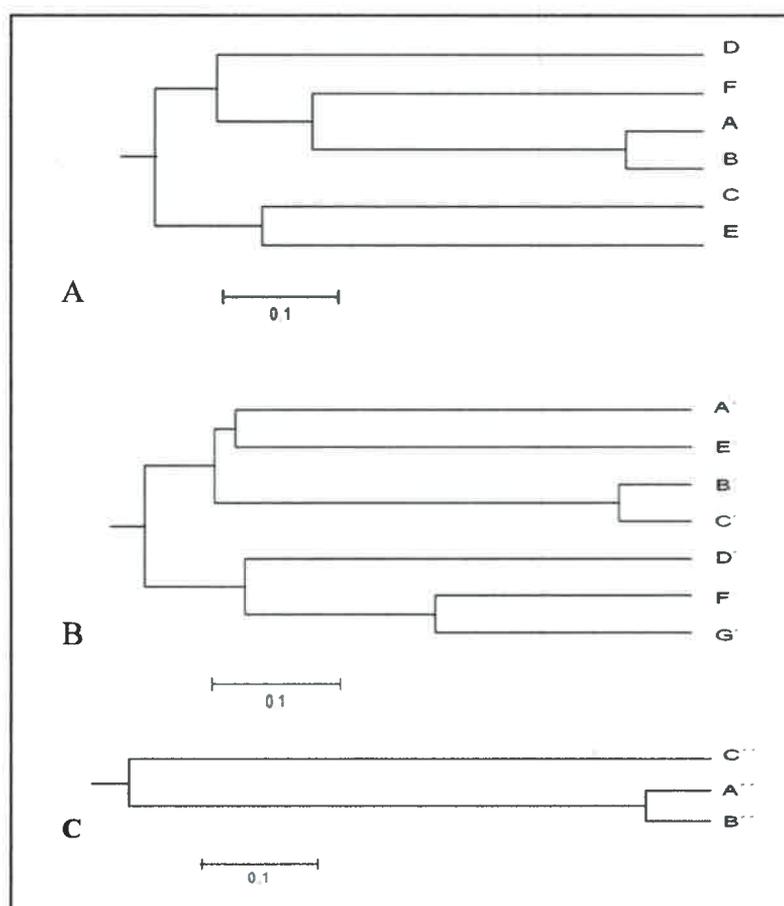
**Figura 27.** Producto de amplificación de “colony-PCR” correspondiente a una colonia que presentaba el inserto del gen *pqqE* (aproximadamente 1000 pb). M: Marcador de peso molecular 1kb (Fermentas); calle 1: producto amplificado de la colonia 2 obtenida de ADN de suelo de la parcela control de la muestra M2; calle 2: control negativo.

A los efectos de estudiar la variabilidad del fragmento del gen *pqqE* se procedió a analizar el polimorfismo de su secuencia mediante RFLP. Para ello se evaluó previamente *in silico* su digestión mediante el análisis de las endonucleasas que tienen sitios de corte en las secuencias del gen *pqqE* de diferentes géneros bacterianos depositadas en el banco de genes (GenBank) NCBI. A partir de dicho análisis fueron seleccionadas tres endonucleasas: *CfoI*, *MspI* y *NdeII*, las cuales fueron empleadas para digerir los productos de amplificación del fragmento de 700 pb de los 72 clones obtenidos.

Cuando se analizaron los productos de las digestiones con las 3 enzimas seleccionadas fue posible observar 6 perfiles diferentes utilizando la enzima *CfoI*: A, B, C, D, E y F, 7 perfiles con la enzima *MspI*: A', B', C', D', E', F' y G' y se obtuvieron tres perfiles diferentes al utilizar la enzima *NdeII*: A'', B'' y C'' (Tabla 13, Figura 28).

**Tabla 13.** Perfiles de digestión obtenidos del análisis RFLP-*pqqE* con las enzimas *CfoI*, *MspI* y *NdeII* a partir de ADN proveniente de suelo de las parcelas control y tratada con agroquímicos de la muestra M2.

<i>CfoI</i>		<i>MspI</i>		<i>NdeII</i>	
Perfil de digestión	Tamaño de bandas (pb)	Perfil de digestión	Tamaño de bandas (pb)	Perfil de digestión	Tamaño de bandas (pb)
A	305, 260, 180	A'	500, 260, 190	A''	320, 220, 190, 140, 100
B	305, 260, 180, 110	B'	260, 230, 180, 140, 80	B''	320, 220, 190, 140
C	400, 310, 200, 150	C'	260, 180, 140, 80	C''	650, 450
D	380, 270, 210, 180	D'	270, 190, 150, 100, 70		
E	330, 290, 200, 120	E'	480, 280, 190, 140		
F	380, 290, 180	F'	450, 210, 150, 110, 80		
		G'	450, 270, 190, 110, 80		



**Figura 28.** Dendrogramas-UPGMA (coeficiente de similitud Dice) obtenidos del análisis RFLP-*pqqE* con las enzimas *CfoI* (A), *MspI* (B) y *NdeII* (C) a partir de ADN proveniente de suelo de las parcelas control y tratada con agroquímicos de la muestra M2.

A partir de los perfiles obtenidos con las 3 enzimas seleccionadas se identificaron 16 patrones diferentes en los 72 clones analizados (Tabla 14). De ellos, 5 patrones (2, 3, 4, 7 y 13) fueron observados tanto en muestras de la parcela control como tratada; siendo los patrones 4 y 2 los predominantes (22 y 21%, respectivamente). Estos resultados sugieren que los suelos albergan bacterias que presentan el gen *pqqE* capaces de sobrevivir a la aplicación de agroquímicos, resultados que coinciden con lo determinado en el grupo de bacterias cultivables solubilizadoras de fosfato.

**Tabla 14.** Patrones obtenidos del RFLP-*pqqE* con la enzimas *CfoI*, *MspI* y *NdeII* de ADN obtenido de suelo proveniente de las parcelas control y tratada con agroquímicos de la muestra M2.

Perfil de digestión <i>CfoI</i>	Perfil de digestión <i>MspI</i>	Perfil de digestión <i>NdeII</i>	Patrón	Nº de clones presentes en las muestras	
				Parcela control	Parcela tratada
B	B'	B''	1	1	0
F	A'	SD	2	9	6
A	B'	B''	3	2	2
A	C'	B''	4	7	9
B	C'	B''	5	3	0
A	A'	SD	6	1	0
A	B'	A''	7	2	5
B	B'	A''	8	0	2
E	G'	SD	9	0	2
C	F'	SD	10	2	0
D	E'	SD	11	0	3
A	D'	B''	12	0	1
A	C'	C''	13	4	5
A	D'	C''	14	0	1
A	B'	SD	15	0	1
A	D'	SD	16	4	0

SD: producto de amplificación sin digerir

En la parcela control se obtuvieron 10 patrones diferentes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13 y 16) en los 35 clones analizados y se observó que los predominantes fueron el 2 y 4 (26 y 20%, respectivamente) (Tabla 14). Por otra parte, los patrones 1 y 6 se encontraron una sola vez. En la parcela tratada se obtuvieron 11 patrones diferentes (2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 y 15) en los 37 clones analizados y, al igual que en la muestra control, se observó que los patrones predominantes fueron el 2 y 4 (16 y 24%, respectivamente) y los patrones 12, 14 y 15 se observaron una sola vez en los clones analizados.

