

Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz

Autores varios



Ediciones

Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Ministerio de
Agricultura, Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación

Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz

PROYECTO INOCULAR PGPM
(PLANT GROWTH PROMOTING MICROORGANISM)

Editores:

Mariana Laura Puente; Julia Elena García y Alejandro Peticari

PROYECTO
inocular





Comisión Científico Técnica del Proyecto Inocular PGPM

Ing. Agr. Graciela Benitende

Área Bioinsumos Microbianos

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CNIA, INTA Castelar.

Ing. Agr. (MSc) Gustavo Ferraris

Área de Desarrollo Rural

INTA EEA Pergamino.

Ing. Agr. Julia García

Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CNIA, INTA Castelar.

Dr. Alicia Godeas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires.

Dr. Edgardo Jofré

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Universidad Nacional de Río Cuarto.

Ing. Agr. Alejandro Peticari

Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CNIA, INTA Castelar.

Ing. Agr. Mariana Puente

Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CNIA, INTA Castelar.

Ing. Agr. Esteban Rubio

Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CNIA, INTA Castelar.

Dr. Claudio Valverde

Programa Interacciones Biológicas, Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes.



Índice de Contenidos

- **6** PRÓLOGO

- **8** **CAPÍTULO 1**
REVISIÓN DEL USO DE *Azospirillum brasilense* COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO EN TRIGO Y MAÍZ EN ARGENTINA.
Puente, Mariana L. y García, Julia E.

- **22** **CAPÍTULO 2**
LAS PSEUDOMONAS: UN GRUPO HETEROGÉNEO CON DIVERSOS MECANISMOS PROMOTORES DEL DESARROLLO VEGETAL.
Valverde, Claudio y Ferraris, Gustavo

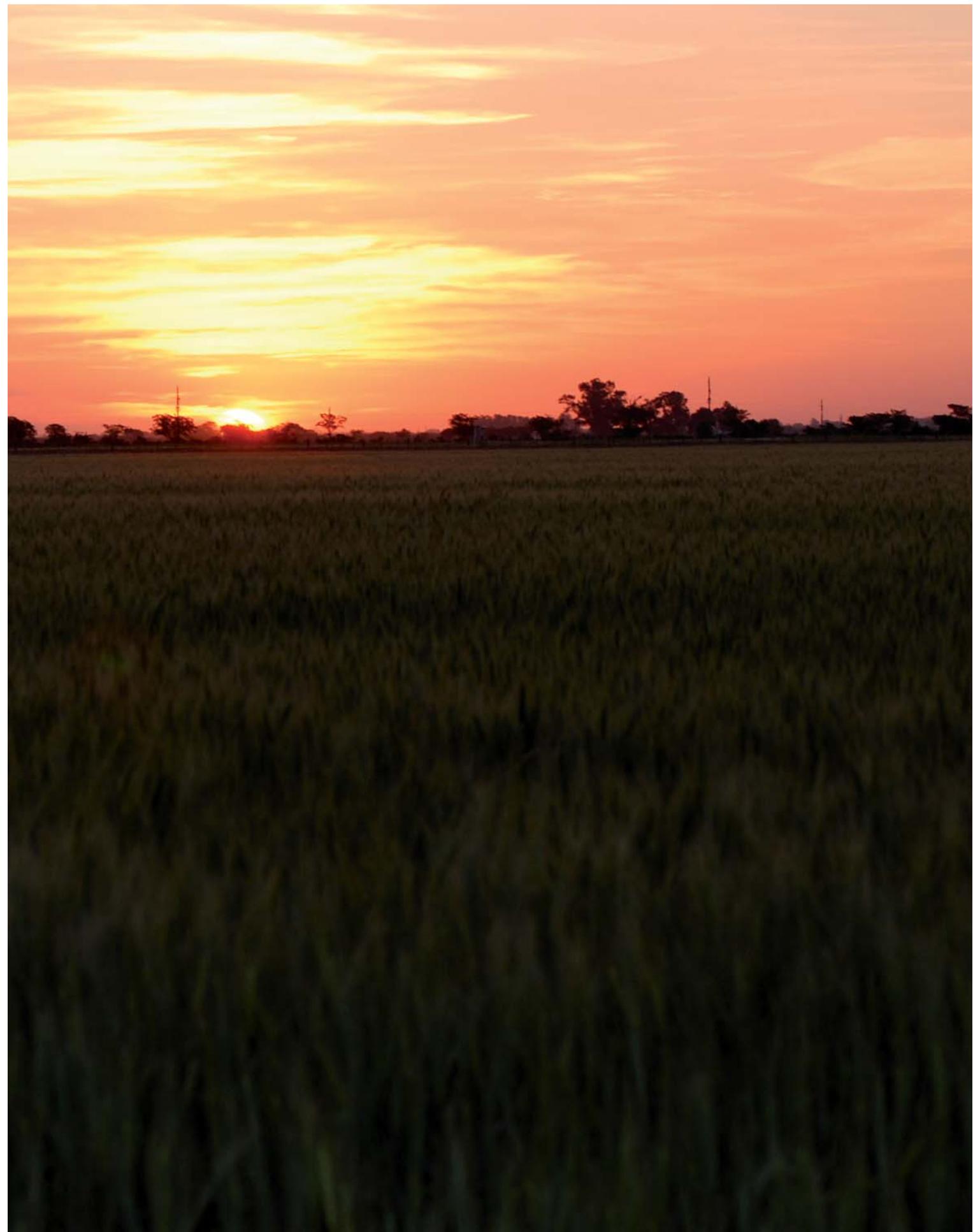
- **44** **CAPÍTULO 3**
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL PERTENECIENTES AL GÉNERO *Bacillus* Y OTROS MUY RELACIONADOS.
Benintende, Graciela B.

