

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**



Trabajo Final presentado para optar al Grado de  
Ingeniero Agrónomo

**Solubilización de fosfatos por *Sinorhizobium meliloti* B399 y  
otras cepas bacterianas y ensayos de coinoculación de alfalfa en  
condiciones de invernáculo**

**Estudiante: DOMÍNGUEZ DIEGO  
DNI: 33532958**

**Director: Dr. Javier Alberto ANDRÉS  
Co-Directora: Ing. Agrónoma Carla BRUNO**

Río Cuarto – Córdoba  
10 de Junio de 2015

## ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Hipótesis.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos.....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Medio inicialmente descrito por Frioni (1992) y modificado por Rosas <i>et al.</i> , (2006) con variaciones en la fuente de P.....	10
2.1.2 Medio Pikovskaya (PVK), original y variando la fuente de P.....	10
2.1.3 Medio NBRIP, original y variando la fuente de P.....	11
<b>2.2 Ensayos de coexistencia entre las cepas bacterianas B399, CHAO y R19.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Ensayos de inoculación y/o coinoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo.....</b>	<b>11</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Ensayos de coexistencia entre las cepas bacterianas.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Ensayos de inoculación y/o co-inoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo.....</b>	<b>19</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>24</b>
<b>6. ANEXO.....</b>	<b>28</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
<b>TABLA 1.</b> Medio FRIONI, original y variando la fuente de fósforo.....	13
<b>TABLA 2.</b> Medio PVK, original y variando la fuente de fósforo.....	14
<b>TABLA 3.</b> Medio NBRIP, original y variando la fuente de fósforo.....	15
<b>TABLA 4:</b> Parámetros de la parte radical de plántulas de alfalfa inoculadas con <i>Sinorhizobium meliloti</i> B399, <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0 y <i>Bacillus</i> spp. R19.....	19
<b>TABLA 5:</b> Parámetros de la parte aérea de plántulas de alfalfa inoculadas con <i>Sinorhizobium meliloti</i> B399, <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0 y <i>Bacillus</i> spp. R19. ....	20

## ÍNDICE DE FOTOS

*Página*

- Foto 1.** Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las Cepas Bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Bacillus* spp. R19 en siembra simultánea.....16
- Foto 2.** Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las Cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Bacillus* spp. R19 en siembra espaciada en el tiempo.....16
- Foto 3.** Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0 en siembra espaciada en el tiempo.....17
- Foto 4.** Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0, en siembra espaciada.....17
- Foto 5.** Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Bacillus* spp. R19, en siembra espaciada.....18

## **RESUMEN**

El fósforo (P) es el macronutriente limitante del crecimiento vegetal más importante en el suelo luego del nitrógeno ya que cumple un papel significativo en varios procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta. La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de P total, pero sólo una pequeña proporción de P está inmediatamente disponible en la solución como aniones de ortofosfato para ser tomado por los vegetales. Para poder satisfacer los requerimientos de la planta debe darse respuesta a partir de otras fuentes de P cuando los niveles críticos son bajos. En este contexto, los microorganismos juegan un papel fundamental mediando en la movilización del P para las plantas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de solubilizar fosfatos desde diversas fuentes por cepas *Sinorhizobium meliloti* B399, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y *Bacillus spp.* R19 y evaluarlos en ensayos de inoculación simple y mixta en alfalfa.

En ningún caso las cepas *S. meliloti* B399, *P. fluorescens* CHA0 y *Bacillus spp.* R19 formaron halo en los medios donde el fósforo estaba ligado al Fe y Al y el crecimiento de éstas en estos medios fue inferior al observado en los medios donde el fósforo estaba ligado al Ca, sin embargo la solubilización, aunque escasa, se llevó a cabo.

Las tres cepas utilizadas, crecieron en todos los medios de cultivo, aunque lo hacen mejor en los medios suplementados con calcio.

La coinoculación no mejoró los parámetros de crecimiento respecto de las inoculaciones simples, aun así se pudo observar que en condiciones de baja disponibilidad de fosforo, ambas inoculaciones favorecen el desarrollo de las plántulas.

## **ABSTRACT**

Phosphorus (P) is the limiting macronutrient most important plant growth in soil after nitrogen. It plays a significant role in several physiological and biochemical processes of the plant. Most agricultural soils contain large reserves of total P, but only a small proportion of P is immediately available in the solution as orthophosphate anions to be taken by plants. In order to meet the requirements, the plant must be answered from other sources of P when the critical levels are low. In this context, microorganisms play a major role in mediating the mobilization of P for plants.

The aim of this work was to study the ability to solubilize phosphate from different sources by strains *Sinorhizobium meliloti* B399, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and *Bacillus* spp. R19 and to evaluate trials of simple and mixed inoculation in alfalfa.

In any case the strains *S. meliloti* B399, *P. fluorescens* CHA0 and *Bacillus* spp. R19 formed halo in media when phosphorus was bound to Fe and Al and their growth in the media was less than observed in the media where the phosphorus was linked to Ca, however solubilization is was carried out.

The three strains used grew in all culture media, although they do better in media supplemented with calcium.

Co-inoculation did not improve growth parameters regarding in single inoculations. Yet it was observed that under low phosphorus availability, both inoculations favor the development of seedlings.

## 1.- INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un elemento crítico en los ecosistemas naturales y agrícolas de todo el mundo. Es el macronutriente limitante del crecimiento vegetal más importante en el suelo luego del nitrógeno ya que cumple un papel significativo en varios procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta, tales como fotosíntesis, transformación de azúcares en almidón y almacenamiento/transporte de la información genética (Barber 1995). La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de P total debido a la aplicación regular de fertilizantes químicos o de los procedentes del tratamiento de aguas residuales (Ravindra *et al.*, 2008). La baja disponibilidad se debe a la alta reactividad del P con calcio (Ca), hierro (Fe) y aluminio (Al). Los suelos alcalinos contienen diferentes fosfatos de Ca, como hidroxiapatita y fluoroapatita mientras que los suelos ácidos incluyen fosfatos amorfos de Fe y Al, variscita ( $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), estrengita ( $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y minerales similares (Barber, 1995). Una importante porción de los fosfatos inorgánicos se adsorben en óxidos e hidróxidos de Fe y Al, minerales de arcillas y sustancias orgánicas las cuales contienen complejos de Fe o Al. Los compuestos orgánicos con P pueden ser mineralizados (o enzimáticamente lisados) a fin de tornar al P disponible para las plantas. Como resultado, las plantas superiores dependen de los procesos de difusión y de una continua liberación desde las fuentes insolubles a fin de poder cubrir sus demandas en P. Además, buena parte de los fosfatos inorgánicos aplicado al suelo como fertilizante es rápidamente inmovilizada después de la aplicación y no está disponible para plantas (Yadav y Dadarwal, 1997)

Las plantas obtienen el P como aniones de ortofosfato, predominantemente en las formas de  $\text{HPO}_4^{-2}$  y  $\text{HPO}_4^{-1}$  desde la solución del suelo. En la mayoría de los suelos, la concentración de ortofosfatos en solución es baja y debe darse respuesta a partir de otras fuentes de P para poder satisfacer los requerimientos de la planta (Richardson *et al.*, 2009).

Los microorganismos del suelo pueden influir en la disponibilidad de P para las plantas, ya sea en su rol de descomponedores de la materia orgánica como de movilizadores de P inorgánico (en asociación y competencia con las plantas).

Numerosas especies bacterianas asociadas a la rizósfera pueden causar efectos benéficos sobre las plantas (Glick, 1995). Tales grupos bacterianos son conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) del inglés plant growth promoting rhizobacteria (Kloepper, 1978) y, entre ellas, se incluyen a los microorganismos solubilizadores de fosfatos o sus siglas en inglés (PSM).

Las principales cepas bacterianas que presentan esta capacidad solubilizadora se ubican en los géneros *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Rodríguez y Fraga, 1999; Fernández *et al.*, 2007).

