

**Caracterización molecular y funcional de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo.**

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Producción Vegetal con orientación en cultivos extensivos*

Esteban Julián Rubio  
Ingeniero Agrónomo-Universidad Nacional de Luján-2003

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

## COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis  
**Olga Susana Correa**  
Ingeniera Agrónoma  
Magister Scientiae

Consejeros de Estudios

**Fabrizio Darío Cassán**  
Microbiólogo (Universidad Nacional de Río Cuarto)  
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

**Alejandro Peticari**  
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Morón)

## JURADO DE TESIS

Directora de tesis  
**Olga Susana Correa**  
Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)  
Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires)

JURADO  
**José Alfredo Curá**  
Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Mar del Plata)  
Doctor en Ciencias (Área biología) (Universidad Nacional de Mar del Plata)

JURADO  
**Román Augusto Serrago**  
Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)  
Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 2 de agosto de 2011

*Dedicada a Gimena y a mi hijo Matías*

*Agradecimientos*

*A mi directora y mis consejeros de tesis, a las Dras Marcela Montecchia e Irma Roberts, a mis compañeros del laboratorio y a Gimena.*

*“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”*

**Esteban Julián Rubio**

## ÍNDICE GENERAL

<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Declaración</b> .....	v
<b>Índice de Cuadros</b> .....	viii
<b>Índice de Figuras</b> .....	ix
<b>Resumen</b> .....	xi
<b>Abstract</b> .....	xii
<b>1. Introducción General</b> .....	1
<b>1.1. Objetivos generales</b> .....	5
<b>Capítulo 1: “Diversidad de <i>Azotobacter</i> en suelos argentinos. Aislamiento y caracterización genotípica y fenotípica de los aislamientos”</b> .....	7
Introducción.....	9
Objetivos e hipótesis.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Resultados.....	17
Discusión.....	33
<b>Capítulo 2: “Evaluación <i>in vitro</i> de características de cepas de <i>Azotobacter</i> relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal”</b> .....	35
Introducción.....	37
Objetivos e hipótesis.....	40
Materiales y Métodos.....	41
Resultados.....	44
Discusión.....	54

<b>Capítulo 3: “Efecto de <i>Azotobacter</i> sobre la germinación y el crecimiento temprano de plantas de trigo”</b> .....	57
Introducción.....	59
Objetivos e hipótesis.....	60
Materiales y Métodos.....	61
Resultados.....	63
Discusión.....	67
<b>Capítulo 4: La producción de auxinas por <i>Azotobacter</i> como mecanismo responsable de la promoción del crecimiento temprano de trigo</b> .....	71
Introducción.....	73
Objetivos e hipótesis.....	73
Materiales y Métodos.....	74
Resultados.....	75
Discusión.....	80
<b>Discusión y conclusiones finales</b> .....	83
<b>Bibliografía</b> .....	87
<b>Apéndice</b> .....	99

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Muestras de suelo empleadas para el aislamiento de <i>Azotobacter</i> .....	19
<b>Cuadro 2.</b> Morfología de las colonias de los aislamientos de <i>Azotobacter</i> crecidas en medio LG luego de 7 días.....	27
<b>Cuadro 3.</b> Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) tiempo de generación (g), ufc.ml <sup>-1</sup> a las 11 y 185 h de crecimiento y producción de auxinas por parte de cepas de <i>Azotobacter</i> .....	51
<b>Cuadro 4.</b> Producción de ácido-3-indolacético (AIA), ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) y zeatina (Z), luego de 5 días (cepas AT18 y AT42) u 8 días de crecimiento (cepas AT19, AT25, AT31 y AT37).....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dendrograma del análisis de los perfiles de rep-PCR de los aislamientos....	23
<b>Figura 2.</b> Dendrograma del ARDRA con la enzima <i>HhaI</i> de las cepas eleccionadas.....	25
<b>Figura 3.</b> Colonias de aislamientos <i>Azotobacter</i> desarrolladas en medio LG luego de 7 días de crecimiento.....	29
<b>Figura 4.</b> Tinción de Gram observada con microscopio óptico de cultivos puros de cepas <i>Azotobacter</i> luego de 48 hs de crecimiento en medio LG sólido.....	30
<b>Figura 5.</b> Producción de pigmentos no difusibles de cepas de <i>Azotobacter</i> en medio de Norris y Jensen luego de 10 días.....	31
<b>Figura 6.</b> Tinciones de Gram observadas con microscopio óptico de los quistes producidos por cepas de <i>Azotobacter</i> luego de 7 días de incubación en medio Burk con 0,3% de butanol como fuente de carbono.....	32
<b>Figura 7 a.</b> Logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por ml de cultivo (ufc.ml <sup>-1</sup> ) y producción de auxinas de cepas de <i>Azotobacter</i> crecidas en cultivos líquidos, en función del tiempo.....	45
<b>Figura 7 b.</b> Logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por ml de cultivo (ufc.ml <sup>-1</sup> ) y producción auxinas de cepas de <i>Azotobacter</i> crecidas en cultivos líquidos, en función del tiempo.....	46
<b>Figura 7 c.</b> Logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por ml de cultivo (ufc.ml <sup>-1</sup> ) y producción auxinas de cepas de <i>Azotobacter</i> crecidas en cultivos líquidos, en función del tiempo.....	47
<b>Figura 8.</b> Ensayos de producción de sideróforos.....	49
<b>Figura 9.</b> Ensayos de solubilización de fosfatos.....	50
<b>Figura 10.</b> Comparación entre la producción de AIA determinada por LC-MS y la producción de auxinas medida por colorimetría (Salkowsky) para los mismos cultivos.....	52
<b>Figura 11.</b> Actividad de nitrogenasa por la técnica de reducción de acetileno de cepas de <i>Azotobacter</i> .....	53
<b>Figura 12.</b> Velocidad germinativa de plántulas de trigo inoculadas con cepas de <i>Azotobacter</i> de baja (AT18 y AT37, AT42) y de alta producción de auxinas	

(AT19, AT25 y AT31).....63

**Figura 13.** Número de raíces seminales de plántulas de trigo a los 8 días de la inoculación con cepas de *Azotobacter* de baja (AT18 y AT37, AT42) y de alta producción de auxinas (AT19, AT25 y AT31).....64

**Figura 14.** Peso seco de la raíz (a) y del tallo (b) de plántulas de trigo a los 8 días de la inoculación con cepas de *Azotobacter* de baja (AT18 y AT37, AT42) y de alta producción de auxinas (AT19, AT25 y AT31).....64

**Figura 15.** Unidades formadoras de colonia por raíz de plántulas de trigo a los 8 días de la inoculación con cepas de *Azotobacter*.....65

**Figura 16.** Longitud de la raíz (cm) de plántulas de trigo a los 8 días de la aplicación de cultivos bacterianos completos (C) y sobrenadantes (S) de cepas de *Azotobacter* de alta (AT19 y AT25), de baja producción de auxinas (AT18) y de soluciones de AIA de baja (AIAb), media (AIAm) y alta (AIAa) concentración de AI.....75

**Figura 17.** Longitud (I) y peso seco del tallo (II) de plantas de trigo a los 8 días de la aplicación de cultivos bacterianos completos (C) o sobrenadantes libres de células (S) del cultivo de cepas de *Azotobacter* de alta (AT19 y AT25) y baja producción de AIA (AT18) y de soluciones AIA de concentraciones baja (AIAb), media (AIAm) y alta (AIAa).....76

**Figura 18.** Número de raíces seminales de plántulas de trigo a los 8 días de la aplicación de cultivos bacterianos completos (C) o sobrenadantes libres de células (S) del cultivo de cepas de *Azotobacter* de alta (AT19 y AT25) y baja producción de AIA (AT18) y de soluciones AIA de concentraciones baja (AIAb), media (AIAm) y alta (AIAa).....77

**Figura 19.** Plántulas de trigo a las 24 h del tratamiento con cultivos completos o sobrenadantes de las cepas AT18, AT19, y AT25 o con soluciones de  $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb),  $14 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAm) y  $26 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAa).....78

**Figura 20.** Plántulas de trigo de 4 días tratadas con soluciones de  $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb),  $14 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb) y  $26 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAa) y con sobrenadantes del cultivo de las cepas AT18 y AT19.....78

**Figura 21.** Raíces de plántulas de trigo de 4 días tratadas con soluciones de  $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb),  $14 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb) y  $26 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAa) y con sobrenadantes del cultivo de las cepas AT18 y AT19.....79

**Caracterización molecular y funcional de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo.**

Conocer la diversidad genética de *Azotobacter* en suelos de Argentina es de gran interés científico-tecnológico debido a su uso actual y futuro en la agricultura. Por otra parte, los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de *Azotobacter* aún no han sido completamente elucidados. En este trabajo se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización genotípica y fenotípica de cepas de *Azotobacter*. La especie más frecuentemente aislada fue *A. chroococcum*, mientras que reportamos por primera vez la presencia de *A. salinestrus* y *A. armeniacus* en suelos argentinos. La producción de sideróforos, la solubilización de fosfatos y la producción de auxinas se evaluaron en 21 de los aislamientos obtenidos. Todas las cepas evaluadas produjeron sideróforos y auxinas, con diferencias entre ellas en la cantidad producida de auxinas, mientras que ninguna cepa solubilizó fosfatos. Se seleccionaron 6 cepas con valores contrastantes de producción de auxinas y se determinó su capacidad de producir ácido indol-3-acético (AIA), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y zeatina (Z) por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, la capacidad de fijar N<sub>2</sub> por la reducción de acetileno-etileno y la capacidad de promover la germinación y el crecimiento temprano de plántulas de trigo. Las 6 cepas seleccionadas produjeron distintos niveles de AIA, GA<sub>3</sub> y Z y difirieron en la capacidad de fijar N<sub>2</sub>. La mayor producción de AIA correlacionó con un mayor desarrollo de raíces seminales y pelos radicales de las plantas inoculadas, y esas respuestas fueron reproducidas por la aplicación exógena de AIA. Además, se observaron efectos positivos de la inoculación sobre el crecimiento aéreo, los cuales no pudieron ser atribuidos a la producción de auxinas. Los resultados obtenidos demuestran que las fitohormonas producidas por *Azotobacter* jugarían un rol muy importante en la promoción temprana del crecimiento de las plántulas de trigo.

Palabras claves: PGPR, fitohormonas, sideróforos, fijación de nitrógeno, inoculación de semillas.

**Molecular and functional characterization of bacteria of the genus *Azotobacter* isolated from soils of Argentina. The role of auxins in response to inoculation of wheat.**

Knowing the genetic diversity of *Azotobacter* in soils of Argentina is of great scientific and technological interest because of its current and future use in agriculture. Moreover, the mechanisms for promoting plant growth of *Azotobacter* have not yet been fully elucidated. In this work it was carried out the isolation and genotypic and phenotypic characterization of different strains of *Azotobacter*. The most frequently isolated species was *A. chroococcum*, whereas we report here for the first time the presence of *A. salinestris* and *A. armeniacus* in argentine soils. The production of siderophores, the phosphate solubilization and the production of auxins were evaluated in 21 of the isolates obtained. All tested strains produced siderophores and auxins, with differences in the amount of the latter, while no strain solubilized phosphates. Six strains with high differences in auxin production were selected and their ability to produce indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3) and zeatin (Z) were determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. In addition, their ability to fix N<sub>2</sub> by the acetylene-ethylene reduction and to promote germination and early growth of wheat seedlings was analyzed. The 6 selected strains produced different levels of IAA, GA3 and Z and differed in their ability to fix N<sub>2</sub>. The higher production of IAA correlated with further development of seminal roots and root hairs of inoculated plants, and these responses were reproduced by exogenous application of IAA. In addition, there were positive effects of inoculation on shoot growth, which could not be attributed to the production of auxins. The results show that phytohormones produced by *Azotobacter* play an important role in promoting early growth of wheat seedlings.

Keywords: PGPR, phytohormones, siderophores, nitrogen fixation, seed inoculation

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---



La diversidad microbiana es fundamental para el mantenimiento y la conservación de los recursos genéticos del mundo. Los suelos albergan una gran diversidad microbiana, la que tiene un rol importante en el mantenimiento de la fertilidad y sanidad edáfica (Ahmad *et al.* 2005a). Además, tiene un gran potencial de uso en la biotecnología, debido a que es una fuente de genes y metabolitos aún desconocida. Colwell (1997) señala que es necesario tomar medidas para censar y conservar dicha diversidad. La diversidad microbiana de los suelos se ve afectada por la vegetación, las propiedades físicas y químicas y el uso y manejo de los suelos (Haynes y Graham 2005, Franchini *et al.* 2007, Clegg 2006). La pérdida de diversidad tiene un impacto profundo en la resistencia y resiliencia de los suelos frente a perturbaciones y condiciones de estrés y por ende en la sustentabilidad de los mismos (Degens *et al.* 2001).

Entre los microorganismos que habitan el suelo se incluyen a las bacterias, hongos, virus, protozoos y algas (Nannipieri y Badalucco 2003). Las bacterias conforman el grupo metabólico más importante del suelo, y si bien se encuentran en menor cantidad que los virus y son menos voluminosas que los hongos, cumplen un rol fundamental en los ciclos de carbono y nitrógeno (Nannipieri y Badalucco 2003). La población bacteriana es mucho más abundante en el volumen de suelo influenciado por las raíces, denominado rizósfera, en relación al suelo no rizosférico (Verma *et al.* 2010). Las bacterias pueden tener efectos neutros, positivos o negativos sobre el crecimiento vegetal. Por otro lado las plantas, a través de los exudados radicales pueden estimular, inhibir o no tener efecto alguno sobre las bacterias del suelo (Pinton *et al.* 2000).

Existe un grupo de bacterias que son capaces de colonizar las raíces de las plantas y promover el crecimiento vegetal, las llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento o PGPR, de la abreviación de *plant growth promoting rhizobacteria* (Kloepper *et al.* 1980). Estas bacterias pueden actuar de una manera directa, facilitando la captación de nutrientes y/o a través de la producción de sustancias que estimulan el crecimiento, o indirectamente, a través de la prevención o disminución del efecto negativo de un organismo fitopatógeno (Verma *et al.* 2010). Las PGPR más estudiadas incluyen miembros de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Klebsiella* (Fuentes-Ramirez y Caballero-Mellado 2005). Los beneficios de la inoculación con PGPR incluyen incrementos en la tasa de germinación, crecimiento de la raíz y del tallo (Cassán *et al.* 2009); rendimiento (Díaz Zorita *et al.* 2009); aumento en la absorción de nutrientes (Okon y Kapulnik, 1986); tolerancia a la sequía (Glick, 1995) y resistencia a la enfermedades entre otros.

### **El modelo bacteriano**

Las especies del género *Azotobacter* agrupan a bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, que están distribuidas en diferentes ambientes de suelo, agua y sedimentos (Aquilanti *et al.* 2004a). La primera especie del género fue descubierta en el año 1901 por el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck empleando una técnica de enriquecimiento con un medio sin nitrógeno. Desde entonces éste se considera, junto con las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, uno de los géneros saprófitos más ampliamente estudiado debido principalmente a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Mrkovacki y Milic, 2001). La especie *A. vinelandii*, en particular, ha sido empleada extensamente como modelo en estudios bioquímicos y genéticos de la fijación biológica nitrógeno (Dalton y Kramer 2006). Recientemente se realizó la secuenciación completa del genoma de esta especie (Setubal *et al.* 2009).

*Azotobacter*, además de su empleo como PGPR, ha tenido otras aplicaciones de importancia biotecnológica, tales como la producción de surfactantes (Thavasi *et al.* 2009), alginatos (Khanafari 2007) y bioplásticos (Khanafari 2006), a partir de la degradación de sustancias de desecho como suero de leche, aceite lubricante para motores y aceite comestible usados. Adicionalmente podría ser utilizado como biorremediador de suelos, dada su capacidad de inmovilizar metales pesados tales como cromo y cadmio (Joshi *et al.* 2009).

La capacidad de fijar nitrógeno de *Azotobacter* motivó principalmente a que se empleara como fertilizante bacteriano. Así, en 1926, investigadores rusos reportaron que la inoculación del suelo con esta bacteria tenía efectos positivos e importantes sobre el crecimiento de plantas de tabaco y la acumulación de nitrógeno en el suelo. Esto llevó a una fuerte tradición de inoculación con este género en Rusia, la que se extendió durante décadas (Kennedy e Islam 2001). Sin embargo, numerosos ensayos a campo realizados entre 1958 y 1960, concluyeron que sólo en el 34% de los casos, *Azotobacter* incrementó el rendimiento de los cultivos y en valores menores al 10% (Mishustin 1970). Así, la práctica de inoculación con *Azotobacter* fue abandonada. No obstante, otros investigadores continuaron reportando efectos positivos de esta bacteria sobre los cultivos (Becking 2006).

Se han realizado una gran cantidad de ensayos *a campo* donde se demuestra el efecto positivo de *Azotobacter* sobre el rendimiento de diferentes cultivos. Se han publicado los efectos sobre cultivos extensivos como maíz (Hussain *et al.* 1987, Martínez-Toledo *et al.* 1988, Pandey *et al.* 1998), trigo (Zambre *et al.* 1984, Behl 2006, Kizilkaya 2008,) y arroz (Kannaiyan *et al.* 1980, Kennedy *et al.* 2004). Además del efecto sobre el rendimiento, algunos investigadores observaron que es posible reducir la fertilización nitrogenada hasta en un 50 % con la inoculación con este microorganismo (Kennedy *et al.* 2004). También se han reportado efectos benéficos en los rendimientos resultantes de la co-inoculación de *Azotobacter* con otros microorganismos como hongos vesículo-arbusculares en trigo (Singh *et al.* 2004, Khan y Zaidi 2007, Bahrani *et al.* 2010) y con *Azospirillum* también en trigo (Rai y Gaur 1988), en colza canola (Yasari *et al.* 2007) y en maíz (Biari *et al.* 2008).

A pesar de la considerable cantidad de información experimental que demuestra los efectos positivos de *Azotobacter* sobre el desarrollo vegetal, los mecanismos de promoción del crecimiento en este género bacteriano, no han sido totalmente comprendidos. Los mecanismos que han sido relacionados con la capacidad de promover el crecimiento vegetal en el género *Azotobacter* son principalmente la fijación del nitrógeno atmosférico (Narula *et al.* 2007), la producción de fitohormonas (Jackson *et al.* 1964, Azcón y Barea 1975, Khalid *et al.* 1999); la solubilización de fósforo (Kumar y Narula 1999) y la producción de sideróforos (Behl 2006); sin embargo, son pocos los trabajos publicados que han intentado vincular de una manera directa alguno de estos mecanismos con la respuesta observada en las plantas luego de la inoculación. Por el contrario, en otras PGPR como en el género *Azospirillum*, se ha demostrado que las fitohormonas y en particular las auxinas, tienen un rol fundamental en la promoción del crecimiento vegetal (Spaepen *et al.* 2007, Bashan y de Bashan 2010).

## **El modelo vegetal**

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es una monocotiledónea que pertenece a la familia de las Poáceas. Es el mayor y más importante cultivo a nivel mundial para consumo directo de humanos, con una cosecha anual de 620 millones de toneladas en

más de cuarenta países y para más del 35 % de la población mundial (Gustafson *et al.* 2010). Más aún, la comercialización mundial de trigo es mayor que la del resto de los cultivos en su conjunto. Debido al incremento de la población mundial, y suponiendo que el consumo de trigo se mantenga constante, se estima que para el año 2025 se requerirán unas 786 millones de toneladas de trigo (Plassé 2007). En Argentina existe una gran brecha entre el rendimiento real y potencial de trigo (Miralles y González 2009), por lo que es posible incrementar el rendimiento a través del empleo de diferentes estrategias o manejos tecnológicos. La superficie sembrada en promedio de las campañas 2003/04 a 2007/08 fue de aproximadamente 6 millones de hectáreas con un rendimiento medio de 2.7 tn.ha<sup>-1</sup> (MAGYP 2010). Sin embargo, la superficie sembrada en las dos últimas campañas fue particularmente baja entre 3,1 y 4,25 millones de hectáreas (MAGYP 2010), debido a inconvenientes climáticos y económicos (Ghida-Daza 2010).

El sector productivo argentino ha incorporado lentamente el empleo de inoculantes, principalmente bacterianos en cultivos de gramíneas, tanto en maíz como en trigo. Se estima que actualmente el 6-7 % del área sembrada con trigo y maíz ha sido inoculada con productos formulados a base de bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* u otros (Perticari *et al.* 2010). Adicionalmente, para formular estos productos mayoritariamente se utilizan rizobacterias nativas debido a que están adaptadas a las condiciones ecológicas y pueden ser más competitivas que otras cepas no nativas (Kizilkaya 2008). Salantur *et al.* (2006) y Kizilkaya (2008) reportaron que, en general, la inoculación de trigo con cepas nativas de PGPR generó mayores respuestas en el rendimiento en relación a cepas exóticas. Así, resulta imprescindible conocer la diversidad de *Azotobacter* en los suelos de nuestro país considerando su potencialidad para la formulación de inoculantes y para otras aplicaciones biotecnológicas. Por otra parte, una mejor comprensión de los mecanismos por los que *Azotobacter* estimula el crecimiento vegetal permitirá mejorar la tecnología de desarrollo y aplicación de inoculantes comerciales a partir de cepas nativas de este microorganismo.

## 1.1. OBJETIVOS GENERALES

- Obtener aislamientos del género *Azotobacter* de suelos argentinos, caracterizarlos y analizar su diversidad.
- Estudiar en tales aislamientos las características vinculadas con la promoción del crecimiento vegetal y relacionar la producción de auxinas con la estimulación de la germinación y el crecimiento temprano de trigo.



**CAPÍTULO 1: “DIVERSIDAD DE *AZOTOBACTER* EN SUELOS ARGENTINOS. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS.”**

---



## INTRODUCCIÓN

---

Según la última edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Kennedy *et al.* 2005), el género *Azotobacter* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, del orden *Pseudomonadales* y clase *Gammaproteobacteria*. El género *Azotobacter* comprende siete especies, *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* y *A. salinestris* (Kennedy *et al.* 2005).

Estas bacterias poseen células gramnegativas que pueden tener forma de cocos o bastones, con bordes redondeados o elipsoidales, de más de 2 µm de diámetro y 4 µm de longitud. Su morfología puede cambiar según las condiciones de cultivo. Generalmente las células suelen agruparse de a pares, aunque a veces pueden estar aisladas o en cadenas de diferente longitud. Dependiendo de la especie pueden ser móviles por flagelos peritricos o no móviles. Son aerobias estrictas y pueden fijar nitrógeno tanto bajo tensiones de oxígeno reducidas como bajo condiciones aeróbicas. Tienen la capacidad de formar estructuras de resistencia denominadas quistes, los cuales poseen cierta resistencia a la desecación y al daño causado por agentes físicos o químicos, y algunas especies pueden producir pigmentos. Desde el punto de vista de su metabolismo son quimioheterótrofas utilizando carbohidratos, alcoholes y sales de ácidos orgánicos como fuente de carbono, y pueden fijar 10 mg de nitrógeno por gramo de carbono en un medio definido conteniendo entre 1-2% de la fuente carbonada (Kennedy *et al.* 2005, Becking 2006)

Las especies del género *Azotobacter* se encuentran en diferentes condiciones climáticas y generalmente en suelos ligeramente ácidos a alcalinos (Kennedy *et al.* 2005). También se ha reportado el aislamiento de *Azotobacter* de las hojas y otras superficies vegetales. El pH tiene una gran influencia sobre la distribución de *Azotobacter* en los suelos. Su presencia suele ser mayor en suelos con pH mayor a 6,5, mientras que en suelos con pH menores de 6 no es común detectar a este género bacteriano (Thompson y Skerman 1979, Kole *et al.* 1988, Martiniuk y Martiniuk 2003, Becking 2006). Jensen (1965) analizando 264 suelos daneses, aisló *Azotobacter* spp. de casi todos los suelos que poseían un pH por encima de 7,5. *A. chroococcum* es la especie que se aísla más frecuentemente de los suelos, *A. beijerinckii* se encuentra principalmente en suelos ligeramente ácidos, mientras que *A. salinestris*, una especie dependiente de sodio para crecer, ha sido aislada de suelos levemente salinos de Canadá, Egipto y Australia (Page y Shivprasad 1991, Kennedy *et al.* 2005). *A. paspali* es la única especie que presenta una asociación que parece ser específica con *Paspalum notatum*. El aislamiento de *A. nigricans* y *A. armeniacus* es poco frecuente, por ello existe poca información sobre su distribución en los suelos (Kennedy *et al.* 2005, Becking 2006).

La clasificación inequívoca de *Azotobacter* a nivel de especie es difícil de lograr si solo se emplean métodos fenotípicos clásicos, debido a la variabilidad en las características fenotípicas observada para distintas cepas de una misma especie (Aquilanti *et al.* 2004a). Por ello, los métodos genotípicos son los más adecuados para la identificación de las especies de este género bacteriano. Varios de los métodos genotípicos empleados para la caracterización e identificación de microorganismos están basados en la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Algunos métodos se basan en la amplificación de numerosos fragmentos distintos empleando cebadores arbitrarios o específicos, que luego se separan en función de su tamaño, originando un patrón de bandas característico o *fingerprint*. Ejemplos de estas técnicas son RAPD (*Random Amplified Polymorphic*

DNA) y rep-PCR (*repetitive sequence based-PCR*).

En la técnica de rep-PCR se emplean cebadores complementarios a secuencias de ADN repetitivas, altamente conservadas, presentes en copias múltiples en la gran mayoría de las bacterias gramnegativas y varias grampositivas (Versalovic *et al.* 1991, 1994). Tres familias de secuencias repetitivas, no relacionadas a nivel de secuencia de ADN, fueron las más estudiadas: las secuencias REP (*Repetitive Extragenic Palindromes*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y los elementos BOX (Louws *et al.* 1994). Este tipo de secuencias repetitivas son transcritas pero no traducidas, tienen el potencial de formar estructuras secundarias del tipo horquillas y podrían jugar un rol importante en la organización del genoma bacteriano. Dado que se considera que la organización del genoma bacteriano es moldeada por la selección, la distribución de las secuencias REP, ERIC y BOX podría ser un indicador de la estructura y evolución del genoma bacteriano (Lupski y Weinstock 1992). Estas secuencias están ubicadas en posiciones intergénicas alrededor de todo el cromosoma, en ambas orientaciones, y sirven como sitios de unión para cebadores específicos diseñados para amplificar los fragmentos de ADN ubicados entre los elementos repetitivos. Luego, esos fragmentos de ADN se separan mediante electroforesis en geles, generando un patrón de bandas específico. Esta técnica es especialmente útil para identificar y diferenciar bacterias a nivel de subespecie o cepa, característica de importancia para el análisis de la diversidad genotípica (Oda *et al.* 2002).

El gen ribosomal 16S (ADNr 16S) es uno de los más utilizados en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Es un gen altamente conservado, presentando regiones homólogas a todos los organismos pero también regiones altamente variables, que permiten la clasificación de las bacterias a nivel de género y especie (Rodicio y Mendoza 2004). El análisis de secuencia del gen ribosomal 16S es uno de los métodos más simples para la clasificación taxonómica de las bacterias. Una alternativa al análisis de secuencia, es el análisis de restricción de este gen, que resulta especialmente útil en estudios que involucran el análisis de un gran número de aislamientos. Esta última metodología denominada ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*) (Heyndrickx *et al.* 1996), consiste en la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S completo empleando cebadores universales, y su posterior digestión con enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes son separados mediante electroforesis en geles y luego el patrón obtenido es comparado y analizado empleando un programa informático de análisis de patrones de bandas. Esta técnica se utiliza generalmente para estudiar diversidad e identificar aislamientos bacterianos a nivel de género o especie (Chenoll *et al.* 2003), y es frecuentemente empleada como una alternativa frente a métodos más laboriosos y caros. Aquilanti *et al.* (2004 a, b) determinaron cuales son las enzimas de restricción más apropiadas para la identificación de cepas de los géneros *Azotobacter* y *Azomonas* y su clasificación a nivel de especie empleando ARDRA.

Actualmente es escaso el conocimiento sobre la diversidad genética de *Azotobacter* a nivel global (Bathia *et al.* 2009), y mucho menos es lo que se conoce de la presencia y diversidad de *Azotobacter* en suelos argentinos. Trabajos como los de Amor Asunción *et al.* (1983) y Vidal de Latina *et al.* (2009) citan el aislamiento de *Azotobacter* de suelos de nuestro país. Sin embargo, en ninguno de los trabajos publicados se ha hecho una identificación a nivel de cepa o especie y menos aún se han empleado técnicas moleculares para su caracterización.

## **OBJETIVOS**

- Obtener aislamientos del género *Azotobacter* de suelos agrícolas y no agrícolas de nuestro país.
- Caracterizar e identificar los aislamientos por técnicas de biología molecular y analizar su diversidad.

## **HIPÓTESIS**

- Existe una gran diversidad genotípica de *Azotobacter* en suelos argentinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### **Aislamiento de *Azotobacter*.**

Se analizaron un total de 84 muestras de suelos agrícolas y no agrícolas de diferentes localidades de 11 provincias de Argentina: Buenos Aires, Entre Ríos, Córdoba, Santa Fe, Santiago del Estero, Salta, Chubut, Río Negro, Neuquén, La Pampa y Jujuy, recolectadas durante los años 2005 y 2006. Las muestras de suelos agrícolas se tomaron de cultivos de trigo, maíz, girasol, soja y maní, así como de suelos sin vegetación o con rastrojos. Las muestras de suelos no agrícolas se tomaron de pasturas implantadas, praderas con especies naturalizadas, banquina de caminos y costas de cursos de agua. La gran mayoría de las muestras fueron extraídas de los primeros 20 cm del suelo, mientras que algunas fueron tomadas de mayores profundidades. Una fracción de cada muestra fue enviada al Laboratorio del Instituto de Suelos del INTA Castelar para la determinación de parámetros físico-químicos del suelo.