- **52** **CAPÍTULO 4**
LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES COMO BIOINOCULANTES.
Godeas, Alicia.

- **60** **CAPÍTULO 5**
EMPLEO DE *Azotobacter* COMO INOCULANTE EN CULTIVOS EXTENSIVOS.
Rubio, Esteban J. y Peticari, Alejandro.

- **66** **CAPÍTULO 6**
EL FUTURO DE LOS INOCULANTES: HACIA EL DESARROLLO DE CONSORCIOS MICROBIANOS PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.
Fischer, Sonia y Jofré, Edgardo.

- **76** **CONSIDERACIONES FINALES**
Peticari, Alejandro; Puente, Mariana L. y García, Julia E.





Prólogo

Si hacemos una revisión de lo ocurrido en los últimos años en el agro podemos observar un marcado crecimiento en la adopción de nuevas tecnologías de producción en busca de reducción de la contaminación ambiental y de los costos de producción en sistemas agropecuarios sustentables. Ante esta necesidad surgen los inoculantes o biofertilizantes como herramientas alternativas de fertilización. La aplicación correcta de estos microorganismos complementa a la fertilización convencional apuntando a una reducción de las dosis de fertilizantes químicos.

El uso de inoculantes en base a microorganismos benéficos denominados PGPM (Plant growth promoting microorganism) tiene como objetivo favorecer el desarrollo de las plantas, aumentando la cantidad de nutrientes asimilables para el cultivo, entre otros procesos. Dentro de los microorganismos PGPM más estudiados podemos citar a *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Micorrizas*.

Sin embargo, hay ciertas pautas que se deben tener en cuenta a la hora de su uso para que los efectos benéficos que estos microorganismos nos aportan puedan ser logrados. Características de su formulación y el adecuado manejo del inoculante en el almacenamiento y aplicación son claves.