Un gran interés reviste la aplicación al suelo o a los cultivos de microorganismos solubilizadores de fosfatos, lo que permite incrementar la disponibilidad de P ya presente en el ambiente y reducir el empleo de fertilizantes químicos (Subba Rao, 1993; Rodríguez y Fraga, 1999)

Los microorganismos solubilizadores de fósforo pueden colaborar en aumentar la disponibilidad de P para el crecimiento vegetal solubilizando este mineral desde complejos y formas insolubles (Goldstein, 1986; Kucey *et al.*, 1989; Richardson, 1994). Además, estos microorganismos pueden mejorar el crecimiento de las plantas

incrementando la eficiencia de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) y la disponibilidad de otros elementos traza (como Fe y Zn) y produciendo sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Kucey *et al.*, 1989).

Los mecanismos más comunes que permiten la solubilización microbiana de fosfatos son la secreción de ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos y enzimas fosfatasas que facilitan la conversión de formas insolubles hacia P disponible para las plantas (Richardson, 2011)

La mayor parte de las investigaciones en el campo de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal se han centrado en conocer y mejorar el proceso de FBN, el cual involucra la simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias Gram negativas colectivamente conocidas como rizobios y que resulta en la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos en las cuales las bacterias fijan el N<sub>2</sub> a cambio de fuentes de carbono que reciben del vegetal.

La disponibilidad de P constituye uno de los principales limitantes para la FBN, afectando principalmente la formación de los nódulos. La respuesta positiva a la disponibilidad de P ha sido reportada en leguminosas tales como alfalfa, trébol, poroto, maní, garbanzo y gandul (Cassman *et al.*, 1981; Al-Niemi *et al.*, 1997; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2007, Wani *et al.*, 2007).

Varios aspectos del proceso de formación de los nódulos se ven limitados por la disponibilidad de P (Schulze *et al.*, 2006; Kouas *et al.*, 2005). Los nódulos de plantas que crecen con suficiente P presentan una concentración de este mineral superior a la que se puede encontrar en tallos y raíces, y en algunos casos esta cantidad llegó a representar el 1.5% del P total de la planta (Schulze *et al.*, 2006). Por su parte, plantas que crecieron en ambientes deficientes en P exhibieron un reducido suministro de carbohidratos a los nódulos lo que afectó la iniciación de la nodulación, el crecimiento de los nódulos ya formados y disminución marcada de la actividad nitrogenasa (Remans *et al.*, 2007). Otro estudio mostró que los bacteroides pudieron verse limitados en su requerimiento de P aún cuando la planta no evidenció este déficit (Al-Niemi *et al.*, 1997)

Sólo unos pocos investigadores informan sobre la capacidad de cepas de rizobios para solubilizar fosfatos (Chabot *et al.*, 1996, Halder *et al.*, 1992, Ahmad *et al.*, 2008).

La solubilización por *Rhizobium leguminosarum* permitió aumentar el crecimiento del maíz (*Zea mays*) y lechuga (*Lactuca sativa*) cuando se inoculó a la planta (Chabot *et al.*, 1996).

Existen numerosas publicaciones referidas al efecto positivo de la inoculación combinada de rizobios con bacterias de vida libre de los géneros *Pseudomonas* (Knigh y Langson-Unkefer, 1988; Rosas *et al.*, 2006) y *Bacillus* (Sindhu *et al.*, 2002) sobre distintas leguminosas. Estos efectos abarcan: inicio más temprano de la nodulación, incremento en el número de nódulos, incrementos en la tasa respiratoria de raíces y en la actividad nitrogenasa, mejor absorción de agua y nutrientes y un mejor estado general de la planta. La coinoculación con *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo incrementó el crecimiento, rendimiento y captura de nitrógeno, fósforo y otros minerales en sorgo y cebada (Bashan y Holguín, 1997).

Los microorganismos solubilizadores de fósforo son rutinariamente aislados por métodos de cultivos en placa con medios con fuente de P insoluble como el empleado por Rosas *et al.* 2006 y el muy difundido medio descrito por Pikovskaya en 1948 (más conocido como medio PVK). Estas pruebas, de relativa eficiencia, se llevan a cabo mediante la selección de los microorganismos que son capaces de producir un halo o zona clara alrededor de la colonia debido a la producción de ácidos orgánicos en el medio circundante.



Sin embargo, la fiabilidad de esta técnica se puso en duda dado que numerosos aislamientos, que no produjeron ningún halo visible, solubilizaron fosfatos inorgánicos en medio líquido. Una modificación sugerida en estos medios a fin de mejorar la claridad y visibilidad de los halos es la utilización del colorante azul de bromofenol suplementando al medio (Gupta *et al.*, 1994).

Una crítica que se le suele formular a los medios tradicionales es la presencia de extracto de levadura en su composición ya que siempre es deseable trabajar con medios definidos, en los que conocemos exactamente su composición, cuando se procura dilucidar el papel de los microorganismos en la mineralización o solubilización de nutrientes.

Por lo tanto, un nuevo medio definido, denominado NBRIP (sigla en inglés del Instituto Nacional de Investigación en Botánica de la India) fue propuesto como alternativo al medio PVK para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfatos (Nautiyal 1999).

Alfalfa (*Medicago sativa L.*) es la leguminosa forrajera más importante que se cultiva en el país, por la calidad de nutrientes que provee al sistema dietario. Esta leguminosa ha sido tradicionalmente la base de la producción forrajera y, junto al trigo, uno de los cultivos iniciadores de la agricultura pampeana. La gran difusión de su cultivo se debe también a su gran adaptabilidad a diferentes suelos y climas y al importante rol que juega en sostener la estructura y fertilidad de los suelos, especialmente cuando puede desarrollar la simbiosis fijadora de N<sub>2</sub> con cepas de rizobios (Muslera Pardo *et al.*, 1984; Viglizzo, 1995; Guiñazú, 2009).

La mayor superficie cultivada corresponde a la región pampeana subhúmeda y semiárida (provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y La Pampa) en donde las principales limitantes para la FBN son la disponibilidad de agua, acidez del suelo y bajo niveles de fósforo soluble (Hijano y Basigalup, 1995). La agricultura continua durante más de 20 años causó un considerable decrecimiento en el P extractable y, en menor medida, en el P inorgánico total (Urioste *et al.*, 1996)

En el área núcleo de Argentina, en condiciones de secano, la alfalfa puede producir entre 8 y 22 Ton. Ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> de materia seca, dependiendo de la disponibilidad hídrica del año (Hijano y Basigalup 1995). Esto implica para contenidos medios de proteína del 20%, un consumo cercano a los 500 kg.ha<sup>-1</sup>.año<sup>-1</sup> de nitrógeno, posibles de ser exportados del área de producción, cuando se utiliza como forraje de corte. Bajo condiciones de riego, con rendimientos que pueden superar las 28 Ton, las extracciones de nitrógeno se pueden aproximar a los 800 Kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Collino *et al.*, 1997; Racca *et al.*, 1998).

La utilización para la siembra de semillas pre inoculadas con rizobios de origen extranjero, cuya eficiencia y adaptación a las condiciones locales no siempre se conocen (Dubois, 1999), y con escasa capacidad de competencia ante las cepas naturalizadas, trae como consecuencia un bajo establecimiento de la nodulación y por consiguiente una escasa reposición del nitrógeno removido del suelo. Aun cuando la inoculación está relativamente difundida, en la actualidad no se ha determinado la proporción relativa de la FBN que proveen las cepas introducidas respecto de las nativas o naturalizadas, ni la competencia que se genera en el suelo, entre ellas, por la ocupación de los sitios potenciales para la formación de nódulos.

Por lo tanto, el desarrollo de productos biotecnológicos que involucren microorganismos rizosféricos reviste un gran interés a efecto de optimizar la FBN e incrementar la absorción de agua y nutrientes en los cultivos.

### **1.1.- Hipótesis:**

La solubilización microbiana de fosfatos a partir de una misma fuente insoluble se encuentra influenciada por la composición del medio de cultivo

La inoculación de alfalfa con microorganismos solubilizadores de fosfatos tiene un efecto promotor de la fijación biológica del nitrógeno y el crecimiento vegetal en condiciones de baja disponibilidad de fósforo

### **1.2.- Objetivo general:**

Estudiar la capacidad de solubilizar fosfatos desde diversas fuentes por microorganismos nativos y cepas de colección y evaluarlos en ensayos de coexistencia, inoculación simple y mixta en alfalfa.