El estudio de RFLP-*pqqE* demostró que de las 3 endonucleasas seleccionadas *CfoI* y *MspI* permitieron identificar un mayor número de perfiles diferentes. Sin embargo, aunque sólo se observaron tres perfiles diferentes al utilizar la enzima *NdeII*, y en algunos casos no se observó producto de digestión, esta enzima permitió diferenciar patrones que con las otras enzimas empleadas no habían sido discriminados.

A los efectos de determinar si el número de clones analizados reflejan la diversidad real de las bacterias de suelo que contienen el gen *pqqE*, se estimó el índice de cobertura de los clones de las muestras. Se observó un índice de cobertura mayor al 70% tanto en parcela control como tratada (80 y 72,7%, respectivamente) (Tabla 15). A partir de los patrones obtenidos en cada muestra se estimaron los índices de diversidad de Simpson y Shannon-Wiener y los resultados indican que habría un incremento en la diversidad de los clones que contienen el gen *pqqE* en la parcela tratada. Estos resultados sugieren que el agregado de agroquímicos modificaría la estructura de la población bacteriana no cultivable solubilizadora de fósforo que contiene el gen *pqqE*.

**Tabla 15.** Número de patrones, porcentaje de cobertura, e índices de Simpson y Shannon-Wiener de los clones obtenidos de suelo proveniente de las parcelas control y tratada con agroquímicos de las muestras M2.

	Librería de clones	
	Parcela Control	Parcela Tratada
Número de patrones totales	10 (35) <sup>a</sup>	11 (37) <sup>a</sup>
Cobertura (%)	80%	72,7%
Índice de Diversidad de Simpson	0,126	0,116
Índice de Diversidad de Shannon-Wiener	2,751	3,099

a: Los valores entre paréntesis indican el número de clones analizados de cada tratamiento

Los cambios en la diversidad y estructura de las comunidades microbianas del suelo pueden ser la clave para entender el impacto de los factores ambientales en la calidad del suelo en los sistemas agrícolas (Hartmann y Widmer, 2006). El análisis mediante RFLP es un método apropiado para comparar cambios entre comunidades bacterianas en muestras ambientales (Dunbar y col., 2000) y, en los últimos años, el estudio por RFLP de fragmentos de genes bacterianos a partir de ADN de suelo ha ido incrementando. Así, esta técnica se puede utilizar a los efectos de evaluar diferentes prácticas agrícolas, como el uso de agricultura orgánica o de fertilizantes, la contaminación por metales, las variaciones temporales o espaciales, etc. Los resultados obtenidos por otros autores indican que mediante RFLP se han demostrado cambios en la estructura y en la diversidad de las comunidades microbianas. Sin embargo, en la mayoría de los estudios el gen analizado ha sido el ARNr 16S (Hartmann y col., 2006; Hackl y col., 2004; Smit y col., 1997). Otros estudios, han analizado el efecto de diferentes condiciones de suelo o prácticas agrícolas sobre la diversidad genes *nif* que codifican para la enzima bacteriana nitrogenasa, esencial en la capacidad de fijación biológica del nitrógeno de las bacterias del suelo (Poly y col., 2001; Angelini y col., 2013). El presente sería el primer estudio que aborda el análisis de un gen “representativo” de una subpoblación de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato. Así, el elevado porcentaje de bacterias cultivables de suelo pertenecientes a diferentes géneros bacterianos con esta propiedad promotora del crecimiento vegetal que demostraron contener el gen *pqqE* y el hallazgo de una gran variedad de perfiles RFLP-*pqqE* obtenidos de muestras de suelo, permitirían sugerir el mismo como un potencial gen marcador para el estudio de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato de suelo. A su vez, el análisis de los resultados del efecto de los agroquímicos tanto en bacterias solubilizadoras cultivables como en bacterias no cultivables indica que su aplicación afecta la estructura de dicha subpoblación microbiana, incrementado la diversidad.

## CAPÍTULO 6

---

---

CONCLUSIONES

- ⊕ Las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección constituyen una comunidad diversa que abarca diferentes géneros.
- ⊕ Los niveles de fósforo soluble liberados por las bacterias fueron variables y mostraron correlación con la evaluación cualitativa. Los valores de pH del sobrenadante en medio líquido conteniendo fosfato tricálcico suplementado con soluciones amortiguadoras sugieren que, en la mayoría de los casos, el mecanismo mediante el cual las bacterias de la colección solubilizan fosfato estaría mediado por acidificación del medio.
- ⊕ La relación entre fósforo solubilizado y valores de pH en el sobrenadante de algunas bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección, indica que la acidificación del medio podría ser consecuencia de la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, aunque las bacterias produjeron diversas cantidades de ácido glucónico, para la mayoría no se pudo establecer una relación entre fósforo solubilizado y producción de este ácido.
- ⊕ Los resultados del ensayo en microcosmo revelaron que la inoculación de plantas de maní con las bacterias solubilizadoras de fosfato de la colección, promueve el crecimiento vegetal e incrementa el contenido de P tanto en el tejido de las plantas como en el soporte utilizado. Por lo tanto, estas cepas constituyen un grupo que, por sus propiedades fisiológicas y metabólicas, permitirían optimizar la producción de esta leguminosa en Córdoba.
- ⊕ La aplicación de agroquímicos en el cultivo de maní modifica la estructura de la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfato cultivables y no cultivables, incrementando su diversidad.
- ⊕ La presencia del gen *pqqE* en las cepas de referencia solubilizadoras de fosfato, en todas las bacterias Gram negativas de la colección y en la mayoría de las bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato aisladas tanto de parcela control como tratada con agroquímicos, sugiere que este gen sería un buen marcador molecular de bacterias Gram negativas solubilizadoras de fosfato.

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis se propone que las bacterias solubilizadoras de fosfato presentes en los suelos del área manisera de Córdoba constituyen un grupo filogenéticamente heterogéneo, cuya diversidad es afectada por la aplicación de agroquímicos, y que el principal mecanismo de solubilización de fosfato sería la producción de ácidos orgánicos. La inoculación de dichas bacterias en plantas de maní resulta en un aumento en su crecimiento y contenido de P.

## CAPÍTULO 7

---

---

BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Abril, A. (2003). ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Austral*. 13: 195-204.
- ◆ Achouak, W., Thiéry, M., Roubaud, P., Heulin, T. (2000). Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugate* in bulk soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 11-19.
- ◆ Agnihotri, V.P., Sinha, A.P., Sing, K. (1981). Influence of insecticides on soil microorganisms and their biochemical activity. *Pesticides*. 15: 16-24.
- ◆ Ahemad, M., Khan, M.S. (2010). Plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. *Eur. Asia J. BioSci.* 4: 88-95.
- ◆ Ahmed, N., Shahab, S. (2011). Phosphate solubilization: their mechanism genetics and application. *Int. J. Microbiol.* 9: 4408-4412.
- ◆ Altschul, S., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhenh Zhang, J.Z., Miller, W., Lipman, J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs". *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- ◆ Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- ◆ Amellal, N., Bartoli, F., Villemin, G., Talouizte, A., Heulin, T. (1999). Effects of inoculation of EPS-producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. *Plant Soil*. 211: 93-101.
- ◆ Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Miller J., Stafford, K., Seymour, S., Light, D., Rastetter, W., Estell, D. (1985). Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science*. 230: 144-149.
- ◆ Angelini, J., Ghio, S., Taurian, T., Ibañez, F., Tonelli, M.L., Valetti, L., Anzuay, M.S., Ludueña, L., Muñoz, V., Fabra, A. (2013). The effects of pesticides on bacterial nitrogen fixers in peanut- growing area. *Arch. Microbiol.* 195: 683-692.
- ◆ Anthony, C. (2004). The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucosa. *Arch. of Biochem. and Biophysics*. 428: 2-9.