Un soporte adecuado es un componente de vital importancia para los inoculantes biológicos de interés comercial. Tanto es así que, a diferencia de lo que ocurre con otros agroquímicos como fertilizantes o plaguicidas, no se puede considerar a un inoculante formulado sobre la base de un microorganismo como un producto "genérico" o un "commodity", sino que es el conjunto indisoluble del microorganismo y el soporte que lo contiene. De este modo, el soporte utilizado es el punto en el que podemos encontrar mayor variación entre inoculantes y, en muchos casos, el aspecto que permite la diferenciación de marcas comerciales, constituyéndose sin duda alguna en un factor de calidad. Una formulación apropiada debe ser estéril, libre de todo contaminante e inocua para el microorganismo y el ser humano que lo va a manipular. Debe proteger a la bacteria, especialmente cuando es expuesta a situaciones adversas como las altas temperaturas.

En cuanto a sus características físicas, debería ser fácil de aplicar y dosificar, adherirse de manera apropiada a las semillas, evitando aglomeraciones en el fondo del cajón sembrador para no obstruir el pasaje de la semilla. Es importante que modifique en el menor grado posible la fluidez de la semilla a través del dosificador, para no provocar cambios sustanciales en la densidad de siembra.

El objetivo de esta publicación es revisar las principales características de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Micorrizas*, dar a conocer los beneficios obtenidos cuando son utilizados a campo y las consideraciones a tener en cuenta al momento de trabajar con estos microorganismos.

Mariana Puente; Julia García y Gustavo Ferraris





Capítulo 1

REVISIÓN DEL USO DE *Azospirillum brasilense* COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO EN TRIGO Y MAÍZ EN ARGENTINA.

Puente, Mariana Laura y García, Julia Elena.

Ingenieras Agrónomas. Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), IMYZA, CNIA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina. Los Reseros y Las Cabañas s/n (1712), Castelar.

e-mail: mpuente@cnia.inta.gov.ar

Dedicamos este capítulo a los Ing. Agr. Silder Barrios y Enrique Rodríguez Cáceres quienes, durante la década de los ochenta en el ex Instituto de Microbiología Agrícola del INTA, lideraron el grupo de trabajo dedicado al estudio de diazótrofos en gramíneas. Estos investigadores efectuaron aislamientos de *Azospirillum* en las diferentes zonas del país. La caracterización bacteriológica de dichos aislamientos proporcionó la identificación de 35 cepas. Con éstas y otras incorporadas desde instituciones extranjeras se formó la colección perteneciente al INTA IMYZA hallándose cepas tanto de la especie *A. brasilense* como de *A. lipoferum*. Simultáneamente Rodríguez Cáceres (1982) desarrolló un método con rojo Congo como colorante diferencial que facilitó el reconocimiento para aislar colonias de *Azospirillum* (figura 1).

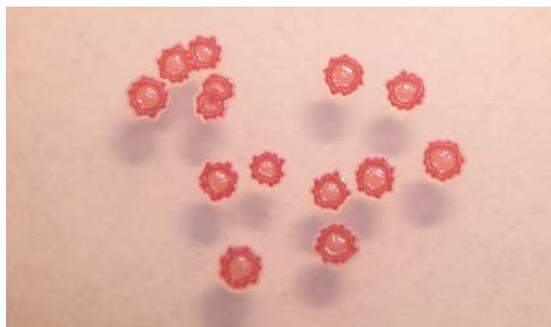


Figura 1. Colonia de *A. brasilense* Az39 en caja de petri con medio RC.

INTRODUCCION

El género *Azospirillum* está conformado por bacterias diazotróficas de vida libre con capacidad de colonizar los tejidos internos y externos de las raíces (Bashan and Levanony, 1990). Este es uno de los géneros más estudiados por su capacidad de mejorar el crecimiento y desarrollo así como el rendimiento de numerosas especies cultivables (Dardanelli et al., 2008). Presenta una amplia distribución

geográfica alrededor del mundo y ha sido aislada de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas y de su rizósfera, incluyendo cereales, pastos forrajeros, cactáceas, etc. (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). Tarrand et al. (1978), fueron los primeros que describieron el género *Azospirillum* con dos especies, *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Actualmente, el género está compuesto por



diez especies que incluyen: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), *A. halopraeferans* (Reinhold et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989), *A. largimobile* (Ben Dekhil et al., 1997), *A. doebereineriae* (Eckert et al., 2001), *A. oryzae* (Xie and Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng et al., 2006) y *A. canadense* (Mehnaz et al., 2007a), y recientemente, se propusieron tres especies más *A. zea* sp. nov. (Mehnaz et al., 2007b), *A. rugosum* sp. nov. (Young et al., 2008) y *A. picis* sp. nov. (Lin et al., 2009).

Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar esta promoción está relacionado con la capacidad de *Azospirillum* de producir o metabolizar compuesto del tipo fitohormonas (Okon y Labandera, 1994). Estos compuestos son las auxinas, especialmente el ácido indol acético (AIA), giberelinas (GAs), citocinas (CA), etileno (E) (Bottini, et al., 1989; Iosipenko and Ignatov, 1995; Patten and Glick, 1996; Rademacher, 1994; Strzelczyk et al., 1994; Perrig et al., 2007) así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico como el ácido abscísico (ABA) (Perrig et al., 2007) y la diaminocadaverina (CAD) (Cassán et al., 2003).

RESPUESTAS AGRONÓMICAS OBTENIDAS A CAMPO

Desde el comienzo del estudio de *Azospirillum* se han realizado numerosas revisiones en donde se contemplaron trabajos de investigación que evaluaron el efecto promotor del *Azospirillum* en ensayos a campo sobre numerosos cultivos de interés agronómico en diferentes partes del mundo. La presente revisión resume los resultados de los ensayos de inoculación con *A. brasilense* realizados desde la campaña 89/90 hasta 07/08 en el cultivo de trigo y maíz abarcando diferentes condiciones agroclimáticas e incluyendo tanto las principa-

les zonas núcleo como zonas productivas de importancia secundaria de la Argentina.

Ensayos a campo en el cultivo de trigo

Okon y Labandera (1994), resumieron los resultados de 20 años de ensayos en diferentes países y reportaron que la respuesta sobre el rendimiento debido a la inoculación con *Azospirillum* fue positiva en el 60-70% de los casos en un rango de incremento entre el 5-30%. Particularmente para la Argentina las respuestas reportadas en el cultivo de trigo y maíz fueron variables (Tabla I).

Cabe destacar que en el momento de realizarse esta revisión en Argentina aún no se había desarrollado un inoculante comercial líquido y estable en el tiempo, y aún se estaba evaluando la cepa más eficiente.

En el año 2003 Rodríguez Cáceres y Di Ciocco realizaron una revisión de ensayos a campo en el cultivo de trigo. Del total de los ensayos revisados, aproximadamente un 75% presentaron respuestas positivas a la inoculación. Similar al reportado por Okon y Labandera (1994), el rango de incremento en los rendimientos atribuidos a la inoculación con *Azospirillum* fue de 3-30%. Los autores observaron que hubo respuesta a la inoculación en los ensayos realizados en ambientes que presentaron limitaciones hídricas o de fertilidad (Tabla II).

El ensayo realizado por Puente et al. (2005 a) durante la campaña 01/02 fue llevado a cabo en Castelar sobre un suelo que corresponde a un Argiudol con fertilidad moderada. Previo a la siembra todos los tratamientos, tanto los no inoculados como los inoculados, fueron fertilizados con nitrógeno (N) y fósforo (P). La variedad utilizada fue Baguette 10. En el mismo se obtuvo un incremento de rendimiento del 20% cuando se inoculó con *A. brasilense* Az39 con una concentración de $1 \cdot 10^7$ UFC semilla⁻¹. Se

Tabla I. Ensayos a campo en el cultivo de maíz y trigo en la República Argentina revisados por Okon y Labandera, 1994.