### **1.2.- Objetivos específicos:**

- Caracterizar cepas de *Sinorhizobium meliloti* B399, *Pseudomonas fluorescens* CHAO y otras especies bacterianas en cuanto a su capacidad de solubilizar fosfatos de Ca, Fe y Al en diferentes medios de cultivo.
- Estudiar la coexistencia de la cepa bacteriana *Sinorhizobium meliloti* B399 con *Bacillus* spp. R19 y *Pseudomonas fluorescens* CHAO
- Evaluar cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 en inoculación simple y mixta con *Pseudomonas fluorescens* CHAO y *Bacillus* spp. R19 sobre el cultivo de alfalfa.

## 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.-Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P (fósforo) en medios alternativos:

En estos ensayos se emplearon diferentes cepas bacterianas, nativas y de colección, que se listan en la siguiente tabla:

Cepa	Características	Referencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	Producción de antibióticos, fitohormonas y solubilización de fosfatos	Défago <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> spp. R19	Aislamiento desde la rizosfera de soja, producción de antibióticos con capacidad antifúngica	Olmedo, 2002
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	Simbionte de alfalfa, fijación de nitrógeno. Cepa recomendada por INTA para inocular alfalfa en Argentina	Guiñazú <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas putida</i> SP22	Solubilización de fosfatos	Rosas <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas putida</i> PCI2	Producción de antibióticos, control biológico de fitopatógenos en tomate	Pastor <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus</i> spp. TO1	Aislamiento desde rastrojo de soja, producción de antibióticos con capacidad antifúngica	Audisio <i>et al.</i> , 2005
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> A86	Simbionte de soja, fijación de nitrógeno y resistencia al fungicida thiram	Andrés <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas aurantiaca</i> SR1	Producción de antibióticos, ácido indol acético e inductor de resistencia sistémica	Andrés <i>et al.</i> , 2011
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 3DOh13	Simbionte de alfalfa, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos	Rosas <i>et al.</i> , 2006

Para los ensayos de solubilización, los microorganismos se sembraron en cajas de Petri que contenían los diferentes medios a evaluar, presentando fuentes de fósforo insoluble, bajo las formas de fosfatos de Ca, Al y Fe.

Cada una de las cepas, aisladas y mantenidas en medio TSA 25%, fue sembrada por picadura en los siguientes medios de cultivo:

2.1.1- Etapa 1. Medio inicialmente descrito por Frioni (1992) y modificado por Rosas *et al.* (2006) con variaciones en la fuente de P.

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	2 g
P-tricálcico	2 g
Agar	15 g
Agua hasta	1 l

*Medios alternativos:* se reemplazó el P-tricálcico por igual cantidad de P-Al y P-Fe.

En estos medios se agregó  $\text{CaCl}_2$  1 g para reemplazar la fuente de calcio

2.1.2- Etapa 2. Medio PVK, diseñado por Pikovskaya (1948), original y variando la fuente de P.

Glucosa	10	g
P-tricálcico	5	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	g
NaClO.	2	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
KCl	0.2	g
Extracto de levadura	0.5	g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.002	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002	g
Agar	15	g
Agua hasta	1	l

(Opción: se agregó en una repetición de la experiencia Azul de bromofenol 0.025 g/l)

*Medios alternativos:* se reemplazó el P-tricálcico por igual cantidad de P-Al y P-Fe.

En estos medios se agregó  $\text{CaCl}_2$  1 g para reemplazar la fuente de calcio

2.1.3- Etapa 3. Medio NBRIP (Nautiyal, 1999) , original y variando la fuente de P

Glucosa	10	g
P-tricálcico	5	g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	g
KCl	0.2	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	g
Agar	15	g
Agua hasta	1	l

(Opción: se agregó en una repetición de la experiencia Azul de bromofenol 0.025 g/l)

*Medios alternativos:* se reemplazó el P-tricálcico por igual cantidad de P-Al y P-Fe.

En estos medios se agregó  $\text{CaCl}_2$  1 g para reemplazar la fuente de calcio.

Se incubó a 28 °C y diariamente se observó la evolución del crecimiento, midiendo en mm el radio del halo que se iban formando en torno a la colonia.

## **2.2-Ensayos de coexistencia entre las cepas bacterianas de *Sinorhizobium meliloti* B399 con *Pseudomonas fluorescens* CHAO y *Bacillus* spp. R19**

Se realizó en los medios de cultivo YEMA (Vincent, 1970) y TSA diluido al 25% (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina). Las cepas se sembraron por estriado hasta el centro de la caja de Petri, cada una cubriendo una mitad de la superficie del medio de cultivo. Se realizaron siembras simultáneas y espaciadas, en este último caso, la segunda cepa se sembró una vez que se observó el crecimiento de la primera. Los medios

sembrados se incubaron a 28°C durante un lapso de más de 48h, debido a la velocidad de crecimiento de las cepas.

### **2.3.-Ensayos de inoculación y/o co-inoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo:**

Las semillas de alfalfa fueron desinfectadas por agitación durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (dilución en base a la formulación comercial 55 g/l). Para los ensayos de inoculación, fueron sembradas bajo condiciones asépticas en bolsas de polietileno negro de 14 cm de alto por 10 cm de ancho, conteniendo cada una 1kg del soporte perlita/arena (2:1). Las plantas fueron inoculadas 2 días luego de la emergencia. La inoculación se realizó aplicando en el sitio de siembra 2 mililitros del cultivo bacteriano (en fase exponencial tardía – comienzo de fase estacionaria) sobre el sistema radical de cada plántula.

Las plantas fueron regadas alternativamente con agua destilada y solución de Jensen libre de N (Vincent 1970) modificada en su fuente de P (fósforo), originalmente el P proviene de  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y es reemplazado por  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Los controles no inoculados fueron regados de la misma manera pero con la adición de 0.5%  $\text{KNO}_3$  por litro de solución de Jensen como fuente de nitrógeno y manteniendo su fuente original de P soluble.

El ensayo incluyó los siguientes tratamientos:

- a- Inoculación simple con la cepa *Sinorhizobium meliloti* B399 (recomendada por INTA para la inoculación de alfalfa en Argentina)
- b- Inoculación simple con la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* CHAO
- c- Inoculación simple con la cepa bacteriana *Bacillus* spp. R19
- d- Inoculación mixta *Sinorhizobium meliloti* B399 – *Pseudomonas fluorescens* CHAO
- e- Inoculación mixta *Sinorhizobium meliloti* B399 – *Bacillus* spp. R19
- f- Control no inoculado y suplementado con N (0.005 g/l de  $\text{KNO}_3$  a la solución de Jensen)
- g- Control no inoculado y sin N

La experiencia se llevó a cabo en invernáculo y alternativamente en cámaras bajo condiciones controladas de luz y temperatura y pH (Ciclo de 16 hs de luz a  $28 \pm 2$  °C y 8 hs de oscuridad a  $16 \pm 2$  °C y bajo una intensidad lumínica de 220  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  y pH de 7).

Aproximadamente 50 días luego de la siembra se evaluó: longitud de tallos y raíces, peso seco de parte aérea y radical, número de nódulos, superficie radical (Técnica de Carley y Watson, 1966) y estado general de la planta.

Cada tratamiento se realizó por triplicado y cada maceta contenía 4 plantas. Los resultados fueron analizados estadísticamente por análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de medias se realizó mediante el test de Duncan ( $\alpha < 0.05$ ). Estas evaluaciones fueron realizadas por medio del Software Estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009)).

### 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1.- Ensayos de solubilización de distintas fuentes de P en medios alternativos

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 1, 2 y 3 respectivamente. En la tabla 1 podemos observar que las cepas *Pseudomonas putida* SP22, *Bacillus* spp. R19 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0 tienen mejor crecimiento en el medio cuya fuente de fósforo es fosfato tricálcico. Además estas cepas produjeron halo en ese medio lo que evidencia su capacidad para solubilizar el fósforo.