Para el aislamiento de *Azotobacter* a partir de las muestras de suelo, se ensayaron varias técnicas de las numerosas citadas en la literatura (Pochon 1954, Brown *et al.* 1962, Döbereiner *et al.* 1995, Kennedy *et al.* 2005, Becking 2006), con el objetivo de establecer una metodología sencilla que permitiera obtener aislamientos exitosos de *Azotobacter* spp. y redujera la posibilidad de errores en la selección de las colonias. Una de las metodologías consistió en la siembra de diluciones decimales seriadas de suspensiones del suelo en placas de Petri con tres medios de cultivo sin nitrógeno. Los medios empleados fueron el medio de Brown (Brown *et al.* 1962) con glucosa como fuente de carbono, el medio de Winogradsky con manitol como fuente de carbono (Kennedy *et al.* 2005) y el medio LG que contiene sacarosa como fuente carbonada y azul de bromotimol como indicador de pH (Döbereiner *et al.* 1995). Otro método empleado fue el de la pasta de suelo, en el cual se mezclaron 30-50 g de suelo con manitol (1% aproximadamente) en un mortero y luego se agregó agua hasta formar una pasta, la cual se distribuyó en placas de Petri y se niveló con una espátula (Becking 2006). También se ensayó el método de la siembra de granos de suelo (Pochon 1954), en el cual se tomó con una espátula una pequeña cantidad de suelo y se lo esparció sobre placas con medio Burk (Kennedy *et al.* 2005) con manitol como fuente de C. Luego de 3-5 días de incubación se observó el crecimiento de colonias en la superficie de los medios empleados en los tres métodos y las colonias con características similares a *Azotobacter* se repicaron en el mismo medio empleado para el aislamiento o en el medio LG con el objetivo de purificarlas.

### Preservación de los aislamientos.

La pureza de los cultivos se verificó a través de la tinción de Gram y observación microscópica, y sucesivos repiques en medio TYG sólido (triptona, extracto de levadura y glucosa 5 g.l<sup>-1</sup> de cada uno) para verificar la ausencia de contaminantes. Inicialmente, los cultivos obtenidos se guardaron a 4°C en tubos con agar inclinado en el medio Burk. Al mismo tiempo, las colonias previamente crecidas en medio agarizado se conservaron a -20°C y -70°C en medio Burk suplementado con glicerol al 50%, de manera similar a lo realizado con las cepas de rizobios y azospirilos de las colecciones bacterianas del Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), perteneciente al

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Sin embargo, luego de más de 4 meses de conservación con estas dos metodologías, muchos aislamientos no crecieron al ser repicados a distintos medios agarizados en placas de Petri. La reactivación de la mayoría de las cepas que no crecían de ese modo se logró al cultivarlas en medio líquido. Debido a esta experiencia, la conservación a largo plazo de las cepas se realizó de manera similar a la realizada en el Banco Nacional de Microorganismos (BNM), INBA, Cátedra de Microbiología Agrícola-FAUBA, y se describe a continuación.

Los aislamientos puros se cultivaron en agitación en medio Burk líquido durante 48 h a 28 °C. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 13000 rpm durante 12 min y las células se suspendieron en medio Burk fresco suplementado con 30 % de glicerol, en un volumen diez veces menor al del cultivo original. La suspensión resultante fue distribuida en microtubos de 1,5 ml de capacidad y se conservaron en freezer a -70°C. Esta modificación permitió una conservación adecuada de las cepas para su uso posterior en ensayos de esta tesis.

### **Caracterización genotípica de los aislamientos e identificación**

La caracterización genotípica e identificación se llevó a cabo mediante las técnicas rep-PCR, ARDRA y el análisis de secuencia parcial del ADNr 16S. En las técnicas rep-PCR y ARDRA se incluyó como cepa de referencia a *A. chroococcum* BNM272 (Banco Nacional de Microorganismos, Argentina). En el ARDRA, se incluyeron además las cepas *A. vinelandii* NRRL-B 14627, *A. vinelandii* NRRL-B 14641 y *A. vinelandii* NRRL-B 14644 (Agricultural Research Service Culture Collection, USA).

#### rep-PCR

Todos los aislamientos se caracterizaron mediante rep-PCR con los cebadores BOXA1R siguiendo el protocolo descrito por Versalovic *et al.* (1994). Para las reacciones de amplificación, se resuspendió una colonia en agua *milliQ* estéril y se utilizó 1 µl como fuente de DNA genómico. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen total de 25 µl conteniendo: buffer Gitschier 1x, 2,5 µM de cebador, 1,25 mM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa, DMSO 10% v/v, glicerol 5% v/v y 5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático (MJ Research PTC-100) con un ciclo de desnaturalización inicial de 7 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), *annealing* (53°C, 1 min) y extensión (65°C, 8 min), y una extensión final a 65°C por 16 min. Los productos de reacción (6 µl) se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% (20x24 cm) en buffer TBE 1x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 20 mM, pH 8,3). La corrida electroforética se realizó a 5 V/cm a temperatura ambiente durante 4,6 horas. En cada gel, en la calle central y en las de los extremos, se incluyó un marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen) como referencia. Las bandas se revelaron sumergiendo los geles en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,6 µg/ml) por 30 minutos y luego se los lavó con agua *milliQ* por otros 30 minutos. Los geles teñidos se observaron con un transiluminador de luz UV (Spectroline) y se fotografiaron con el sistema de documentación Kodak EDAS120. Las imágenes digitales de los *fingerprints* se normalizaron con los marcadores de peso molecular utilizados como referencia, y se analizaron con el programa GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). El grado de similitud entre los perfiles genéticos se determinó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) y los dendrogramas se

construyeron utilizando el método de pares de grupos con media aritmética (UPGMA) (Sneath y Sokal 1973, Häne *et al.* 1993).

#### Análisis de restricción del gen ribosomal 16S amplificado por PCR (ARDRA)

Las cepas representativas de cada grupo de rep-PCR se identificaron mediante ARDRA, siguiendo la metodología descrita por Aquilanti *et al.* (2004 a). Para la amplificación de los genes ribosomales 16S se emplearon los cebadores universales para eubacterias fD1 y rD1. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen de 50 µl conteniendo *buffer* 1x (provisto con la enzima), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10% de DMSO, 0,3 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa y 1 µl de suspensión celular preparada de igual forma que en la técnica de rep-PCR. La amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), *annealing* (60°C, 40 seg) y extensión (72°C, 2 min) y una extensión final de 72°C por 8 min. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *Rsa*I y *Hha*I. Las digestiones fueron llevadas a cabo por separado para cada enzima en un volumen final de 20 µl que contenía 5 U de la enzima, *buffer* 1x (provisto con la enzima), 0,1 mg.µl<sup>-1</sup> de albúmina de suero bovina (BSA) y 10 µl del producto de amplificación. Se incubó durante 2 h a 37°C. Los productos de las digestiones se analizaron en geles de agarosa de alta resolución al 2% (agarosa MetaPhor) de 10 cm de largo, en *buffer* TBE 1x. La electroforesis se realizó a 5V/cm durante 2,5 h, incluyendo en la calle central y en las de ambos extremos de cada gel, los marcadores de peso molecular 50bp DNA Ladder y 100bp DNA Ladder (Promega). Los geles se tiñeron y fotografiaron de igual manera que lo descrito para el análisis de rep-PCR. El grado de similitud entre los perfiles se determinó utilizando el coeficiente de Dice y los dendrogramas se construyeron utilizando el método de pares de grupos con media aritmética (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973, Häne *et al.*, 1993).

Los perfiles de restricción se compararon con aquellos publicados por Aquilanti *et al.* (2004a). Estos autores no incluyeron las especies *A. salinestrus* y *A. nigricans* en su trabajo, por lo tanto, los perfiles obtenidos fueron también comparados con los generados por la restricción virtual con las enzimas *Rsa*I y *Hha*I de las secuencias del ADNr 16S de las cepas tipo de *A. salinestrus* (ATCC 49674, N° de acceso GeneBank AB175656) y de *A. nigricans* (IAM 15005 N° de acceso GeneBank AB175651), disponibles en la base de datos GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para ello, se empleó el programa Restriction Mapper versión 3 (<http://www.restrictionmapper.org/>).

#### Secuenciación parcial del ADNr 16S

Con el objetivo de confirmar la identificación de los aislamientos realizada por ARDRA, una o más cepas de cada grupo fueron seleccionadas para la secuenciación parcial del ADNr 16S. Además, en la selección de las cepas a secuenciar, se tuvo en cuenta de incluir aquellas cepas que se emplearon en los ensayos de inoculación del Capítulo 3. Se emplearon los cebadores universales Y1 e Y2 (Young *et al.* 1991) que permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 290 pb del gen ribosomal 16S. La extracción del ADN se llevó a cabo a partir de cultivos líquidos de 24 h empleando un *kit* comercial (Wizard Genomic DNA purification kit, Promega). La concentración

de ADN se ajustó a  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . La amplificación se llevó a cabo en un volumen de  $25 \mu\text{l}$  conteniendo Buffer 1x (provisto con la enzima),  $1,5 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,2 \text{ mM}$  de dNTPs,  $0,4 \text{ mM}$  de cada cebador,  $2,5 \text{ U}$  de *Taq* DNA polimerasa y  $50 \text{ ng}$  de ADN. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de  $5 \text{ min}$  a  $95^\circ\text{C}$ , seguida por  $30$  ciclos de desnaturalización ( $94^\circ\text{C}$ ,  $1 \text{ min}$ ), *annealing* ( $69^\circ\text{C}$ ,  $40 \text{ seg}$ ) y extensión ( $72^\circ\text{C}$ ,  $1 \text{ min}$ ), y una extensión final a  $72^\circ\text{C}$  durante  $5$  minutos.

El producto amplificado ( $3 \mu\text{l}$ ) se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al  $1\%$  (p/v) en TBE1x. El gel se tiñó con SYBR Safe DNA gel staining (Invitrogen) durante  $30 \text{ min}$ . Se incluyó un marcador de peso molecular  $1\text{Kb plus DNA Ladder}$  (Invitrogen). Los productos de PCR se purificaron utilizando un *kit* comercial (QIA quick PCR purification kit), se ajustó su concentración a  $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , y las muestras fueron enviadas a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar para su secuenciación. Las secuencias parciales del ADNr 16S de las cepas nativas obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank empleando el programa Basic BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1990) y se alinearon entre sí con el programa ClustalX 2.0.11 (Thompson *et al.* 1997). Las secuencias obtenidas se depositaron luego en la base de datos GenBank con sus correspondientes números de acceso.

### **Caracterización microbiológica clásica**

Se realizó la caracterización microbiológica clásica de  $21$  aislamientos seleccionados en función del grado de similitud encontrado en el análisis de rep-PCR

#### Morfología y tamaño de las colonias

La morfología y tamaño de las colonias se determinó en cultivos sembrados en placas de Petri con medio LG, luego de  $6$  días de incubación a  $28^\circ\text{C}$ . Al cabo de ese tiempo se describió el diámetro, tamaño, forma, borde, elevación, superficie, características físicas y estructura interna de las colonias, de acuerdo a los criterios propuestos por Verna (1945).

#### Tinción de Gram

Se realizó la coloración según la técnica de Gram con la metodología de Hucker (Doetsch 1981). Se emplearon cultivos bacterianos crecidos en medio Burk sólido y la tinción se realizó luego de  $2$  días de incubación a  $28^\circ\text{C}$ .

#### Movilidad

La movilidad se determinó en preparados húmedos a partir de un cultivo bacteriano puro de  $48 \text{ h}$  de crecimiento en medio Burk líquido mediante su observación en el microscopio óptico (Kennedy *et al.* 2005)

### Producción de pigmentos

Para evaluar la producción de pigmentos se empleó la técnica descrita por Kennedy *et al.* (2005). Se estriaron cultivos en placas de Petri conteniendo medio de Norris y Jensen modificado por la omisión de  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  para favorecer la producción de pigmentos. Las placas fueron examinadas con luz natural para la visualización de pigmentos difusibles y bajo luz ultravioleta para pigmentos fluorescentes.

### Producción de quistes

Para inducir la formación de quistes, una característica diferencial del género *Azotobacter*, los aislamientos se cultivaron en medio Burk con 0,3% de butanol como única fuente de carbono (Socolofsky y Wyss 1961), durante 7 días a 28°C. La presencia de dichas estructuras se evaluó mediante tinción de Gram y observación con microscopio óptico.

## RESULTADOS

---

Con la siembra de diluciones seriadas en tres medios diferentes, todos sin nitrógeno, se lograron obtener aislamientos con características macro y microscópicas típicas del género *Azotobacter*, aunque también se observó el crecimiento de numerosos tipos de colonias. Varias de estas colonias se asemejaron a las colonias típicas de *Azotobacter*, sin embargo, al observarse al microscopio, la morfología celular de algunas de ellas no era la típica del género. Además, la purificación se hacía muy dificultosa y lenta requiriendo varios subcultivos. En el método de la pasta de suelo se observó el crecimiento de colonias brillantes, algunas blancas y otras transparentes en la superficie de la pasta. Partiendo de las colonias blancas, luego de dos o tres subcultivos en el medio LG, se obtuvieron aislamientos con las características típicas de *Azotobacter*, tanto macro como microscópicas. Por lo tanto, se consideró que esta metodología, además de ser simple, era confiable para el aislamiento del género en cuestión; sin embargo, se observó como desventaja el gran tiempo que demandaba dicha metodología, la dificultad de regular la cantidad de agua a emplear para formar una pasta y mantener un adecuado nivel de humedad en la placa durante la incubación. Además, se necesita una muestra de suelo de tamaño considerable, a veces no disponible. Por último, la siembra de los granos de suelo en un medio sin N y con manitol como fuente de carbono resultó ser el método más simple y confiable para el aislamiento de *Azotobacter* a partir de las muestras de suelo. La presencia de *Azotobacter* se evidenciaba por el crecimiento de colonias mucosas, blancuzcas y brillantes alrededor de algunas partículas de suelo. A partir de dichas colonias y luego de dos a tres subcultivos en medio LG se lograron obtener cultivos puros del tipo de *Azotobacter*. En función de estos resultados se decidió emplear como metodología rutinaria para el aislamiento, la siembra de granos de suelo y el posterior subcultivo en medio LG hasta obtener cultivos puros. Se seleccionaron las colonias de color amarillo, en diferentes tonalidades, secas o mucosas y de diferentes formas y tamaños desarrolladas en el medio LG. En todos los casos, al observar preparados de estas colonias en el microscopio, se apreciaron células relativamente grandes y con las formas típicas de *Azotobacter*. Además, en los primeros subcultivos en el medio LG fue común observar además el crecimiento de pequeñas colonias transparentes y brillantes. Sin embargo, en el microscopio se visualizaban células muy pequeñas, en forma de bastones o cocos, gramnegativos o positivos, cuya morfología era muy diferente a la descrita para el género *Azotobacter* y por lo tanto, estas colonias fueron descartadas.

En el cuadro 1 se presentan las 84 muestras de suelos empleadas para el aislamiento de *Azotobacter* sp. Se logró el aislamiento y purificación de colonias con características típicas del género *Azotobacter* de 31 de las 84 muestras de suelos, obteniéndose un total de 39 aislamientos. Se analizaron 59 muestras de suelos agrícolas y 25 muestras de suelos no agrícolas. En el 57% de las muestras de suelos no agrícolas fue posible el aislamiento de bacterias del tipo *Azotobacter*, mientras que sólo en el 27% de los suelos agrícolas se detectó la presencia de bacterias con características de dicho género. Hubo ocho aislamientos (AT44, AT45, AT46, AT47, AT48, AT49, AT50 y AT51) que no pudieron ser cultivados nuevamente luego de preservarlos, y por lo tanto no fueron caracterizados.

*Azotobacter* se aisló de suelos muy diferentes entre sí tal como lo evidencian por ejemplo, los valores de materia orgánica, pH, conductividad eléctrica y fósforo (Cuadro 1). En casi todas las muestras de suelos donde se logró el aislamiento de *Azotobacter* el pH fue mayor a 6. Las excepciones fueron las muestras N°38 (pH= 5,5) y la muestra N°47 (pH=5,8).

**Cuadro 1.** Muestras de suelo empleadas para el aislamiento de *Azotobacter*. Las muestras fueron tomadas entre 0-20 cm de profundidad, excepto en los sitios en los cuales se especifica entre paréntesis la profundidad de muestreo. <sup>a</sup>Aislamientos que no pudieron volver a ser cultivados luego de su conservación

Nº de muestra	Sitio muestreado	Ubicación (Provincia y localidad)	Aislamientos obtenidos	MO (%)	pH	CE (mS/cm)	P (ppm)
<b>Suelos agrícolas</b>							
1	Cultivo de maíz	Buenos Aires (Azul)	-	5,12	5,50	0,15	14,90
2	Rastrojo de maíz	Buenos Aires (Azul)	AT25	3,38	7,30	0,48	7,40
3	Cultivo de Soja	Buenos Aires (Colón)	-	4,79	5,30	0,88	72,10
4	Cultivo de Trigo	Buenos Aires (Colón)	-	4,02	6,00	1,35	48,60
5	Cultivo de girasol	Buenos Aires (Tres Arroyos)	-	3,47	5,41	0,79	34,80
6	Cultivo de avena	Buenos Aires (Necochea)	-	4,36	6,27	0,20	30,30
7	Cultivo de Trigo	Buenos Aires (S. A. de Areco)	-	3,28	5,45	0,80	18,6
8	Cultivo de trigo	Buenos Aires (Orense)	-	4,9	5,4	0,75	17,1
9	Suelo desnudo	Buenos Aires (Balcarce)	AT22	5,72	5,80	1,21	51,00
10	Cultivo de trigo	Buenos Aires (Tres Arroyos)	-	3,34	5,20	0,22	10,40
11	Cultivo de soja	Buenos Aires (Chivilcoy)	-	3,81	5,50	0,33	6,70
12	Cultivo de soja (20-40cm)	Buenos Aires (Chivilcoy)	-	2,38	5,50	0,26	3,60
13	Cultivo de soja (40-60 cm)	Buenos Aires (Chivilcoy)	-	1,10	5,90	0,43	2,10
14	Cultivo de soja	Buenos Aires (Chivilcoy)	-	4,10	5,40	0,39	7,30
15	Cultivo de soja (20-40 cm)	Buenos Aires (Chivilcoy)	-	3,53	5,50	0,26	5,90
16	Cultivo de soja (40-60 cm)	Buenos Aires (Chivilcoy)	-	1,26	5,90	0,30	1,30
17	Cultivo de girasol	Buenos Aires (el Ciclón)	-	3,31	nd	nd	18,9
18	Suelo desnudo	Buenos Aires (Echeverría)	-	2,57	5,69	0,53	8,6
19	Rastrojo de trigo	Buenos Aires (Castelar)	-	3,02	5,62	0,52	15,8

**Cuadro 1. Continuación**

<b>Nº de muestra</b>	<b>Sitio muestreado</b>	<b>Ubicación (Provincia y localidad)</b>	<b>Aislamientos obtenidos</b>	<b>MO (%)</b>	<b>pH</b>	<b>CE (mS/cm)</b>	<b>P (ppm)</b>
20	Cultivo de soja(0-30cm)	Buenos Aires (Junín)	-	2,07	6,1	0,42	3,4
21	Cultivo de soja(30-60cm)	Buenos Aires (Junín)	-	0,86	7,35	0,32	2,1
22	Cultivo de soja(60-200cm)	Buenos Aires (Junín)	-	0,12	8,92	0,33	3,1
23	Cultivo de soja	Córdoba (Villa Dolores)	AT50 <sup>a</sup>	1,76	7,66	0,34	34,2
24	Cultivo de trigo	Córdoba (Corral De Bustos)	-	3,10	5,81	0,68	24,10
25	Cultivo de trigo	Córdoba (Corral De Bustos)	-	2,90	6,00	0,55	11,30
26	Cultivo de trigo	Córdoba (Corral De Bustos)	-	3,00	5,93	0,63	21,10
27	Cultivo de trigo	Córdoba (Corral De Bustos)	-	2,86	6,20	0,57	7,40
28	Cultivo de trigo	Córdoba (Corral De Bustos)	AT33	3,12	6,13	0,69	10,10
29	Cultivo de trigo	Córdoba (Corral De Bustos)	AT32	3,48	6,08	0,63	11,60
30	Cultivo de trigo	Córdoba (Corral De Bustos)	AT36	3,15	6,06	0,52	11,1
31	Cultivo de Soja	Córdoba (Huinca Renancó)	-	1,34	6,33	0,4	31,6
32	Cultivo de maní	Córdoba (Santa Eufemia)	-	2,16	5,1	1,21	41,7
33	Cultivo de trigo	Córdoba (Santa Eufemia)	-	3,57	5,53	0,72	31,3
34	Cultivo de soja	Córdoba (Bell Ville)	-	2,02	6,13	0,65	16,5
35	Cultivo de soja	Córdoba (Bell Ville)	-	2,02	6,13	0,65	16,5
36	Cultivo de trigo	La Pampa (Gral Pico)	AT46 <sup>a</sup>	3,45	nd	nd	42,2
37	Cultivo de trigo	La Pampa (Paraná)	AT39	4,47	7,00	0,93	13,50
38	Suelo desnudo	Entre Ríos (C. del Uruguay)	AT48 <sup>a</sup>	8,17	5,5	1,5	16,6
39	Cultivo de soja	Santa Fe (Videla)	AT37	2,10	7,43	0,54	7
40	Cultivo de soja (20-40cm)	Santa Fe (Videla)	-	1,59	8,07	1,04	3,10
41	Cultivo de soja (40-60 cm)	Santa Fe (Videla)	AT38	1,00	8,28	0,94	3,00
42	Cultivo de soja (0-20 cm)	Santa Fe (Videla)	-	2,45	6,53	0,75	18,00
43	Cultivo de soja (20-40 cm)	Santa Fe (Videla)	-	1,79	6,38	0,28	6,40
44	Cultivo de soja (40-60 cm)	Santa Fe (Videla)	-	1,12	6,71	0,46	5,3
45	Cultivo de soja	Santa Fe (Runciman)	-	3,43	5,00	1,26	33,50
46	Cultivo de soja	Santa Fe (Runciman)	-	4,64	5,00	1,45	67,00

Cuadro 1. Continuación

Nº de muestra	Sitio muestreado	Ubicación (Provincia y localidad)	Aislamientos obtenidos	MO (%)	pH	CE (mS/cm)	P (ppm)
47	Cultivo de soja	Santa Fe(Amstrong)	AT49 <sup>a</sup>	3,45	5,8	0,39	52,1
48	Cultivo de soja	Santa Fe (Amstrong)	-	3,36	6,00	0,71	101,4
49	Cultivo de soja	Santa Fe (Amstrong)	-	3,41	6,00	0,67	76,1
50	Cultivo de Soja	Santa Fe (Amstrong)	-	3,45	6,10	0,39	40,20
51	Cultivo de soja	Santa Fe (Oliveros)	-	1,88	5,63	0,51	12,1
52	Cultivo de soja	Santa Fe (Venado Tuerto)	-	3,74	6,07	0,44	35,80
53	Cultivo de soja	Santiago del Estero (Quimilí)	-	2,84	7,03	nd	125,70
54	Cultivo de soja	Santiago del Estero (Quimilí)	AT16, AT1, AT2	3,10	7,17	nd	127,80
55	Cultivo de soja	Santiago del Estero (Quimilí)	AT17, AT18	2,78	7,16	nd	104,20
56	Cultivo soja	Salta (Embarcación)	AT19	1,78	6,40	0,21	48,80
<b>Suelos no agrícolas</b>							
57	Pastura de trébol	Buenos Aires (Arrecifes)	-	4,36	4,70	0,53	29,70
58	Costado de camino	Buenos Aires (Sta. Clara del Mar )	AT9	5,72	7,83	0,80	8,50
59	Terreno urbano	Buenos Aires (Sta. Clara del Mar )	AT4,AT5	0,98	8,45	0,48	8,50
60	Pastura de trébol rojo	Buenos Aires (Vedia)	-	2,95	5,50	0,29	15,00
61	Costado de laguna	Buenos Aires (Mar chiquita)	AT30	1,86	8,20	0,43	1,90
62	Costado laguna	Buenos Aires (Mar chiquita)	AT31	1,05	8,00	1,45	7,70
63	Pastura de Festuca	Buenos Aires (Bordenave)	AT44 <sup>a</sup>	2,31	7,20	0,12	22,00
64	Pastura de Festuca	Buenos Aires (Bordenave)	AT51 <sup>a</sup>	2,79	6,57	0,16	21,60
65	Pastura de Festuca	Buenos Aires (Bordenave)	-	3,38	6,99	0,17	11,10
66	Pastura de Agropiro	Buenos Aires (Bordenave)	AT45 <sup>a</sup>	5,00	6,54	0,23	12,90
67	Pastura de Agropiro	Buenos Aires (Bordenave)	-	6,79	6,40	0,24	11,40
68	Banquina	Buenos Aires (necochea)	-	7,07	6,05	0,22	146,40
69	Pastura de gramíneas	Santa Fe (Runciman)	AT47 <sup>a</sup>	1,57	8,21	2,46	226,2
70	Pastura de gramíneas	Santa Fe (Runciman)	-	4,55	nd	nd	72,2
71	Pastura de gramíneas	Santa Fe (Runciman)	-	4,24	nd	nd	79,4
72	Pradera natural	Chubut (Pto Mdryn)	AT42	1,09	7,5	0,48	7,4
73	Pradera natural	Chubut (Gaiman)	AT28	3,15	8,3	0,66	45,8

**Cuadro 1. Continuación**

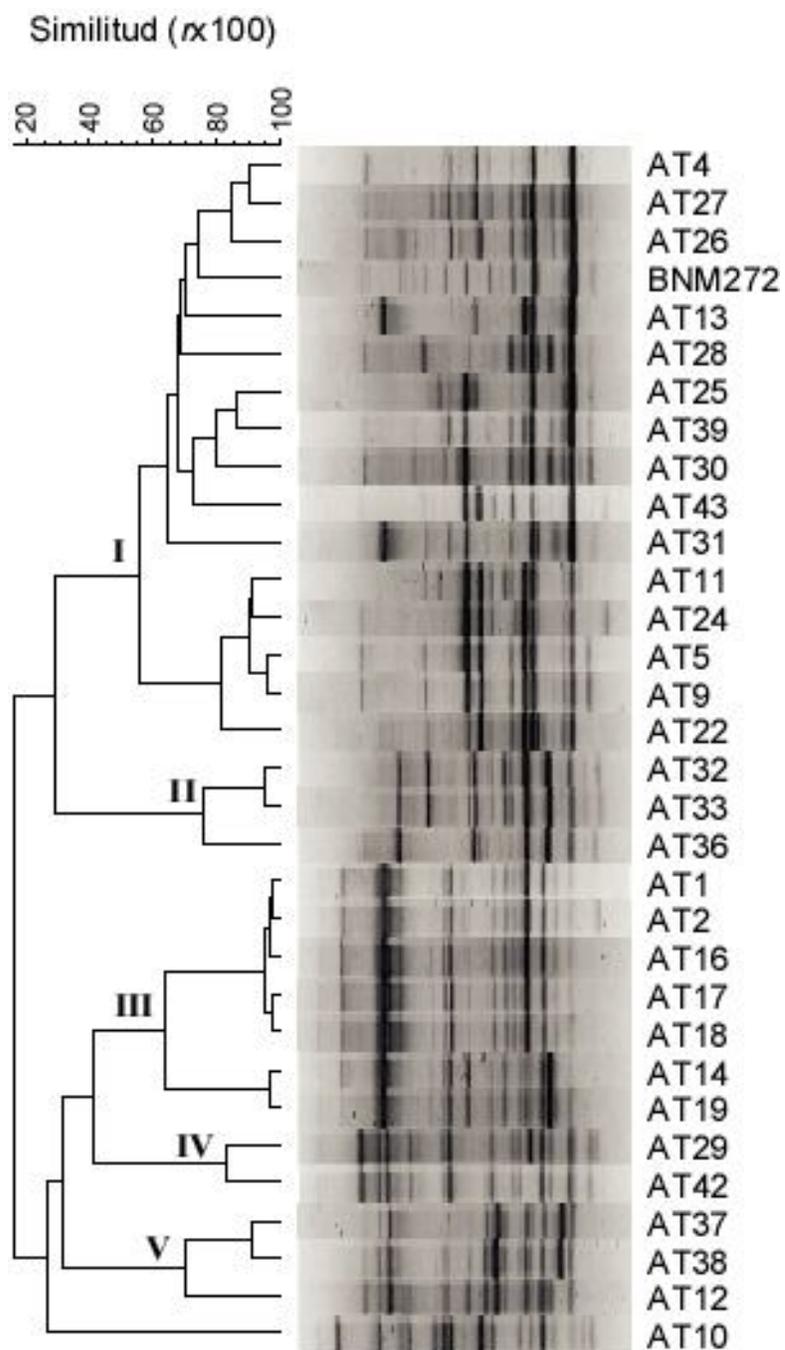
<b>Nº de muestra</b>	<b>Sitio muestreado</b>	<b>Ubicación (Provincia y localidad)</b>	<b>Aislamientos obtenidos</b>	<b>MO (%)</b>	<b>pH</b>	<b>CE (mS/cm)</b>	<b>P (ppm)</b>
74	Orilla de río	Chubut (Villa Ameghino)	AT29	2,81	7,7	1,5	43,5
75	Orilla de Río	Chubut (Trevelín)	AT43	1,02	6,60	1,58	8,10
76	Pradera natural	Chubut (Esquel)	AT24	2,74	6,40	0,49	40,40
77	Costa de Arroyo	Neuquén (Villa La Angostura)	-	1,79	6,20	1,51	17,50
78	Costa de arroyo.	Río Negro(Gutiérrez)	-	8,03	6,20	nd	45,50
79	Pradera natural	Río Negro(Gutiérrez)	-	2,74	5,40	1,48	1,00
80	Pradera natural	Salta (J.V.González)	AT14	1,64	7,80	2,24	3,00
81	Banquina camino	Jujuy (Tilcara)	AT10, AT11, AT12, AT13	0,19	8,77	0,28	4,80
82	Pradera natural	Jujuy (Tilcara)	AT26, AT27	0,19	8,77	0,28	4,80
83	Campo natural (sierra)	Córdoba (V. Gral. Belgrano)		nd	nd	nd	nd
84	Campo natural (valle)	Córdoba (La Cumbrecita)		nd	nd	nd	nd

## Caracterización genotípica e identificación de los aislamientos

### rep-PCR

Para evaluar la diversidad entre las cepas aisladas se realizó una caracterización genotípica inicial mediante rep-PCR. Los perfiles genéticos obtenidos y el análisis de agrupamiento se muestran en la Figura 1. La mayoría de los aislamientos presentaron perfiles de rep-PCR característicos, por lo que pueden considerarse cepas distintas. Se obtuvieron 23 cepas diferentes, ( $r < 90\%$ ), 5 representadas por más de un aislamiento. En su mayoría, estos aislamientos fueron obtenidos de diferentes sitios de muestreo de una misma localidad y podrían considerarse cepas hermanas, como es el caso de los aislamientos AT32 y AT33 aislados de dos sitios muestreados de un mismo establecimiento agropecuario y los aislamientos AT5 y AT9, aislados de dos sitios diferentes de Santa Clara del Mar. Un caso particular es el de los aislamientos AT4 y AT27 que tienen dos orígenes muy distantes entre sí, como Jujuy y Buenos Aires, pero sin embargo presentaron perfiles de rep-PCR muy similares que indican una estrecha relación genética.