- ◆ Anthony, C. (2001). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxidants and Redox Signalling*. 3: 757-774.
- ◆ Antoun, H., Prevost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. PGPR: Biocontrol and Fertilization. Z.A.Siddiqui (ed). (pp. 1-38).
- ◆ Anzuay, M.S., Frola, O., Angelini, J.G, Ludueña, L.M., Fabra, A., Taurian, T. (2013). Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis*. 60: 143-154.
- ◆ Arcand, M.M., Schneider, K.D. (2006). Plant- and microbial-based mechanisms to improve the argonomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Cincias*. 78: 791-807.
- ◆ Arora, R.K., Ramanatha Rao, R.K. (1995). Expert Consultation on Tropical Fruti species of Asia. Int Plant Genetic Resource Inst. Off. for South Asia, New Delhi.
- ◆ Ascheri, L. (2007). Fertilización fosfatada de trigo en suelos haplustoles del sudeste de Córdoba. *IPNI (International Plant Nutririon Institute)*. 34: 17-19. <http://www.ipni.net>.
- ◆ Ausubel, F.M., Blent, R., Kingston, R.E. (1991). En: Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
- ◆ Babalola, O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32: 1559-1570.
- ◆ Babana, A.H., Antoun, H. (2006). Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. *Plant Soil*. 287: 51-58.
- ◆ Badri, D.V., Weir, T.L, van der Lelie, D., Vivanco, J.M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 642-650.
- ◆ Barriuso, J., Marín, S., Mellado, R.P. (2010). Effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities: a comparison with pre-emergency applied herbicide consisting of a combination of acetochlor and terbuthylazine. *Environ. Microbiol.* 12: 1021-1030.

- ◆ Bashan, Y., de-Bashan, L.E. (2005). "Plant growth promoting". Encyclopedia of soils in the environment. Ed. D. Hillel, Elsevier, Oxford, U.K. vol. 1. (pp. 103-115) 2200p.
- ◆ Bécquer, C.J., Salas, B., Archambault, D., Slaski, J., Anyia, A. (2008). Selección de rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá, inoculados en maíz (*Zea mays*, L.). Fase I: invernadero. *Pastos y Forrajes*. 31: 229-246.
- ◆ Ben Farhat, M., Farhat, A., Bejar, W., Kammoun, R., Bouchaala, K., Fourati, A., Antoun, H., Bejar, S., Chouayekh, H. (2009). Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Arch. Microbiol.* 191: 815-24.
- ◆ Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Gen. Microbiol.* 84: 188-198.
- ◆ Bernier, P.Y., Lamhamedi, M.S., Simpson, D.G. (1995). Shoot: root ratio is of limited use in evaluating the quality of container conifer stock. *Tree Planters' Notes*. 46: 102-106.
- ◆ Biville, F., Turlin, E., Gasser, F. (1989). Cloning and genetic analysis of six pyrroloquinoline quinone biosynthesis genes in *Methylobacterium organophilum* DSM760. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2917-2929.
- ◆ Boddington, C.L., Dood J.C. (2000). The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian Ultisol. *Plant Soil*. 218: 137-144.
- ◆ Boldt, T.S., Jacobsen, C.S. (1998). Different toxic effect of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 161: 29-35.
- ◆ Bolsa de cereales de Córdoba. (2011). Sistema de Información Agroeconómica. Informe ESPECIAL Maní, Octubre 2011. <http://www.bccba.com.ar>
- ◆ Bolton, H. Jr, Elliott, L.F., Turco, R.F., Kennedy, A.C. (1990). Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* sp. and effects on plant growth. *Plant Soil*. 123: 121-124.

- ◆ Bonadeo, E., Moreno, I. (2006). En: Peanut crop in Córdoba: Mineral nutrition (pp. 113-123). Eds. E. M. Fernandez, O. Giayetto, Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- ◆ Bonadeo, E., Moreno, I., Pedelini, R. (1997). Algunos aspectos nutricionales del cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.). 12° Jornada Nacional del Maní. Gral. Cabrera-Córdoba. (pp. 29-31).
- ◆ Bonadeo, E., Moreno, I., Pedelini, R. (1998). Estudio preliminar sobre los niveles de nitrógeno, fósforo, calcio y boro en suelo y su relación con el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) III Reunión Nacional de Oleaginosos. Bahía Blanca, Argentina. (p. 225).
- ◆ Bosch, E. N., da Veiga, A. (2002). Pérdida de fertilidad de un suelo agrícola. INTA, Buenos Aires.
- ◆ Bray, R.H., Kurtz, L.T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- ◆ Busman, L., Lamb, J., Randall, G., Rehm, G., Schmitt, M. (2009). Phosphorus in the agricultural environment. The nature of phosphorus in soil. University of Minnesota. <http://www.extension.umn.edu>.
- ◆ Bhuyan, S., Sreedharan, B., Adhya, T.K., Sethunathan, N. (1993). Enhanced biodegradation of g-hexachlorocyclohexane (g-HCH) in HCH (commercial) acclimatized flooded soil: factors affecting its development and persistence. *Pestic. Sci.* 38: 49-55.
- ◆ Boote, K.J. (1982). Growth Stages of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Science.* 9: 34-40.
- ◆ Cámara Argentina del Maní. (2012). Outlook del cluster manisero argentino. Las Exportaciones. <http://www.camaradelmani.com.ar>
- ◆ Cartieaux, F., Thibaud, M.C., Zimmerli, L., Lessard P., Sarrobert, C. (2003). Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plantgrowth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *Plant J.* 36: 177-188.
- ◆ Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Plant Soil.* 184: 311-321.

- ◆ Chaparro, J.M., Sheflin, A.M., Manter, D.K., Vivanco, J.M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol. Fertil Soils*. 48: 489-499.
- ◆ Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecology*. 34: 33-41.
- ◆ Choi, O., Jinwoo, K., Jung-Gun, K., Yeonhwa, J., Jae, S.M., Chang, S. P., Ingyu, H. (2008). Pyrroloquinoline Quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiol*. 146: 657-668.
- ◆ Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., Sa, T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem*. 37: 1970-1974.
- ◆ Cisneros, J.M. (2001). Uso de las tierras en el sur de Córdoba. Revista Agro Mercado: Maní. (pp. 23-24).
- ◆ Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37 (Database issue): D141-145. doi:10.1093/nar/gkn879.
- ◆ Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A., Aguilar, O.M. (2010). Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fertil Soils*. 46: 727-738.
- ◆ Comisión Royal en Polución Medioambiental. (1996). Sustainable use of soil. 19th report of the Royal Comisión on Enviromental Pollution. Publication Cmnd 3165. HMSO, London, United Kingdom.
- ◆ Cope, J.T., Starling, J. G., Ivey, H. W., Mitchell, C.Jr. (1984). Response of peanuts and other crops to fertilizers and lime in two long terms experiments. *Peanut Sci*. 11: 91-94.
- ◆ Coyne, M. (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Paraninfo D.L. Madrid, España.