TABLA 1. Medio inicialmente descrito por Frioni (1992) y modificado por Rosas et al., (2006) con variaciones en la fuente de fósforo

		48HS					
		FRIONI-Ca		FRIONI-Fe		FRIONI-AI	
CEPA		Ø (mm)	halo(mm)	Ø(mm)	halo(mm)	Ø(mm)	halo(mm)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	0,5 ± 0,0		0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHA0	13,0 ± 4,2	3,0 ± 1,4	0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Pseudomonas putida</i>	SP22	12,6 ± 2,8	5,2 ± 2,5	0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Pseudomonas putida</i>	PCL2	3,8 ± 6,7	2,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Bacillus</i> sp.	R19	0,5 ± 0,0		0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Bacillus</i> sp.	TO1	0,5 ± 0,0		0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	A86	0,5 ± 0,0		0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	SR1	0,5 ± 0,0		0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3DOh13	3,0 ± 0,5		0,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1	
		72HS					
		FRIONI-Ca		FRIONI-Fe		FRIONI-AI	
CEPA			halo(mm)	Ø(mm)	halo(mm)	Ø(mm)	halo(mm)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	3 ± 1,1		3,2 ± 1,3		2,7 ± 0,9	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHA0	12,0 ± 5,7	2,5 ± 1,9	1,0 ± 0,1		5,0 ± 0,1	
<i>Pseudomonas putida</i>	SP22	15,0 ± 3,3	4,8 ± 1,9	2,4 ± 0,8		2,2 ± 0,2	
<i>Pseudomonas putida</i>	PCL2	15,7 ± 1,1	2,0 ± 0,1	4,5 ± 0,5		5,7 ± 0,5	
<i>Bacillus</i> sp.	R19	12,0 ± 4,6		3,6 ± 0,8		4,2 ± 0,4	
<i>Bacillus</i> sp.	TO1	13,3 ± 5,8		17,7 ± 8,7		9,0 ± 0,8	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	A86	8,0 ± 2,7		3,0 ± 0,1		5,5 ± 2,4	
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	SR1	30,0 ± 0,1		6,5 ± 0,5		6,7 ± 1,7	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3DOh13	3,5 ± 0,5		3,2 ± 1,8		3,6 ± 1,5	

		144Hs					
		FRIONI-Ca		FRIONI-Fe		FRIONI-AI	
CEPA		Ø(mm)	halo(mm)	Ø(mm)	halo(mm)	Ø(mm)	halo(mm)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	3,8 ± 1,2		4,5 ± 1,1		7,1 ± 0,6	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHA0	17,7 ± 5,5	4,0 ± 0,8	1,5 ± 0,1		4,3 ± 1,5	
<i>Pseudomonas putida</i>	SP22	31,3 ± 1,0	9,1 ± 2,0	2,5 ± 0,5		3,2 ± 1,7	
<i>Pseudomonas putida</i>	PCL2	19,0 ± 1,1	1,2 ± 0,5	7,2 ± 0,9		6,5 ± 0,5	
<i>Bacillus sp.</i>	R19	22,1 ± 9,0	4,0 ± 0,1	6,6 ± 0,5		6,0 ± 2,1	
<i>Bacillus sp.</i>	TO1	22,3 ± 4,9		30,0 ± 9,2		16,0 ± 4,5	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	A86	13,7 ± 3,5	3,0 ± 0,1	5,7 ± 0,9		6,7 ± 1,8	
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	SR1	<50		10,0 ± 0,8		10,5 ± 1,7	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3DOh13	4,0 ± 0,5		3,6 ± 0,5		5,7 ± 1,2	

En la tabla 2 podemos observar, al igual que en el medio descrito por Frioni, que las cepas SP22, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y *Bacillus spp.* R19 tienen buen crecimiento en el medio PVK con fuente de fósforo tricálcico, estas forman halo clorótico. La cepa *Sinorhizobium meliloti* B399 presentan bajo crecimiento cuando el fósforo se encuentra como tricálcico como así también ligado al hierro y al aluminio. Aunque esta cepa no presenta halo no podemos decir que no tiene la capacidad de solubilizar el fósforo.

TABLA 2. Medio PVK, original y variando la fuente de fósforo.

		48 HS					
		PVK-Ca		PVK-Fe		PVK-AI	
CEPA		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	3,3 ± 0,5	-	1,6 ± 0,5	-	2,3 ± 2,3	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHA0	7,3 ± 1,5	1,3 ± 0,5	3,6 ± 1,5	-	1,0 ± 0,0	-
<i>Pseudomonas putida</i>	SP22	9,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	5,5 ± 0,7	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	PCL2	5,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,7	-	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	R19	8,6 ± 1,5	2,3 ± 0,5	1,0 ± 0,1	-	2,0 ± 1,0	-
<i>Bacillus sp.</i>	TO1	23,6 ± 5,6	-	3,0 ± 1,7	-	2,8 ± 2,2	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	A86	6,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,6 ± 0,5	-	1,8 ± 1,0	-
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	SR1	9,5 ± 0,7	-	1,0 ± 0,1	-	1,0 ± 0,1	-
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3DOh13	2,3 ± 0,5	-	3,0 ± 1,0	-	1,8 ± 1,2	-

		72 HS					
		PVK-Ca		PVK-Fe		PVK-Al	
CEPA		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	3,3 ± 0,5	-	2,6 ± 0,5	-	2,3 ± 0,5	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHA0	7,6 ± 1,5	1,3 ± 0,5	4,6 ± 0,5	-	3,0 ± 1,0	-
<i>Pseudomonas putida</i>	SP22	10,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	6,5 ± 2,1	-	0,5 ± 0,1	-
<i>Pseudomonas putida</i>	PCL2	6,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,5 ± 0,7	-	0,5 ± 0,1	-
<i>Bacillus sp.</i>	R19	9,0 ± 2,0	2,6 ± 1,1	2,0 ± 1,0	-	2,3 ± 0,5	-
<i>Bacillus sp.</i>	TO1	25,3 ± 5,7	-	3,6 ± 1,1	-	5,0 ± 0,1	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	A86	7,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,5	-	2,1 ± 0,7	-
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	SR1	10,0 ± 0,1	-	3,0 ± 2,8	-	1,0 ± 0,1	-
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3DOh13	2,3 ± 0,5	-	3,0 ± 1,0	-	2,0 ± 0,1	-
		144 HS					
		PVK-Ca		PVK-Fe		PVK-Al	
CEPA		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	3,6 ± 0,5	-	2,6 ± 0,5	-	3,3 ± 0,5	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHA0	13,3 ± 3,5	4,0 ± 1,7	5,0 ± 0,1	-	3,3 ± 0,5	-
<i>Pseudomonas putida</i>	SP22	17,0 ± 1,4	6,5 ± 0,7	6,5 ± 2,1	-	0,5 ± 0,1	-
<i>Pseudomonas putida</i>	PCL2	10,5 ± 0,7	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	-	0,5 ± 0,1	-
<i>Bacillus sp.</i>	R19	14,6 ± 2,0	3,6 ± 1,1	4,5 ± 0,8	-	2,6 ± 1,1	-
<i>Bacillus sp.</i>	TO1	29,0 ± 8,1	-	5,0 ± 1,0	-	6,3 ± 0,5	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	A86	14,3 ± 2,0	3,6 ± 0,5	2,6 ± 0,5	-	2,6 ± 0,5	-
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	SR1	12,5 ± 2,1	1,0 ± 0,1	4,0 ± 2,8	-	1,0 ± 0,1	-
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3DOh13	2,6 ± 0,5	-	3,3 ± 1,5	-	2,0 ± 0,1	-

En la tabla 3 podemos observar que en el medio NBRIP, y donde el fósforo está ligado a Ca, la formación de halo de solubilización en la mayoría de las cepas ensayadas. Las cepas que se utilizarán en los ensayos de inoculación (*Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Bacillus* R19) nuevamente tienen mejor crecimiento cuando el fósforo se encuentra como P-tricálcico. Al igual que en los medios anteriores, no se observa la formación de halos cuando el fósforo está ligado a Fe y Al.

TABLA 3. Medio NBRIP, original y variando la fuente de fósforo.