A un nivel de similitud del 55% pueden definirse 5 grupos que incluyen a todas las cepas aisladas menos a la cepa AT10, que ocupa una posición separada. La cepa *A. chroococcum* BNM272 utilizada como referencia conforma el grupo I, el cual incluye al 48% de los aislamientos que fueron obtenidos de suelos de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Jujuy y Chubut. El grupo II agrupa a los tres aislamientos provenientes de diferentes muestras de un suelo agrícola de Córdoba (AT32, AT33 y AT36) y el grupo III comprende a cinco aislamientos obtenidos de dos muestras de un suelo de Santiago del Estero con perfiles muy similares, (AT1, AT2, AT16, AT17, AT18) y a dos aislamientos de dos localidades de Salta (AT14 y AT19). El grupo IV está conformado por dos aislamientos de dos muestras de distintas localidades de la provincia de Chubut (AT42 de Puerto Madryn y AT29 de Villa Ameghino), mientras que el grupo V agrupa a un aislamiento de un suelo de Jujuy, y dos aislamientos a dos profundidades diferentes de un mismo suelo de Santa Fe (AT37 y AT38).

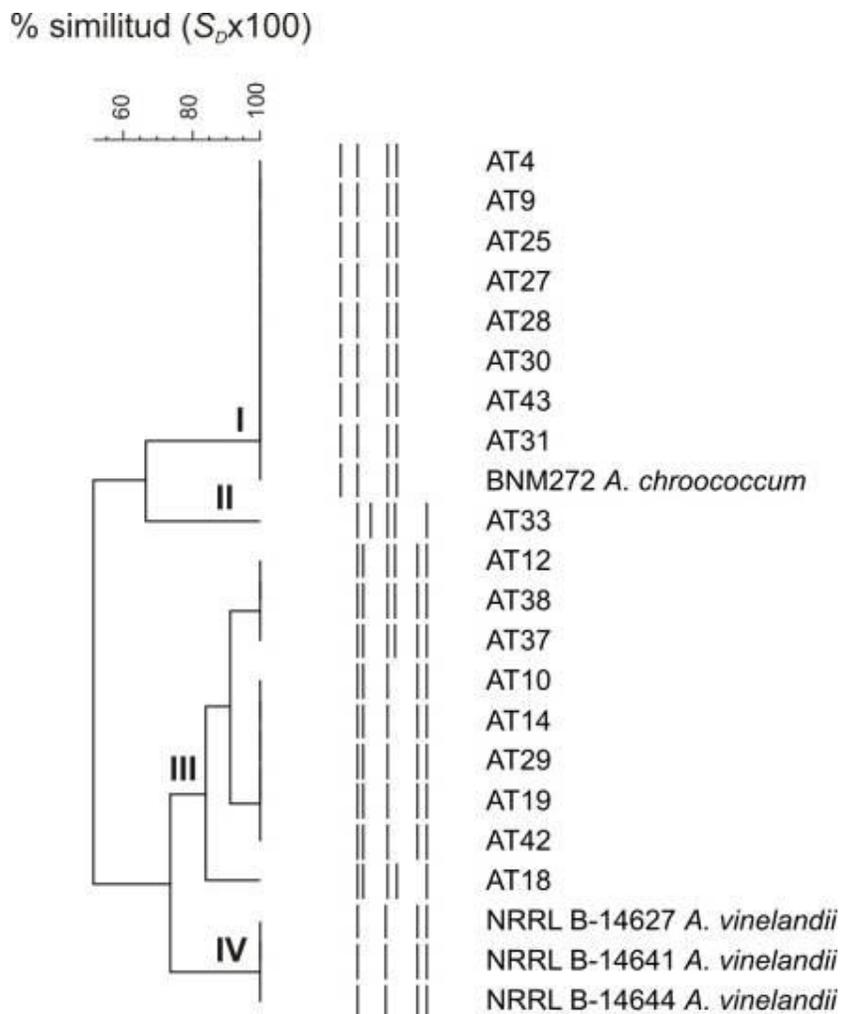


**Figura 1.** Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis de los perfiles de rep-PCR con los cebadores BOXA1R de los aislamientos obtenidos de diferentes suelos.

## ARDRA

Se realizó la identificación taxonómica de los aislamientos a nivel de género y especie mediante el análisis de restricción del gen ribosomal 16S (ARDRA). Solo se analizaron cepas representativas de todos los aislamientos, incluyendo una o más cepas de cada grupo de rep-PCR. Las cepas seleccionadas fueron: AT4, AT9, AT10, AT12, AT14, AT18, AT19, AT25, AT27, AT28, AT29, AT30, AT31, AT33, AT37, AT38, AT42 y AT43. Este criterio fue adoptado debido a que existe una alta correlación entre los agrupamientos que se obtienen con las técnicas de rep-PCR y los valores de homología DNA-DNA (Rademaker *et al.* 2000), el criterio principal para el delineamiento de especies en bacteriología.

El análisis de restricción con la enzima *RsaI* generó un único patrón de bandas en todos los aislamientos analizados, coincidente con el de la cepa de referencia *A. chroococcum* BNM272 (datos no mostrados). Este perfil de restricción de 5 bandas es característico del género *Azotobacter* y también de la especie *Azomonas macrocytogenes*. En el análisis con la enzima *HhaI* se obtuvieron 5 perfiles diferentes, los cuales según el análisis de agrupamiento (Dice/UPGMA) pueden dividirse en 4 grupos principales definidos a un nivel de similitud mayor al 80% (Figura 2). Las cepas del grupo I presentaron un perfil idéntico al de la cepa BNM272, característico de la especie *A. chroococcum*. La cepa AT33 presentó un perfil de bandas característico de la especie *A. armeniacus*. El grupo IV quedó conformado por las cepas de referencia de *A. vinelandii*, las cuales presentaron el perfil de restricción esperado para la especie. En el grupo III se incluyen tres perfiles muy similares entre sí, pero ninguno coincidió con los publicados por Aquilanti *et al.* (2004a, b). Por lo tanto dichos perfiles fueron comparados con el perfil generado con la restricción virtual de las cepas tipo de *A. nigricans* y *A. salinestris*, especies que Aquilanti *et al.* (2004a, b) no incluyeron en sus trabajos.



**Figura 2.** Dendrograma (Dice/UPGMA) basado en el análisis de los patrones de restricción obtenidos con *HhaI* del ADNr 16S de las cepas seleccionadas. Los grupos se definieron a  $S_D > 80$  %.

Los tamaños de los fragmentos obtenidos en el ARDRA con la enzima *HhaI* de las cepas del grupo III (AT10, AT12, AT14, AT18, AT19, AT29, AT37, AT38, AT42) son similares a los generados en la restricción virtual del ADNr 16S de la cepa *A. salinestris* ATCC 49674, por lo cual podrían ser asignadas a la especie *A. salinestris*.

#### Secuenciación parcial del gen ribosomal 16S

Las secuencias parciales del gen ribosomal 16S obtenidas (290 pb aprox.) se depositaron en la base de datos GenBank bajo los siguientes números de acceso: AT18: HQ541448; AT19: HQ591467; AT25: HQ623180; AT31: HQ623181; AT33: HQ623182; AT37: HQ62378 y AT42: HQ623179.

Cuando se alinearon las secuencias parciales del gen ARNr16S de las cepas del grupo I, AT25 y AT31, presentaron un 99% de identidad de secuencia entre ellas. Las

secuencias parciales del ADNr 16S de las cepas AT18, AT19 y AT42 del grupo II resultaron idénticas entre sí según lo observado en el alineamiento de las mismas. La secuencia de la cepa AT37, también del grupo II, tuvo un 99 % de identidad con las mismas.

Las secuencias parciales del ADNr 16S obtenidas fueron comparadas con las secuencias de nucleótidos depositadas en el GenBank. Las cepas AT25 y AT31 presentaron 100% y 99% de identidad de secuencia, respectivamente, con *A. chroococcum*. Las cepas AT18, AT19 y AT42 mostraron una identidad de secuencia del 100 % y la cepa AT37 del 99 %, con la cepa tipo de *A. salinestris*. La cepa AT33 tuvo un 99 % de identidad de secuencia con las especies *A. nigricans* y *A. armeniacus*. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en el ARDRA, se decidió clasificar a la cepa AT33 como *A. armeniacus*. Además, *A. nigricans* es una especie con células no móviles (Thompson y Skerman 1979), y la cepa AT33, al igual que el resto de los aislamientos caracterizados en este trabajo, evidenció tener movilidad (ver apartado sobre movilidad más adelante)

Según los resultados de los análisis del rep-PCR, ARDRA y de la secuenciación parcial el gen ribosomal 16S, pueden clasificarse a los 15 aislamientos del grupo I del rep-PCR como *A. chroococcum*, los 13 aislamientos incluidos en los grupos III, IV y V como *A. salinestris* y los 3 aislamientos del grupo III como *A. armeniacus* (Figuras 1 y 2).

### **Caracterización microbiológica clásica**

Para esta caracterización se seleccionaron uno o más aislamientos de cada grupo de rep-PCR como representativas. Los aislamientos elegidos fueron: AT4, AT9, AT10, AT11, AT12, AT13, AT14, AT18, AT19, AT22, AT25, AT28, AT29, AT30, AT31, AT33, AT36, AT37, AT38, AT39, AT42.

### **Morfología y tamaño de las colonias**

Luego de una semana de incubación, las 21 cepas evaluadas produjeron colonias amarillas con diferentes tonalidades, de forma circular a irregular, la mayoría brillantes, mucosas, con bordes y superficies lisos. El diámetro de las colonias varió entre 1 a 8 mm. Las cepas AT10 y AT42 formaron colonias particularmente opacas y secas, mientras que por otro lado la cepa AT36 produjo colonias muy mucosas. (Cuadro3, Figura3). La mayoría de los aislamientos identificados como *A. salinestris* presentaron colonias relativamente secas en relación a los aislamientos de las otras dos especies, con excepción de las cepas AT37 y AT38.

**Cuadro 2.** Morfología de las colonias de los aislamientos de *Azotobacter* crecidas en medio LG luego de 7 días.

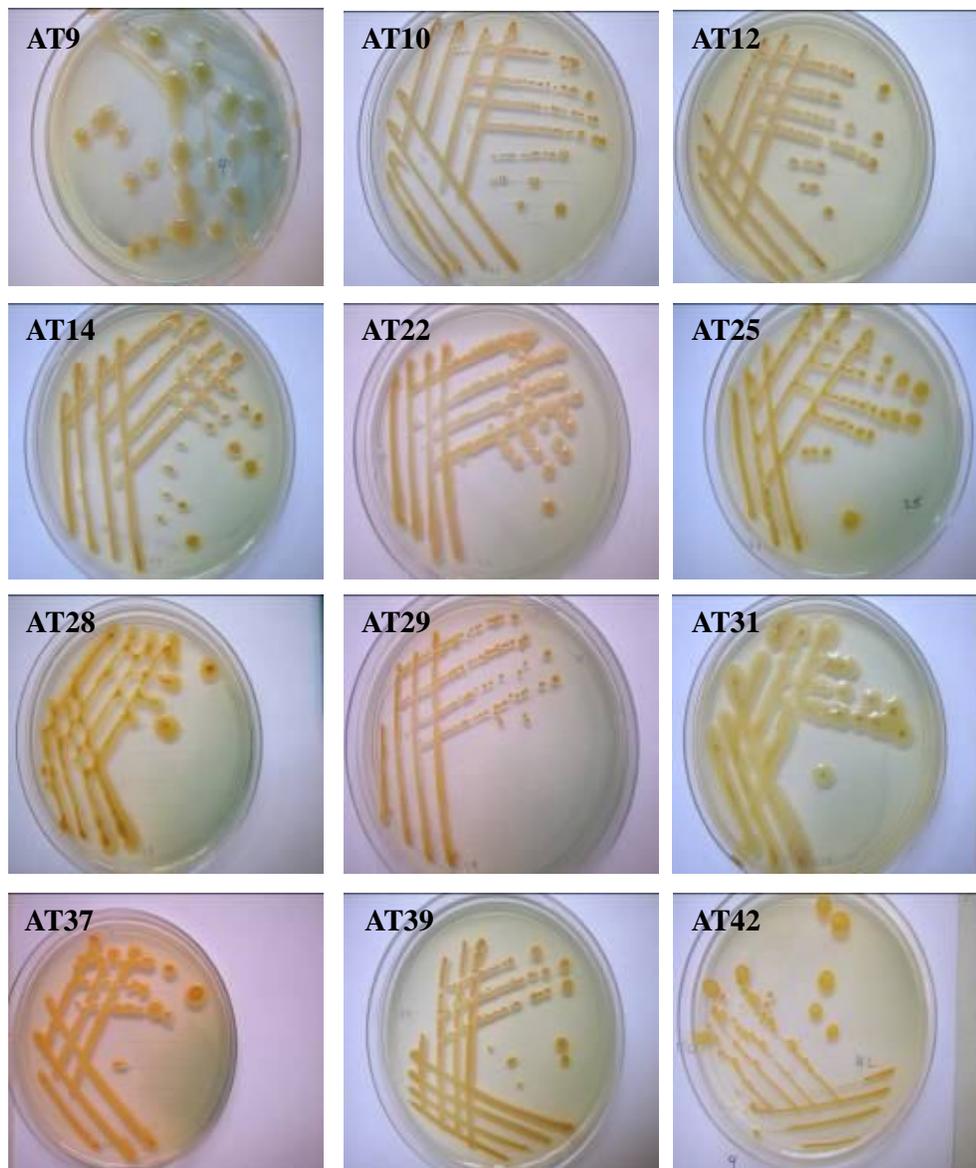
Cepa	Especie	Tamaño	Forma	Borde	Elevación	Sup. <sup>f</sup>	Características físicas	EI <sup>g</sup>
AT4	AC <sup>a</sup>	Mediano <sup>d</sup>	Circular	Liso	Cabezuela	Lisa	Amarilla, brillante, mucosa	Hom. <sup>h</sup>
AT9	AC	Grande <sup>c</sup>	Circular	Liso	Cabezuela	Lisa	Amarilla, brillante, mucosa	Hom
AT10	AS <sup>b</sup>	Pequeño <sup>e</sup>	Circular o irregular	Lobado	Esparcida	Lisa	Amarilla, borde más oscuro, mate, seca	Hom
AT11	AC	Grande	Circular	Liso	Pulvinada	Lisa	Amarilla, brillante, mucosa	Hom
AT12	AS	Mediano	Circular	Liso o lobado	Esparcida	Lisa	Amarilla, borde más claro, brillante	Hom
AT13	AC	Mediano	Circular	Liso	Esparcida o pulvinada	Lisa	Amarilla, borde más claro, brillante, mucosa	Hom
AT14	AS	Mediano	Circular o irregular	Lobado	Esparcida	Rugosa	Amarilla, borde más claro, semi-mate	Het <sup>i</sup>
AT18	AS	Pequeño	Circular o irregular	Lobado	Esparcida	Lisa	Amarilla, brillante, seca	Hom
AT19	AS	Mediano	Circular o irregular	Lobado	Esparcida	Rugosa	Amarilla, l borde más claro, semi-mate	Hom
AT22	AC	Mediano	Circular	Lobado	Pulvinada	Lisa	Amarilla, brillante, mucosa	Het
AT25	AC	Grande	Circular o irregular	Ondulado	Esparcida	Lisa	Amarilla, mate	Hom

<sup>a</sup> AA: *A. chroococcum*, <sup>b</sup> AS: *A. salinestris*, <sup>c</sup> AA: *A. armeniacus*. <sup>c</sup> Grande: 6-8 mm de diámetro.; <sup>d</sup> mediano: 4-6 mm de diámetro, <sup>e</sup> Pequeño: 1-4 mm de diámetro. <sup>f</sup> Sup: Superficie. <sup>g</sup>EI: Estructura interna, <sup>h</sup>homogénea, <sup>i</sup>heterogénea.

**Cuadro 2. Continuación**

<b>Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Sup.<sup>f</sup></b>	<b>Características físicas</b>	<b>EI<sup>g</sup></b>
<b>AT28</b>	AC	Grande	Circular o irregular	Liso	Esparcida	Lisa	Amarilla brillante, aguachenta	Het
<b>AT29</b>	AC	Pequeño	Circular	Liso	Elevada	Lisa	Amarilla, brillante	Hom
<b>AT30</b>	AC	Mediano	Circular o irregular	Lobado	Esparcida	Lisa	Amarilla brillante, mucosa	Hom
<b>AT31</b>	AC	Mediano	Circular	Liso	Convexa	Lisa	Amarilla, brillante, mucosa	Hom
<b>AT33</b>	AA <sup>c</sup>	Mediano	Circular	Liso	Pulvinada	Lisa	Amarilla, borde más claro, brillante, mucosa	Hom
<b>AT36</b>	AA	Grande	Circular	Liso	Elevada	Lisa	Amarilla, borde más claro , brillante, mucosa	Hom
<b>AT37</b>	AS	Grande	Circular	Liso	Esparcida	Lisa	Amarillo intenso, brillante, mucosa	Hom
<b>AT38</b>	AS	Grande	Circular o irregular	Liso	Esparcida	Lisa	Amarillo intenso, brillante, mucosa	Hom
<b>AT39</b>	AC	Pequeño	Circular	Liso	Esparcida	Lisa	Amarilla, semi-mate	Hom
<b>AT42</b>	AS	Mediano	Circular o irregular	Ondulado	Esparcida	Lisa	Amarilla, mate, seca	Hom

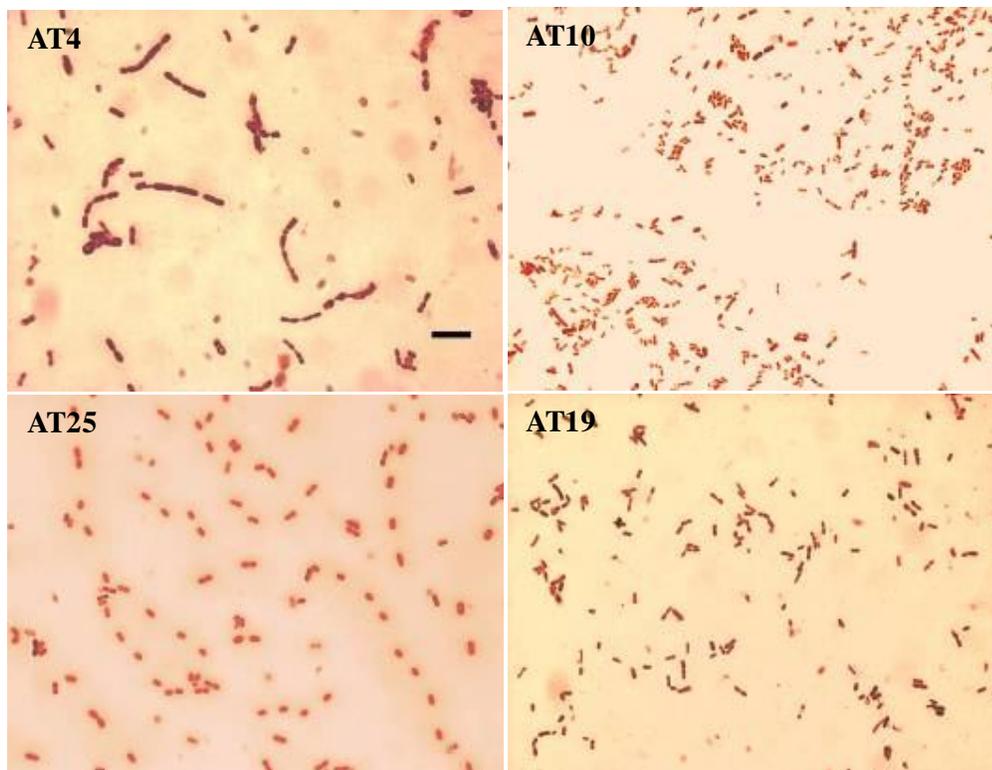
.<sup>a</sup> AA: *A. chroococcum*, <sup>b</sup> AS: *A. salinestrus*, <sup>c</sup> AA: *A. armeniacus*. <sup>c</sup> Grande: 6-8 mm de diámetro.; <sup>d</sup> mediano: 4-6 mm de diámetro, <sup>e</sup> Pequeño: 1-4 mm de diámetro. <sup>f</sup> Sup: Superficie. <sup>g</sup>EI: Estructura interna, <sup>h</sup>homogénea, <sup>i</sup>heterogénea.



**Figura 3.** Colonias de aislamientos *Azotobacter* sp. desarrolladas en medio LG luego de 7 días de crecimiento.

### Tinción de Gram

Las 21 cepas resultaron gramnegativas. En la mayoría de las cepas se presentaron tres tipos diferentes de morfologías celulares en el mismo preparado: bacilos rectos con bordes redondeados, bacilo ovoides y en menor proporción, cocos (Figura 4). Los bacilos se ubicaban solos o de a pares y en algunas cepas se evidenció la formación de cadenas (cepas AT4, AT13, AT14, AT29 y AT33). Las cepas AT4, AT11 y AT9 poseían bacilos relativamente grandes respecto al resto, por el contrario las cepas AT10 y AT19 presentaron bacilos más pequeños.



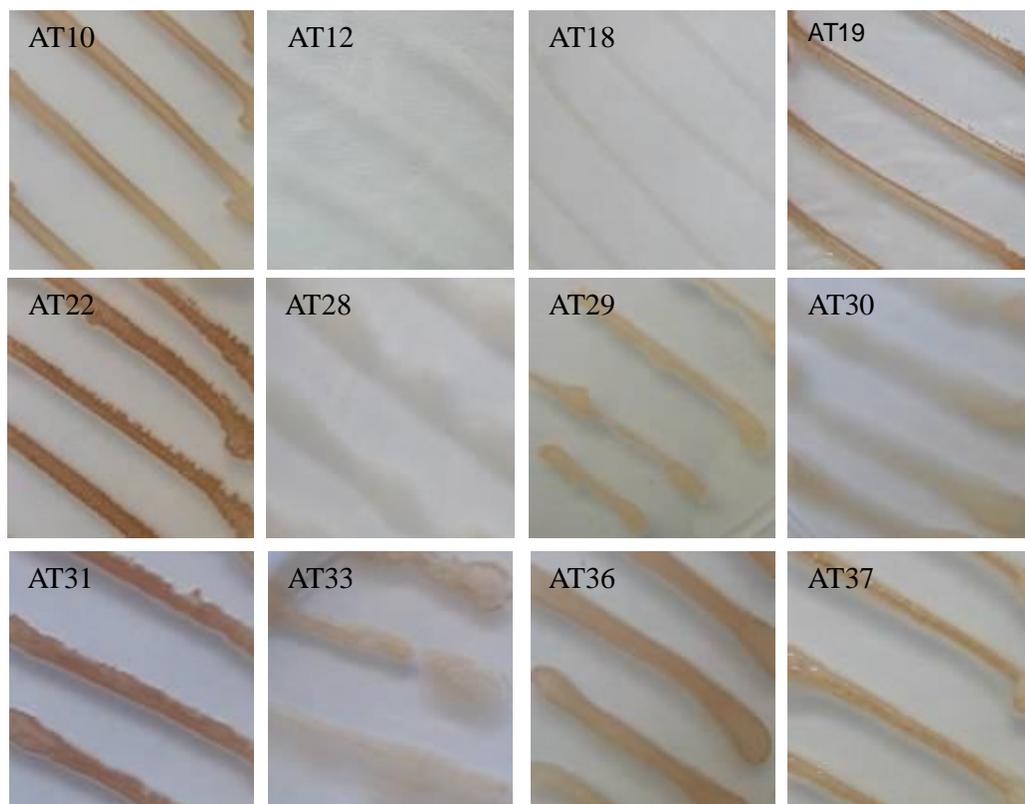
**Figura 4.** Tinción de Gram observada con microscopio óptico de cultivos puros de cepas *Azotobacter* sp. luego de 48 h de crecimiento en medio LG sólido. La barra de escala 10  $\mu$ m se aplica a todas las fotos.

### Movilidad

Se observó movilidad en todas las cepas.

### Producción de pigmentos difusibles

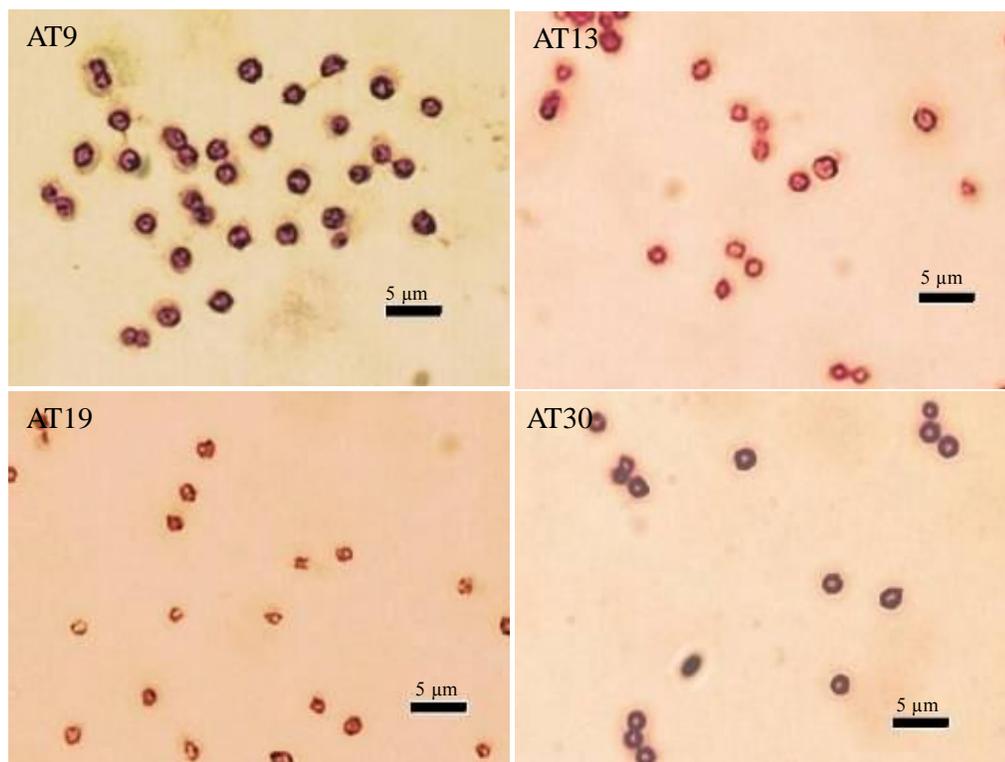
No se observó la formación de pigmentos difusibles ni fluorescentes en ninguna de las cepas evaluadas. Todas las cepas produjeron pigmentos no difusibles color marrón cuya intensidad aumentaba a medida que envejecía el cultivo, característica común en el género *Azotobacter* (Becking 2006, Kennedy *et al.* 2005, Thompson y Skerman, 1979). Las cepas AT12, AT18 y AT28 presentaron un color particularmente claro (Figura 5)



**Figura 5.** Producción de pigmentos no difusibles de cepas de *Azotobacter* sp. en medio de Norris y Jensen luego de 10 días.

### Producción de quistes

Todos los aislamientos analizados presentaron formación de quistes en medio con butanol. La formación de quistes es una característica fenotípica que permite diferenciar *Azotobacter* de *Azomonas*, género taxonómicamente relacionado. En la Figura 6 se muestran los quistes formados por cuatro cepas.



**Figura 6.** Tinciones de Gram observadas con microscopio óptico de los quistes producidos por cepas de *Azotobacter* sp. luego de 7 días de incubación en medio Burk con 0,3% de butanol como fuente de carbono. Barra de escala, 5 µm.

## DISCUSIÓN

---

El análisis del rep-PCR permitió evidenciar una notable diversidad entre los aislamientos de *Azotobacter* analizados lo cual confirma la hipótesis planteada. El medio LG resultó ser muy útil para la identificación preliminar de los aislamientos del género *Azotobacter* ya que la totalidad de los aislamientos clasificados preliminarmente como *Azotobacter* sp. en base a las características morfológicas de sus colonias, fueron luego confirmados como pertenecientes al género mediante las técnicas moleculares empleadas. Estos resultados concuerdan con lo informado por Aquilanti *et al.* (2004a) quienes empleando el mismo medio para aislar *Azotobacter* y *Azomonas* de suelos de Italia y utilizando ARDRA para confirmar sus resultados preliminares, determinaron que 40 de los 49 aislamientos pertenecían a dichos géneros.

La falta de aislamientos de cepas de *Azotobacter* en suelos de pH menor a 6 coincide con lo informado en otros estudios sobre la distribución de este género principalmente en suelos de pH neutro a alcalino (Kole *et al.* 1988, Martiniuk y Martiniuk 2003, Barnes *et al.* 2007).