- ❖ Criadero El Carmen. (2007). Investigación y desarrollo de nuevas variedades de maní. En: <http://www.criaderoelcarmen.com.ar>. Noviembre, 2011.
- ❖ Curtis, T.P., Sloan, W.T., Scannell, J.W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 10494-10499.
- ❖ Daita, F. (2006). En: Peanut crop in Córdoba: Mineral nutrition (pp. 215- 235). Eds. E. M. Fernandez, O. Giayetto, Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- ❖ Das, A.C., Debnath, A., Mukherjee, D. (2003). Effect of herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. *Chemosphere.* 53: 217-221.
- ❖ Das, A.C., Debnath, A. (2006). Effect of systemic herbicides on N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. *Chemosphere.* 65: 1082-1086.
- ❖ Das, A.C., Mukherjee, D. (1994). Effect of insecticides on the availability of nutrients, nitrogen fixation, and phosphate solubility in the rhizosphere soil of rice. *Biol. and Fert. Soils.* 18: 37-41.
- ❖ de Bruijn, F. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187.
- ❖ de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, H.M.I., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., Vanderleyden, J., De Mot, R., Lugtenberg, B.J.J. (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microb. Int.* 15: 1173-1180.
- ❖ De Freitas, J. R., Banerjee, M. R., Germida, J. J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.) *Biol. and Fert. Soils.* 24: 358-364.
- ❖ Debnath, A., Das, A.C., Mukherjee, D. (2002). Rhizosphere effect of herbicides on nitrogen fixing bacteria in relation to availability of nitrogen in rice soil. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 50: 463-466.

- ◆ Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Igual, J.M., Muñoz, J.A., González, F., Blázquez, M.L., García, C. (2006). Characterization of brushite as are-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2645-2654.
- ◆ Derka, C.A., Sánchez, A.N. (2006). Cultivo del maní (*Arachis hypogaea*). En: <http://www.inta.gov.ar>. Noviembre, 2011.
- ◆ Deubel, A., Gransee, A., Merbach, W. (2000). Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163: 387-392.
- ◆ De Werra, P., Pechy-Taur, M., Keel, C., Maurhofer, M. (2009). Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4162-4174.
- ◆ Dey, R., Pal K.K., Bhatt D.M., Chauhan, S.M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159: 371-394.
- ◆ Díaz-Zorita, M., Fernández, C.M.V. (2008). Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassán F., Garcia de Salamone, I.E. (eds.). Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. (pp.155-166).
- ◆ Dick, R.E., Quinn, J.P. (1995). Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Appl. Microbiol. Biotech.* 43: 545-550.
- ◆ Doran, J.W., Sarrantonio, M., Liebig, M. (1996). En: Soil health and sustainability. Sparks, D.L. (Ed.). *Adv. in Agron.* 56: 1-54.
- ◆ Doran, J.W., Zeiss, M.R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 15: 3-11.
- ◆ Drouillon, M., Merckx, R. (2003). The role of citric acid as a phosphorus mobilization mechanism in highly P-fixing soils. *Gayana Bot.* 60: 55-62.
- ◆ Duine, J.K. (1991). Quinoproteins-enzyme containing the cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptofan quinone. *Eur. J. Biochem.* 200: 271-284.

- ◆ Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R. (2000). Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2943-2950.
- ◆ Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., Fry, J.C. (2003). Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metalcontaminated soil. *App. Environ. Microbiol.* 69: 3223-3230.
- ◆ Espinosa-Victoria, D., López-Reyes L., De La Cruz-Benítez A. (2009). Use of 16S rRNA gene for characterization of phosphate-solubilizing bacteria associated whit corn. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 31-37.
- ◆ Fasim, F., Ahmed, N., Parson, R., Gadd, G.M. (2002). Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiol. Lett.* 213: 1-6.
- ◆ Fernandez, E. M., Giayetto, O. (2006). El cultivo de maní en Córdoba. Universidad Nacional de Río Cuarto. Primera Edición. Octubre 2006.
- ◆ Fernandez, L.A., Zalba, P., Gómez, M.A., Sagardoy, M.A. (2005). Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Inorgánico Aisladas de Suelos de la Región Sojera. *Ci. Suelo.* 23: 31-37.
- ◆ Fernández, L.A. Zalba, P., Gómez, M.A., Sagardoy, M.A. (2007). Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils.* 43: 805-809.
- ◆ Ferreira, A., Quecine, M.C., Lacava, P.T., Oda, S., Azevedo, J.L., Araujo, W.L. (2008). Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 287: 8-14.
- ◆ Fiant, S., Alonso, C., Fontana, T., Spinazzé, C., Costero, D., Augusto G., Pérez, C., Bonvehi, L, Fuentes, L., Meriggiola, P. (2013). Caracterización de la producción de maní (*Arachis hipogaea*) campaña 2012/2013. Bolsa de Cereales de Córdoba. XXVIII Jornada Nacional del maní. Córdoba, Argentina. Libro de resúmenes. (pp. 24-25).

- ❖ Fiske, E.H., Subbarow, Y. (1925). The solubilization of phosphate: the action of various organic compounds on dicalcium and tricalcium phosphate. *New Zealand J. Sci. Technol.* 33: 436-444.
- ❖ Flores-Encarnación, M., Sánchez-Cuevas, M., Ortiz-Gutiérrez, F. (2004). The PQQ-dehydrogenases. A novel example of bacterial quinoproteins. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 46: 47-59.
- ❖ Freire, J.R.J. (1984). Important limiting factors in soils for the *Rhizobium* legume symbiosis. En Alexander (Ed). *Biological Nitrogen Fixation: ecology, technology and physiology*. Plenum Publishing Corp., New York. (pp. 51-74).
- ❖ Fumero, M.V., Medeot, D.B., Albornoz, A.I., Bueno, M.A., Dardanelli, M.S. (2010). Estudios básicos en las señales de comunicación mutualista entre *Arachis hypogaea* y bacterias asociadas. Congreso Semana del Microbiólogo. VIII Edición ISBN 978-950-665-600-3, 8:20.
- ❖ Fundación Maní Argentino. (2011). Outlook del Cluster Manisero Argentino. <http://www.fundacionmani.org.ar>
- ❖ García de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47: 404-411.
- ❖ García de Salamone, I.E., Michelena, R., Rodríguez, A., Montemitoli, I., Gatti, S., Rorig, M. (2006). Ocurrencia de micorrizas vesículo arbusculares en plantas de maíz, soja y trigo en sistemas de siembra directa. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.* 26: 67-72.
- ❖ Giandana, E. (1997). El cultivo de maní: cultivares. Manual de maní. Segunda Edición. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi (INTA).
- ❖ Gianinazzi, S., Schuepp, H. (1994). En: *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhauser Verlag, Basel. (p. 226).
- ❖ Giayetto, O., Cerioni, G., Asnal, W., Cisneros, J. (1998). III Reunión Nacional de Oleaginosas, Bahía Blanca, Argentina.