		24 HS					
		NBRIP-Ca		NBRIP-Fe		NBRIP-AI	
CEPA		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
Sinorhizobium meliloti	3DOh13	4,5 ± 0,7	—	1,0 ± 0,1	—	1,0 ± 0,1	—
Pseudomonas fluorescens	CHA0	8,0 ± 1,4	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	—	2,7 ± 1,0	—
Pseudomonas putida	SP22	10,0 ± 2,8	2,2 ± 0,3	5,0 ± 2,8	—	1,0 ± 0,1	—
Pseudomonas putida	PCL2	6,5 ± 0,7	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	—	4,2 ± 1,0	—
Bacillus sp.	R19	5,8 ± 3,2	1,7 ± 0,3	3,6 ± 1,5	—	2,6 ± 2,0	—
Bacillus sp.	TO1	2,0 ± 1,0	—	1,3 ± 0,5	—	1,3 ± 0,5	—
Pseudomonas aurantiaca	SR1	6,5 ± 0,7	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	—	1,0 ± 0,1	—
Sinorhizobium meliloti	B399	2,8 ± 1,0	—	1,1 ± 0,2	—	1,3 ± 0,5	—
Bradyrhizobium japonicum	A86	7,5 ± 4,3	2,0 ± 0,1	2,0 ± 1,7	—	2,1 ± 1,2	—
		72 HS					
		NBRIP-Ca		NBRIP-Fe		NBRIP-AI	
CEPA		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
Sinorhizobium meliloti	3DOh13	4,5 ± 0,7	—	1,2 ± 0,3	—	1,0 ± 0,1	—
Pseudomonas fluorescens	CHA0	8,0 ± 1,4	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	—	3,5 ± 0,7	—
Pseudomonas putida	SP22	11,0 ± 1,4	3,0 ± 1,4	5,5 ± 2,1	—	1,0 ± 0,1	—
Pseudomonas putida	PCL2	9,0 ± 1,4	1,7 ± 0,3	2,2 ± 0,3	—	4,5 ± 1,4	—
Bacillus sp.	R19	7,0 ± 2,6	1,6 ± 0,2	4,3 ± 2,0	—	2,6 ± 2,0	—
Bacillus sp.	TO1	4,5 ± 0,8	—	1,3 ± 0,5	—	2,5 ± 1,3	—
Pseudomonas aurantiaca	SR1	7,0 ± 0,7	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,7	—	1,0 ± 0,1	—
Sinorhizobium meliloti	B399	3,1 ± 0,7	—	1,5 ± 0,5	—	1,3 ± 0,5	—
Bradyrhizobium japonicum	A86	8,6 ± 3,2	1,6 ± 0,5	2,8 ± 2,7	—	2,5 ± 1,3	—
		144 HS					
		NBRIP-Ca		NBRIP-Fe		NBRIP-AI	
CEPA		Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)	Ø colonia (mm)	halo(mm)
Sinorhizobium meliloti	3DOh13	5,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,3	—	1,0 ± 0,1	—
Pseudomonas fluorescens	CHA0	10,5 ± 2,1	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,1	—	3,5 ± 0,7	—
Pseudomonas putida	SP22	13,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3	5,5 ± 2,1	—	1,0 ± 0,1	—
Pseudomonas putida	PCL2	10,0 ± 1,4	2,0 ± 0,1	3,5 ± 0,7	—	5,7 ± 1,0	—
Bacillus sp.	R19	13,0 ± 3,4	4,0 ± 1,0	4,6 ± 2,5	—	3,0 ± 1,7	—
Bacillus sp.	TO1	6,3 ± 1,1	1,0 ± 0,1	1,8 ± 1,0	—	2,8 ± 0,7	—
Pseudomonas aurantiaca	SR1	9,0 ± 1,4	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	—	1,7 ± 0,3	—
Sinorhizobium meliloti	B399	3,6 ± 0,5	—	1,8 ± 0,2	—	1,8 ± 0,2	—
Bradyrhizobium japonicum	A86	14,0 ± 2,6	4,1 ± 0,7	3,0 ± 2,6	—	2,5 ± 1,3	—

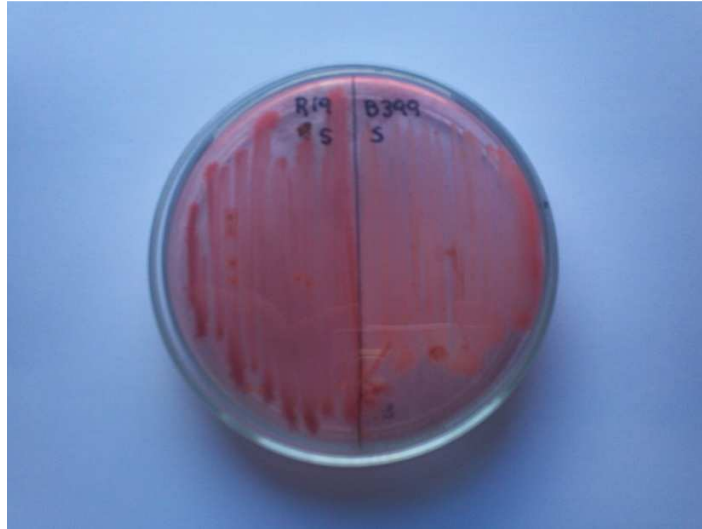
Como se puede observar las cepas estudiadas crecen en todos los medios de cultivo, si bien lo hacen mejor en los medios suplementados con calcio.

En las condiciones de nuestro estudio, los resultados obtenidos en los medios tradicionalmente usados para la detección de la solubilización de fosfatos pudieron ser reproducidos en el medio NBRIP, tal como lo propuso por Nautiyal (1999).

Por otra parte, el empleo del colorante azul de bromofenol en los medios, sugerido por Gupta *et al.* (1994) permitió una mejor visualización del resultado cuando los halos estuvieron presentes.

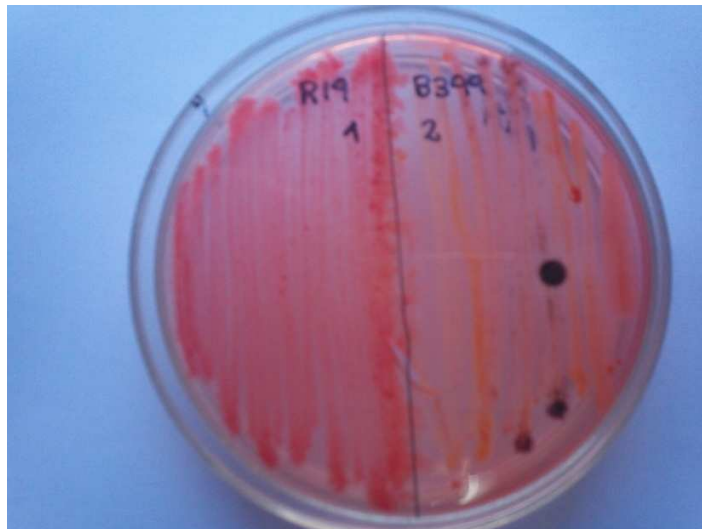
### 3.2.- Ensayos de coexistencia de la cepas bacteriana *Sinorhizobium meliloti* B399 con *Bacillus* spp. R19 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0

**Foto 1.** Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Bacillus* spp. R19 en siembra simultánea.



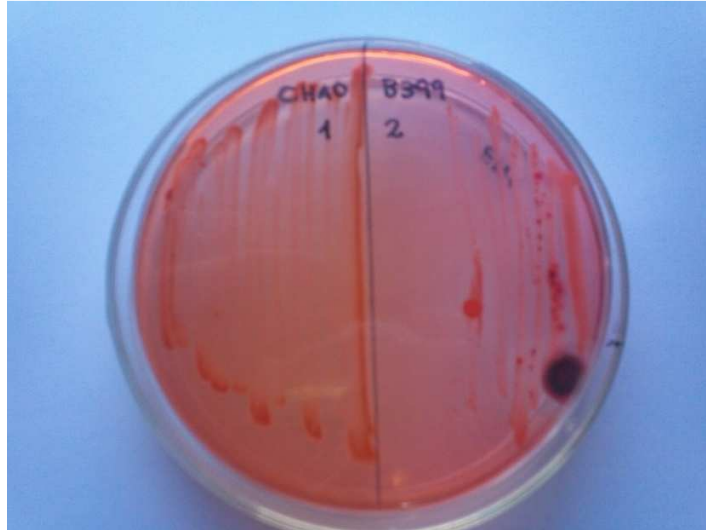
Se puede observar el crecimiento de ambas cepas sembradas en medio de cultivo YEMA, por lo que podemos decir que coexisten en el mismo medio.