Cultivo	Localidad	Incremento en rinde (%)	Cepa-Inoculante	Año	Fuente
Trigo (cv Marcos Juarez INTA)	Castelar (Buenos Aires)	33%		1986	Barrios et al., 1986
Trigo (Cochicó INTA, Pro INTA Pigüe, Buck Poncho)	Región Semiárida	Suelos no fertilizados: 13-30% con Az39 En suelos fertilizados sin respuesta Cepa Sp245 sin respuesta	Az39, Cd, Sp 245 Inoculante en turba carbón	3 Campañas	Rodríguez Cáceres et al., 1993
Trigo (Buck Manantial)	Viedma (Río Negro)	30-100%	Sp111 Inoculante en turba	1988-1992	G. Pozzo Ardizzi (Comunicación Personal)
Maíz	Tucumán	No fertilizados: 15-25% Fertilizados: 40%		1986-1991	Bellone C. (Comunicación Personal)
Maíz (cv PixF465)	Pergamino (Buenos Aires)	37% con Az5 INTA Sin respuesta significativa con Az3, y A. <i>lipoferum</i> ATCC	Az5 INTA Az3, y A. <i>lipoferum</i> ATCC Inoculante en turba		Barrios et al., 1984
Maíz (6 híbridos)	Daireaux (Buenos Aires)	Según el híbrido las respuestas variaron de 0-10.5%	Cd y A. <i>lipoferum</i> Br-17 Inoculante líquido	1992-1993	Castro Videla G. (Comunicación personal)



Tabla II. Datos de los ensayos realizados en el cultivo de trigo por Rodríguez Cáceres y Di Ciocco, 2003.

Cultivar	Localidad	Incremento en rinde (%)	Cepa-Inoculante	Año	Fuente
Buck Poncho	Necochea	11.6	A. br. Az39 Inoculante en turba	1992-1996	Rodríguez Cáceres E. y Di Ciocco, C.A. 2003. Factores que condicionan la respuesta de trigo a la inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i> Az 39 INTA en la pradera pampeana. Revista de Ciencia y Tecnología N°8. Agosto de 2003. p 9-16.
	Miramar	-16.0			
	C. Casares	3.2			
Prointa Federal	Luján	-2.6		1987	
		-1.87		1988	
Cochicó		13.4		1990	
		24.3		1990	
		20.8		1991	
Prointa Pigüe	Bordenave	15.5		1991	
Cochicó		21.6		1991	
Buck Poncho		33.4	1991		
Prointa Pigüe	Anguil	16.0	1992		
Cochicó			1992		
Cochicó	Gral. Pico	30.0	1992		



determinó que este incremento se produjo debido a un aumento significativo en el número de granos. Además del rendimiento la inoculación incrementó el número de macollos, largo y peso seco radicular medidos a los 4 meses posteriores a la siembra.

Bolleta et al. (2002) probaron el efecto de la inoculación con *A. brasilense* en el cultivo de trigo vr Pro INTA Colibrí en la localidad de Bordanave durante la campaña 02/03. El ensayo se realizó sobre un suelo clasificado como Haplustol éntico con fertilidad química y física bajas. Se evaluó la respuesta de la inoculación con dos niveles de N, 0 y 25 kg·ha⁻¹. El incremento de rendimiento debido a la inoculación fue de 17 y de 14% respectivamente.

En la campaña 04/05 en la localidad de San Antonio de Areco las respuestas en rendimiento obtenidas debido a la inoculación con *A. brasilense* sobre el rendimiento del cultivo de trigo vr. Klein Gavilán fueron promedio de 4% en los tratamientos sin fertilización y de 2% promedio para los tratamientos con fertilización con N y P (Mousegne y Paganinin, 2006). En la campaña siguiente, en la misma localidad, utilizando la variedad Klein Jabalí se obtuvieron respuestas en el rendimiento a la inoculación del 25% en aquellas parcelas que no recibieron fertilización. En cambio, la respuesta a la inoculación obtenida en las parcelas con fosfato monoamónico (PMA) a la siembra fue del orden de 1.3% (Mousegne et al., 2006).