- ◆ Girvan, M.S., Bullimore, J., Ball, A.S., Pretty, J. N., Osborn, A.M. (2004). Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2692-2701.
- ◆ Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-17.
- ◆ Glick, B.R. (2012). Plant growth promoting bacteria: Mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation Scientifica. Vol. 2012, Article ID 963401, T. Ano, G. Comi, Shoda, M. (Eds). Doi.org/10.6064/2012/963401.
- ◆ Glick, B.R., Patten C.L., Holguin G., Penrose, D.M. (1999). Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK.
- ◆ Goldstein, A.H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphate historical perspectiv and future prospects. *Am. J. Altem. Agric.* 1: 51-57.
- ◆ Goldstein, A.H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hortic.* Vol. 12.
- ◆ Goldstein, A.H. (2000). Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology. Proc.4<sup>th</sup> Int. Fert. Assoc. Tech.Conf. IFA, Paris. (p. 220).
- ◆ Goldstein, A.H. (2007). Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. En: Velazquez, E., Rodriguez-Barrueco, C. (Eds) First International Meeting on Microbial phosphate solubilization. Springer, Dordrecht. (pp. 91- 96).
- ◆ Goldstein, A.H., Braverman, K., Osorio, N. (1999). Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 295-300.
- ◆ Goldstein, A.H., Liu, S.T. (1987). Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *BioTechnol.* 5: 72-74.

- ◆ Goosen, N., Horsman, H.P., Huinen, R.G., van de Putte, P. (1989). *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171: 447-455.
- ◆ Gorlach-Lira, K., Stefaniak, O., Slizak, W., Owedyk, I. (1997). The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup. *Microbial Res.* 152: 319-329.
- ◆ Grimes, H.D., Mount, M.S. (1984). Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biol. Biochem.* 16: 27-30.
- ◆ Gulati, A., Rahi, P., Vyas, P. (2008). Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from rhizosphere of seabuckthorn growing in cold deserts of Himalayas. *Curr. Microbiol.* 56: 73-79.
- ◆ Gupta, R., Singal, R., Shanker, A., Kuhad R.C., Saxena, R.K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Gen. Applied Microbiol.* 40: 255-260.
- ◆ Gupta, R.P., Vyas, M.K., Pandher, M.S. (1998). Role of phosphorus solubilizing microorganisms in P-economy and crop yield. En: *Soil-Plant-Microbe Interaction in Relation to Nutrient Management* Ed. Kaushik, B.D. (pp. 95-101). New Delhi: Venus Printers and Publishers.
- ◆ Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L.J. (1998). Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World J. Microbiol. Biotech.* 14: 669-673.
- ◆ Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L., Sessitsch, A. (2004). Comparison of Diversities and Compositions of Bacterial Populations Inhabiting Natural Forest Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5057-5065.
- ◆ Halder, A.K., Mishra, A.K., Bhattavharya, P., Chakrabartty, P.K. (1990). Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* an *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 81-92.

- ◆ Han, S.H., Kim, C.H., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, S.M., Park, S.K., Kim, K.Y., Krishnan, H.B., Kim, Y.C. (2008). Inactivation of *pqq* genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 282: 140-146.
- ◆ Handelsman, J., Stabb, E.V. (1996). Biocontrol of soil borne plant pathogens. *Plant Cell.* 8: 1855-1869.
- ◆ Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci.* 48: 89-93.
- ◆ Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463-471.
- ◆ Hartmann, M., Fliessbach, A., Oberholzer, H.R., Widmer, F. (2006). Ranking of crop and long-term farming system effects based on soil bacterial genetic profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 378-388.
- ◆ Hartmann, M., Widmer, F. (2006). Community Structure Analyses Are More Sensitive to Differences Soil Bacterial Communities than Anonymous Diversity Indices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7804-7812.
- ◆ He, K., Nukada, H., Urakami, T., Murphy, M.P. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems. *Biochem. Pharmacol.* 65: 67-74.
- ◆ Herschkovitz, Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballer, M., Hartmann, A., Okon, Y., Jurkevitch, E. (2005)a. Inoculation with the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbiol. Ecol.* 50: 277-288.
- ◆ Herschkovitz, Y., Lerner, A., Okon, Y., Jurkevitch, E. (2005)b. *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*). *Environ. Microbiol.* 11: 1847-1852.
- ◆ Herter, T., Berezina, O.V., Zinin, N.V., Velikodvorskaya, G.A., Greiner, R., Borriss, R. (2006). Glucose-1-phosphatase (*agpE*) from *Enterobacter cloacae* displays enhanced phytase activity. *Appl. Microbiol. Biotech.* 70: 60-64.

- ◆ Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241.
- ◆ Hoagland, D., Arnon, D.I. (1950). Water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347.
- ◆ Huff, J.P., Grant, B.J., Penning, C.A., Sullivan, K.F. (1990). Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *BioTechniques.* 9: 570-577.
- ◆ Hwangbo, H., Park, R.D., Kim, Y.W., Rim, Y. S., Park, K. H., Kim, T. H., Suh, J. S., Kim, K. Y. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. *Curr. Microbiol.* 47: 87-92.
- ◆ Ibañez, F., Angelini, J., Taurian, T., Tonelli, M.L., Fabra, A. (2009). Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Syst. Appl. Microb.* 32: 49-55.
- ◆ Illmer, P., Schinner, F. (1992). Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389 -395.
- ◆ Illmer, P., Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 257-263.
- ◆ INSA-INDELMA S.A. (2005). Productos. En <http://www.insamani.com.ar>. Noviembre, 2011.
- ◆ Insam, H. (2001). Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma.* 100: 389-402.
- ◆ Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2391-2396.
- ◆ Jeffries, P. Gianinazzi, S., Peroto, S.,Turnau, K., Barea, J.M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils.* 37: 1-16.
- ◆ Johnsen, K., Jacobsen, C.S., Torsvik, V., Sørensen, J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biol. Fertil. Soils.* 33: 443-453.

- ◆ Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G., van Hess, P.A.W. (2003). Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil*. 248: 31-41.
- ◆ Jorquera, M.A., Hernandez, M.T., Rengel, Z., Marschner, P., Mora, M. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytatemineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol. Fertil. Soils*. 44: 1025-1034.
- ◆ Joseph, S., Jisha, M.S. (2009). Buffering Reduces Phosphate Solubilizing Ability of Selected Strains of Bacteria. *World J. Agric. Sci*. 5: 135-137.
- ◆ Kennedy, A.C., Smith, K.L. (1995). Soil microbial diversity and sustentability of agricultural soils. *Plant Soil*. 170: 75-86.
- ◆ Khairnar, N.P., Misra, H.S., Apte, S.K. (2003). Pyrroloquinoline-quinone synthesized in *Escherichia coli* by pyrroloquinoline-quinone synthase of *Deinococcus radiodurans* plays a role beyond mineral phosphate solubilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 312: 303-308.
- ◆ Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. (2007). Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. A review. *Agron Sustainable Develop*. 27: 29-43.
- ◆ Killham, K. (1994). En: Soil Ecology. Cambridge Univesity Press, Cambridge, United Kingdom.
- ◆ Kim, K.Y., Jordan, D., Krishnan, H.B. (1997). *Rahnella aqualitidis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxiapatite. *FEMS Microbiol. Lett*. 153: 273-277.
- ◆ Kim, K.Y., Jordan, D., Krishnan, H.B. (1998). Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett*. 159: 121-127.
- ◆ Kim, C.H., Han, S.H., Kim, K.Y., Cho, B.H., Kim, Y.H., Koo, B.S., Kim, Y.C. (2003). Cloning and expression of pyrroloquinoline quinine (PQQ) genes from a phosphate solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. *Curr. Microbiol*. 47: 457-461.