**Foto 2.** Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Bacillus* spp. R19 en siembra espaciada en el tiempo.



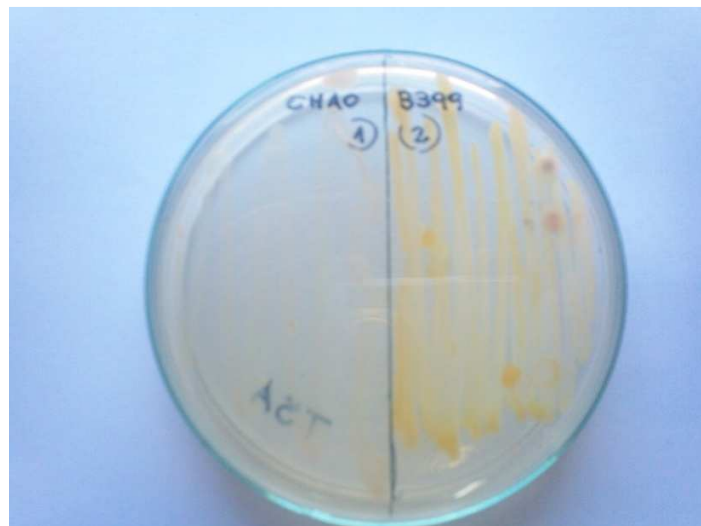
Se sembró en primer lugar la cepa *Bacillus* spp. R19 y en segundo lugar la cepa *Sinorhizobium meliloti* B399 observándose el crecimiento conjunto de estas bacterias, por lo que la primera no inhibe, por compuestos antimicrobianos, a la segunda.

**Foto 3.** Ensayo de coexistencia en medio YEMA (Vincent, 1970), entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0 en siembra espaciada en el tiempo.



Se puede apreciar que *Pseudomonas fluorescens* CHA0, sembrada inicialmente, no ejerce ningún efecto inhibitorio sobre la cepa B399, es decir ambas pueden coexistir en el mismo medio.

**Foto 4.** Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya–Lab. Britania) entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Pseudomonas fluorescens* CHA0, en siembra espaciada.



En este medio de cultivo se observó crecimiento de ambas cepas bacterianas sin inhibición cuando *Pseudomonas fluorescens* CHA0 se sembró primero que *Sinorhizobium meliloti* B399 y viceversa.

**Foto 5.** Ensayo de coexistencia en medio TSA diluído al 25% (Agar Tripticasa Soya–Lab. Britania) entre las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Bacillus* spp. R19, en siembra espaciada.



También aquí se puede observar buena coexistencia entre estas dos cepas bacterianas.

### 3.3.- Ensayos de inoculación y/o coinoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de raíces:

**TABLA 4:** Parámetros de la parte radical de plántulas de alfalfa inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* B399, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y *Bacillus* spp. R19.

Los datos se obtuvieron a los 50 días de cultivo.

Tratamiento	Longitud de raíces (cm)	Área superficial (ml NaOH)	Peso Seco de raíces (g/ planta)	Número de nódulos por planta
Control no inoculado sin N	14,36 ± 2,45 a	0,87 ± 0,39 ab	0,01 ± 2,2 a	0 c
Control no inoculado con N	18,4 ± 2,45 ab	0,75 ± 0,39 a	0,01 ± 2,2 a	0 c
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	24,4 ± 2,45 b	1,46 ± 0,39 ab	0,04 ± 2,2 c	1,2 ± 0,3 ab
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	25,61 ± 2,45 b	2,17 ± 0,39 bc	0,03 ± 2,2 b	0,3 ± 0,3 bc
<i>Bacillus</i> spp. R19	26,6 ± 2,45 b	2,99 ± 0,39 c	0,04 ± 2,2 c	0,3 ± 0,3 bc
B399 + CHA0	24,6 ± 2,45 b	1,09 ± 0,39 ab	0,05 ± 2,2 d	1,9 ± 0,3 a
B399 + R19	16,2 ± 2,45 a	0,75 ± 0,39 a	0,05 ± 2,2 d	1 ± 0,3 ab
B399 control	21 ± 3,87 ab	0,93 ± 0,72 ab	0,05 ± 2,2 d	1,5 ± 0,48 a

Los datos representan la media de 10 plantas por cada tratamiento. Los valores promedios seguidos de letras diferentes denotan diferencias significativas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba de Duncan.

#### Longitud de raíces:

Los tratamientos B399, CHA0, R19 y el tratamiento co-inoculado B399+CHA0 presentan diferencias significativas respecto al tratamiento control no inoculados sin nitrógeno, sin embargo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación simple y co-inoculados con respecto al control no inoculado con nitrógeno

#### Área superficial:

El tratamiento microbiano R19 presento diferencias significativas en cuanto a los controles no inoculados, sin embargo el tratamiento CHA0 también presento una buena área superficial radical mostrada a través de la mayor cantidad de titulación.

**Peso seco de las raíces:**

Tanto los tratamientos inoculados como los co-inoculados presentaron diferencias significativas con respecto a los controles no inoculados, pudiendo observarse que los ensayos co-inoculados (B399+CHAO) y (B399+R19) son los que mayor peso seco han mostrado.

**Numero de nódulos por planta:**

No se observaron diferencias significativas con respecto al número de nódulos entre el tratamiento inoculado B399 y co-inoculados con respecto al control B399.

El resultado de la evaluación en parte aérea se presenta en la siguiente tabla:

**TABLA 5:** Parámetros de la parte aérea de plántulas de alfalfa inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* B399, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y *Bacillus* spp. R19. Los datos se obtuvieron a los 50 días de cultivo.

Tratamiento	Longitud de tallos (cm)	Peso Seco de tallos (g/planta)
Control no inoculado sin N	15,46 ± 1,53 ab	0,04 ± 3,6 bc
Control no inoculado con N	17,24 ± 1,53 abc	0,04 ± 3,6 ab
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	19,1 ± 1,53 bcd	0,04 ± 3,6 a
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	22,27 ± 1,53 d	0,05 ± 3,6 abc
<i>Bacillus</i> spp. R19	22,02 ± 1,53 cd	0,05 ± 3,6 abc
B399 + CHAO	15,8 ± 1,53 ab	0,05 ± 3,6 c
B399 + R19	15,7 ± 1,53 ab	0,06 ± 3,6 c
B399 control	12,75 ± 2,42 a	0,11 ± 3,6 d

Los datos representan la media de 10 plantas por cada tratamiento. Los valores promedios seguidos de letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba de Duncan.

**Longitud de los tallos:**

Se presentan diferencias significativas del tratamiento microbiano *pseudomonas fluorescens* CHAO y *Bacillus* spp. R19 respecto al control B399 y controles no inoculados.

**Peso seco de los tallos:**

Los tratamientos inoculados no presentan diferencias significativas respecto a los controles no inoculados, pero si presentan diferencias significativas las bacterias co-inoculadas con respecto a los controles no inoculados con nitrógeno.

En el presente trabajo se analizó la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico de la cepa de *Sinorhizobium meliloti* B399 junto a otras cepas de referencia en medios alternativos. Respecto a esto se puede decir que la disponibilidad del fósforo puede ser facilitada por la acción de algunos hongos y bacterias solubilizadores de fosfatos de calcio, hierro y aluminio (Tandon y Roy, 2004; Richardson et al., 2009).

En el medio de cultivo NBRIP con fuente de Ca como fosfato tricalcico se observó el mejor crecimiento de las cepas con respecto a los otros dos medios, presentando halos de mayor diámetro, lo que evidencia la capacidad que tienen estas bacterias de solubilizar el fosforo.

En el caso de B399 evidencio un lento crecimiento, y el mejor comportamiento lo demostró en este medio de cultivo

Jones *et al.* (1991) y Whitelaw (2000) mencionan que la ausencia de halos de solubilización en los medios de cultivo sólido no necesariamente indica que el organismo carezca de habilidad solubilizadora, sino que posiblemente este tipo de medios son insensibles para detectar la actividad de algunos microorganismos, lo que evidencia la no detección de halos en los medios de cultivo con P-Fe y P-Al.

Con los resultados observados podemos inferir que la detección a nivel de laboratorio de la solubilización microbiana de fosfatos a partir de una misma fuente insoluble se encuentra influenciada por la composición del medio de cultivo.