*A. chroococcum* es la especie del género *Azotobacter* aislada más frecuentemente de los suelos (Aquilanti *et al.* 2004a, Kennedy *et al.* 2005, Tejera y Lluh 2005.). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con esto ya que esta especie estuvo representada por el 48 % de los aislamientos. Sin embargo, además de esta especie, se aislaron varias cepas de *A. salinestris* y 2 cepas de *A. armeniacus*. La importancia de este resultado radica en la baja frecuencia de aislamientos de esta especie. Prácticamente no existen reportes del aislamiento de *A. armeniacus*, más allá de cuatro aislamientos de suelos de Armenia, sobre la base de los cuales fue propuesto *A. armeniacus* como una nueva especie (Thompson y Skerman, 1979).

Si bien el objetivo de este trabajo no fue estudiar la ecología de *Azotobacter* en los suelos analizados, es posible hacer algunas consideraciones al respecto. Se detectó la presencia de *Azotobacter* spp. en 37 % de las 84 muestras analizadas, las cuales correspondieron a diferentes suelos de la Argentina. Además, se encontró un gran contraste entre el menor porcentaje de *Azotobacter* en suelos agrícolas (27%) comparado al mayor porcentaje en los suelos no agrícolas (57%). Desafortunadamente, estos resultados no pueden ser comparados con los informados en la literatura ya que Kole *et al.* (1988) aisló *Azotobacter* del 89 % de 202 muestras de suelo estudiadas, tomadas en su mayoría de suelos del este de Canadá, mientras que Martiniuk y Martiniuk (2003) estudiaron la distribución de *Azotobacter* en 31 suelos polacos, y detectaron su presencia en el 50% de los suelos, sin embargo, en ninguno de esos trabajos se informó el uso de esos suelos. Hace muchos años, numerosos estudios sugirieron que *Azotobacter* podía ser usado como un indicador de deficiencias de diferentes nutrientes del suelo (Zemiecka 1932, Jones 1932, Halversen y Hoge, 1941). Sin embargo, el empleo de dicho método fue criticado por varios autores dada su baja reproducibilidad y poca practicidad. (Fuller y Hanks, 1982). Dado estos antecedentes, podría ser que la ausencia de *Azotobacter* en algunas de las muestras de suelos agrícolas se deba a niveles relativamente bajos de algún nutriente.

No se encontró ningún rasgo fenotípico, de los evaluados en la caracterización microbiológica clásica, que se pueda asociar de manera clara a alguna de las especies definidas en este trabajo. La morfología celular observada en todos los aislamientos analizados es coincidente con la descrita en la bibliografía (Thompson y Skerman 1979, Kennedy *et al.* 2005, Becking 2006).



**CAPÍTULO 2: “EVALUACIÓN *IN VITRO* DE CARACTERÍSTICAS DE  
*AZOTOBACTER* RELACIONADAS CON LA PROMOCIÓN DEL  
CRECIMIENTO VEGETAL”**

---



## INTRODUCCIÓN

---

La producción de hormonas y sideróforos, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica de nitrógeno, son los principales mecanismos que se han asociado con la estimulación del crecimiento producida por *Azotobacter* en las plantas (Kumar y Narula 1999, Mrkovacki y Milic 2001, Behl 2006). No obstante, son pocos los trabajos en los que realmente se ha demostrado de manera fehaciente que algunas de las cualidades mencionadas son responsables de las respuestas positivas observadas en las plantas inoculadas.

### Producción de fitohormonas

Algunos trabajos, la mayoría publicados hace más de 20 años, han sugerido que la producción de fitohormonas por *Azotobacter* podría estar implicada en la respuesta observada en los vegetales (Jackson *et al.* 1964, Azcón y Barea 1975, Nieto y Frankenberger 1990). Por ejemplo, Nieto y Frankenberger (1990 y 1991) demostraron que la adición de dos precursores de citoquininas junto con la inoculación con una cepa de *A. chroococcum* productora de citoquininas, incrementó el rendimiento y el crecimiento de rábano y maíz en comparación con la aplicación de los precursores o de la bacteria por separado. González-López *et al.* (1986), reportaron que la cepa *A. vinelandii* ATCC12837 produce auxinas, giberelinas y citoquininas en medio químicamente definido. Azcón y Barea (1975) detectaron auxinas, citoquininas y giberelinas en los sobrenadantes de una cepa de *A. beijerinckii* y otra de *A. chroococcum*. Por su parte, Brown y Burlingham (1968) informaron la producción de ácido giberélico en una cepa de *A. chroococcum*. En los tres trabajos mencionados las determinaciones se hicieron por cromatografía en papel y bioensayos mientras que, Nieto y Frankenberger (1989) detectaron la producción de citoquininas en sobrenadantes de cultivos de *A. chroococcum*, *A. beijerinckii* y *A. vinelandii* empleando HPLC. Hasta el momento no existen trabajos publicados en los cuales se haya determinado la producción de citoquininas y giberelinas por parte de *Azotobacter* a través de metodologías más confiables y precisas como cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrometría de masa.

### Auxinas

El ácido 3-indolacético (AIA) es la principal auxina de las plantas y es una de las fitohormonas de mayor relevancia dado que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal como la división, elongación y diferenciación celular (Zaho 2010). En algunas PGPR se ha demostrado que la síntesis de AIA bacteriano estimula el crecimiento de las plantas (Xie *et al.* 1996, Dobbelaere *et al.* 1999, Idris *et al.* 2007, Patten y Glick 2002). Por ejemplo, la inoculación con una mutante de *Pseudomonas putida* de reducida capacidad de producción de auxinas, mostró una menor capacidad de estimular el desarrollo de la raíz de colza canola en relación a la cepa salvaje (Patten y Glick, 2002).

El AIA puede ser sintetizado por una o más rutas biosintéticas, tanto en plantas como en bacterias. El aminoácido triptófano es el principal precursor en las vías de síntesis del AIA y se han descrito 5 vías de síntesis de AIA bacteriano que emplean al triptófano como precursor (Baca y Elmerich 2007). También existen rutas de síntesis de

AIA que no requieren del triptófano como precursor, por ejemplo en *Azospirillum brasilense* se han descrito tres vías de síntesis de AIA, dos dependientes de triptófano y una que no lo es. Una de las vías dependientes de triptófano, la vía del ácido-3-indolpirúvico (AIP) es considerada la vía más importante en *Azospirillum* y en otras bacterias PGPR (Spaepen *et al.* 2007, Dodd *et al.* 2010). La enzima clave de esta vía es la ácido 3-indolpirúvico descarboxilasa. Un mutante con el gen inactivado para la síntesis de esta enzima (gen *ipdC*), produce sólo el 10% del AIA producido por una cepa salvaje de *A. brasilense* (Van de Broeck *et al.* 2005). Similares resultados se obtuvieron con mutantes en *Bacillus amyloliquefaciens* (Idris *et al.* 2007). Hasta el momento no se han aislado u obtenido mutantes de *Azotobacter* sp. con capacidad alterada en la producción de auxinas, que permitan establecer cuál es la ruta principal para la biosíntesis de AIA.

En varios trabajos se ha estimado la capacidad de *Azotobacter* sp. y de otros géneros bacterianos de producir auxinas con el reactivo de Salkowsky (Ahmad *et al.* 2005b, Zahir *et al.* 2005, Ahmad *et al.* 2008). Es un método colorimétrico simple, rápido, económico y ampliamente empleado para estimar la producción *in vitro* de auxinas (Dodd *et al.* 2010). Este reactivo no sólo detecta AIA, sino también ácido indolpirúvico e indolacetamida, por lo que debe tenerse en cuenta al interpretar los datos obtenidos en las determinaciones (Glickman y Dessaux, 1995). Por ello, es conveniente confirmar la producción de auxinas con métodos más específicos como la cromatografía líquida a alta presión (HPLC) o la cromatografía gaseosa (GC) o líquida (LC), acoplada a espectrometría de masa (MS).

### **Producción de sideróforos**

A pesar de la abundancia del hierro en los suelos, su disponibilidad para los microorganismos y las plantas es muy baja dado que se encuentra presente en formas minerales difíciles de solubilizar. Por esta razón, la mayoría de los microorganismos han desarrollado sistemas específicos de adquisición de hierro basados en el empleo de sustancias quelantes de bajo peso molecular, llamados sideróforos (Kraepiel *et al.* 2009). Los sideróforos son secretados al ambiente, capturan los iones férricos y luego el complejo sideróforo-Fe<sup>+3</sup> es absorbido por las células bacterianas tras un reconocimiento específico llevado a cabo por proteínas de membrana (Hofte y Baker 2007). La adquisición de hierro mediada por sideróforos juega un rol fundamental en la habilidad de los microorganismos para colonizar las raíces e interviene en las interacciones que se establecen entre los microorganismos en la rizósfera. La competencia por hierro a través de la producción de sideróforos es uno de los mecanismos observado en algunas bacterias capaces de controlar patógenos del suelo (Lugtenberg y Kamilova 2009). Además, la producción de sideróforos por bacterias colonizadoras de la raíz puede desencadenar también una mejora del sistema de defensa de la planta de manera sistémica, fenómeno denominado resistencia sistémica inducida (ISR) (Hofte y Baker 2007). A pesar del gran número de trabajos sobre el tema, no está claro aún si los sideróforos microbianos pueden ser empleados por los vegetales como fuente significativa de hierro para su nutrición (Crowles 2006, Dobbelaere *et al.* 2003).

Los sideróforos producidos por al menos tres especies del género *Azotobacter*, *A. crhoococum*, *A. vinelandii* y *A. salinestrís* se han identificado desde el punto de vista estructural y funcional (Kennedy *et al.* 2005). Recientemente se han publicado trabajos en los cuales se estudió la capacidad de los sideróforos de *A. vinelandii* para ligarse con Mo y V, cofactores de la enzima nitrogenasa (Kraepiel *et al.* 2009, Wichard

*et al.* 2009). A bajas concentraciones de Mo, V o Fe, los complejos formados entre estos elementos y los sideróforos son absorbidos por la bacteria. A altas concentraciones de Mo o V, casi en el umbral de toxicidad, la producción de sideróforos se incrementa notablemente acomplejando estos elementos, mientras que el sistema de transporte al interior de la célula se inactiva. La producción de sideróforos en esta situación podría considerarse como un mecanismo de detoxificación (Wichard *et al.* 2009, Bellenger 2008).

### **Solubilización de fosfatos**

El fósforo es uno de los principales nutrientes que limitan el crecimiento de las plantas. Una gran proporción del fósforo del suelo se encuentra bajo formas insolubles y por lo tanto, no disponible para las plantas (Rodríguez *et al.* 2007). Ciertos microorganismos del suelo tienen la capacidad de convertir el fósforo insoluble en el suelo a formas solubles y asimilables por los vegetales a través de la mineralización de fosfatos orgánicos o de la solubilización de fosfatos inorgánicos. En trabajos donde se observó la promoción del crecimiento vegetal al inocular con cepas de *Azotobacter* capaces de solubilizar fosfatos, no fue posible asociar inequívocamente esa cualidad con el efecto positivo sobre la planta. Por un lado porque la solubilización de fósforo *in vitro* no está necesariamente asociada a la capacidad de promover el crecimiento vegetal, tal como lo demostraron Collavino *et al.* (2010) con aislamientos de diferentes especies bacterianas. Y por otro lado, porque además de solubilizar fosfatos las cepas de *Azotobacter* también exhibían otros mecanismos de promoción del crecimiento (Narula *et al.* 2000). Por lo tanto, los efectos positivos de la inoculación sobre la absorción de nitrógeno, fósforo y potasio y la producción de biomasa radical respecto a los controles sin inocular no pudieron adjudicarse a una propiedad microbiana en particular. Sin embargo, con otros géneros bacterianos fue posible demostrar el rol importante de la solubilización microbiana de fosfatos en la promoción del crecimiento vegetal. Lifshitz *et al.* (1987) observaron que al inocular semillas de canola con una cepa de *Pseudomonas putida*, de reconocida capacidad solubilizadora de fósforo, se incrementó la absorción de fósforo marcado ( $^{32}\text{P}$ ) y además, se estimuló la elongación del tallo de plántulas crecidas en un suelo estéril. Por lo tanto, sería posible estimular el crecimiento vegetal a través de la inoculación con cepas bacterianas solubilizadoras de fósforo que posibiliten un aumento en la disponibilidad y absorción de este elemento por las plantas.

### **Fijación biológica de nitrógeno**

Inicialmente la fijación de nitrógeno fue considerada el principal mecanismo por el cual *Azotobacter* estimulaba el crecimiento de las plantas. El incremento en el contenido de N en las plantas inoculadas, así como la reducción en la necesidad de aplicación de fertilizantes nitrogenados son considerados frecuentemente evidencia de este mecanismo (Verma *et al.* 2010) Sin embargo, los pocos estudios realizados con  $^{15}\text{N}$  no pudieron demostrar que *Azotobacter* aporte N fijado a las plantas de sorgo y moha inoculadas (Behl 2006). Shabaev *et al.* (1999) inocularon plantas de avena con *Azotobacter* en suelo fertilizado con  $^{15}\text{N}$  y aunque el balance de N en el suelo resultó positivo, indicando que el N fijado se habría acumulado en el suelo, éste no fue utilizado por las plantas. Es probable que el nitrógeno fijado por los microorganismos no simbióticos quede inmovilizado en la biomasa microbiana del suelo o en la materia

orgánica y por lo tanto no esté disponible inmediatamente para ser usado por las plantas (Shabaev *et al.* 1999). Además, la observación de respuestas positivas a la inoculación en condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo y el descubrimiento de otros mecanismos como la producción de fitohormonas hizo que la fijación de N deje de ser considerado como un mecanismo principal de estimulación del crecimiento vegetal en *Azotobacter* y en otros fijadores libres de nitrógeno. En contraposición, estudios recientes hechos en *Azospirillum*, en los cuales se comprobó el aporte significativo a las plantas del nitrógeno fijado por la bacteria, sugieren que la fijación debe ser considerada como un mecanismo más de las PGPR (Bashan y de Bashan 2010).

La fijación de nitrógeno microbiana puede ser medida a través de varias metodologías. Una de ellas es la técnica de reducción de acetileno que se basa en la capacidad que tiene la enzima nitrogenasa de reducir sustratos con triple enlace y entre ellos, el acetileno a etileno. Es una técnica muy útil debido a su simplicidad, la cual permite comparar microorganismos aislados o sistemas microorganismo-planta por su capacidad potencial de fijar N (Dalton y Kramer 2006). El resultado se considera un indicador cualitativo de la capacidad de fijación de nitrógeno. Empleando esta técnica Rodelas *et al.* (1999), Kizilkaya (2009) y Lu y Huang (2010) encontraron una gran variabilidad en la capacidad de fijar N entre diferentes aislamientos de *Azotobacter*

Por lo expuesto en los párrafos anteriores, en el presente capítulo se determinará la capacidad de las cepas nativas de *Azotobacter* de producir sideróforos y de solubilizar fosfatos. Además se determinará el nivel de producción de auxinas, citoquininas y giberelinas y la capacidad de fijar nitrógeno de cepas seleccionadas.

## OBJETIVOS

- Caracterizar el crecimiento y evaluar la producción de fitohormonas, la capacidad de producir sideróforos, solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno de cepas nativas de *Azotobacter spp.*
- Seleccionar cepas de *Azotobacter* con diferente capacidad de producción de auxinas.

## HIPÓTESIS

- Las cepas nativas de *Azotobacter* tienen capacidad para producir auxinas *in vitro* y pueden caracterizarse según los niveles de producción.
- Algunas de las cepas nativas de *Azotobacter* producen sideróforos y solubilizan fosfatos *in vitro*.
- Las cepas seleccionadas difieren en la producción de ácido 3-indolacético, ácido giberélico y zeatina y en la capacidad de fijación de nitrógeno *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Se evaluó la capacidad de producir sideróforos y solubilizar fosfatos de los 21 aislamientos que habían sido seleccionados en el capítulo anterior en función del análisis de rep-PCR. La caracterización del crecimiento y producción de compuestos auxínicos fue realizada en 18 de los 21 aislamientos, debido a la contaminación de tres de ellos tal como se indica en los resultados.

### Caracterización del crecimiento y producción de auxinas

Se caracterizó el crecimiento y la producción de auxinas de los aislamientos en un medio de cultivo conteniendo peptona de harina de soja como fuente de triptófano. Se inocularon tubos de ensayo conteniendo 4 ml de medio A (en g.l<sup>-1</sup>: Sacarosa 10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4, CaSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,02, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,4, NaMoO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O 0,002, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,006, peptona de harina de soja 5, pH 7.1) con 0,4 ml de cultivo stock almacenado a -70°C y se incubaron a 28°C en agitación durante 48 hs. Luego, con 1 ml de este cultivo se inocularon erlenmeyers de 125 ml de capacidad que contenían 25 ml de medio A y se incubaron en agitación a 28°C durante 8 días. Durante este período se tomaron 2,5 ml de caldo de cultivo de todas las cepas a las 17, 41, 65, 113, 137 y 185 h. Parte de las muestras se emplearon para determinar el número de unidades formadoras de colonia por unidad de volumen (ufc.ml<sup>-1</sup>) y su densidad óptica, excepto en las muestras tomadas a las 137 y 185 hs. Se realizaron diluciones seriadas en microplacas y se empleó el método de la microgota (Miles y Misra, 1938) para determinar las ufc.ml<sup>-1</sup> del cultivo bacteriano. La densidad óptica se midió en espectrofotómetro a 600 nm. El resto de la muestra fue centrifugado a 10000 rpm durante 15 minutos y 1,5 ml del sobrenadante se guardó en microtubos a -20 °C para la posterior determinación de auxinas.

Se empleó la técnica colorimétrica de Salkowsky para la determinación de auxinas (Glickman y Dessaux 1995). El método se basa en la oxidación que produce el ácido sulfúrico en la molécula de indol, generando una coloración rojiza. Para ello, 1 ml de sobrenadante del cultivo bacteriano se mezcló con igual volumen de reactivo de Salkowsky (19,98 g.l<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O en 7,9 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Luego de dejar la muestra 30 minutos en oscuridad, se registró la absorbancia en espectrofotómetro a 530 nm. Se realizó una curva patrón empleando soluciones de diferentes concentraciones de AIA (Sigma) (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 µg.ml<sup>-1</sup>). Posteriormente, se determinó la ecuación de la recta que permitió calcular la concentración de auxinas presente en los sobrenadantes. Se realizaron dos repeticiones por cepa, excepto en las muestras tomadas a las 137 h y 185 h donde se realizó una sola determinación por cepa. Se comparó la producción de auxinas y el log (ufc.ml<sup>-1</sup>) a las 113 hs de cultivo de las cepas mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y comparación de medias por el test DGC, utilizando el paquete estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2010).

Con el objetivo de evaluar posteriormente el efecto de la producción de auxinas sobre el crecimiento temprano de trigo (Capítulo 3), se seleccionaron cepas con valores contrastantes de producción de auxinas. Se eligieron tres cepas con baja producción de auxinas y tres cepas de alta producción de tales compuestos. Además, al seleccionar las cepas, se tuvo en cuenta que estén distanciadas genéticamente en función del rep-PCR (Capítulo 1). Con la finalidad de caracterizar el crecimiento de *Azotobacter* más

detalladamente, se realizó la curva de crecimiento de estas 6 cepas tomando muestras para determinar el número de células viables y la densidad óptica a las 0, 4, 7,5 y 11 h de cultivo. Se realizaron dos repeticiones por cepa. Se calculó también el tiempo de generación, la velocidad específica de crecimiento (Brock 2000) y la producción de auxinas a las 185 hs de cultivo.

### **Producción de sideróforos**

La producción de sideróforos se evaluó empleando tres metodologías que se basan en el uso de un medio de cultivo denominado CAS del inglés Chrome Azurol S, desarrollado por Schwyn y Neilands (1987). Este medio contiene Fe (III) y el colorante cromo-azurol S formando un complejo. Si el hierro es removido por un sideróforo, se produce un cambio de color del complejo, que cambia de azul a naranja o púrpura. En primer lugar, la producción de sideróforos fue evaluada por el método tradicional de Schwyn y Neilands (Rosas y Schroder, 1992), en el cual las bacterias fueron inoculadas sobre el medio CAS agarizado. Luego se utilizó la misma metodología pero se modificó la composición del medio de manera que contenga los mismos nutrientes y la misma concentración que el medio Burk, en el cual *Azotobacter* crece mejor. El resto de los componentes del medio CAS, fundamentales para la formación del complejo entre el hierro y el colorante cromo-azurol S, no fueron alterados. Finalmente, se empleó la metodología descrita por Pérez-Miranda *et al.* (2007), denominada por los mismos autores método O-CAS (O de “*overlaid*”). Para ello las cepas fueron sembradas por punción con palillos estériles en placas de Petri conteniendo medio Burk sin hierro adicionado. Luego de 4 días las colonias ya crecidas fueron recubiertas con una capa de medio CAS fundido y enfriado. El medio CAS se preparó sin la presencia de nutrientes y con la adición de 9 g.l<sup>-1</sup> de agar. Luego de 20 horas las placas fueron examinadas para registrar la formación de un halo naranja o púrpura alrededor de las colonias, lo cual indicó la excreción de sideróforos. Se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones para cada cepa en cada uno de ellos. Con el objetivo de descartar falsos positivos, las cepas fueron también sembradas en medio Burk suplementado con 2 ml.l<sup>-1</sup> de una solución 1,64% de Fe-EDTA, en el cual no debería producirse cambio de color. Se incluyó la cepa *Pseudomonas fluorescens* BNM 233, provista por el Banco Nacional de Microorganismos de la FAUBA, como control positivo.

### **Solubilización de fosfatos.**

La capacidad de solubilizar fosfatos se evaluó empleando tres medios de composición diferente: Pikovskaya (Pikovskaya 1948) y NBRIP cuya fuente de fosfatos insolubles fue fosfato tricálcico (Nautiyal 1999) y el medio Burk (Kennedy *et al.* 2005) modificado por la omisión de fuentes solubles de fosfatos y conteniendo fosfato tricálcico como única fuente del elemento Se inocularon 4 µl (1 gota) del cultivo bacteriano puro en placa de Petri y luego de 14 días de incubación a 28°C se observó la presencia del halo de solubilización de fosfatos (zona clara) formado alrededor de cada colonia. Como control positivo se incluyó la cepa de *P. fluorescens* BNM 233, con reconocida capacidad de solubilizar fosfato, Se realizaron tres experimentos independientes, y en cada uno de ellos cada cepa fue evaluada por triplicado.

### **Producción de fitohormonas**

Se determinó la producción de ácido 3-indolacético (AIA), ácido giberélico ( $GA_3$ ) y zeatina (Z) de las seis cepas seleccionadas anteriormente en función de su producción de auxinas. Las cepas fueron cultivadas de la misma manera descrita anteriormente al evaluar la producción de auxinas por el método de Salkowski. Con la finalidad de obtener cultivos con similares títulos para las seis cepas se tuvieron en cuenta los resultados de las curvas de crecimiento realizadas en cada caso. Para las cepas AT18 y AT42 el tiempo de cultivo fue de 5 días, mientras que las restantes cepas se cultivaron durante 8 días. Transcurrido el período de cultivo, las células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min, los sobrenadantes se acidificaron a pH 3 con HCl 1N, se filtraron ( $0.22\mu\text{m}$ ) y se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Estos sobrenadantes fueron enviados al Laboratorio de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto para la determinación de fitohormonas. La cuantificación se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida y espectrometría de masas en *tandem* (LC-MS-MS) (Apéndice 1). Los datos se expresaron en  $\mu\text{g}$  de cada metabolito. $\text{ml}^{-1}$  del sobrenadante.

### **Fijación de nitrógeno**

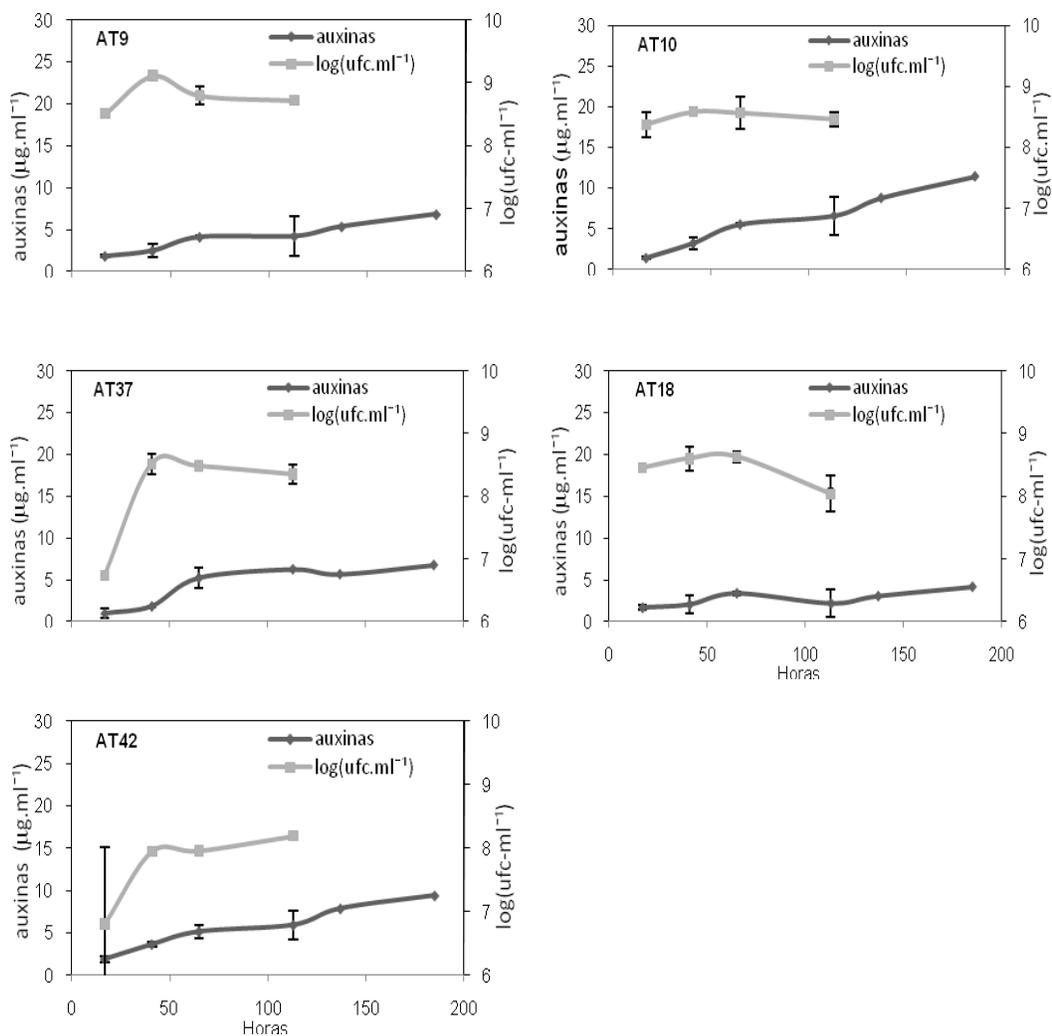
La capacidad de fijar  $N_2$  de las cepas seleccionadas de *Azotobacter* sp. se estimó a través de la medición de la actividad nitrogenasa por la técnica de reducción de acetileno en cultivos puros. Para el preinóculo, se inocularon tubos de ensayo conteniendo 4 ml de medio Burk con 0,4 ml de cultivo bacteriano almacenado a  $-70^\circ\text{C}$  y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  en agitación durante 24 hs. Luego, con 1 ml de este cultivo se inocularon tubos de ensayo con medio fresco y se incubaron durante 24 hs en agitación. A partir de este último cultivo se inoculó 1ml en 5 ml de medio Burk sólido contenido en viales de 15 ml de capacidad cerrados con tapón de algodón, los cuales se incubaron 24 hs a  $28^\circ\text{C}$ . Posteriormente, los viales fueron sellados herméticamente con tapones de goma, se inyectó un 10 % de acetileno en la atmósfera del vial y se incubaron otras 24 hs a  $30^\circ\text{C}$ . Los viales se enviaron al Laboratorio de Servicios Analíticos Especiales (FAUBA) para la cuantificación del etileno ( $C_4H_2$ ) producido por la actividad de la enzima nitrogenasa, a través de cromatografía gaseosa. Los cultivos bacterianos que crecieron en los viales se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril a fin de remover las células del medio de cultivo y se determinó el contenido de proteínas con el *kit DC Protein Assay* (Biorad). La actividad nitrogenasa se expresó en  $\text{nmol}$  de  $C_4H_2$ . $\text{mg}$  de proteína $^{-1}$  por 24h. Se realizaron tres repeticiones para cada cepa. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y las medias se compararon con el test DGC con el paquete estadístico INFostat (Di Rienzo *et al.* 2010).