- ❖ Kim, Y-H, Kim C-H, Han, S.H., Kang, B.R., Cho, S.M., Lee, M.C., Kim, Y.C. (2006). Expression of *pqq* genes from *serratia marcescens* W1 in *Escherichia coli* inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Pathol.* 22: 323-328.
- ❖ Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* 58: 169-188.
- ❖ Kishnaraj, P.U., Goldstein, A.H. (2001). Cloning a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli* in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 215-220.
- ❖ Kloepper, J.W., Lifshitz R., Zablotowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
- ❖ Kloepper, J.W., Lifshitz R., Scgroth, M.N. (1988). *Pseudomonas* Inoculants to Benefit Plant Production. ISI Atlas of Science, Animal and Plant Science Institute for Public Information, Philadelphia, USA. (pp. 60-64).
- ❖ Kpombrekou, K., Tabatabai, M.A. (1994). Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.* 158: 442-453.
- ❖ Kucey, R.M.N., Janzen, H.H., Legget, M.E. (1989). Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42: 199-228.
- ❖ Kuldeep, J.P., Singh, A.K., Nareshkumar, G., Archana, G. (2010). Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Appl. Soil Ecol.* 44:252-261.
- ❖ Kumar, V., Rishi Kumar, R.B., Narula, N. (2001). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiol. Res.* 156: 87-93.
- ❖ Kuklinsky-Sobral, J., Welington, L.A., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L. (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil.* 273: 91-99.

- ◆ Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F., Lemanceau, P. (1996). The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2449-2456.
- ◆ Lin, Q., Zhao, M., Chen, Y. (2007). Effects of 2,4-dichlorophenol, pentachlorophenol and vegetation on microbial characteristics in a heavy metal polluted. *Soil J. Environ. Sci. Health B.* 42:551-557.
- ◆ Liu, T.S., Lee, L.Y., Tai, C.Y., Hung, C.H., Chang, Y.S., Wolfram, J.H., Rogers, R., Goldstein, A.H. (1992). Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme Pyrroloquinoline. *J. Bacteriol.* 174: 5714-5819.
- ◆ Loganathan, P., Nair S. (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt tolerant, nitrogen-fixing and phosphate solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1185-1190.
- ◆ López, L., Pozo, C., Gómez, M.A., Calvo, C., González López, J. (2002). Studies on the effects of the insecticide aldrin on aquatic microbial populations. *Biodet. Biodeg.* 50: 83-87.
- ◆ Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (1992). Short, interspersed DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525-4529.
- ◆ Magnusson, O. T., Toyama, H., Saeki, M., Rojas, A., Reed, J.C., Liddington, R.C., Klinman, J.P., Schwarzenbacher, R. (2004). Quinone biogenesis: Structure and mechanism of PqqC, the final catalyst in the production of pyrroloquinoline quinine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101: 7913-7918.
- ◆ Margelef, D. (1958). Information theory in ecology. *General Systematics.* 3: 36-71.
- ◆ Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 889 pp 2<sup>nd</sup> Ed Academic Press, San Diego, CA.
- ◆ March, G.J., Marinelli, A. (2005). En: *Enfermedades del maní en argentina*. ISBN 987-43- 8755-6.

- ◆ Martínez-Toledo, M.V., Salmeron, V., Gonzalez-Lopez, J. (1992). Effect of organophosphorous insecticide, phenofos on agricultural soil microflora. *Chemosphere*. 24: 71-80.
- ◆ Matsushita, K., Toyama, H., Yamada, M., Adachi, O. (2002). Quinoproteins: structure, function and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 13-22.
- ◆ Meade, H., Long, S., Ruvkun, G., Brown, S., Ausubel, F. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic *Rhizobium meliloti* mutants induced by Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149: 114-122.
- ◆ Mehta, S., Nautiyal, Ch. Sh. (2001). An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 51-56.
- ◆ Meulenbergh, J.J.M., Sellink, E., Riegman, N.H., Postma, W. (1992). Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. *Mol. Gen. Genet.* 232: 284-294.
- ◆ Meyer, J.B., Frapolli, M., Keel, C., Maurhofer, M. (2011). Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene pqqC, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 7345-7354.
- ◆ Mijangos, I., Becerril, J.M., Albizu, I., Epelde, L., Garbisu, C. (2009). Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biol. Biochem.* 41: 505-513.
- ◆ Miller, J.H. (1972). En: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbory, NY. (p. 433).
- ◆ Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2012). Perfil del maní: situación y perspectivas. <http://todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=21039>.
- ◆ Misra, H.S., Khairnar, N.P., Barik, A., Indira, P.K. (2004). Pyrroloquinoline-quinone: a reactive oxygen species scavenger in bacteria. *FEBS Lett.* 578: 26-30.
- ◆ Mohammadi, K., Ghalavand, A., Aghaalikhani, M., Heidari, G.R., Sohrabi, Y. (2011). Introducing the sustainable soil fertility system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Afr. J. Biotech.* 10: 6011-6020.

- ◆ Moorman, T.B. (1989). A review of pesticides effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. *J. Product. Agric.* 2: 14-23.
- ◆ Morris, C.J., Biville, F., Turlin, E., Lee, E., Ellermann, K., Fan, W.H., Ramamoorthi, R., Springer, A.L., Lindstrom, M.E. (1994). Isolation, phenotypic characterization and complementation analysis of mutants in *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequence of *pqqD*, *pqqG*, and *pqqC*. *J. Bacteriol.* 176: 1746-1755.
- ◆ Moss, J.P., Ramanatha Rao, V. (1995). The peanut – reproductive development to plant maturity. En: eds. H.E. Pattee y H.T. Stalker, *Advenles in Peanut Science*. Am. Peanut Res. And Educ. Soc., Inc., Stilwater, OK. (pp. 1-13).
- ◆ Mudalagiriappa, S., Agasimani, C.S., Veeranna, H.K., Nanjappa, H.V. (1997). Growth analysis and pattern of dry matter accumulation in groundnut (*Arachis hypogea*) as influenced by phosphate solubilizers. *Crop Res.* 13: 541-546.
- ◆ Muller, L.E. (1961). Un aparato micro-Kjeldahl simple para análisis rutinarios rápidos de materias vegetales. *Turrialba.* 11:17-25.
- ◆ Murphy, J., Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphore in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* 27: 31-36.
- ◆ Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Microbiol.* 2: 317-322.
- ◆ Nahas, E. (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 567-572.
- ◆ Naiman, A.D., Latronico, A.E., García de Salamone, I.E. (2009). Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Soil Biol.* 45: 44-51.
- ◆ Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265-270.
- ◆ Nehl, D.B., Allen, S.J., Brown, J.F. (1997). Deleterious rhizosphere bacteria: An integrating perspective. *Appl. Soil Ecol.* 5: 1-20.