Del análisis de los parámetros fisiológicos en el ensayo con alfalfa se pudo observar que se incrementó el crecimiento de las plantas en tratamiento de inoculación, lo que nos indica que hay una asociación benéfica por parte de las PGPR con la especie vegetal inoculada

Se observó un incremento del crecimiento de las raíces, ya que estas bacterias PGPR se caracterizar por favorecer el crecimiento de las mismas. Las cepas B399, CHAO y R19 como así también lasco-inoculadas desarrollaron mayor longitud de raíces, aumentando su capacidad de exploración en la rizosfera concordando con lo descrito por Glick (1995). También se observó un incremento significativo en el peso seco de las raíces.

En cuanto a la longitud de los tallos se presentó un mayor crecimiento en los tratamientos con CHAO, R19 y B399 en inoculación simple, pero no así en las co-inoculadas y no presentaron diferencias significativas en cuanto al peso seco, pero se notó mayor peso en los tratamientos con CHAO, R19 y bacteriasco-inoculadas, favorecido por el desarrollo de las raíces.

La titulación nos da evidencia sobre la capacidad de absorción de agua y nutrientes de las raíces, esta se puede observar con el área de superficie radical.

El tratamiento R19 es el que mostró diferencias significativas, pero también se vio un incremento considerable en CHAO y B399, lo que sugiere que pueden colaborar en aumentar la disponibilidad de P para el crecimiento vegetal solubilizando este mineral desde complejos y formas insolubles (Goldstein, 1986; Kucey *et al.*, 1989).

Respecto al número de nódulos no se observó diferencias significativas pero aun así fue mayor la cantidad en el tratamiento co-inoculado con B399 + CHAO, lo que lo que evidencia el efecto positivo de la inoculación combinada de rizobios con bacterias de vida libre de los géneros *Pseudomonas* (Knigh y Langson-Unkefer, 1988; Rosas *et al.*, 2006) y *Bacillus* (Sindhu *et al.*, 2002) sobre distintas leguminosas.

Podemos concluir diciendo que el empleo de microorganismos PGPR favorece el crecimiento de los cultivos en condiciones de baja concentración de fosforo, constituyendo una alternativa para aprovechar fuentes de fósforo menos disponibles.



#### 4- CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se pudo observar que en los ensayos de solubilización las cepas bacterianas *Sinorhizobium meliloti* B399 pudieron crecer en condiciones de baja disponibilidad de fosforo, presentando el mejor comportamiento en medios de cultivo con fuente de fosforo como fosfato tricalcico; esta cepa no produjo halo en ninguno de los tres medios de cultivo utilizados, sin embargo no podemos decir que la misma no tiene capacidad de solubilizar fosforo en estas condiciones de cultivo.

Se observó que a nivel de laboratorio la solubilización de fosfatos a partir de una misma fuente insoluble se encuentra influenciada por la composición del medio de cultivo.

Respecto a la inoculación de las plántulas de alfalfa con microorganismo promotores del crecimiento (PGPR) se pudo observar que en condiciones de baja disponibilidad de fosforo, favorece el desarrollo de estas plántulas notándose un aumento en cuanto a longitud de raíces, peso seco de raíces y área radical.

La inoculación con microorganismos PGPR ante escenarios de baja disponibilidad de fosforo favorece el crecimiento de los cultivos, siendo una alternativa al uso de fertilizantes químicos reduciendo los costos que este último implica, como así también un menor impacto ambiental

Cabe destacar que estos resultados son a nivel de laboratorio con siembra en invernáculo en condiciones totalmente estériles, sin embargo este trabajo se debería complementar con un ensayo a nivel de campo con sus respectivas variables en cuestión para que se pueda tener mayor seguridad antes de sugerir su aplicación en las actividades productivas

## 5- BIBLIOGRAFÍA

- AHMAD, F., I. AHMAD y M.S. KHAN. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.
- AL-NIEMI, T.S., M.S. KAHN y T.R. MC DERMOTT. 1997. P metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiol.* 113: 1233-1242.
- ANDRÉS, J.A., N.S. CORREA y S.B. ROSAS. 1998. Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram. Isolation of fungicide resistant strains. *Boil. Fertil. Soil* 26: 141-145.
- ANDRÉS, J.A., M. ROVERA, L.B. GUIÑAZÚ, N.A. PASTOR y S.B. ROSAS. 2011. Role of *Pseudomonas aurantiaca* in crop improvement. En: D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 107-122.
- AUDISIO, A, J. ANDRÉS, G. AVANZINI, A. CAPRINI, A. THUAR y C. OLMEDO 2005. Biocontrol de hongos patógenos de maní por la aplicación de rizobacterias. *Libro de la V Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos – V Encuentro sobre fijación Biológica de Nitrógeno*. Universidad Nacional de Jujuy. Versión CD – ROM.
- BARBER, S.A. 1995. *Soil nutrient bioavailability (Second Edition)*. John Wiley, New York, USA. 414p.
- BASHAN, Y. y G. HOLGUIN. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*43: 103-121.
- CARLEY, H.E. y R.D. WATSON. 1966. A new gravimetric method for estimating root-surface areas. *Soil Science* 102: 289-291.
- CASSMAN, K.G. A.S. WHITENY y R.L FOX. 1981. Phosphorus requirements of soybean and cow pea as affected by mode of N nutrition. *Agron. J.* 73: 17-22
- CHABOT, R., H. ANTOUN y P. CESAS. 1993. Stimulation de la croissance de la laitue romaine et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can.J. Microbiol.* 39: 941-947.
- CHABOT, R., H. ANTOUN y CESAS, MP. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil* 184: 311-321.

- COLLINO, D.J., A. LOPEZ, J. DARDANELLI, R. SERENO y R.W. RACCA. 1997. Effect of soil water availability on water use strategies and dry matter production by two alfalfa cultivars differing in winter dormancy". *PHYTON* 61 (1/2): 45-53.
- DEFAGO, G., C.H. BERLING, U. BURGER, D. HAAS, G. KAHR, C. KEEL, C. VOISARD, P. WIRTHNER y B. WUTHRICH. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential applications and mechanisms. En: HORNBY, D., R.J. COOK, Y. HENIS, W.H. KO, A.D. ROVIRA, B. SCHIPPERS, P.R. SCOTT (Eds). *Biological control of soil-borne plant pathogens*. CAB International, Oxon, UK, pp. 93–108.
- DI RIENZO, J.A., F. CASANOVES, M.G. BALZARINI, L. GONZÁLEZ, M. TABLADA Y C.W. ROBLEDO. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 268 pp.
- DUBOIS, M. 1999. La oferta varietal de alfalfa. *Génesis XII* 38:14-19.
- FERNÁNDEZ, L.A., P. ZALBA, M.A. GÓMEZ y M.A. SAGARDOY. 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils* 43:805-809.
- FRIONI, L. 1992. *Ecología microbiana del suelo*. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 519p.
- GLICK, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109–117.
- GOLSTEIN, A.H. 1986. Bacterial phosphate solubilization: Historical perspective and future prospects. *Am. J. Alt. Agric.* 1: 57–65.
- GUÍÑAZÚ, L.B. 2009. Utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR'S) en el mejoramiento de la productividad de alfalfa. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. p: 52-55.
- GUÍÑAZÚ, L.B., ANDRÉS, J.A., DEL PAPA, M.F., PISTORIO, M. y ROSAS, S.B. 2010. Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate - solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biol. Fertil. Soils* 46: 185-190.
- GUPTA, R., R. SINGAL, A. SHANKAR, R.C. KUHAD y R.K. SAXENA. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 255-260.
- GYANESHWAR, P., G. NARESH KUMAR, J.L. PAREKH y P.S. POOLE. 2002. Role of soils microorganisms in improving P nutrition in plants. *Plant Soil* 245: 83-93.