## RESULTADOS

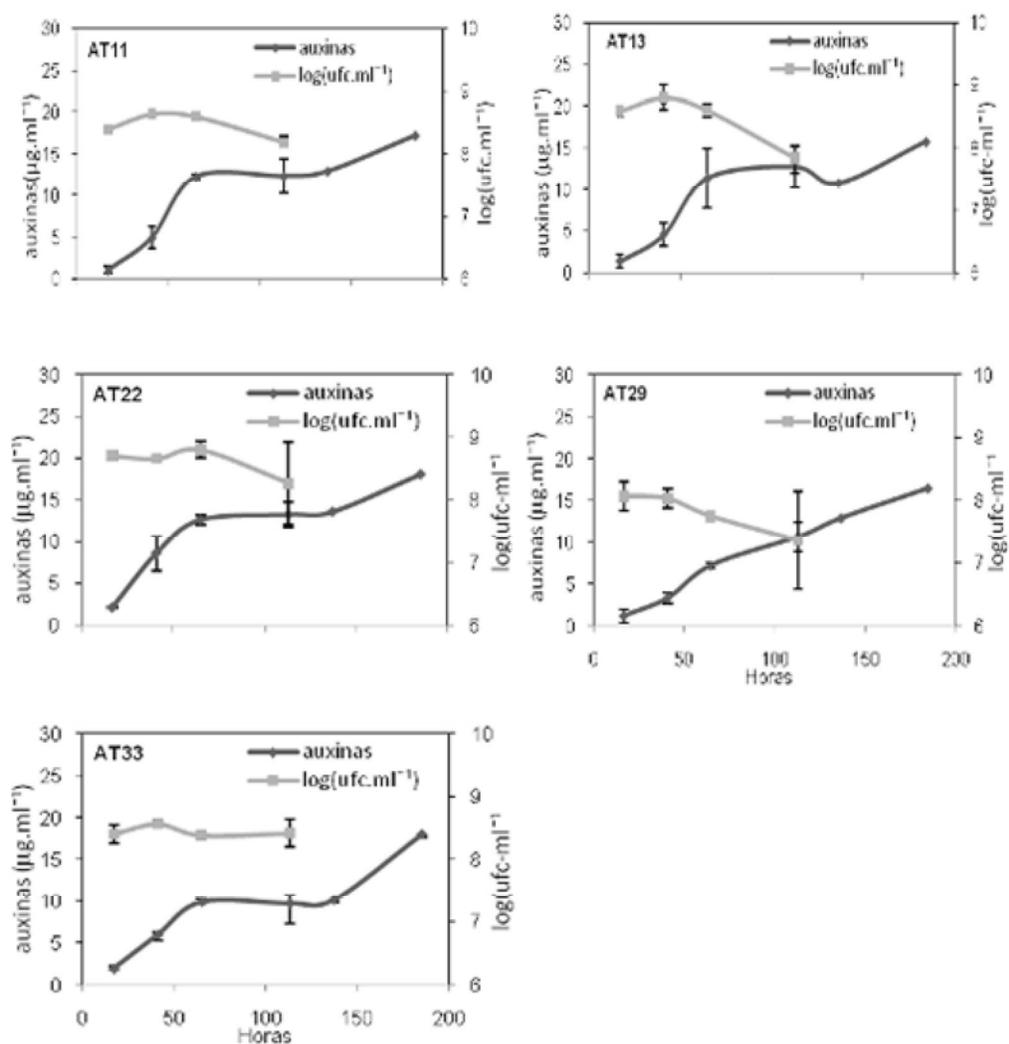
---

### **Caracterización de la producción de auxinas del crecimiento y en cepas nativas de *Azotobacter*.**

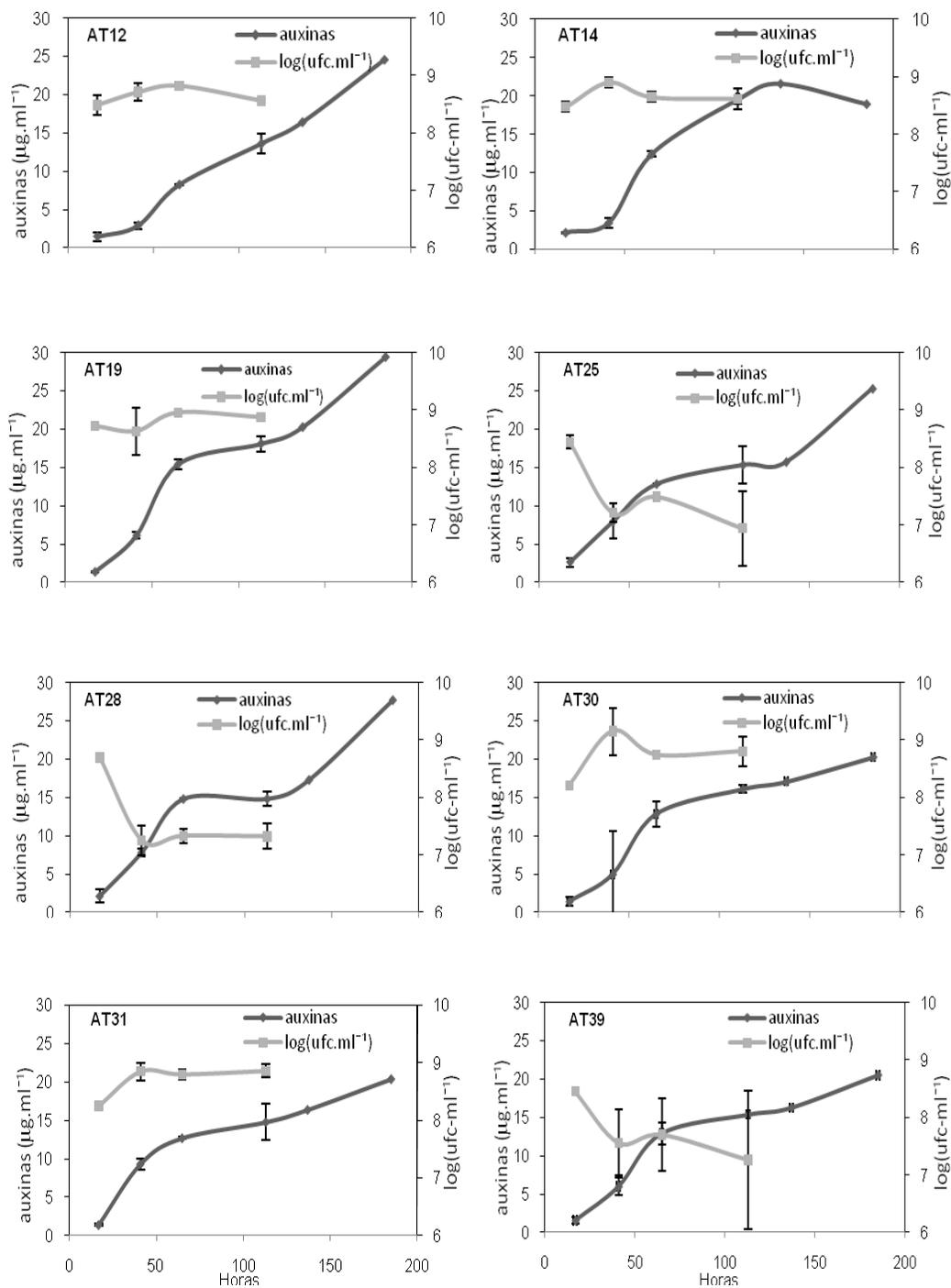
Se caracterizó la producción de auxinas y el crecimiento en 18 cepas de *Azotobacter* nativas de nuestro país. En experimentos preliminares se había evaluado la capacidad de producción de auxinas en el medio mineral Burk; sin embargo, las cantidad de tales compuestos a los 5 días desde la inoculación fueron extremadamente bajas (menores a  $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y se observó una alta variabilidad entre las repeticiones. Por lo tanto, se incorporó al medio la peptona de harina de soja, que resultó ser una fuente adecuada de triptófano para la síntesis de auxinas. En los resultados descritos a continuación no se incluyeron a las cepas AT4, AT36 y AT38 ya que se observó que sus cultivos estaban contaminados. Las cepas se agruparon de acuerdo al nivel de producción de auxinas. A las 17 h de cultivo la producción de auxinas fue menor a  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en todas las cepas. Después de las 17 h, en general, todas las cepas mostraron un aumento en la concentración de auxinas, aunque con variaciones de acuerdo a la cepa y a su nivel de producción final. Las cepas de baja producción mostraron un aumento de poca magnitud a lo largo de todo el período evaluado (Figura 7 a), mientras que en muchos casos la producción llegó a una meseta a las 65 h (Figura 7 b y c). Luego, hasta las 113 h no se verificaron cambios destacables y a partir de allí, la producción aumentó de nuevo sin alcanzarse una nueva meseta. La mayor acumulación de auxinas en el medio de cultivo se obtuvo, en general, durante la etapa de crecimiento estacionario o de muerte en algunas cepas, como por ejemplo en las cepas de *A. chroococcum* AT11 y AT13 (Figura 7 b).



**Figura 7 a.** Producción de auxinas y logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por ml de cultivo ( $\text{ufc.ml}^{-1}$ ) de cepas de *Azotobacter* crecidas en cultivos líquidos, en función del tiempo. Las muestras fueron tomadas a las 17, 41, 65 y 113 h. Para la medición del contenido de auxinas se tomaron muestras adicionales a las 137 y 185 horas. Cada punto es el promedio de dos experimentos, a excepción de los datos correspondientes a las 137 y 185 h que corresponden a una única determinación. Las barras indican el error estándar.



**Figura 7 b.** Producción de auxinas y logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por ml de cultivo ( $\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) de cepas de *Azotobacter* crecidas en cultivos líquidos, en función del tiempo. Las muestras fueron tomadas a las 17, 41, 65 y 113 h. Para la medición del contenido de auxinas se tomaron muestras adicionales a las 137 y 185 horas. Cada punto es el promedio de dos experimentos, a excepción de los datos correspondientes a las 137 y 185 h que corresponden a una única determinación. Las barras indican el error estándar.



**Figura 7 c.** Logaritmo del número de unidades formadoras de colonia por ml de cultivo ( $\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y producción de auxinas en cepas de *Azotobacter* crecidas en cultivos líquidos, en función del tiempo. Las muestras fueron tomadas a las 17, 41, 65 y 113 h. Para la medición del contenido de auxinas se tomaron muestras adicionales a las 137 y 185 horas. Cada punto es el promedio de dos experimentos, a excepción de los datos correspondientes a las 137 y 185 h que corresponden a una única determinación. Las barras indican el error estándar.

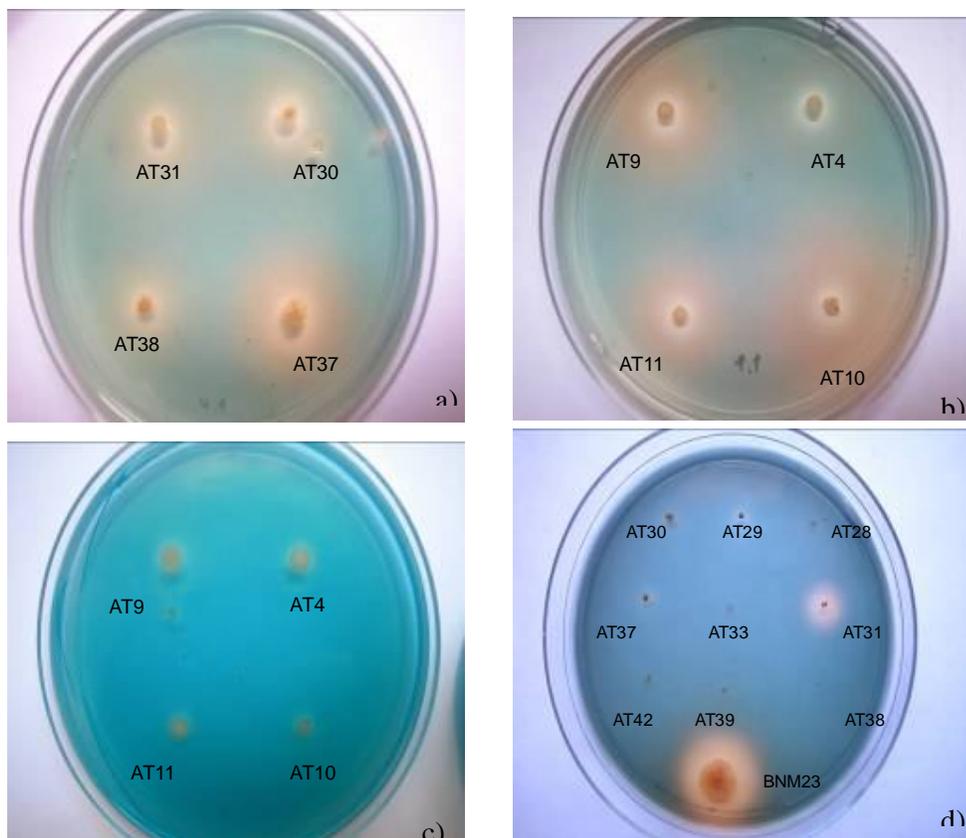
Se observaron diferencias ( $p < 0.0001$ ) en la producción de auxinas entre las cepas a las 113 h de cultivo. La cepa *A. salinestrus* AT18 produjo la menor cantidad de auxinas ( $1.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y se diferenció de manera significativa del resto, mientras que las cepas *A. choroococcum* AT9 y *A. salinestrus* AT10, AT37 y AT42 produjeron entre 2 y  $7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de auxinas, y también se diferenciaron del resto de las cepas las cuales produjeron entre 9 y  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de auxinas.

Respecto a las ufc. $\text{ml}^{-1}$  se observaron diferencias ( $p = 0.0007$ ) a las 113 h de incubación. Las cepas AT11, AT13, AT18, AT25, AT28, AT29, AT39 y AT42 presentaron valores entre  $2 \times 10^7$  y  $1.5 \times 10^8$  ufc. $\text{ml}^{-1}$ , mientras que las cepas restantes tuvieron títulos que variaron entre  $2.4 \times 10^8$  y  $7.5 \times 10^8$  ufc. $\text{ml}^{-1}$ . No se observó ninguna relación entre la producción de auxinas y el número de células en el medio de cultivo. Hubo cepas que alcanzaron títulos altos, por ejemplo la cepa AT37, pero la producción de auxinas fue baja (Figura 7 a), mientras que otras como la AT25 alcanzaron un título bajo, pero la producción de auxinas fue alta (Figura 7 c).

Durante los ensayos las cepas AT10, AT12, AT19 y AT42 presentaron dos tipos de colonias diferentes en medio A sólido. Uno de los fenotipos fueron colonias claras y más secas y el otro, por el contrario colonias oscuras y brillantes. Para establecer si las dos variantes se trataban de la misma cepa, las mismas fueron analizadas por rep-PCR y se compararon con el cultivo original. Las cepas AT10, A19 y AT42 y sus dos variantes, así como el cultivo original resultaron tener el mismo perfil de rep-PCR. Sin embargo, uno de los fenotipos de la cepa AT12 resultó ser diferente a la cepa original. Por esta razón se decidió no continuar trabajando con la cepa AT12.

### **Producción de sideróforos**

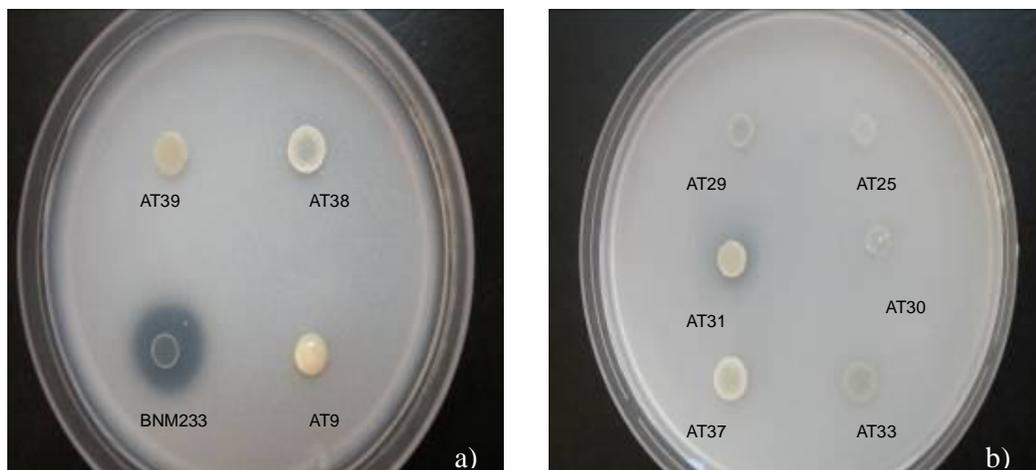
Inicialmente, se evaluó la capacidad de producir sideróforos de las cepas de *Azotobacter* en el medio de Schwyn y Neilands (1987), ampliamente utilizado para tal fin en la bibliografía; sin embargo, el crecimiento de las cepas en dicho medio fue escaso o nulo. Por el contrario, la cepa control *P. fluorescens* BNM 233 creció adecuadamente y puso en evidencia la producción de sideróforos (Figura 8d). Bajo la hipótesis de que la composición del medio de cultivo original no fuera la óptima para *Azotobacter* se probó otra metodología en la que se modificaron los nutrientes para favorecer el crecimiento de esta bacteria; sin embargo, las cepas aisladas en este trabajo tampoco mostraron un buen crecimiento bajo estas nuevas condiciones. Por esta razón se decidió emplear el método O-CAS (Pérez-Miranda *et al.* 2007). Con esta técnica, todas las cepas evaluadas produjeron un cambio de color del medio de azul a naranja, indicativo de la producción de sideróforos (Figura 8 a y b). Cómo se esperaba, teniendo en cuenta que la presencia de hierro en el medio de cultivo debería inhibir la producción de sideróforos, no hubo formación de halo cuando las cepas fueron inoculadas en el medio suplementado con Fe-EDTA (Figura 8c).



**Figura 8.** Ensayos de producción de sideróforos a), b) y c) con el método O-Cas. En c) se adicionó Fe al medio de cultivo d) Método tradicional propuesto por Schwyn y Neilands (1987).

### Solubilización de fosfatos

La capacidad de solubilizar fosfatos de las cepas de *Azotobacter* aisladas de suelos de Argentina se evaluó en tres medios de cultivo diferentes; sin embargo, ninguna de las cepas produjo halo de solubilización en los medios NBRIP, Pikovskaya y Burk modificado, conteniendo fosfato tricálcico como única fuente de fósforo. Alrededor de las colonias de algunas de las cepas, en algunas repeticiones de los ensayos, se evidenció una leve aclaración del medio, aunque sin llegar a formarse un halo transparente (Figura 9b). Por su parte, la cepa control de *P. fluorescens* BNM 233 produjo halo de solubilización en los tres medios empleados (Figura 9a).



**Figura 9.** Ensayos de solubilización de fosfatos. a) Cepas crecidas en medio Burk sin fosfatos solubles. b) Cepas crecidas en medio NBRIP.

### **Selección de cepas de *Azotobacter* para su uso como PGPR en trigo y caracterización de su crecimiento en medio de cultivo.**

Se seleccionaron tres cepas con alta producción de auxinas, *A. salinestrus* AT19, *A. chroococcum* AT25 y AT31 y tres cepas con baja producción de tales sustancias, las cepas de *A. salinestrus* AT18, AT37 y AT42, en función de lo producido a los 5 días de incubación y la tendencia observada más allá de ese tiempo (Figura 7 a, b y c). Además, se caracterizó el crecimiento de las 6 cepas seleccionadas en las primeras horas de iniciado el cultivo. En los muestreos a 0, 4 y 7,5 h de iniciado el cultivo, no fue posible determinar las ufc.ml<sup>-1</sup> en la cepa AT37 debido al crecimiento confluyente de las colonias. En el resto de las cepas, la concentración celular en el tiempo inicial varió entre  $1 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup> (Cuadro 3). Durante las primeras 11 hs de cultivo el incremento en la densidad óptica acompañó al incremento en el número de ufc.ml<sup>-1</sup> (datos no mostrados). A las 11 h de cultivo las cepas AT18, AT19 y AT31 presentaron los títulos más altos ( $1,9$  a  $2,5 \times 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>). Las cepas AT25 y AT42 presentaron títulos intermedios,  $3,3 \times 10^7$  y  $8,7 \times 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup>, mientras que la cepa AT37 presentó el título más bajo,  $6,0 \times 10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup>. La cepa AT42 presentó la mayor velocidad específica de crecimiento y consecuentemente el menor tiempo de generación. Por el contrario, la cepa AT31 fue la de menor velocidad específica de crecimiento.

**Cuadro 3.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de generación (g), ufc.ml<sup>-1</sup> a las 11 y 185 h de crecimiento y producción de auxinas (A) por parte de cepas de *Azotobacter*. Cada valor representa el promedio de dos repeticiones  $\pm$  su desvío estándar.

Cepa	$\mu$ h <sup>-1</sup>	g (h)	ufc.ml <sup>-1</sup> 11 horas	ufc.ml <sup>-1</sup> 185 h	A( $\mu$ g.ml <sup>-1</sup> ) 185 h
AT18	0,35 $\pm$ 0,23	1,1 $\pm$ 0,72	2,5 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 3,5 x 10 <sup>7</sup>	4,9 x 10 <sup>7</sup> <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 0,70
AT19	0,27 $\pm$ 0,05	1,14 $\pm$ 0,22	1,9 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 1,1 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 2,6 x 10 <sup>8</sup>	30,5 $\pm$ 0,70
AT25	0,19 $\pm$ 0,02	1,61 $\pm$ 0,17	3,3 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 3,8 x 10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>8</sup> $\pm$ 7,3x10 <sup>8</sup>	23,1 $\pm$ 0,70
AT31	0,16 $\pm$ 0,01	1,89 $\pm$ 0,06	2,5 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 7,5 x 10 <sup>7</sup>	5,4 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 1,5 x 10 <sup>8</sup>	23,6 $\pm$ 0,70
AT37	nd	nd	6,0 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 8,5 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>8</sup> $\pm$ 1,4 x 10 <sup>8</sup>	5,7 $\pm$ 0,70
AT42	0,37 $\pm$ 0,15	0,88 $\pm$ 0,36	8,7 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 9,5 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>7</sup> <sup>*</sup>	9,3 $\pm$ 0,17

<sup>a</sup>Corresponden a una única determinación.

Luego de 185 h de cultivo (aprox. 8 días), las cepas AT37, AT19 y AT25 y AT31 presentaron títulos mayores a 1,2 x 10<sup>8</sup> y de hasta 5,4 x 10<sup>8</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>. Las cepas AT18 y AT42 tuvieron valores más bajos, de 4,9 x 10<sup>7</sup> y 2,0 x 10<sup>7</sup> respectivamente. En general el crecimiento se caracterizó por un aumento del título bacteriano entre las 11 y las 185 h excepto para las cepas AT18 y AT42, en las cuales se observó un descenso del número de células en el mismo período. Los valores de auxinas determinados a las 185 h fueron similares a los obtenidos en la determinación realizada anteriormente (Figura 7, a, b, c).

### Producción de fitohormonas y fijación biológica de nitrógeno en las cepas seleccionadas

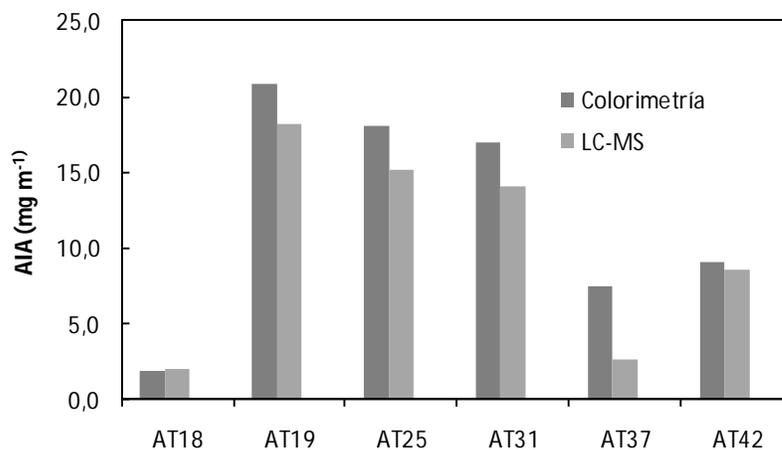
Las seis cepas seleccionadas produjeron diferentes niveles AIA, GA<sub>3</sub> y Z y demostraron diferencias en la actividad de la enzima nitrogenasa como indicadora del proceso de fijación biológica de nitrógeno. Las cepas *A. salinestris* AT19, *A. chroococcum* AT25 y *A. chroococcum* AT31 fueron las que produjeron la mayor cantidad de ácido indol-3-acético (AIA), 18,1; 15,2 y 14  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que la cepa *A. salinestris* AT42 produjo un valor intermedio (8.5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) y las cepas de *A. salinestris* AT18 y AT37 produjeron 2 y 2,6  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de AIA, respectivamente (Cuadro 5). La producción de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) estuvo en el rango de 0,3 a 0,7  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>, siendo las mayores productoras las cepas AT18 y AT37 y las de menor producción fueron AT19 y AT31. La producción de zeatina (Z) varió de 0,5 a 1,2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>, siendo las mayores productoras las AT18 y AT31 y la de menor producción la cepa AT37.

**Cuadro 4.** Producción de ácido-3-indolacético (AIA), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y zeatina (Z), luego de 5 días (cepas AT18 y AT42) u 8 días de crecimiento (cepas AT19, AT25, AT31 y AT37).

Cepa	AIA( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	GA3( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Z( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
AT18	2,0	0,7	1,2
AT19	18,1	0,3	0,8
AT25	15,2	0,6	0,9
AT31	14,0	0,4	1,2
AT37	2,6	0,7	0,5
AT42	8,5	0,5	0,8

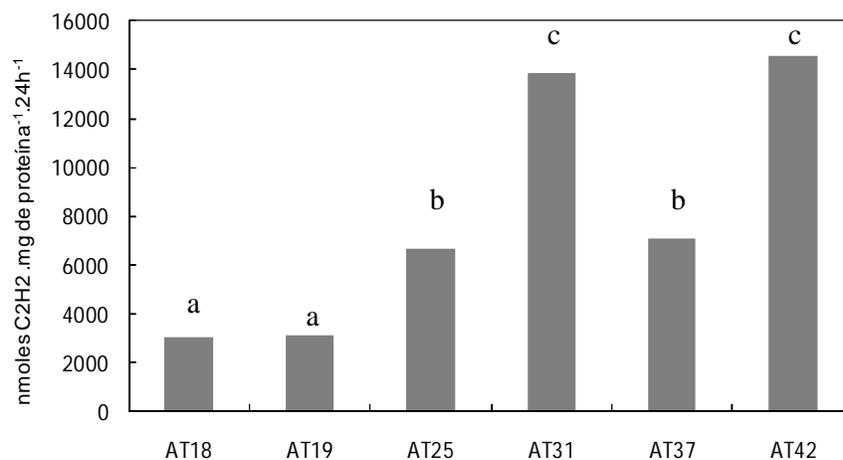
Los títulos de las cepas fueron los siguientes:  $2,6 \times 10^8$ ,  $5,8 \times 10^8$ ,  $2,2 \times 10^7$ ,  $4,5 \times 10^8$ ,  $1,4 \times 10^8$  y  $1,5 \times 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> para las cepas AT18, AT19, AT25, AT31, AT37 y AT42, respectivamente.

En la mayoría de las cepas, las concentraciones de auxinas obtenidas con la metodología propuesta por Salkowsky resultaron levemente superiores a los valores de AIA determinados por LC-MS (Figura10).



**Figura 10.** Comparación entre la producción de AIA determinada por LC-MS y la producción de auxinas medida por colorimetría (Salkowsky) para los mismos cultivos

Las seis cepas demostraron capacidad potencial para fijar  $N_2$ , observándose diferencias significativas entre las cepas ( $p < 0.0001$ ). Las cepas *A. chroococcum* AT31 y *A. salinestris* AT42 fueron las de mayor actividad nitrogenasa, *A. chroococcum* AT25 y *A. salinestris* AT37 presentaron valores intermedios, mientras que *A. salinestris* AT18 y *A. salinestris* AT19 presentaron los valores más bajos de actividad nitrogenasa (Figura 11).



**Figura 11.** Actividad de nitrogenasa por la técnica de reducción de acetileno de cepas de *Azotobacter*. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas según test DGC ( $\alpha=0.05$ )

## DISCUSIÓN

---

Los resultados de este capítulo sugieren que las cepas evaluadas son capaces de producir auxinas y que las diferencias en los niveles de producción permiten clasificarlas en altas, medias y bajas productoras lo cual corrobora una de las hipótesis planteadas inicialmente. La producción de sideróforos fue una característica compartida por todas las cepas, en tanto que no pudimos verificar la capacidad de solubilizar fosfatos. Además, las cepas seleccionadas producen giberelinas y citoquininas, y fijan nitrógeno con diferencias marcadas entre ellas.

De las curvas de crecimiento, se deduce que a excepción de las cepas de *A. salinestris* AT37 y AT42, a las 17 h todas de las bacterias se encontraban ya en la fase estacionaria de su crecimiento. Esto permitiría explicar el por qué no se observó una relación lineal entre la densidad óptica y el crecimiento expresado con  $\log(\text{ufc.ml}^{-1})$  con ninguna de las cepas y los valores de absorbancia no pudieron ser usados como estimadores del crecimiento. Además, durante la incubación de las cepas se observó la producción de pigmentos oscuros y de agregados (flóculos) de diferentes formas y tamaños que afectaron los valores de absorbancia registrados. Tampoco se observó una relación clara entre densidad óptica de los cultivos y la producción de auxinas que permita proponer un patrón general para todas las cepas.

En nuestro trabajo, la dinámica en la producción de auxinas de las cepas fue similar a lo reportado por otros autores siendo típica de todo producto resultante del metabolismo secundario. Para la mayoría de las cepas la concentración de auxinas en el medio de cultivo aumentó con el tiempo de cultivo hasta los 8 días, excepto en las cepas de *A. salinestris* AT18 y AT37, en las cuales no se observó incrementos en la concentración de auxinas más allá de las 65 hs de incubación. El rango de producción de auxinas de los aislamientos evaluados fue similar a lo reportado por otros autores para *Azotobacter* Correa *et al.* (2008) determinaron la producción de auxinas de las cepas de *A. chroococcum* BNM272 y BNM273 en un medio similar al empleado en el presente trabajo, y encontraron que la cepa BNM272 produjo  $8,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de auxinas, tanto a los 2 como a los 5 días de cultivo, mientras que la cepa BNM273 produjo  $8,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$  y  $13,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$  a los 2 y 5 días, respectivamente. En *Azotobacter* no se han estudiado las rutas de producción de auxinas, sin embargo, por los resultados obtenidos y en coincidencia con lo reportado por otros autores en otras especies bacterianas, las rutas dependientes de triptófano serían las predominantes. Amhad *et al.* (2005b) informaron que el rango de producción de 10 aislamientos de *Azotobacter* fue de  $2,7$  a  $10,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de auxinas luego de 15 días de cultivo en un medio sin triptófano y sin nitrógeno, mientras que con el agregado de  $5 \text{mg.ml}^{-1}$  de triptófano, la producción varió entre  $7,3$  y  $32,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . García-Tabares *et al.* (1987) informaron que en *A. vinelandii* DSM382 la producción de AIA fue una función lineal de la concentración de triptófano en el medio de cultivo, en el rango de 0 a 0,05%. Bautista y Gallardo (2008) observaron un aumento lineal en la producción de auxinas hasta el sexto día de crecimiento en cultivos de *A. vinelandii* ATCC12518 empleando un medio con triptona como fuente de triptófano, al igual que lo que observamos con nuestras cepas.