- ◆ Neumann, G., Romheld, V. (2000). The release of root exudates as affected by the plant physiological status. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* (Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, Z., Eds.). (pp. 41-93). Marcel Dekker, New York.
- ◆ Ngoma, L., Babalola, O., Ahmad, F. (2012). Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Scient. Research and Essays*. 7: 4003-4013.
- ◆ Nicholson P.S., Hirsch, P.R. (1998). The effects of pesticides on the diversity of culturable soil bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 84: 551-558.
- ◆ O'Donnel A.G., Goodfellow M., Hawksworth, D.L. (1994). Theoretical practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganism. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 345: 65-73.
- ◆ Ogut, M., Er, F., Kandemir, N. (2010). Phosphate solubilization potentials of soil *Acinetobacter* strains. *Biol. Fertil. Soils*. 46: 707-715.
- ◆ Pal, S.S. (1998). Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant Soil*. 198: 169-177.
- ◆ Pal, R., Chakrabarti, K., Chakraborty, A., Chowdhury, A. (2006). Effect of pencycuron on microbial parameters of waterlogged. *Soil J. Environ. Sci. Health B*. 41: 1319-1331.
- ◆ Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (1997). En: Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- ◆ Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol.* 10:94 doi:10.1186/1471-2180-10-94.
- ◆ Pedelini, R. (1997). El cultivo de maní: suelo, rotación de cultivos. En: Manual de maní. Segunda edición. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi (INTA).
- ◆ Pedelini, R. (2008). Maní, guía práctica para su cultivo. INTA-FMA; Manfredi (Cba.) - Argentina.
- ◆ Pedelini, R. (2012). Maní, guía práctica para su cultivo. INTA-FMA; Manfredi (Cba.) - Argentina.

- ◆ Pedraza, R.O., Teixeira, K.R.S., Fernández Scavino, A., García de Salamone, I., Baca, B.E., Azcón, R., Baldani, V.L.D., Bonilla, R. (2010). Microorganisms that enhance plant growth and soil quality. Review. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11: 155-164.
- ◆ Peix, A., Rivas-Boyer, A.A., Mateos, P.F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33: 103-110.
- ◆ Pérez, E., Sulbarán, M., Ball, M.M., Yarzabal, L.A. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the southeastern Venezuelan region. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2905-2914.
- ◆ Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., Laval, G., Lebeau, T., Lemanceau, P., Leyval, C., Lindström, K., Pandard, P., Romero, E., Sarr, A., Schloter, M., Simonet, P., Smalla, K., Wilke, M., Martin-L, F. (2011). Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality – Method to directly extract DNA from soil samples. *J. Mic. Methods.* 84: 454-460.
- ◆ Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J. Agr. Environ. Ethic.* 8: 17-29.
- ◆ Podile, A.R., Kishore, G.K. (2006). En: Plant- Associated Bacteria: Plant growth-promoting rhizobacteria, Part 2. (pp. 195-230).
- ◆ Polonenko, D.R., Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C.A., Laliberte, M., Zaleska, I. (1987). Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* 33: 498-503.
- ◆ Poly, F., Jocteur Monrozier, L., Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152: 95-103.
- ◆ Pretty, J.N., Mason, C.F., Nedwell, D.B., Hine, R.E. (2003). Environmental costs of freshwater eutrophication in England and Wales. *Environ. Sci. Technol.* 37: 201-208.

- ◆ Pretty, J., Brett, C., Gee, D., Hine, R., Mason, C.F., Morison, J.I.L., Raven, H., Rayment, M., van der Bijl, G. (2000). An assessment of the total external costs of UK agriculture. *Agric. Syst.* 65: 113-136.
- ◆ Puente, M.E., Bashan, Y., Li C.Y., Lebsky, V.K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, I: root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6: 629-642.
- ◆ Puehringer, S., Metlitzky, M., Schwarzenbacher, R. (2008). The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochem.* 9:8.doi:10.1186/1471-2091-9-8.
- ◆ Puig. (2004). Boletín INTA N° 307.
- ◆ Quiquampoix, H., Mousain, D. (2005). En: Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: B. L. Turner, E. Frossard y D. S. Baldwin (Eds.). *Organic phosphorus in the environment*. CAB International. (pp. 89-108).
- ◆ Raghothama, K.G., Karthikeyan, A.S. (2005). Phosphate acquisition. *Plant Soil.* 274: 37-49.
- ◆ Ramachandran, K., Srinivasan, V., Hamza, S., Anandaraj, M. (2007). Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum L.*) cuttings. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. (pp. 325-331).
- ◆ Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6: 139-144.
- ◆ Reyes, I., Alvarez, L., El-ayoubi, H., Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro.* 20: 37-48.
- ◆ Richarson, A.E. (1994). Soil microorganismos and phosphorus availability. En: *Soil Biota, Management in Sustainable Farming Systems*. C.E. Pankhurst, B.M. Doubbe, V.V.S.R. Gupts y P.R. Grace (Eds.). (pp 50-62). CSIRO, Melbourne, Australia.
- ◆ Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E., O'Hara, C.P., Simpson, R.J. (2001). Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil-microorganisms. *Plant Soil.* 229: 47-56.

- ◆ Rivas, R., Peix, A., Mateos, P.F., Trujillo, M.E., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. (2007). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. (pp. 23-33).
- ◆ Rodriguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17: 319-339.
- ◆ Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287: 15-21.
- ◆ Rojas, D.F., Garrido, M.F., Bonilla, R.B. (2009). Standardization of a complex culture media for multiplication of C50 *Rhizobium* sp. Strain. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 10: 70-80.
- ◆ Ruda de Schenquer, E.E., Mongiello, A., Acosta, A. (2004). Contaminación y salud del suelo. CETEA. UNL. (pp. 14).
- ◆ Sainz Rozas, H., Echeverria, H., Angelini, H. (2012). Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región Pampeana y ExtraPampeana argentina. *RIA Vol. 38 N° 1.*
- ◆ Saleh-Lakha, S., Glick, B.R. (2007). En: Plant growth promoting bacteria. (pp. 503-520) en: Cap.20 Modern Soil Microbiology. Jan Dirk van Elsas, Janet K. Jansson, Jack T. Trevors (Eds.)
- ◆ Sarita, S., Sharma, P., Priefer, U., Prell, J. (2005). Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolate. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 1-11.
- ◆ Sashidhar, B., Podile, A.R. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1-12.
- ◆ Sambrook J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (2001). En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- ◆ Saubidet, M.I., Barneix, A.J. (2004). Crecimiento y acumulación de nitrógeno en plantas de trigo inoculadas con rizobacterias, en hidroponía. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone, I.E., Miyazaki, S.S. (Eds.). *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. (pp. 187-193).
- ◆ Schlüter, P.M., Harris, S.A. (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes*. 6: 569-572.
- ◆ Seong, J.Y., Yun, J.C., Hae, K.M., Kwang, K.C., Jin, W.K., Sang, C.L., Yeon, H.J. (1996). Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Tech.* 18: 449-454.
- ◆ Shen, Y-Q, Bonnot, F., Imsand, E.M., RoseFigura, J.M., Sjölander, K., Klinman, J.P. (2012). Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. *Biochem.* 51: 2265-2275.
- ◆ Shen, W., Lin X., Gao, N., Zhang, H., Yin, R., Shi, W., Duan, Z. (2008). Land use intensification affects soil microbial populations, functional diversity and related suppressiveness of cucumber Fusarium wilt in China's Yangtze River Delta. *Plant Soil*. 306: 117-127.
- ◆ Simonsen, L., Fomsgaard, I.S., Svensmark, B., Spliid, N.H. (2008). Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *J. Environ. Sci. Health B*. 43: 365-375.
- ◆ Simpson, E.H. 1(949). Measurement of diversity. *Nature*. 163: 688.
- ◆ Singh, J., Singh, D. (2005). Dehydrogenase and phosphomonoesterase activities in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) field after diazinon, imidacloprid and lindane treatments. *Chemosphere*. 60: 32-42.
- ◆ Smit, E., Leeftang, P., Wernars, K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 249-261.