- HALDER, A.K., A. MISRA y P.K. CHAKRABARTY. 1991. Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Indian J. Exp. Biol.* 29: 28–31.
- HALDER, A.K., A. BANERJEE, A. MISRA y P.K. CHAKRABARTY. 1992. Role of ammonium and nitrate on release of soluble phosphate from hydroxyapatite by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Basic Microbiol.* 32: 325–330.
- HIJANO, E.H. y D.H. BASIGALUP. 1995. El cultivo de la alfalfa en la Argentina. En: *La alfalfa en la Argentina*. Hijano E.H. y A. Navarro Eds. INTA.p: 12-18.
- JONES, D., B. F. L. SMITH, M. J. Wilson, and B. A. GOODMAN. 1991. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycol. Res.* 95: 1090-1093.
- KHAN, M.S., A. ZAIDI y P.A. WANI. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in a sustainable agriculture – A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 29-43.
- KLOPPER, J.W. y M.N. SCHROTH. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: *Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Vol. 2, Station de Phatologie Végétale et Phytobactériologie, INRA, Angers, France, p. 879–882.
- KNIGHT, T.J. y P.J. LANGSTON-UNKEFERJ. 1988. Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin releasing plant pathogen. *Science* 241: 951-954.
- KOUAS, S., N. LABIDI, A. DEBEZ y C. ABDELLY. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agron. Sustain. Dev.* 25: 389-393.
- KUCEY, R.M., H.H. JENZEN y M.E. LEGGETT. 1989. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42: 199–228.
- MUSLERA PARDO, E. y C. RATERA GARCÍA. 1984. La alfalfa. En: *Praderas y forrajes*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. p: 625-694.
- NAUTIYAL, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol.Lett.* 170: 265–270.
- OLMEDO, C. 2002. *Selección de cepas bacterianas con actividad promotora del crecimiento en soja*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- PASTOR, N.A., E. CARLIER, J.A. ANDRÉS, S.B. ROSAS y M. ROVERA. 2012. Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *J. Environ. Manag.* 95: 332-337.
- PIKOVSKAYA, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.

- RACCA, R.W., D. BASIGALUP, E. BREZONI, J. DARDANELLI, N.GONZALEZ, N. HANSEN, E. LOPEZ, A. PERTICARI, A. CUADRELLI y E.RIVERO. 1998. Cuantificación de la FBN en alfalfa y caracterización de los factores ambientales que la regulan. XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Maturín, Venezuela.
- RAVINDRA N.P., G. RAMAN, K.B. NARAYANAN y N. SAKTHIVEL. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol.* 8:230.
- REMANS, R., A. CROONENBORGH, R. TORREZ GUTIERREZ, J. MICHIELS y J. VANDERLEYDEN. 2007. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 341-351.
- RICHARDSON, A.E. 1994. Soil micro-organisms and phosphate availability. En: Pankhurst, C.E., B.M. Doube, V.V. Gupts y P.R. Grace. (Eds.). *Soil Biota Management in Sustainable Agriculture*. CSIRO, Melbourne, Australia. p: 50-62.
- RICHARDSON. A.E., J.M. BAREA, A.M. MCNEILL y C. PRINGET-COMBARET. 2009. Acquisition of P and N in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.
- RICHARDSON, A.E. y R.J. SIMPSON. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol.* 156:989–996.
- RODRÍGUEZ, H. y R. FRAGA. 1999. Phosphate-solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17: 319–339.
- ROSAS, S.B., J.A. ANDRÉS, M. ROVERA y N.S. CORREA. 2006. Phosphate solubilizing *Pseudomonas putidaca*n influence the rhizobia–legume symbiosis. *Soil Biol. Biochem.* 38: 3502-3505.
- SCHULZE, J., G. TEMPLE, S.J. TEMPLE, H. BESCHOW y C.P. VANCE. 2006. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Ann. Botany*98: 731-740.
- SINDHU, S.S., S.K. GUPTA, S. SUNEJA y K.R. DADARWAL. 2002. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. *Biol. Plantarum*45: 117-120.
- SUBBA RAO, N.S. 1993. Biofertilizers in Agriculture and Forestry. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, New Delhi, India. 242 p.
- TANDON, H. L. S., and R. N. ROY. 2004. Integrated Nutrient Management - A glossary of terms. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), Organización para el Desarrollo y Concertación en materia de Fertilizantes, Nueva Delhi.

URIOSTE, A.M., A.A. BONO, D.E. BUSCHIAZZO, G.G. HEVIA y E.N. HEPPER. 1996. Fracciones de fósforo en suelos agrícolas y pastoriles de la región semiárida pampeana central (Argentina). *Ciencia del Suelo* 14: 92-95.

VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biology Programme Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K. p: 120-130.

VIGLIZZO, E.F. 1995. El rol de la alfalfa en los sistemas de producción. En: HIJANO, E.H. y A. NAVARRO (Eds). *La alfalfa en la Argentina*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina. p: 260-272.

WANI, P.A., M.S. KHAN y A. ZAIDI. 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 283-287.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69: pp. 99-151, 2000.

YADAV, K.S. y K.R. DADARWAL. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. En: Dadarwal, K.R. (Ed). *Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production*. Scientific Publishers, Jodhpur, India. p: 293-308.

## 6.- ANEXO

**Foto 1:** Lote de plántulas de alfalfa sembradas e inoculadas en laboratorio



**Foto 2:** Plántulas de alfalfa control no inoculado y suplementado con N (0,005 g/l de  $\text{KNO}_3$  a la solución de Jensen) y plántulas de alfalfa control no inoculado y sin N



**Foto 3:** Plántulas de alfalfa inoculadas con la cepa bacteriana *Sinorhizobium meliloti* B399, regadas alternadamente con agua destilada y solución de Jensen modificado.



**Foto 4:** Plántulas de alfalfa inoculadas con la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* CHA0, regadas alternadamente con agua destilada y solución de Jensen modificado.





**Foto 5:** Plántulas inoculadas con la cepa bacteriana *Bacillus* spp. R19, regadas alternadamente con agua destilada y solución de Jensen modificado.



**Foto 6:** Plántulas de alfalfa co-inoculadas con cepas bacterianas B399 + R19, regadas con agua destilada alternada con solución Jensen modificada.



**Foto 7:** Plántulas de alfalfa control, inoculadas con la cepa *Sinorhizobium meliloti* B399, regadas con agua destilada alternada con solución Jensen.



**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud de Tallo (cm)	74	0,29	0,22	27,04

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	637,52	7	91,07	3,87	0,0014
Tratamiento	637,52	7	91,07	3,87	0,0014
Error	1551,48	66	23,51		
Total	2189,00	73			

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 23,5072 gl: 66

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
3,00	22,27	10	1,53	A		
4,00	22,02	10	1,53	A	B	
5,00	19,10	10	1,53	A	B	C
2,00	17,24	10	1,53		B	C D
6,00	15,80	10	1,53			C D
7,00	15,70	10	1,53			C D
1,00	15,46	10	1,53			C D
8,00	12,75	4	2,42			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud de Raíz (cm)	74	0,27	0,20	36,11

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1496,64	7	213,81	3,57	0,0026
Tratamiento	1496,64	7	213,81	3,57	0,0026
Error	3952,43	66	59,89		
Total	5449,07	73			

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 59,8853 gl: 66

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
4,00	26,60	10	2,45	A	
3,00	25,61	10	2,45	A	
6,00	24,60	10	2,45	A	
5,00	24,40	10	2,45	A	
8,00	21,00	4	3,87	A	B
2,00	18,40	10	2,45	A	B
7,00	16,20	10	2,45		B
1,00	14,36	10	2,45		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Nº de Nodulos	74	0,36	0,29	132,79

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	33,34	7	4,76	5,27	0,0001
Tratamiento	33,34	7	4,76	5,27	0,0001
Error	59,70	66	0,90		
Total	93,04	73			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,9045 gl: 66

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
6,00	1,90	10	0,30	A
8,00	1,50	4	0,48	A
5,00	1,20	10	0,30	A B
7,00	1,00	10	0,30	A B
3,00	0,30	10	0,30	B C
4,00	0,30	10	0,30	B C
1,00	0,00	10	0,30	C
2,00	0,00	10	0,30	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Titulación (ml)	73	0,31	0,23	87,36

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	44,09	7	6,30	4,10	0,0009
Tratamiento	44,09	7	6,30	4,10	0,0009
Error	99,90	65	1,54		
Total	143,99	72			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 1,5369 gl: 65

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
4,00	2,99	10	0,39	A
3,00	2,17	10	0,39	A B
5,00	1,46	10	0,39	B C
6,00	1,09	10	0,39	B C
8,00	0,93	3	0,72	B C
1,00	0,87	10	0,39	B C
2,00	0,75	10	0,39	C
7,00	0,75	10	0,39	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)