Ferraris y Couretot, (2006a) evaluaron los efectos de la inoculación con *Azospirillum* durante la campaña triguera de 2005/06 en la localidad de Pergamino. Se utilizaron las variedades Prointa Gaucho y Baguette 11 Premium. Se incorporó el factor fertilizante teniendo en cuenta tratamientos sin fertilizar, y otros con los agregado de fosfato monoamónico (PMA; 11-23-0) y N en 2 dosis (90 y 150 kg·ha⁻¹). La inoculación produjo un incremento en el rinde de 7.8% siendo la respuesta a *Azospirillum* estadísticamente significativa (376 kg·ha⁻¹)

independiente de la variedad y la fertilización empleada. Para la misma campaña, estos autores (Ferraris y Couretot, 2006b) evaluaron la respuesta de *Azospirillum* bajo diferentes niveles de fertilidad. Ambos ensayos fueron conducidos sobre un suelo de la serie Pergamino. Se aplicó fósforo en forma de PMA (11-23-0) y N en forma de urea (0-46-0) con una dosis de 125 kg·ha⁻¹. El azufre se aplicó en forma de sulfato de Calcio (0-0-0-18S). A pesar que los tratamientos inoculados presentaron un incremento frente a los testigos estos aumentos no fueron significativos.

Otros autores (Fornasero y Toniutti, 2003) también evaluaron la respuesta de a la inoculación con niveles crecientes de N (0, 20, y 40 kg·ha⁻¹). El ensayo se llevó a cabo en la Localidad de San Justo, provincia de Santa Fe durante la campaña 02/03. La variedad de trigo utilizada fue Don Enrique. Los resultados en este ensayo indican que hubo respuesta a la fertilización pero la inoculación no ejerció efectos sobre el rendimiento.

Montaner et al. (2007) evaluaron los efectos de *A. brasilense* durante la campaña 06/07 en las localidades de Azul con y sin fertilización fosforada. La variedad utilizada fue Klein Tauro. El rendimiento obtenido en las parcelas sin fertilización fue de 7149 kg·ha⁻¹ para los tratamientos inoculados y 5921 kg·ha⁻¹ en las no inoculadas. En el caso de las parcelas fertilizadas con 90 kg·ha⁻¹ de fosfato diamónico (PDA) se obtuvieron 7076 kg·ha⁻¹ en los tratamientos inoculados y 6579 kg·ha⁻¹ para los tratamientos sin inocular. Por lo tanto, la respuesta promedio en rendimiento a la inoculación fue del 20% cuando no se fertilizó y de 7.5% cuando se fertilizó con fósforo.

Díaz Zorita et al. (2008) evaluaron la respuesta de la inoculación con la cepa Az39 de *A. brasilense* entre las campañas 2002-2006 en 297 sitios experimentales de la región pampeana. Los ensayos de esta red fueron manejados según las condiciones de manejo representati-



vas para cada región evaluada, y en la mayoría de los casos se fertilizó con N y P. Los rendimientos variaron entre 850 y 8050 kg·ha⁻¹ y la media de los 297 sitios demostró que las semillas inoculadas con *A. brasilense* tuvieron un incremento en el rendimiento de 260 kg·ha⁻¹. La inoculación incrementó el peso seco radicular y aéreo durante la etapa vegetativa, el número de granos y su peso al momento de la cosecha. En general, se observó una mejor respuesta a la inoculación en sitios subhúmedos, con perfiles profundos, que en sitios semiáridos con suelos superficiales. También observaron que cuando utilizaron cultivares derivados de genotipos europeos los rendimientos eran mayores a los que expresaban los genotipos de origen argentinos o de mexicanos.

Durante la campaña 02/03 Bono et al. (2003), establecieron 3 ensayos localizados en Anguil utilizándose para estos ensayos el cultivar Baguette 10, de los cuales dos sitios presentaron respuesta positiva. En el primer ensayo, el tratamiento con *Azospirillum* sin fertilizar produjo un incremento del 11%, cuando se fertilizó con FDA se produjo un incremento del 8.71% y en el caso de la fertilización con urea+FDA el incremento fue del 5.7%, comparando con sus respectivos testigos. Sin embargo, estos incrementos no llegan a ser significativos. En el segundo ensayo se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos inoculados sin fertilizar del 30% y los inoculados y fertilizados con dosis alta de FDA+urea presentaron un incremento del rinde del 20%.