La producción de sideróforos por parte de todas las cepas analizadas no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que la síntesis de sideróforos ha sido ampliamente estudiada en varias especies del género *Azotobacter* (Page 1987, Kennedy *et al.* 2005, Page y von Tigerstrom 1988, Fekette *et al.* 1989). En contraposición, Joseph *et al.* (2007) empleando la metodología universal de Schwyn y Neilands (1987) no observaron producción de sideróforos en ninguno de los 40 aislamientos rizosféricos de

*Azotobacter* que estudiaron. Ahmad *et al.* (2008), con la misma metodología, detectaron la producción de sideróforos en el 16 % de un total de 42 aislamientos. Sin embargo, según nuestros resultados, la metodología tradicional de Schwyn y Neilands no sería adecuada para determinar la producción de sideróforos en cepas del género *Azotobacter*. El crecimiento de las bacterias en el medio de cultivo resultó muy escaso o nulo, y los resultados fueron variables entre repeticiones y experimentos. Sólo la cepa de *Pseudomonas fluorescens* BNM233 creció adecuadamente y expresó la producción de sideróforos con la metodología tradicional. El medio de cultivo de esta técnica contiene bromuro de hexadecyltrimetilamonio (HDTMA), un detergente que puede ser tóxico para ciertas bacterias y hongos (Alexander y Zuberer, 1991, Pérez Miranda *et al.* 2007). En cambio, con el método O-CAS, las bacterias crecen en un medio más favorable y una vez crecidas las colonias se agrega el medio CAS, no interfiriendo de esta manera con el crecimiento bacteriano.

Nuestros resultados de solubilización de fosfatos coinciden con los informados en otros trabajos. Correa *et al.* (2008) tampoco detectaron solubilización de fosfatos con las cepas BNM272 y BNM273 de *A. chroococcum*. Por el contrario, Ahmad *et al.* (2008) utilizando el medio de Pikovskaya agarizado reportaron solubilización de fosfatos en el 74 % de los aislamientos de *Azotobacter* (de un total de 47 aislamientos) obtenidos de suelo. Además, es importante aclarar que se ha comprobado que muchos aislamientos de microorganismos que no producen halo de solubilización en medios agarizados, sí son capaces de solubilizar fosfatos insolubles en medio líquido (Nautiyal 1999). Por lo tanto no se debe descartar la capacidad de solubilizar fosfatos de las cepas de *Azotobacter* aisladas en este trabajo. Estudios empleando otras metodologías podrían ayudar a confirmar o rechazar estos resultados preliminares.

Debido a las diferentes metodologías empleadas y las diferentes condiciones de cultivo resulta difícil comparar los valores de producción de fitohormonas de este estudio con los obtenidos en otros trabajos con *Azotobacter*. Según lo reportado en la literatura, la producción de sustancias del tipo giberelinas por diferentes especies de *Azotobacter* determinada por cromatografía en papel en conjunto con bioensayos, varió entre 0,03  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 4,3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Azcón y Barea 1975, Brown y Burlingham 1968, Martínez Toledo *et al.* 1986), mientras que la producción de sustancias del tipo citoquininas, determinada por cromatografía en papel o HPLC estuvo entre 0,05 y 5,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Azcón y Barea 1975, González López *et al.* 1986, Martínez-Toledo *et al.* 1988, Nieto y Frankenberger 1989, Taller y Wong 1989). Por otro lado, la producción de sustancias del tipo auxinas, con las mismas técnicas estuvo en el rango de 0,2 a 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Martínez-Toledo *et al.* 1988, González López *et al.* 1986, García-Tabares *et al.* 1987). Con metodologías más precisas que las anteriores, y salvando las diferencias en cuanto a la especie y condiciones de cultivo, los valores de hormonas que observamos en las cepas de *Azotobacter* están dentro del rango obtenido por otros autores para *Azospirillum* (Perrig *et al.* 2007).

La técnica colorimétrica resultó una herramienta adecuada para estimar la concentración de AIA de los sobrenadantes bacterianos, mostrando una buena correlación con la metodología de LC-MS. Como se mencionó anteriormente, la técnica de Salkowsky no es específica para AIA, sino que también detecta ácido 3-indolpirúvico (AIP) e indol-3-acetamida (IAM). Las escasas diferencias entre los resultados de ambas metodologías sugieren que las cepas evaluadas no produjeron niveles importantes de otras auxinas además de AIA, con excepción de la cepa AT37. Por el contrario, Ali *et al.* (2009) encontraron concentraciones muy superiores de AIA empleando el reactivo de Salkowsky en relación al AIA determinado por GC-MS en aislamientos de varios géneros bacterianos. Por su parte, Loper y Schroth (1986), analizando la producción

AIA de 14 cepas rizosféricas, observó que en 4 de esas cepas, la producción de auxinas medida por la técnica de Salkowsky fue superior al AIA medido por HPLC, mientras que en las cepas restantes no se encontraron diferencias entre ambas metodologías.

En los siguientes capítulos, la producción de fitohormonas, particularmente de auxinas será el mecanismo que se someterá a prueba como la causa principal de la promoción del crecimiento vegetal por parte de las cepas seleccionadas de *Azotobacter*.

**CAPÍTULO 3: “EFECTO DE *AZOTOBACTER* SOBRE LA GERMINACIÓN Y  
CRECIMIENTO TEMPRANO DE PLANTAS DE TRIGO”**

---



## INTRODUCCIÓN

---

Para comprobar el efecto del AIA producido por bacterias sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas se han empleado diferentes estrategias o abordajes en el laboratorio, tales como el empleo de cepas mutantes alteradas en su capacidad de producir AIA (Spaepen *et al.* 2008); combinar la inoculación con la aplicación de precursores de la síntesis de AIA (Ahmad *et al.* 2005b); correlacionar la producción bacteriana de AIA con el contenido endógeno de la hormona en las plantas inoculadas (Ali *et al.* 2009) y el empleo de plantas mutantes alteradas en la síntesis o sensibilidad a estas fitohormonas (Ortiz Castro *et al.* 2009). Por ejemplo, en *Azospirillum* sp. en base a numerosos estudios, algunos realizados con mutantes deficientes en la síntesis de AIA (Barbieri y Galli 1991, Dobbelaere *et al.* 1999), se considera que la producción de AIA, es la principal explicación de los efectos producidos por su inoculación en diferentes especies vegetales. El AIA altera el metabolismo y la morfología de las raíces, resultando en una mayor absorción de agua y nutrientes y como consecuencia, mayores rendimientos (Bashan y de Bashan 2010)

En *Azotobacter* son escasos los estudios realizados al respecto. Trabajos en trigo y maíz reportaron que la inoculación con una cepa nativa de *Azotobacter* seleccionada por su producción de auxinas *in vitro*, incrementó el crecimiento, el rendimiento y la absorción de nitrógeno, y que la aplicación combinada con triptófano produjo incrementos en el crecimiento aún más pronunciados (Zahir *et al.* 2005, Khalid *et al.* 1999); sin embargo, la síntesis de AIA por sí sola no explicaría por completo los efectos de promoción del crecimiento observados con la inoculación con bacterias productoras de auxinas (Spaepen *et al.* 2007, Xie *et al.* 1996). La existencia de mecanismos múltiples como la producción de otras fitohormonas capaces de inducir respuestas fisiológicas en las plantas, dificultan la comprensión de la expresión de un carácter en particular (Ribaudó *et al.* 2006). Por otra parte, las fitohormonas operan en un complejo sistema incluyendo *cross-talk* y *feedback*, por lo cual es muy difícil establecer el rol que una hormona en particular tiene en la respuesta vegetal (Dodd *et al.* 2010).

El aumento en la tasa y el porcentaje de germinación como respuesta a la inoculación con ciertas bacterias se ha asociado positivamente también con la síntesis de fitohormonas (Kaymak, 2010) Aislamientos de *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. incrementaron la germinación de *Catharanthus roseus*, siendo los porcentajes de germinación de los tratamientos control e inoculado de 35% y 70% respectivamente (Karthikeyan *et al.* 2007). Sin embargo, los autores no determinaron de manera inequívoca la producción de fitohormonas de los aislamientos que utilizaron.

En función de lo expuesto hasta aquí, es probable que la producción de auxinas explique gran parte de los efectos producidos por *Azotobacter* sp. en la germinación y el crecimiento temprano de plantas de trigo. Por lo tanto, en este capítulo se evaluará la respuesta del trigo a la inoculación con diferentes cepas de *Azotobacter* sp. con contrastante producción de auxinas *in vitro*. Los ensayos se llevarán a cabo bajo condiciones axénicas y controladas con el fin de determinar el potencial que tiene cada cepa para estimular la germinación y el crecimiento de trigo en las etapas tempranas de desarrollo.

**OBJETIVO**

- Evaluar el efecto que sobre la germinación y el crecimiento temprano de plantas de trigo tiene la inoculación con cepas nativas de *Azotobacter* con diferente capacidad de producir compuestos del tipo de las auxinas.

**HIPÓTESIS**

- La producción de auxinas y otras fitohormonas *in vitro* por cepas nativas de *Azotobacter* se correlaciona positivamente con la capacidad de estimular la germinación y el crecimiento temprano en plántulas de trigo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Se llevaron a cabo tres ensayos diferentes. El primero tuvo como objetivo evaluar el efecto de *Azotobacter* sobre la germinación, el segundo ensayo se realizó para evaluar el efecto de la bacteria sobre el crecimiento de plántulas de trigo a los 8 días después de la inoculación, inoculando semillas pre-germinadas y por último, el tercer ensayo tuvo el mismo objetivo que el anterior pero su duración fue de 18 días.

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de la variedad de trigo Baguette Premium 13 (Nidera). Antes de realizar las experiencias se evaluó su energía y poder germinativo de acuerdo a las normas de la *International Seed Test Asociation* (ISTA) (Peretti 1994). Las semillas se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v) durante 3 minutos en agitación. Luego, se las enjuagó varias veces con agua destilada estéril y se dejaron secar bajo flujo laminar para su utilización.

### Cultivos bacterianos

Para estos experimentos se emplearon las cepas de *A. salinestrus* AT18, AT37 y AT42 consideradas de baja producción de auxinas y las cepa de *A. salinestrus* AT19, y de *A. chroococcum* AT25 y AT31 consideradas de alta producción. Se utilizaron cultivos bacterianos de 5 y 8 días de crecimiento, preparados según lo descrito en el capítulo 2. Además, se determinó la producción de auxinas y las ufc.ml<sup>-1</sup> de cultivo.

### Efecto de *Azotobacter* sobre la germinación

La inoculación se realizó sumergiendo las semillas en el caldo bacteriano durante 40 minutos, en agitación y a temperatura ambiente. Se incluyó un tratamiento testigo por inmersión de las semillas en agua destilada. Luego las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1-2 h y se sembraron a razón de 50 semillas por bandeja plástica (15 cm x 25 cm de capacidad), conteniendo dos toallas de papel humedecidas con 15 ml de agua destilada estéril. Las semillas se cubrieron con una toalla de papel, el cual se humedeció con 10 ml de agua destilada estéril. Se empleó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento, donde cada bandeja fue la unidad experimental. Se realizaron 3 experimentos independientes. Para mantener la humedad de las semillas, las bandejas fueron colocadas dentro de bolsas de polietileno transparente y se incubaron en una cámara de cultivo con 16 hs de luz y 8 de oscuridad, a 24°-27°C, bajo una intensidad lumínica de 100  $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Se registró el número de plántulas normales con raíces mayores a 3 mm a los 1, 2, 3, 4, y 8 días luego de siembra y se calculó el porcentaje de germinación a los 4 y 8 días y la velocidad germinativa (Peretti, 1994). La velocidad germinativa se determinó como la sumatoria de los cocientes entre el número de plántulas nuevas registradas en cada recuento y el número de días desde la siembra en que se realizó dicho recuento.

## **Efecto de *Azotobacter* sobre el crecimiento temprano.**

### Ensayo en bandejas (8 días)

Se pre-germinaron semillas de trigo durante 24 hs de la manera descripta anteriormente. Al cabo de ese tiempo se seleccionaron semillas con longitud homogénea de radícula (mayor a 0.5 cm) y se colocaron a razón de 15 por bandeja de plástico, sobre dos toallas de papel humedecidas con 15 ml de agua destilada estéril. Cada semilla se inoculó con 100  $\mu$ l del caldo bacteriano. Se incluyó un tratamiento de inoculación con agua destilada estéril como control. Luego, las semillas fueron cubiertas con otra toalla de papel y se aplicaron 10 ml de agua destilada estéril. Luego de 8 días en cámara de cultivo bajo las mismas condiciones descriptas anteriormente, se evaluó la longitud y el peso seco del tallo y de la raíz, el número de raíces seminales y la colonización radical. Para determinar la colonización radical, las raíces de dos plantas se trituraron en un mortero adicionando 2 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, se hicieron diluciones seriadas, las que se sembraron sobre la superficie de placas con medio A, modificado por la omisión de la peptona de harina de soja, con el objetivo de reducir el crecimiento de microorganismos diferentes a *Azotobacter*. Al cabo de 2-3 días se contó el número de colonias con características similares a *Azotobacter* y se expresó la colonización radical como  $\text{ufc.raíz}^{-1}$ . Se empleó el mismo diseño que en el ensayo anterior y se realizaron dos experimentos independientes.

### Ensayo en macetas (18 días)

Semillas pre-germinadas e inoculadas de igual forma que en el ensayo anterior se incubaron en bandejas, bajo las mismas condiciones previamente descriptas, durante 24 hs. Luego, las plántulas se plantaron en macetas plásticas de 1.4 litros de capacidad conteniendo vermiculita estéril y se incubaron bajo las mismas condiciones descriptas. Las macetas se regaron con solución de Hoagland 0,25x (Hoagland y Arnon 1950). Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con 5 repeticiones por tratamiento, consistiendo cada repetición de una maceta con 5 plántulas. Al cabo de 18 días se determinaron la longitud y el peso seco de la raíz y del tallo y el número de raíces por planta. Se realizaron dos experimentos independientes.

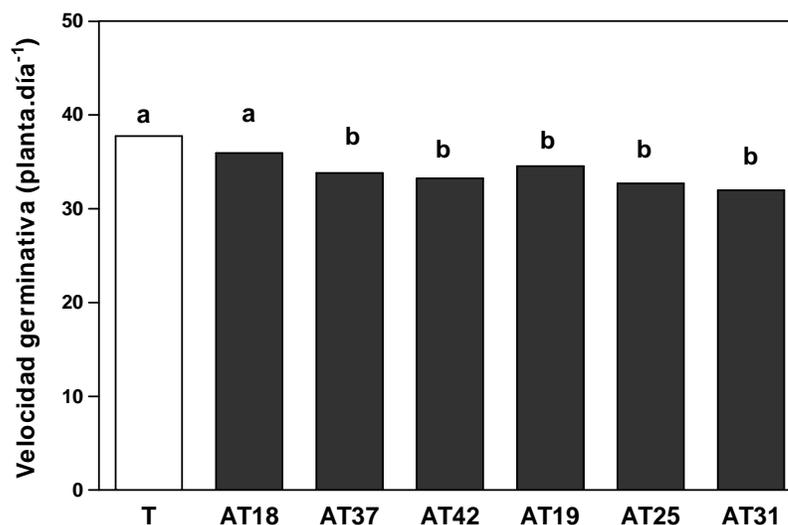
## **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon con el test DGC utilizando el paquete estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2010).

## RESULTADOS

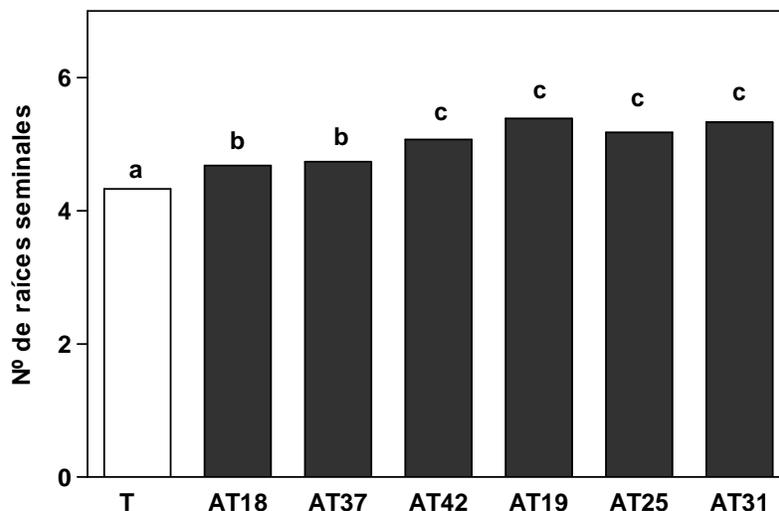
La densidad bacteriana y la concentración de auxinas de los cultivos bacterianos empleados en los ensayos fueron similares a los valores obtenidos en ensayos anteriores (Capítulo 2). Las cepas *A. salinestrus* AT18, *A. salinestrus* AT19, *A. chroococcum* AT25, *A. chroococcum* AT31, *A. salinestrus* AT37 y *A. salinestrus* AT42 tuvieron títulos de  $8,8 \times 10^7$ ,  $6,0 \times 10^8$ ,  $1,3 \times 10^8$ ,  $4,4 \times 10^8$ ,  $1,8 \times 10^8$  y  $1,2 \times 10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Las cepas AT18, AT37, y AT42 de baja producción de auxinas presentaron concentraciones de AIA en el caldo bacteriano de 2,2, 5,3 y 9,3 µg.ml<sup>-1</sup> de auxinas, respectivamente. Las cepas AT19, AT25 y AT31, seleccionadas por su alta producción de AIA, produjeron 26,3, 21,8 y 21,9 µg.ml<sup>-1</sup> de auxinas, respectivamente.

La inoculación no afectó la germinación, a los 4 días se alcanzó el máximo porcentaje de germinación, cuyo promedio para todo el ensayo fue del 97,3%. Sin embargo, la velocidad germinativa disminuyó significativamente con la inoculación, excepto con la cepa AT18 (Figura 12).



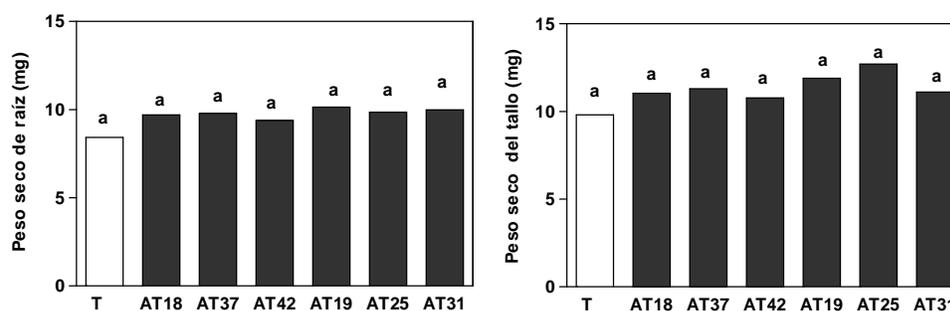
**Figura 12.** Velocidad germinativa de plántulas de trigo inoculadas con cepas de *Azotobacter* de baja (AT18 y AT37, AT42) y de alta producción de auxinas (AT19, AT25 y AT31). T: sin inocular. Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ).

La inoculación de semillas pre-germinadas de trigo con todas las cepas incrementó ( $p < 0,0001$ ) el número de raíces seminales de las plántulas a los 8 días (Figura 13). Dichos incrementos fueron del 17, 20, 23 y 24 % para las cepas AT42, AT25, AT31 y AT19, altas productoras de AIA *in vitro*, mientras que el aumento en el número de raíces seminales generado por las cepas AT18 y AT37, fue de menor magnitud, 8 y 9 %, respectivamente. La cepa AT42 si bien en principio fue clasificada como baja productora de auxinas, tanto en este ensayo como en anteriores produjo más del doble de auxinas que las cepas AT18 y AT37.



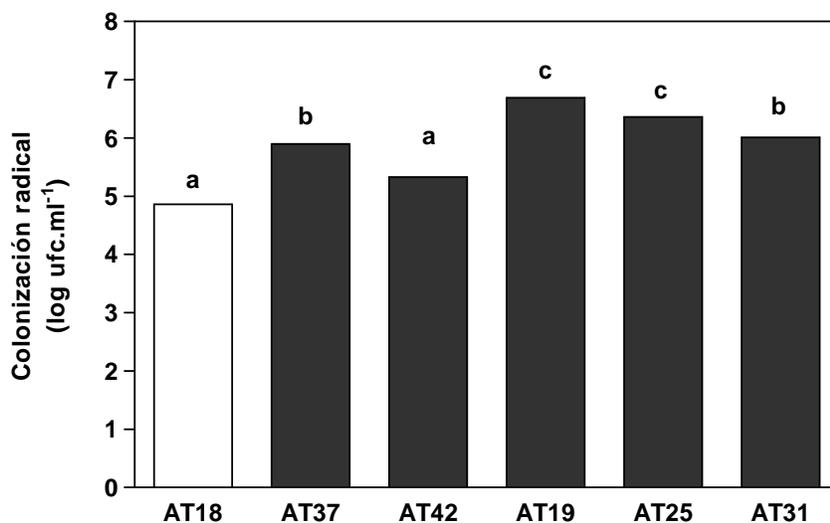
**Figura 13.** Número de raíces seminales de plántulas de trigo a los 8 días de la inoculación con cepas de *Azotobacter* de baja (AT18, AT37 y AT42) y de alta producción de auxinas (AT19, AT25 y AT31). T: sin inocular. Los valores representan el promedio de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ). DGC.

El peso seco de la raíz se incrementó con la inoculación de todas las cepas de *Azotobacter* aunque las diferencias no resultaron significativas ( $p=0,055$ ) (Figura 14a). Dichos incrementos variaron entre un 11% y un 20,3% para las cepas AT42 y AT19, respectivamente. El peso seco del tallo se incrementó entre un 13 % y un 29,5 % con la inoculación, siendo las cepas AT19 y AT25 las que más aumentaron este parámetro (Figura 14b), aunque estas diferencias tampoco resultaron significativas ( $p=0,1$ ). Tampoco la longitud de la raíz ( $p=0,67$ ) y del tallo ( $p= 0,16$ ) se vieron afectados por la inoculación (datos no mostrados).



**Figura 14.** Peso seco de la raíz y del tallo de plántulas de trigo a los 8 de la inoculación con cepas de *Azotobacter* de baja producción de auxinas (AT18 AT37 y AT42), y de alta producción de auxinas (AT19, AT25 y AT31). Los valores representan el promedio de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno y las barras el error estándar de las medias.

En el ensayo en bandejas se evaluó la colonización de las raíces por parte de las 6 cepas de *Azotobacter*. Se observaron diferencias significativas ( $p=0,0001$ ) entre las cepas en la colonización de las raíces (Figura 15). Las plántulas inoculadas con las cepas AT19 y AT25 presentaron  $4,9 \times 10^6$  y  $2,3 \times 10^6$  ufc.raíz<sup>-1</sup> respectivamente, valores superiores al hallado en las plantas inoculadas con las cepas AT31 y AT37, que tuvieron igual cantidad de ufc.raíz<sup>-1</sup>,  $1 \times 10^6$ , mientras que las plantas inoculadas con las cepas AT18 y AT42, resultaron ser las de menor colonización radical, con valores de  $7,6 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  ufc.raíz<sup>-1</sup> respectivamente.



**Figura 15.** Unidades formadoras de colonia por raíz de trigo, a los 8 días de la inoculación con cepas de *Azotobacter*. Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones de 1 experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Al analizar el ensayo en macetas, se observó que la inoculación de semillas pregerminadas de trigo con *Azotobacter* sp. no afectó de manera significativa a ninguno de los parámetros de crecimiento, tales como la longitud y peso seco del vástago, el número de raíces y el peso seco de la raíz, luego de 18 días desde la inoculación (datos no mostrados). Las evaluaciones de la longitud radical no fueron consideradas debido a que se produjo mucho error en su medición a causa de roturas de la raíces al descalzar las plantas de las macetas con vermiculita.

Con el objetivo de verificar si la falta de respuesta a la inoculación observada a los 18 días podría estar relacionada con la colonización de la raíz, se llevó a cabo un ensayo adicional en macetas, que fue realizado con las cepas AT18, AT19 y AT25, las cuales habían demostrado diferencias en la colonización radical a los 8 días desde la inoculación. A los 18 días se determinó la colonización de la superficie radical. Para ello la raíz de cada planta se sacudió para eliminar los restos menos adheridos de vermiculita y luego se puso en agitación en un erlenmeyer con 100 ml de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones seriadas y se determinó las ufc.raíz<sup>-1</sup>, con el mismo procedimiento que el empleado para el ensayo en bandejas. Además, se determinó el peso seco de la raíz y del tallo. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y el test DGC. No se observaron efectos significativos en el peso seco de la raíz ( $p=0,67$ ) y del tallo ( $p=0,32$ ). Sin embargo, se observaron diferencias ( $p=0,001$ ) entre las tres cepas

en la colonización de la superficie radical. El número de bacteria por raíz fue de  $1,7 \times 10^4$ ,  $1,9 \times 10^6$  y  $3,6 \times 10^6$  para las plantas inoculadas con las cepas AT18, AT25 y AT19, respectivamente.

## DISCUSIÓN

---

Los resultados de este capítulo nos permiten corroborar solo parcialmente la hipótesis planteada. Las cepas de *Azotobacter* que produjeron más auxinas fueron las que indujeron un aumento mayor en el número de raíces seminales de trigo. En otros parámetros del crecimiento no se observó una respuesta significativa. Sin embargo, la magnitud de las diferencias observadas permite sugerir que la inoculación con *Azotobacter* afectó positivamente el peso seco del tallo y de la raíz de plántulas de trigo a los 8 días desde la inoculación.

Las raíces seminales emergen de los nudos del hipocótilo embrionario de las semillas en germinación, en trigo su número varía de 3 a 6 y constituyen 1-14% del sistema completo de la raíz. El sistema de raíces seminales es muy importante para el establecimiento de las plántulas de trigo. Ellas crecen y funcionan durante toda la vida de la planta, y penetran en el suelo más tempranamente y a mayor profundidad que las raíces adventicias, las cuales emergen de los nudos del coleóptilo o de los macollos (Manske y Vlek 2002). Más aún, bajo condiciones de humedad limitada del suelo es posible que las raíces adventicias no se desarrollen o que su crecimiento se vea limitado. Por lo tanto, en esos casos, las plantas alcanzan su madurez dependiendo principalmente de las raíces seminales (Sanguinetti *et al.* 2007). Esto último destaca la importancia de nuestros resultados de inoculación con *Azotobacter* ya que las plantas con mayor número de raíces seminales estarán en mejores condiciones para soportar situaciones de estrés hídrico, al menos, en etapas tempranas de su crecimiento, aumentando las chances de tener un buen stand de plantas logradas a campo.

El retraso en la germinación observado con la inoculación con *Azotobacter* no fue un resultado sorprendente ya que ese efecto negativo sobre la germinación ya había sido informado (Harper y Lynch 1979). Estos autores observaron una disminución en el porcentaje de germinación cuando inocularon semillas de cebada con cultivos completos (bacterias + sobrenadante) de *A. chroococcum*. Sin embargo, este efecto no se produjo al tratar las semillas con el sobrenadante libre de células. Estos autores sugieren que la inhibición en la germinación se debe a una competencia entre la bacteria y la semilla por el oxígeno disponible. El retraso en la germinación que observamos es posible que se deba, en parte, a un exceso en el número de células en los cultivos utilizados. Apoya esta hipótesis el hecho de que la cepa AT18, cuyo título fue considerablemente menor al del resto de las cepas, no afectó negativamente a la velocidad germinativa. Por otra parte, García-González *et al.* (2005) reportaron que la aplicación de sobrenadantes libres de células de *Azotobacter beijerinckii*, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* acortó el tiempo de germinación de semillas de trigo respecto al tratamiento con agua, y que la aplicación de una solución de AIA de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  produjo el mismo efecto. Sin embargo, los autores no mencionan la concentración de auxinas presente en el sobrenadante, ni el volumen aplicado.

Es un hecho conocido que la concentración bacteriana es un factor a considerar cuando se desarrolla un estudio con PGPR, y su efecto se ha demostrado que depende de la especie y variedad vegetal inoculada. Kurdish *et al.* (2008) observaron que la inoculación de pimiento, tomate, zapallo y remolacha, sumergiendo las semillas en caldos bacterianos de *A. vinelandii* con concentraciones de  $1 \times 10^8$  a  $9 \times 10^8$  ufc. $\text{ml}^{-1}$  aumentaron el porcentaje de germinación, mientras que la inoculación de trigo inhibió su germinación en un 13 % respecto al testigo. Sin embargo, al inocular con el mismo caldo bacteriano diluido 50 veces, el porcentaje de germinación se incrementó en un 20%. Así mismo, Somova *et al.* (2001), observaron que la inoculación con

*Pseudomonas putida* y *P. fluorescens* podía estimular o inhibir la germinación de semillas de trigo en función de la concentración bacteriana del inóculo, y que la concentración óptima era distinta para diferentes variedades de trigo. Por lo expuesto precedentemente, los resultados que obtuvimos para la germinación podrían deberse no solo al título bacteriano, sino también a la variedad de trigo utilizada.