- ◆ Smith, E., Leeﬂang, P., Glandorf, B., van Elsas J.D., Wernans, K. (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2614-2621.
- ◆ Son, H.J., Park, G.T., Cha, M.S., Heo, M.S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technol.* 97: 204-210.
- ◆ Song, O.R., Lee, S.J., Lee, Y.S., Lee, S.C., Kim, K.K., Choi, Y.L. (2008). Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA 23 isolated from cultivated soil. *Brazil J. Microbiol.* 39: 151-156.
- ◆ Stadnyk, L., Campbell, R.S., Jhonson, B.T. (1971). Pesticide effect on growth and <sup>14</sup>C-assimilation in a fresh water alga. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 6: 1-6.
- ◆ Stalker, H.T. (1997). Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crops Research Elsevier.* 53: 205-217.
- ◆ Stites, T.E., Mitchell, A.E., Rucker, R.B. (1999). Physiological importance of quinoenzymes and the o-quinone family of cofactors. *Amer. Soc. Nutr. Sci.* (pp. 719-727).
- ◆ Stevenson, F.J. (2005). *Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients.* JohnWiley and Sons, New York.
- ◆ Subbarao, N.S. (1988). Phosphate solubilizing micro-organism. En: *Biofertilizer in agriculture and forestry.* Regional Biofert. Dev. Centre, Hissar, India. (pp. 133-142).
- ◆ Sudarma, I.M., Suprpta, D.N. (2011). Diversity of soil microorganisms in banana habitats with and without *Fusarium* wilt symptom. *J. ISSAAS.* 17: 147-159.
- ◆ Sundara, B., Natarajan, V., Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Res.* 77: 43-49.
- ◆ Sun, H.Y., Deng, S.P., Raun, W.R. (2004). Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5868-5874.

- ❖ Takahashi, S., Anwar, M.R. (2007). Wheat grain yield, phosphorus uptake and soil phosphorus fraction after 23 years of annual fertilizer application to an Andosol. *Field Crops Research*. 101: 160-171.
- ❖ Taurian, T., Anzuay, M.S., Angelini, J.G., Tonelli, M.A., Ludueña, L., Pena, D., Ibañez, F., Fabra, A. (2010). Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant Soil*. 329: 421-431.
- ❖ Taurian, T., Anzuay, M.S., Ludueña, L.M., Angelini, J.G., Muñoz, V., Valetti, L., Fabra, A. (2013). Effects of single and co-inoculation with native phosphate solubilising strain *Pantoea* sp J49 and the symbiotic nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 on peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth. *Symbiosis*. 59: 77-85.
- ❖ Thien, S.J., Myers, R. (1992). Plant growth substances produced by *A. brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environment. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- ❖ Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Poolasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 418:671-677.
- ❖ Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., Ovreas, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64: 53-62.
- ❖ Tripura, C., Sashidhar, B., Podile, A.R. (2007). Ethyl methanesulfonate mutagenesis-enhanced mineral phosphate solubilization by groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5. *Curr. Microbiol.* 54: 79-84.
- ❖ Trivedi, P., Sa, T. (2008). *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr. Microbiol.* 56: 140-144.
- ❖ Valverde, C., Ferrari, A., Wall, L.G. (2002). Phosphorus and the regulation of nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* BCU110501. *New Phytologist*. 153: 43-52.
- ❖ Valverde, A., Delvasto, P., Peix, A., Velázquez, E., Santa Regina, I., Ballester, A., Rodríguez-Barrueco, C., García-Balboa, C., Igual, J.M.(2006). *Burkholderia*

- ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2421-2425.
- ◆ van Elsas, J.D., Trevors, J.T. (1997). En: *Modern Soil Microbiology*. van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.) New York: Marcel Dekker.
  - ◆ Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 60: 407-438.
  - ◆ Vázquez, P. (1996). Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociadas a la rizosfera de los mangles: *Avicennia germinans* (L.) L. y *Laguncularia racemosa* (L.) Gerth. Tesis para el título de Biólogo marino. Univ. Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S.
  - ◆ Vázquez, P., Holguin G., Puente M.E., Lopez-Cortes A., Bashan Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* 30: 460-468.
  - ◆ Versalovic, J., Schneider, M., Bruijin, F., Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell Bio.* 5: 25-40.
  - ◆ Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255: 571-586.
  - ◆ Vidal, J. (2007). Buen año para producción manicera: El maní se está agrandando. *Clarín*, 01/01/2007.
  - ◆ Vincent, J.M. (1970). En “Manual Práctico de la Rizobiología” Editorial Hemisferio Sur.
  - ◆ Vikram, A., Alagawadi, A.R., Krishnaraj, P.U., Kumar, M. (2007). Transconjugation studies in *Azospirillum* sp. negative to mineral phosphate solubilization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1333-1337.
  - ◆ Vyas, P., Gulati, A. (2009). Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol.* 9: 174.

- ◆ Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BoiTech. 10*: 506-513.
- ◆ Wan, J.H.C., Wong, M.H. (2004). Effects of earthworm activity and P-solubilizing bacteria on P availability in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci. 167*: 209-213.
- ◆ Wardle, D.A., Parkinson, D. (1990). Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant Soil. 122*: 21-28.
- ◆ Wei, D., Yang, Q., Zhang, J-Z., Wang, S., Chen, X-L., Zhang, X-L. (2008). Bacterial Community Structure and Diversity in a Black Soil as Affected by Long-Term Fertilization. *Pedosphere. 18*: 582-592.
- ◆ Weller, D.M., Cook, R. (1986). Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol. 8*: 328-344.
- ◆ White, P.J., Hammond, J.P. (2008). Phosphorus nutrition of terrestrial plants. En: White, P.J., Hammond, J.P. (Eds). *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. Springer, Dordrecht. (pp. 51-81).
- ◆ Whitelaw, M.A. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron. 66*: 99-151.
- ◆ Whiting P.H., Midgley M., Dawes E.A. (1976). The regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate and of glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. 154*: 659-668.
- ◆ Yahalom, E., Okon, Y., Dovrat, A. (1988). Early nodulation in legumes inoculated with *Azospirillum* and *Rhizobium*. *Symbiosis. 6*: 69-80.
- ◆ Yang, X.-P., Zhong, J.-F., Lin, J.-P., Mao, B.-D., Wei, D.-Z. (2010). Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans* pqqABCDE gene cluster. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37*: 575-580.
- ◆ Yi, Y., Huang, W., Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World J. Microbiol. Biotechnol. 24*: 1059-1065.

- ❖ Young, C.C., Chang, C.H., Chen, L.F., Chao, C.C. (1998). Characterization of the nitrogen fixing and ferric phosphate solubilizing bacteria isolated from Taiwan soil. *J. Chin. Agricult. Chem. Soc.* 36: 201-210.
- ❖ Yukl, E.T., Wilmont, C.M. (2012). Cofactor biosynthesis through Protein Post-Translational modification. *Cur. Opinion Chem. Biol.* 16: 54-59.
- ❖ Zhang, X., Hai, R., Wei, J., Cui, Z., Zhang, E., Song, Z., Yu, D. (2009). MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis. *BMC Microbiol.* 9:205 doi:10.1186/1471-2180-9-205.

73215

U.N.R.C  
Biblioteca Central



73215