La capacidad de fijar nitrógeno *in vitro*, estimada en el Capítulo 2 (Figura 11) no parece tener relación con la promoción del crecimiento observada, ya que por ejemplo las cepas AT18 y AT19 con valores similares de actividad nitrogenasa generaron diferentes tipos de respuesta en las plantas inoculadas (Figuras 11 y 12). Nuestros resultados, coinciden con los observados por Rodelas *et al.* (1999) quienes al coinocular plántulas de *Vicia faba* L. con *Rhizobium* y cepas de *Azotobacter* con diferente capacidad de reducción de acetileno *in vitro* tampoco encontraron una relación entre esta característica y la estimulación del crecimiento de las plantas. Más aún, una de las cepas con mayor actividad nitrogenasa redujo el crecimiento de las plantas. Barbieri *et al.* (1986) empleando un mutante *nif* (incapaz de fijar nitrógeno) de *A. brasilense* sp6, productor de auxinas, encontró respuestas en la estimulación del crecimiento de trigo similares a las observadas con la inoculación con la cepa salvaje. Además, teniendo en cuenta que la fijación de nitrógeno es un proceso con altos requerimientos energéticos, en los ensayos realizados es probable que la plántula de trigo no excrete cantidades suficientes de sustancias carbonadas que puedan ser empleadas por la bacteria para fijar nitrógeno (Bashan y de Bashan 2010).

La falta de estimulación del crecimiento de las plantas a los 18 días de la inoculación resultó sorprendente dada la mayor producción de raíces seminales observada a los 8 días y a la tendencia observada en los otros parámetros. Sin embargo, otros autores tuvieron resultados similares. Ribas *et al.* (2009) inocularon semillas y plántulas de trigo, maíz y soja con cultivos de *A. brasilense* Az39 y observaron que la magnitud de la respuesta observada a los 8 días desde la inoculación en ciertos parámetros del crecimiento era mayor que la observada a los 14 días. Es posible que nuestros resultados se deban a una baja colonización radical, valor que podría estar por debajo del óptimo requerido para observar una respuesta sostenible en el tiempo. Desafortunadamente, existen pocos trabajos en la bibliografía internacional sobre valores de colonización radical de *Azotobacter* sp. en trigo, por lo tanto no podemos saber si la cantidad de bacterias detectadas en las raíces está fuera del rango óptimo para estimular el crecimiento del trigo. Otros autores han indicado que, con la excepción de la asociación entre *A. paspali* con *Paspalum notatum*, *Azotobacter* no es un buen colonizador de las raíces de las plantas (Kennedy y Tchan 1992). Específicamente, en plantas de trigo, Rovira (1963) informó que *Azotobacter* sp. es un pobre colonizador de las raíces, sugiriendo que ello se debía a la incapacidad de la bacteria para utilizar los exudados radicales (Rovira *et al.* 1965). Sin embargo, esos estudios no son comparables con el nuestro debido a que las plantas crecieron en tubos de ensayo con arena. Por otra parte, Narula *et al.* (2007), mediante microscopía de inmunofluorescencia, demostraron que *A. chroococcum* cepa Mac27 colonizó las raíces de trigo en un sistema hidropónico. Además, en un ensayo en invernáculo con suelo sin esterilizar, los autores observaron que la misma cepa colonizó en igual magnitud las raíces de trigo y el suelo e incrementó el crecimiento de las plantas luego de 60 días desde la inoculación. Por el contrario, Rovira (1963) en un ensayo similar observó también a los 60 días una estimulación del crecimiento de las plantas, a pesar de que la presencia de *Azotobacter* sp. en las raíces fue insignificante. De modo que la interacción de múltiples factores, tales como las condiciones físico-químicas del sustrato, la competencia con otros microorganismos, así como la composición de los exudados radicales, determinada principalmente por la

variedad de trigo, podrían estar implicados en la falta de respuesta que hemos observado. Además, es posible que la respuesta que se observó en las plántulas a los 8 de la inoculación se deba solo a la acción de las fitohormonas presentes en el caldo bacteriano al momento de la inoculación, de modo que si la concentración de las mismas no se mantiene en el tiempo ese efecto estimulador podría perderse a los 18 días desde la inoculación.



**CAPÍTULO 4: “LA PRODUCCIÓN DE AUXINAS POR *AZOTOBACTER* COMO MECANISMO RESPONSABLE DE LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO TEMPRANO EN TRIGO”.**

---



## INTRODUCCIÓN

---

Los resultados del capítulo anterior sugieren que las auxinas producidas por *Azotobacter* tienen un rol importante en modificar la morfología radical de las plántulas de trigo inoculadas. Además, con algunas cepas también se observó estimulación del crecimiento de la parte aérea. No hemos encontrado en la literatura referencias sobre la relación entre la producción de auxinas y la estimulación del crecimiento radical de plantas de trigo inoculadas con *Azotobacter*; sin embargo, con otros géneros de PGPR se demostró que la proliferación del sistema radical de trigo es causada principalmente por la producción de AIA (Sapaepen *et al.* 2008). En tal sentido, una cepa mutante de *A. brasilense*, con reducida capacidad de producir AIA, redujo el número y la longitud de las raíces laterales así como el desarrollo de pelos radicales de plántulas de trigo, en relación con la cepa salvaje (Barbieri *et al.* 1991). También se demostró en *Azospirillum* sp. que la promoción o inhibición del crecimiento radical dependía de la concentración celular del inóculo de manera análoga a lo que ocurre con la aplicación exógena de AIA, la cual estimula el crecimiento de la raíz a bajas concentraciones y lo inhibe en altas (Baca y Elmerich 2007). De manera similar, sobrenadantes libres de células, con altos contenidos de AIA de *A. brasilense* y *Klebsiella pneumoniae* generaron diferentes tipos de respuestas en el sistema radical de plántulas de arroz en función de la concentración del sobrenadante aplicada en un sistema hidropónico.

En base a lo expuesto anteriormente, en este capítulo se propuso evaluar el efecto de *Azotobacter* sobre el crecimiento de plántulas de trigo y fundamentalmente a nivel de la morfología radical y comparar esta respuesta con aquella obtenida cuando se aplica AIA de manera exógena. Además se analizó si la presencia de la bacteria es necesaria para producir dicha respuesta a la inoculación.

### OBJETIVO

- Evaluar el efecto de la producción de auxinas por *Azotobacter* sp. sobre el crecimiento vegetativo de plántulas de trigo y el desarrollo de pelos radicales.

### HIPÓTESIS

- La producción de auxinas en el medio de cultivo por *Azotobacter* sp. es el mecanismo principal que participa en la promoción temprana del crecimiento de las plántulas de trigo y en la alteración de la morfología radical.

- No se requiere la presencia de la bacteria para observar esos efectos tempranos debidos a la inoculación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

En un primer ensayo se evaluó el efecto de las auxinas producidas por cepas de *Azotobacter* sp. sobre el crecimiento temprano, mientras que en un segundo ensayo se determinó el efecto sobre la morfología radical. En el primer ensayo se emplearon las cepas AT18, de baja producción de auxinas y las cepas AT19 y AT25 de alta producción, mientras que en el segundo se usaron solamente las cepas AT18 y AT19. La preparación y la determinación de las auxinas y las ufc.ml<sup>-1</sup> de los cultivos bacterianos, así como la obtención de las semillas pre-germinadas se realizaron de igual manera que en el capítulo anterior. Los sobrenadantes libres de células se obtuvieron por centrifugación de los cultivos bacterianos a 10000 rpm durante 15 min y se filtraron (0.22 µm).

### Efecto sobre el crecimiento temprano

Los tratamientos consistieron en la aplicación de 100 µl por semilla del cultivo bacteriano completo, del sobrenadante libre de células o de diferentes concentraciones de ácido indol-3 acético (AIA) puro (Sigma). Se emplearon tres concentraciones de AIA: una alta (AIAa) similar a la concentración de auxinas determinada en los sobrenadantes de las cepas de mayor producción (AT19 y AT25), otra similar a la concentración de auxinas del sobrenadante de la cepa AT18 de baja producción (AIAb) y una concentración intermedia (AIAm). Además se incluyó como control un tratamiento con 100 µl de agua destilada. Al cabo de 8 días desde la aplicación de los tratamientos, se midió la longitud y el peso seco del tallo y de la raíz y el número de raíces seminales.

### Efecto sobre la morfología radical

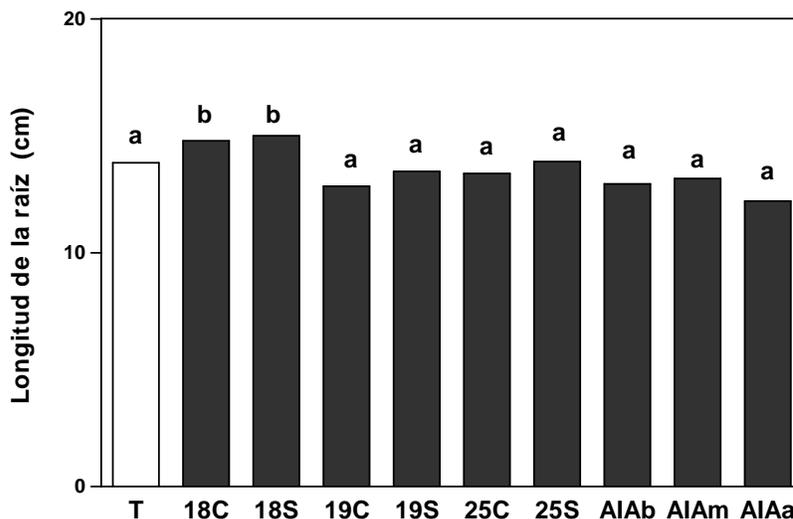
Se colocaron 5 semillas de trigo pre-germinadas sobre agar-agua al 0,7% en placas de Petri. Cada semilla fue inoculada con 200 µl del sobrenadante de las cepas AT18 y AT19 o con 200 µl de 3 soluciones de AIA con tres concentraciones diferentes, de manera similar que en el ensayo anterior. Los controles se inocularon con agua destilada estéril. Las placas se incubaron en la oscuridad durante 3 días a 25 °C. Al finalizar el experimento se sumergieron las raíces de las plántulas en una solución de cristal violeta (0,075 % en alcohol 70°) (Dobbelaere *et al.* 1999) y se enjuagaron con agua destilada. Luego las raíces se colocaron en una placa de Petri con agua, se observaron con lupa (25x) y se tomaron fotografías.

## RESULTADOS

Los títulos de los cultivos bacterianos de las cepas *A. salinestris* AT18, *A. salinestris* AT19 y *A. chroococcum* AT25 empleados en la presente experiencia fueron  $3,7 \times 10^8$ ,  $6,8 \times 10^8$  y  $4,7 \times 10^7$  cfu.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. La concentración de auxinas en los sobrenadantes fueron 1,6; 23,8 y 20 µg.ml<sup>-1</sup> para las cepas AT18, AT19 y AT25, respectivamente.

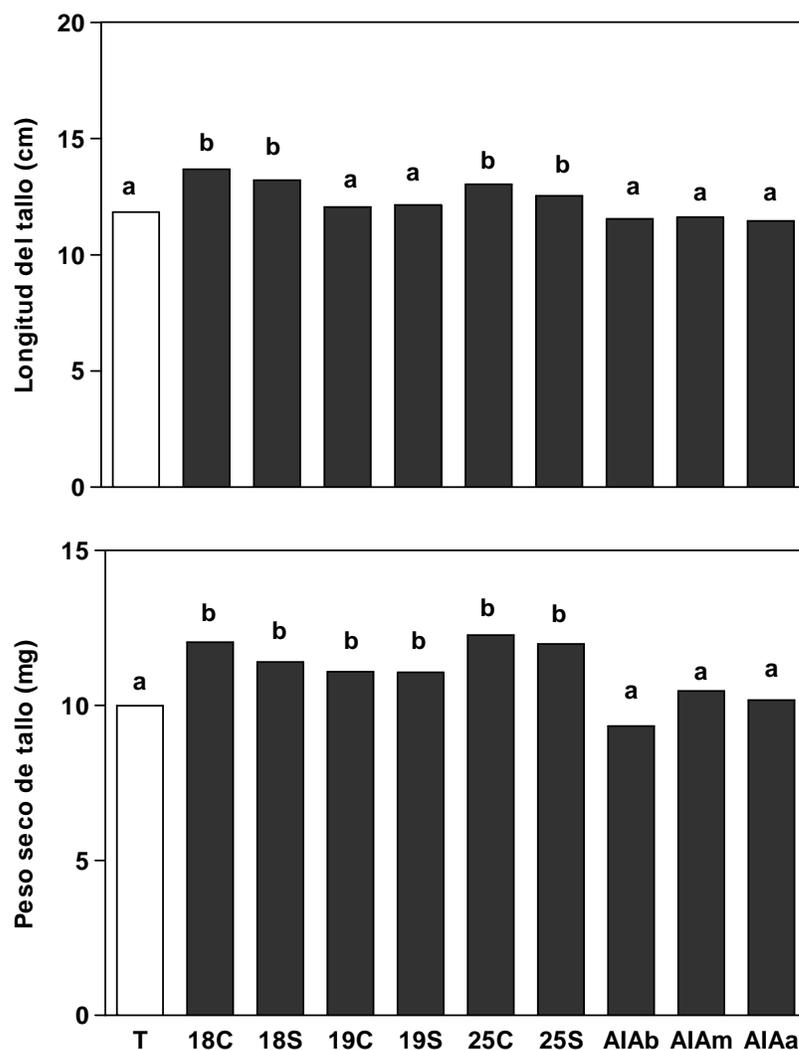
### Efecto sobre el crecimiento temprano

En ninguno de los parámetros evaluados se observó diferencias entre la aplicación del cultivo bacteriano completo y del sobrenadante de cada cepa. A los 8 días desde la inoculación el peso seco de la raíz no resultó afectado por la aplicación de los diferentes tratamientos ( $p=0,25$ ) (datos no mostrados), pero sí lo hizo la longitud de la raíz ( $p=0,0009$ ). La aplicación de la cepa AT18 produjo un incremento del 7-8 % en la longitud de la raíz respecto al testigo y a los otros tratamientos (Figura 16).



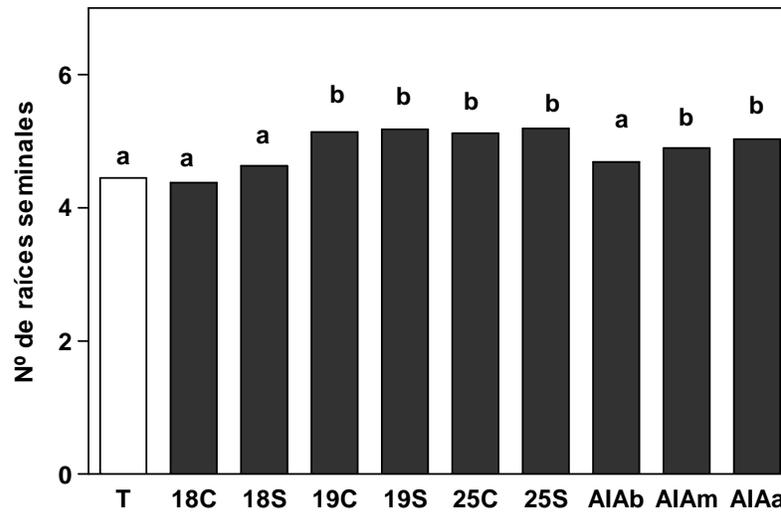
**Figura 16.** Longitud de la raíz (cm) de plántulas de trigo luego de 8 días de la aplicación de cultivos bacterianos completos (C) y sobrenadantes (S) de cepas de *Azotobacter* de alta (AT19 y AT25), de baja producción de auxinas (AT18) y de soluciones de AIA de baja (AIAb), media (AIAm) y alta (AIAa) concentración. T: sin inocular y sin AIA sintético. Los valores representan el promedio de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas.

En general, tanto la longitud ( $p=0,0005$ ) como el peso seco del tallo ( $p=0,0001$ ) fueron positivamente afectados por los cultivos completos y los sobrenadantes bacterianos (Figura 17). Las cepas AT18 y AT25 incrementaron la longitud y el peso seco del tallo, mientras que la cepa AT19 aumentó sólo el peso seco del tallo respecto al resto de los tratamientos. Tanto el sobrenadante como el cultivo completo de la cepa AT18 incrementaron el peso seco del tallo respecto al testigo, un 14,2 y 20,6 %, respectivamente. Los incrementos en el peso seco del tallo con la cepa AT25 fueron de 23 y 20 % para el cultivo completo y el sobrenadante, respectivamente, mientras que con la cepa AT19 el incremento fue de un 11% (sobrenadante y cultivo completo). Por el contrario, ninguna de las soluciones de AIA mostraron efectos sobre el crecimiento de la parte aérea.



**Figura 17.** Longitud y peso seco del tallo de plantas de trigo luego de 8 días de la aplicación de cultivos bacterianos completos (C) o sobrenadantes libres de células (S) del cultivo de cepas de *Azotobacter* de alta (AT19 y AT25) y baja producción de AIA (AT18) y de soluciones AIA de concentraciones baja (AIAb), media (AIAm) y alta (AIAa). T: sin inocular y sin AIA sintético. Los valores representan el promedio de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas.

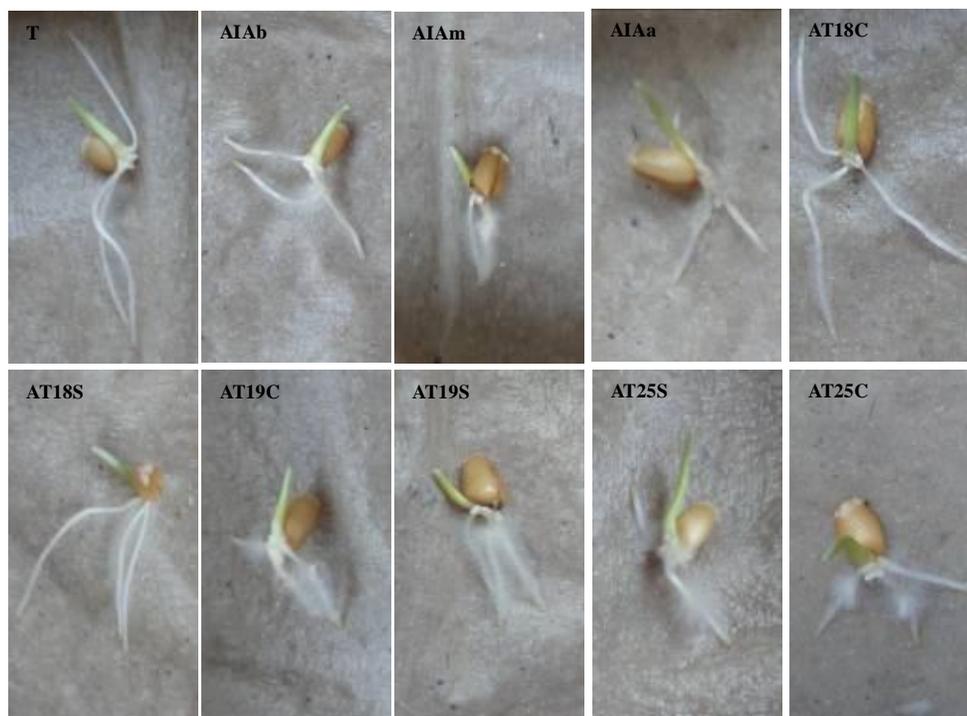
Las plantas tratadas con las cepas de mayor producción de auxina *in vitro* AT25 y AT19, así como aquéllas tratadas con las soluciones de concentraciones media y alta de AIA, desarrollaron un mayor número de raíces seminales respecto al testigo (T) y a las plantas tratadas con el sobrenadante y el cultivo completo de la cepa AT18 baja productora de auxinas.



**Figura 18.** Número de raíces seminales de plántulas de trigo cuyas semillas se trataron con cultivos bacterianos completos (C) o sobrenadantes libres de células (S) del cultivo de cepas de *Azotobacter* de alta producción de AIA (AT19 y AT25), de baja producción (AT18) y de soluciones AIA de baja (AIAb), media (AIAm) y alta (AIAa) concentración T, sin inocular y sin AIA sintético. Los valores representan el promedio de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de DGC. ( $\alpha=0,05$ ).

#### Efecto sobre la morfología radical

En el ensayo en bandejas a las 24 hs se observaron diferencias entre los tratamientos en la morfología de las raíces (Figura 19). Las plántulas tratadas con las cepas AT19 y AT25 y con las soluciones de AIAa y AIAm tuvieron raíces más cortas que el resto de los tratamientos. La aplicación de la solución AIAb redujo levemente la longitud de las raíces en relación al control y al tratamiento con la cepa AT18.

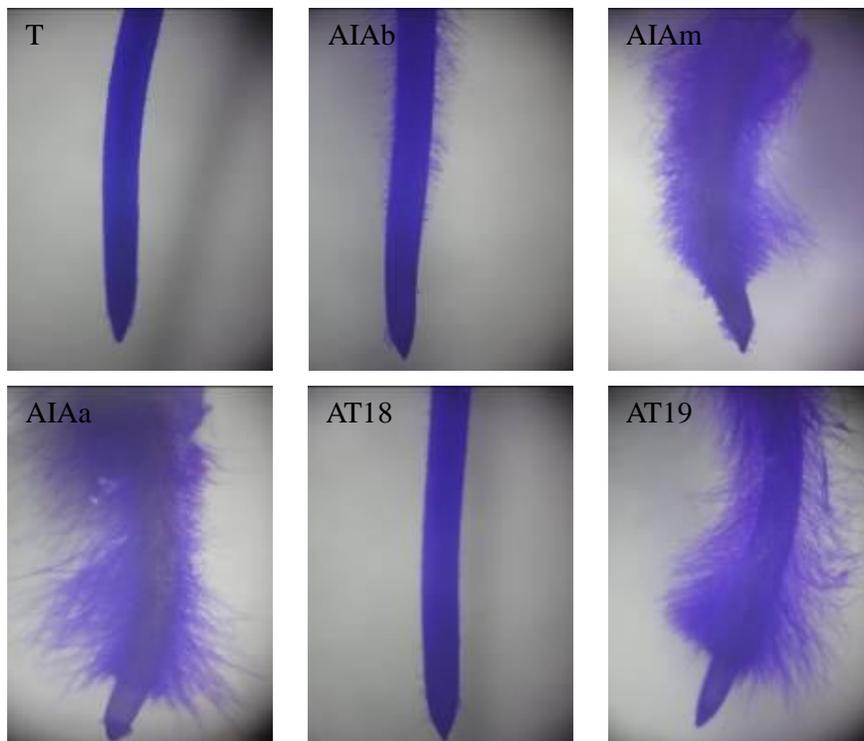


**Figura 19.** Plántulas de trigo a las 24 h del tratamiento con cultivos completos (C) o sobrenadantes (S) de las cepas AT19, AT18 y AT25 o con soluciones de  $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb),  $14 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAm) y  $26 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAa).

Tanto la aplicación de las soluciones de AIA así como del sobrenadante de la cepa AT 19 tuvieron un marcado efecto sobre la morfología de las raíces de las plántulas de trigo de 4 días (Figuras 20 y 21) comparado con las plantas testigo. Las soluciones de AIAm, AIAa y el sobrenadante de la cepa AT19 redujeron notablemente el largo de la raíz y estimularon la formación de pelos radicales. La solución de AIAb redujo levemente la longitud radical respecto del testigo y del sobrenadante de la cepa AT18. El desarrollo de los pelos radicales no se vio afectado por la solución de AIAb ni por la cepa AT18.



**Figura 20.** Plántulas de trigo de 4 días tratadas con soluciones de  $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb),  $14 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAb) y  $26 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (AIAa) y con sobrenadantes del cultivo de las cepas AT18 y AT19. Las raíces tiñieron con una solución de cristal violeta.



**Figura 21.** Raíces de plántulas de trigo de 4 días tratadas con soluciones de  $2 \mu.\text{ml}^{-1}$  (AIAb),  $14 \mu.\text{ml}^{-1}$  (AIAb) y  $26 \mu.\text{ml}^{-1}$  (AIAa) y con sobrenadantes del cultivo de las cepas AT18 y AT19. Las raíces tñieron con una solución de cristal violeta.

## DISCUSIÓN

---

La aplicación de AIA comercial logró simular el incremento en el número de raíces seminales producido por las cepas AT19 y AT25, permitiendo confirmar que el AIA producido por *Azotobacter* sería el principal mecanismo involucrado en la estimulación del desarrollo de raíces seminales de plántulas de trigo, tal como lo sugerían los resultados del capítulo anterior. De manera similar, la adición de concentraciones AIA en el medio de germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* incrementó el número de raíces basales luego de 4 días (Remans *et al.* 2008). Por otra parte, la mayor estimulación del crecimiento aéreo por parte de la cepa AT18, baja productora de auxinas, sugiere que es otro el mecanismo que participa en la generación de esta respuesta. El efecto observado podría deberse a la mayor concentración de GA<sub>3</sub> que produce esta bacteria. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la cepa AT19, la cual produjo la mitad de GA<sub>3</sub> comparada con las cepas AT18 y AT25, incrementó en menor proporción el peso seco y la longitud del tallo. Además, el GA<sub>3</sub> producido por AT18 podría también ser responsable de la estimulación de la longitud radical generada por la inoculación con dicha cepa. El crecimiento de la raíz primaria también se ve influenciado fuertemente por las giberelinas. Plantas mutantes de *Pisum sativum*, deficientes en la producción de ácido giberélico, tuvieron raíces más cortas respecto al fenotipo salvaje (Yaxley *et al.* 2001). Se ha demostrado además que la adición de GA<sub>3</sub> en un amplio rango de concentraciones a raíces intactas de *Vicia* y *Lepidium* estimuló la elongación de la raíz primaria (El-Antably and Larsen, 1974).

Si bien se conoce que concentraciones bajas de auxinas estimulan la elongación radical (Patten y Glick 2002, Dodd *et al.* 2010), la concentración de AIA presente en el sobrenadante de la cepa de baja producción así como en la solución de menor concentración de AIA sería aún demasiado alta como para estimular la elongación de la raíz de las plántulas de trigo de nuestro estudio.

Los resultados de este capítulo sobre la necesidad de la presencia o no de la bacteria para promover el crecimiento de trigo coinciden con lo postulado por Cassán *et al.* (2009), quienes sugieren que la estimulación del crecimiento por parte de *Azospirillum* sp. y *Bradyrhizobium* sp. en los estadíos tempranos en soja y maíz se debería a la presencia de reguladores del crecimiento en el caldo de cultivo y que no dependería de la presencia de la bacteria en lo que se define como el efecto fitohormonal de la inoculación. También El-Khawas y Adachi (1999) reportaron incrementos significativos en la longitud, peso y área de la raíz de plántulas de arroz al aplicar sobrenadantes de cultivos de cepas *A. brasilense* y *K. pneumoniae* productoras de AIA.

Los efectos observados en la morfología radical de las plántulas cuyas semillas fueron tratadas con los sobrenadantes bacterianos pudieron ser reproducidos con la aplicación de soluciones de AIA comercial. Este resultado permitiría asignarle a la producción de auxinas el rol principal en la modificación de la morfología radical de las plantas de trigo; sin embargo, el sobrenadante de la cepa AT18, no redujo la longitud de la raíz como sí lo hizo la solución AIAb, de similar concentración. Por lo tanto otros mecanismos, además de la producción de AIA, estarían implicados en la respuesta observada con esa cepa. Algunos de los mecanismos propuestos fueron discutidos al analizar los resultados del ensayo en bandejas.

Los resultados que obtuvimos concuerdan con los de otros estudios en los que se utilizaron células separadas del caldo bacteriano y resuspendidas en una solución buffer (Dobbelaere *et al.* 1999) o de sobrenadantes libres de células (El-Khawas y Adachi

1999). La inoculación con concentraciones crecientes de células de las cepas *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* sp245 produjo una disminución de la longitud y superficie radical y un aumento en la densidad y longitud de pelos radicales en plántulas de trigo a los 5 días desde la siembra (Dobbelaere *et al.* 1999). Por el contrario, al inocular semillas de trigo con concentraciones crecientes de una mutante *ipdc*, que produce sólo un 10% del AIA de las cepas salvajes, no se redujo la longitud radical, mientras que la densidad y longitud de los pelos radicales aumento levemente (Dobbelaere *et al.* 1999). El-Khawas y Adachi (1999), en un sistema hidropónico, observaron que a medida que se aumentaba la concentración del sobrenadante de cepas de *A. brasilense* y *K. pneuomaniae* productoras de auxinas, se incrementaba el número de raíces laterales y pelos radicales y se reducía la longitud de la raíz de plántulas de arroz a los 21 días desde la siembra.

En el ensayo en bandejas de este capítulo se registraron más efectos de promoción del crecimiento significativos que en el ensayo en bandejas del capítulo 3. En ambos ensayos se observaron incrementos en el peso seco del tallo con las cepas AT18, AT19 y AT25, así como un incremento en la longitud radical con la cepa AT18. La baja reproducibilidad en los experimentos con cepas de PGPR es un hecho frecuente tanto en laboratorio como *a campo* (Brown 1974, Babalola 2010). Harper y Lynch (1979) reportaron que los efectos de estimulación del crecimiento radical de plantas de cebada inoculadas con *A. chrocoocum*, en ensayos en placas de Petri, no se pudieron repetir de manera consistente. La consistencia de los efectos positivos sobre el crecimiento vegetal en sucesivos ensayos es un hecho que debe tenerse en cuenta al momento de seleccionar una cepa para el desarrollo de un inoculante. Así, Kloepper *et al.* (1988) al seleccionar en invernáculo cepas promotoras del crecimiento vegetal pusieron mayor énfasis en la repetición de la respuesta observada que en la magnitud de la misma, repitiendo los ensayos como mínimo 3 veces y con algunas cepas hasta 11 veces. En el mencionado trabajo, sólo las cepas con los resultados más consistentes en invernáculo, fueron posteriormente evaluadas *a campo*.



## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES**

---



El conocimiento y relevamiento de la diversidad microbiana de los suelos es un tema que ha recibido poca atención en nuestro país; sin embargo, no debería ignorarse ya que forma parte del patrimonio nacional y sería una forma de defenderlo y preservarlo. En el mundo desarrollado nos ven como fuente de germoplasma, ellos han degradado sus recursos y los nuestros son muy vastos y diversos. La diversidad nativa de *Azotobacter* sp. es en particular importante debido a su uso actual y futuro como PGPR y como recurso biotecnológico. Como aporte al conocimiento y al potencial uso de esta bacteria, en este trabajo se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización genotípica y fenotípica de cepas de *Azotobacter* de diferentes suelos de la Argentina. En este trabajo pusimos en evidencia la diversidad genotípica de *Azotobacter* que existe en nuestros suelos e identificamos los aislamientos al nivel de especie, a través de metodologías moleculares. En lo que respecta a nuestro conocimiento, es la primera vez que se aíslan *A. salinestris* y *A. armeniacus* de suelos argentinos, siendo *A. armeniacus* una especie con muy baja frecuencia de aparición a nivel internacional.

A pesar de los numerosos estudios que mencionan el aislamiento de *Azotobacter* de diferentes ambientes, nuestro aporte es original ya que son muy pocos los trabajos de caracterización genotípica de aislamientos de este género bacteriano. La antigua caracterización fenotípica puede generar confusiones y llevar a conclusiones erróneas sobre la distribución de *Azotobacter* en los suelos y sobre sus cualidades en relación a la promoción del crecimiento vegetal. En ninguno de los trabajos citados en la bibliografía internacional, en los que se determinó la capacidad de producir sideróforos, solubilizar fosfatos, y producir auxinas de aislamientos clasificados como *Azotobacter* se confirmó la asignación a nivel de género por métodos genotípicos. Por lo tanto, es posible que esa sea una de las razones por la que todas las cepas que evaluamos produjeron sideróforos, mientras que por el contrario en otros trabajos los autores no informaron dicha capacidad en ninguno o en muy pocos de sus aislamientos. Un ejemplo de clasificación errónea, y posteriormente corregida, es la de Cavaglieri *et al.* (2004a, b y 2005a) quienes observaron que aislamientos de suelo clasificados como *A. armeniacus* en función la caracterización microbiológica clásica, tenían una importante acción de biocontrol contra el hongo fitopatógeno *Fusarium verticilloides*; sin embargo, en un trabajo posterior Cavaglieri *et al.* (2005b) informaron que según estudios de secuenciación del gen ribosomal 16S, los aislamientos que anteriormente habían clasificado como *A. armeniacus* pertenecían en realidad a la especie *Microbacterium oleovorans*.

Este trabajo es un aporte original al estudio de los mecanismos responsables de las respuestas observadas en las plantas con la inoculación con *Azotobacter*. Como se planteó anteriormente, existe escaso conocimiento sobre los mecanismos que operan en el género *Azotobacter* responsables de la estimulación del crecimiento de las plantas. En general, los estudios que informan sobre la producción de fitohormonas por parte de *Azotobacter* datan de hace más de diez años, y en los mismos se emplearon metodologías consideradas actualmente como poco precisas. En este trabajo demostramos la capacidad de producir ácido gibérelico, zeatina y ácido 3-indolacético de seis cepas nativa *Azotobacter* con una metodología más precisa y confiable. Además, nunca antes se había determinado la capacidad de producir fitohormonas de cepas de la especie *A. salinestris*, siendo éste otro aporte original del trabajo que aquí presentamos.

Nuestros resultados demuestran la importancia de la producción de AIA por parte de *Azotobacter* para la estimulación del crecimiento temprano de plántulas de trigo. Las cepas que produjeron mayor cantidad de auxinas *in vitro* estimularon en mayor proporción el desarrollo de raíces seminales y pelos radicales respecto a las demás cepas, y esas respuestas pudieron ser reproducidas con la aplicación exógena de

AIA comercial. Sin embargo, en el crecimiento de la parte aérea se observaron efectos positivos que no pudieron ser atribuidos a la producción de auxinas, dado que fueron observados con cepas de baja producción de AIA y no fueron reproducidos por la aplicación de AIA comercial. Por lo tanto, es necesario seguir investigando a qué otros mecanismos pueden atribuirse dichos efectos. Además, demostramos que no se necesita de la presencia de la bacteria para estimular la producción de raíces seminales. Este es un resultado interesante ya que se podría pensar en la utilización biotecnológica de productos comerciales sin la bacteria para estimular el enraizamiento de plantas en esquemas de micropropagación.

En resumen, los resultados obtenidos nos permiten confirmar en gran medida las hipótesis planteadas al demostrar que existe una gran diversidad genética de *Azotobacter* en suelos argentinos, que las cepas nativas evaluadas presentan características que han sido relacionadas con la capacidad de estimular el crecimiento vegetal en otros géneros bacterianos y que la producción de auxinas sería el principal mecanismo de acción de las cepas de *Azotobacter* para estimular el crecimiento temprano de las plántulas de trigo; sin embargo, son necesarios estudios básicos más profundos que permitan relacionar de manera más directa la producción de fitohormonas por parte de *Azotobacter* con las respuestas observadas en las plantas. Para ello sería importante la obtención de mutantes con reducida o atenuada capacidad de producción de fitohormonas, los cuales hasta el momento no están disponibles y cuya obtención excede los objetivos de este trabajo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Ahmad I, Shiekh MY, Ahmad F (2005a) Microbial diversity of rhizospheric soil with special reference to plant growth promoting isolates of *Azotobacter*. *Biosci Biotech Res Asia*. 3(2):51-58
- Ahmad F, Ahmad I, Khan M. (2005b) Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turk J Biol* 29:29-34
- Ahmad F, Ahmad I, Khan, MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173-181
- Alexander B, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12:39-45
- Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S (2009) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Lett Appl Microbiol* 48(5):542-547
- Altschul S, Stephen F, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- Amor Asunción MJ, Cusato M, Saubidet MI (1983) Aislamiento ecológico de *Azotobacter*. *Ciencia e Investigación*. 40:1-12
- Aquilanti L, Favilli F, Clementi F. (2004a). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol Biochem* 36:1475-1483
- Aquilanti L, Mannazzu I, Papa R, Cavalca L, Clementi F (2004b). ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) characterization of *Azotobacteraceae*: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *J Microbiol Meth* 57:197-206
- Azcon R, Barea JM (1975) Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant Soil* 43:609-619
- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32(11):1559-1570
- Baca BE, Elmerich C (2007) Microbial production of plant hormones. En: Elmerich C, Newton WE (eds) *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer, Dordrecht, pp 113-143
- Bahrani A, Pourreza J, Hagh Joo M (2010) Response of Winter Wheat to Co-Inoculation with *Azotobacter* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) under different sources of nitrogen fertilizer. *Amer-Eurasian J Agric Environ Sci* 8(1):95-103
- Barbieri P, Baggio C, Bazzicalupo M, Galli E, Zanetti G, Nuti M (1991) *Azospirillum*-gramineae interaction: effect on indole-3-acetic acid. *Dev. Plant Soil Sci*. 48:161-168
- Barbieri P, Zanelli T, Galli E, Zanetti G (1986) Inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol Lett* 36:87-90
- Barnes RJ, Baxter SJ, Lark RM (2007) Spatial covariation of *Azotobacter* abundance and soil properties: A case study using the wavelet transform. *Soil Biol Biochem* 39(1):295-310
- Bashan Y, de-Bashan LE (2010) How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-A critical assessment. *Adv Agron* 108:77-136
- Becking JH (2006) The family *Azotobacteraceae*. En Dworkin M, Falkow S (eds.) *The*

Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Springer, Nueva York, pp 759-783

- Behl RK, Narula N, Vasudeva M, Sato A, Shinano T, Osaki M (2006) Harnessing wheat genotype x *Azotobacter* strain interactions for sustainable wheat production in semi arid tropics. *Tropics* 15(1):121-133
- Bellenger J-P, Wichard T, Kustka AB, Kraepiel AML (2008) Nitrogen fixing soil bacterium uses catechol siderophores for molybdenum and vanadium acquisition. *Nat Geo Sci* 1:243-246
- Bhatia R, Ruppel S, Narula N (2009) *NifH*-based studies on azotobacterial diversity in cotton soils of India. *Arch Microbiol* 191:807-813
- Biari A, Gholami A, Rahmani HA (2008) Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in Arid region of Iran. *J Boil Sci* 8:1015-1020
- Brown ME, Burlingham SK, Jackson, RM (1962) Studies on *Azotobacter* species in soil. I. Comparison of media and techniques for counting *Azotobacter* in soil. *Plant and Soil* 17:309-319
- Brown ME, Burlingham SK (1968) Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococcum*. *J Gen Microbiol* 53:135-144
- Brown ME (1974) Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathol* 12:181-197
- Cassan F, Perrig D, Sgroi V, Masciarelli O, Penna C, Luna V (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol* 45:28-35
- Cavaglieri L, Passone A, Etcheverry (2004a) Screening procedures to select rhizobacteria with biocontrol activity upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Res Microbiol* 155:747-754
- Cavaglieri L, Passone A, Etcheverry M (2004b) Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. *Biol Control* 31:259-267
- Cavaglieri L, Andrés L, Ibáñez M, Etcheverry M (2005a) Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterization and inoculum density. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:179-187
- Cavaglieri L, Orlando J, Etcheverry M (2005b) *In vitro* influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production: effect of seeds treatment on maize root colonization. *Lett Appl Microbiol* 41:390-396
- Celis Bautista LX, Gallardo IR (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y giberelinas) en cultivos microbianos. Disertación, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá
- Chenoll E, Macián MC, Aznar R (2003) Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Syst Appl Microbiol* 26:546-556
- Clegg CD (2006) Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grassland on the microbial community composition of soils. *Appl Soil Ecol* 31: 73-86
- Collavino M M, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM (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
- Colwell RR (1997) Microbial diversity: the importance of exploration and Conservation. *J Ind Microbiol Biotech* 18:302-307

- Correa OS, Berti MF, Montecchia MS y Villalba Villasboa DE (2008) Uso de *Azotobacter chroococcum* como inoculante en soja. XXI Congreso argentino de la ciencia del suelo. 13 al 16 de mayo de 2008. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.
- Crowles DE (2006) Chapter 8: Microbial Siderophores in The Plant Rhizosphere. En: Barton L y Abadía J (eds.) Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Springer, Netherlands, pp 169-198
- Dalton D, Kramer S (2006) Nitrogen-Fixing Bacteria In Non-Legumess. En Gnanamanickam S (ed) Plant-Associated Bacteria. Springer, Netherlands, pp.105-130
- Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, Duncan LC (2001) Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biol Biochem* 33:1143-1153
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2010) InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz-Zorita M, Fernández-Canigia M V (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur J Soil Biol* 45:3-11
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Vande Broek A, Vanderleyden J (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212:155-164.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:107-149
- Döbereiner JV, Baldani LD, Baldani JL (1995) Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas. MAARA-EMBRAPA-CNPAB, Brasilia, Brazil.
- Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova WI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann Appl Biol* 157:361-380
- Doetsch N (1981) Determinative methods of light microscopy. En: Manual of Methods for General Microbiology. Gerhardt P (ed), American Society of Microbiology, Washington, pp 21-33
- El-Antably HMM, Larsen P (1974) Distribution of gibberellins and abscisic acid in geotropically stimulated *Vicia faba* roots. *Physiol Plant* 32:322-329
- El-Khawas H, Adachi K (1999) Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol Fertil Soils* 28:377-381
- Fekete FA, Lanzi RA, Beaulieu JB, Longcope DC, Sulya AW, Hayes RN, Mabbott GA (1989) Isolation and preliminary characterization of hydroxamic acids formed by nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* B-8. *Appl Environ Microbiol* 55:298-305
- Franchini JC, Crispino CC, Souza RA, Torres E, Hungria M (2007) Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. *Soil Tillage Res* 92 (1-2):18-29
- Fuentes-Ramírez LE, Caballero- Mellado J (2005) Bacterial biofertilizers. En Siddiqui ZA (ed.). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Netherlands, pp.143-172
- Fuller WH, Hanks K (1982) Distribution of *Azotobacter* in arid soils. *Plant Soil*. 64: 355-361
- García-González MM, Farías-Rodríguez R, Peña-Cabriales JJ, Sánchez-Yáñez JM

- (2005) Inoculación del Trigo var. Pavón con *Azospirillum spp* y *Azotobacter beijerinckii*. Terra Latinoam 23:65-72
- García-Tabares T, Herraiz-Tomico T, Amat-Guerri F, Bilbao JLG (1987) Production of 3-indoleacetic acid and 3-indolelactic acid in *Azotobacter vinelandii* cultures supplemented with tryptophan. Appl Microbiol Biotechnol 25:502-506
- Ghida-Daza C (2010) Análisis económico del cultivo de trigo <http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/economia/ectrigo10.pdf>. Consultado noviembre de 2010
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free living bacteria. Can J Microbiol 41:109-114
- Glickmann E, Dessaux Y (1995) A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. Appl Environ Microbiol 61(2):793-796
- González-López J, Salmerón V, Martínez-Toledo MV, Ballesteros F, y Ramos-Cormenzana A (1986) Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically defined media and dialysed soil media. Soil Biol Biochem 18:119-120
- Gustafson P, Raskina O, Ma X, Nevo E (2009) Wheat Evolution, Domestication, and Improvement. En: Carver B F (ed) Wheat Science and Trade. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 5-30
- Halversen WV, Hoge WG (1941) The *Azotobacter* Plaque Test as Applied to the Determination of Phosphate Deficiency in Idaho Soils. Agron J 34 (6): 503-512
- Häne BG, Jäger K, Drexler H. (1993) The Pearson product moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. Electrophoresis. 14: 967-972
- Harper HT, Lynch JM (1979) Effects of *Azotobacter chroococcum* on barley seed germination and seedling development. J Gen Microbiol 112:45-51
- Haynes RJ, Graham MH (2005) Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods. Appl Soil Ecol 29(2):155-164
- Heyndrickx M, Vauterin L, Vandamme P, Kersters K, De Vos P (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. J Microbiol Methods 26:247-259.
- Hoagland, DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347:1-32.
- Höfte M y Bakker P (2007) Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. En Varma A, Chincholkar SB (eds) Soil Biology, Volume 12, Microbial Siderophores. Springer-Verlag, Berlin, pp 121-133
- Hussain A, Arshad M, Hussain A, Hussain F (1987) Response of maize (*Zea mays*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. Biol Fertil Soil 4:73-77
- Idris EE, Iglesias EJ, Talon M, Borriss R (2007) Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Mol Plant Microbe Interact 20:619-626
- Jackson RM, Brown ME, Burlingham SK (1964) Similar effects on tomato Plants of *Azotobacter* inoculation and application of gibberellins. Nature 203:851-852
- Jensen, H L (1965) Non-symbiotic nitrogen fixation. En Bartholomew WV, Clark FE (ed.) Soil nitrogen, Monograph 10. American Society of Agronomy, Wisconsin, pp 436-480

- Jones D II(1932) The soil plaque *Azotobacter* test for soil deficiency. Scientific Agr 12:716-726
- Joseph B, Ranjan Patra R, Lawrence R (2007) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.) Int J Plant Prod 2:141-152
- Joshi P, Juwarkar AA (2009) *In-vivo* studies to Elucidate the Role of Extracellular Polymeric Substances from *Azotobacter* in immobilization of heavy metals. Environ Sci Technol 43(15):5884-5889
- Kannaiyan S, Govindarajan K, Lewin HD (1980) Effect of foliar spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. Plant Soil 56:487-490
- Karthikeyan B, Jaleel CA, Gopi R, Deiveekasundaram M (2007) Alterations in seedling vigour and antioxidant enzyme activities in *Catharanthus roseus* under seed priming with native diazotrophs. J Zhejiang Univ Sci B 8:453-457
- Kaymak, H (2010) Potential of PGPR in Agricultural Innovations. En: Maheshwari DK (ed) Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs Vol 18 Springer, Berlin, pp 45-79
- Kennedy C, Rudnick P, MacDonald M, Melton T (2005) Genus III: *Azotobacter*. En: Garrity GM (ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. Vol. Two. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. Springer, New York, pp 384-402
- Kennedy IR, Tchan YT (1992) Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. Plant Soil 141:93-118
- Kennedy IR, Islam N (2001) The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: A review. Aust J Exp 41:447-457
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? [Soil Biol Biochem 36:1229-1244](#)
- Khalid M, Zahir ZA, Waseem A, Arshad M (1999) *Azotobacter* and L-tryptophan application for improving wheat yield. Pak J Biol Sci 2:739-742
- Khan MS, Zaidi S (2007) Synergistic Effects of the Inoculation with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus on the Performance of Wheat. Turk J Agric For 31:355-362
- Khanafari A, Sepahi AA, Mogharab M (2006) Production and recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from whey degradation by *Azotobacter*. Iranian J Environ Healt Sci Eng 3 (3):193-198
- Khanafari A, Sepahei A (2007) Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. Int J Environ Sci Tech 4(4):427-32
- Kizilkaya R (2008) Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecol Eng 33:150-156
- Kizilkaya R (2009) Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. J Environ Biol 30: 73-82
- Kloepper JW, Schroth NM, Miller TD (1980) Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70:1078-1082
- Kloepper JW, Hume DJ, Scher FM, Singleton C, Tipping B, Aliberte MI, Frauley K, Kutchaw T, Simonson C, Lifshitz R, ZaleskaI, Lee L (1988) Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). Plant Dis 72:42-46

- Kole MM, Altosaar I (1988) Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. *Can J Microbiol* 34:815-817
- Kraepiel AML, Bellenger J-P, Wichard T, Morel FMM (2009) Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *Biometals* 22(4):573-81.
- Kumar V, Narula N (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol Fertil Soils* 28:301-305
- Kurdish IK, Bega ZT, Gordienko AS, Dyrenko DI (2008) The effect of *Azotobacter vinelandii* on plant seed germination and adhesion of these bacteria to cucumber roots *Appl Biochem Microbiol* 44 (4):400-404
- Lifshitz R, Kloepper JW, Kozlowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM, Zalesca I (1987) Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can J Microbiol* 33:390-395
- Loper JE, Schroth MN (1986) Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76:386-389
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol* 60:2286-2295
- Lü C, Huang B (2010) Isolation and characterization of *Azotobacteria* from pine rhizosphere *Afr J Microbiol Res* 4(12):1299-1306
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-556
- Lupski JR, Weinstock GM (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 174:4525-4529
- Nannipieri P, Badalucco L. (2003) Biological processes. En: Benbi DK, Nieder R(Eds), *Handbook of Processes and Modelling in the Soil-Plant System*. Haworth Press, Binghamton, New York, pp. 57-82.
- MAGyP (2010) Informe semanal al 9/12/10. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación. [http://www.sia.gov.ar/estimaciones\\_agricolas/01-semanal/archivo/100000\\_2010/001200\\_Diciembre/101209%20Informe%20semanal%20al%2009-Dic-10.pdf](http://www.sia.gov.ar/estimaciones_agricolas/01-semanal/archivo/100000_2010/001200_Diciembre/101209%20Informe%20semanal%20al%2009-Dic-10.pdf). Consultado en diciembre de 2010
- Manske GGB, Vlek PLG (2002) Root architecture – wheat as a model plant. En: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant Roots: The Hidden Half*, 3<sup>era</sup> edn. Marcel Dekker, New York, pp 249-259
- Martinez-Toledo MV, J. Gonzalez-Lopez J, de la Rubia T, Moreno J, Ramos-Cormenzana A (1988) Grain yield response of *Zea mays* (hybrid AE 703) to *Azotobacter chroococcum* H23. *Biol Fertil Soils* 6:352-353
- Martinez-Toledo MV, Moreno J, De la Rubia T, González López J (1988) Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil* 110:149-152
- Martyniuk S, Martyniuk M (2003) Occurrence of *Azotobacter* Spp. in Some Polish Soils. *Pol J Environ Stud* 12( 3):371-374
- Miles AA, Misra SA (1938) The estimation of the bactericidal power of blood. *J Hyg* 38:732-737
- Miralles DJ, González FG (2009) El trigo en Argentina: Perspectivas ecofisiológicas del pasado, presente y futuro para aumentar el rendimiento. [http://agro.faua.info/files/miralles\\_aapresid.pdf](http://agro.faua.info/files/miralles_aapresid.pdf). Consultado en noviembre de 2010

- Mishustin EN (1970) The importance of non-symbiotic nitrogen fixing micro-organisms in agriculture. *Plant Soil* 32:545-554
- Mrkovacki N, Milic Y (2001) Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Ann Microbiol* 51:145-158.
- Narula N, Kumar V, Behl RK, Deubel A, Gransee A, Merbach W (2000) Effect of Psolubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. *J Plant Nutr Soil Sci* 163:393-398
- Narula N, Remus R, Deubel A, Granse A, Dudeja SS, Behl RK, Merbach W (2007) Comparison of the effectiveness of wheat roots colonization by *Azotobacter chroococcum* and *Pantoea agglomerans* using serological techniques. *Plant Soil Environ* 53:167-176
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170:265-270
- Nieto KF, Frankenberger WTJr (1989) Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Soil Biol Biochem* 21:967-972
- Nieto KF, Frankenberger, WTJr (1990) Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the growth of *Raphanus sativus* (radish). *Plant and Soil* 127:147-156
- Nieto KF, Frankenberger WT (1991) Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the vegetative growth of *Zea mays*. *Plant Soil* 135:213-221.
- Oda Y, Wanders W, Huisman LA, Meijer WG, Gottschal JC, Forney LJ (2002) Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol* 68:3467-3477
- Okon Y, Kapulnik Y (1986) Development and function of *Azospirillum*-Inoculated roots. *Plant Soil* 90:3-16
- Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodriguez L, Lopez-Bucio J (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4:701-712
- Page WJ (1987) Iron-dependent production of hydroxamate by sodium-dependent *Azotobacter chroococucum*. *Appl Environ Microbiol* 53:1418-1424
- Page WJ, von Tigerstrom M (1988) Aminochelin, a catecholamine siderophore produced by *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 134:453-460
- Page WJ, Shivprasad S (1991) *Azotobacter salinestris* sp. nov., asodium-dependent, microaerophilic, and aeroadaptive nitrogen-fxing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 41:369-376
- Pandey A, Sharma ES, Palni LM (1998) Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biol Biochem* 30: 379-384.
- Patten CL, Glick BR (2002) The role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Appl Environ Microb* 68:3795-3801
- Peretti A (1994) Manual para Análisis de Semillas. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection *J Microbiol Methods* 70(1):127-131
- Perrig D, Boiero L, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V (2007) Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Appl*

Microbiol Biotechnol 75:1143-1150

- Perticari A, Puente ML, García JE (2010) Consideraciones finales. En: Puente ML, García JE, Perticari A (eds) Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz. INTA, CABA, pp 77-81
- Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17:362-370
- Pinton, R., Z. Varanini, and P. Nannipieri. 2000. *The Rhizosphere*. Marcel Dekker, New York.
- Plassé C (2007) Molecular and phenotypic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) for winter hardiness. Disertación, Zurich
- Pochon J (1954) Manuel technique d'analyse microbiologique du sol, Masson, Paris.
- Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:665-677
- Rai SN, Gaur AC (1988) Characterization of *Azotobacter* spp. and effect of *Azotobacter* and *Azospirillum* as inoculant on the yield and N-uptake of wheat crop. *Plant Soil* 109: 131-134
- Remans R, Beebe S, Blair M, Manrique G, Tovar E, Rao I, Croonenborghs A, Torres-Gutierrez R, El-Howeity M, Michiels J, Vanderleyden J (2008) Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 302:149-161
- Ribas A, Torres D, Penna C, Luna V, Cassán FD (2009) Inoculación de semillas de trigo, maíz y soja concultivos en fase exponencial o estacionaria de *a. brasilense* az39 y su relación con la producción de fitohormonas y la promoción del crecimiento vegetal. Reunión Nacional de Biología de Suelos y Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno, Tucumán. Libro de Resúmenes, pp 91-106
- Ribaudó C, Krumpholz E, Cassán F, Bottini R, Cantore M, Curá A (2006) *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J Plant Growth Regul* 24:175-185
- Rodelas B, González-López J, Pozo C, Salmerón, V, Martínez-Toledo, MV (1999) Response of faba bean (*Vicia faba* L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae. *Appl Soil Ecol* 12:51-59
- Rodicio M, Mendoza MC (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22:238-245
- Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2007) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. En: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velazquez-Perez E, Rodriguez-Barrueco C (eds) Series: Developments in Plant and Soil Sciences, Vol. 102. Springer, Dordrecht, pp. 15-21
- Rosas S y Schroder E (1992) Informe UNESCO. Short Time Fellowships in Biotechnology
- Rovira AD (1963) Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free living nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato, and wheat. *Plant Soil* 19:304-14
- Rovira AD (1965) Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Ann Rev Microbiol* 19:241-266

- Salantur A, Ozturk A, Akten S (2006) Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environ* 52(3):111–118
- Sanguineti MC, Li S, Maccaferri M, Corneti S, Rotondo F, Chiari T, Tuberosa R (2007) Dissection of genetic variability for root architecture in elite durum wheat germplasm. *Ann Appl Biol* 151:291-305
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47-56
- Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvag H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez JA, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Maerk M, Miller NM, Norton S, O'Carroll IP, Paulsen I, Raulfs EC, Roemer R. et al. (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 191(14):4534-4545
- Shabaev VP, Smolin VY, Strekozova VI (1991) The effect of *Azospirillum brasilense* Sp. 7 and *Azotobacter chroococcum* on nitrogen - balance in soil under cropping with oats (*Avena sativa* L.). *Biol Fert Soils* 10:290-292
- Singh R, Behl RK, Singh KP, Jain P, Narula N (2004) Performance and gene effects for wheat yield under inoculation of arbuscular mycorrhiza fungi and *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil Environ* 50:409-415
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Socolofsky MD, Wyss O (1961) Cysts of *Azotobacter*. *J Bacteriol* 81:946-954
- Somova LA, Pechurkin NS, Sarangova AB, Pisman TI (2001) Effect of bacterial population density on germination wheat seeds and dynamics of simple artificial ecosystems. *Adv Space Res* 27(9):1611-1615
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism–plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425-448
- Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J (2008) Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312:15:23.
- Taller BJ, Wong TY (1989) Cytokinins in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol* 55:266-267
- Tejera N, Lluch C, Martínez-Toledo MV, González-López J (2005) Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant Soil* 270(1-2):223-232
- Thavasi R, Subramanyam Nambaru VRM, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, Banat IM (2009) Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. *Mar Biotechnol* 11:551-556
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882
- Thompson JP, Skerman VBD (1979) *Azotobacteraceae*: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria. Academic Press, Inc., London.
- Vande Broek A, Gysegom P, Ona O, Hendrickx N, Prinsen E, Van Impe J, Vanderleyden J (2005) Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:311-323
- Verma JP, Janardan Y, Tiwari KN, Lavakush, Singh V (2010) Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *Int J Agr Res* 5(11):954-983.

- Verna LC (1945) Técnicas generales y experimentación bacteriológica. El Ateneo, Buenos Aires, pp 293-303
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JS. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl Acids Res, 24:6823-6831
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Meth Mol Cell Biol 5: 25-40
- Vidal de Latina MC, Jaime MA y Clúa A (2009) Bacterias fijadoras libres de nitrógeno atmosférico en raíz de *Nerium Oleander*, L., laurel de jardín en Tucumán-Argentina. Reunión Nacional de Biología de Suelos y Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno, Tucumán, Libro de Resúmenes, pp 4-7
- Wichard T, Bellenger JB, Morel, FMM, Kraepiel AML (2009) Role of the siderophore azotobactin in the bacterial acquisition of nitrogenase metal cofactors. Environ Sci Technol 43:7218-7224
- Xie H, Pasternak JJ, Glick BR (1996) Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. Curr Microbiol 32:67-71
- Yasari E, Patwardhan AM (2007) Effects of (*Azotobacter* and *Azospirillum*) inoculants and chemical fertilizers on growth and productivity of canola (*Brassica napus* L.). Asian J Plant Sci 6(1):77-82
- Yaxley JR, Ross JJ, Sherriff LJ, Reid JB (2001) Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. Plant Physiol 125:627-633
- Young JPW, Downer HL, Eardly BD (1991) Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. J Bacteriol 173: 2271-2277
- Zahir ZA, Asghar HN, Akhtar MJ, Arshad M (2005) Precursor (L-tryptophan)-inoculum (*Azotobacter*) interaction for improving yields and nitrogen uptake of maize. J Plant Nutr 28:805-817
- Zambre MA, Konde BK, Sonar KR (1984) Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. Plant Soil 79:61-67
- Zhao Y (2010) Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. Annu Rev Plant Biol 61:49-64
- Ziemiacka J (1932) The *Azotobacter* test of soil fertility applied to the classical fields at Rothamsted. J Agric Sci 22: 797-810

## APÉNDICE

---



## **1. Metodología LC-MS para determinación de fithormonas.**

Las muestras (10 ml) fueron suplementadas con 10 ng de cada uno de los estándares internos de cada hormona (AIA y GA<sub>3</sub>) y se dejaron estabilizar por 30 minutos en heladera. Luego se procedió a particionar por duplicado los sobrenadantes acidificados y tratados exógenamente con estándares con igual volumen de acetato de etilo (10 ml). Se colectaron las fracciones orgánicas en balones y se evaporaron a sequedad total en evaporador rotatorio orbital a 35° C. Las muestras se resuspendieron en un volumen final de 1.5 ml de metanol puro, se filtraron (0,22 µm), se recolectaron en tubos plásticos tipo eppendorff y evaporaron por completo en sistema de vacío y a temperatura ambiente. Las muestras fueron resuspendidas en 100 µl de metanol puro y se colocaron en viales específicos, conteniendo insertos de 150 µl de capacidad. Finalmente fue inyectado un volumen de 10 µl de cada muestra en un sistema de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tandem (LC-MS MS). El contenido endógeno de cada hormona (AIA y GA<sub>3</sub>) se calculó mediante la aplicación de la ecuación que relaciona el área del pico y el tiempo de retención obtenido por cada compuesto presente en la muestra, con respecto al obtenido para su correspondiente estándar. En el caso de la Z el contenido se calculó mediante la relación del área del pico y el tiempo de retención obtenido para una muestra de la hormona pura, con respecto al obtenido en la muestra procesada.