Ensayos a campo en el cultivo de maíz

García de Salomone et al. (1996), llevaron a cabo experimentos a campo durante las campañas 89/90 y 90/91 probando los efectos del *Azospirillum* spp. (mezcla de 7 cepas) en diversos genotipos de maíz. Se probaron 15 genotipos de maíz (12 argentinos y 3 brasileños) en un suelo Argiudol vértico de la provincia de Buenos Aires (Universidad de Buenos

Aires). En la primera campaña el rinde promedio fue de 19.7%, mientras que en la segunda campaña el incremento fue de 16.5%, ambos datos respecto al testigo sin inocular.

Durante la campaña 99/00, Ventimiglia et al. (2000), realizaron un ensayo en maíz utilizando la cepa de *A. brasilense* Cd. El lote, ubicado en la Localidad de 9 de Julio, fue fertilizado previo a la siembra con N (115 kg·ha⁻¹), pentóxido de fósforo (100 kg·ha⁻¹), potasio (18 kg·ha⁻¹) azufre (18 kg·ha⁻¹) y magnesio (4.6 kg·ha⁻¹), aplicando también N líquido (64 kg·ha⁻¹), y la siembra se realizó con el híbrido DK 696. Los tratamientos inoculados obtuvieron una diferencia con respecto a los testigos de 6.3% (730 kg·ha⁻¹).

Puente et al. (2005b) durante la campaña 04/05, registraron en 23 sitios de la región pampeana, incrementos en los rendimientos debido a la inoculación del 6,5%

La respuesta a la inoculación con *Azospirillum* sobre el rendimiento de maíz (PANAR 6148) obtenida por Funaro y Quiroga (2005) campaña 04/05 en INTA Anguil fue de 4% tanto como para los tratamientos fertilizados con FDA como los no fertilizados. Sin embargo, aquellos tratamientos fertilizados los rendimientos absolutos obtenidos fueron mayores.

Incrementos del rendimiento del 27% fueron obtenidos por Mousegne et al. (2005), en la localidad de San Antonio de Areco cuando se inoculó con *A. brasilense*. El híbrido utilizado fue Albion MG. Todos los tratamientos fueron fertilizados con PMA a la siembra y urea en V6.

En el Valle Medio del Río Chubut, en donde el clima es árido y los suelos son pobres en materia orgánica y nitrógeno, Rimoldi et al. (2001), evaluaron el efecto de la inoculación con *Azospirillum* y la fertilización con NPKS en un cultivo de maíz (SPS 2702). El ensayo se llevó a cabo sobre tierras clasificadas como aptas para la agricultura y bajo riego. Se encontró efecto significativo para la fertiliza-



ción pero no se detectaron efectos positivos para la inoculación con *Azospirillum*.

DETERMINACIÓN DE CALIDAD DEL INOCULANTE

Basándonos en nuestros conocimientos y en el documento de procedimientos de la RED-CAI (Red de control de calidad de inoculantes; 2008, Inédito) las pruebas que deben realizarse para que un inoculante formulado en base a *Azospirillum* spp. pueda ser considerado apto para su utilización son las siguientes:

1) Determinación de pH

Se mide directamente del producto con pehachímetro digital.

2) Ingrediente activo

Se utiliza el Medio de crecimiento selectivo RC (Rodríguez Cáceres, 1982) para bacterias del género *Azospirillum*. Este medio presenta en su formulación rojo Congo como colorante diferencial que permite el fácil reconocimiento de colonias de *Azospirillum*. Para esta determinación se realiza un estriado por agotamiento en la caja de Petri. Una vez sembradas las cajas de Petri se incuban invertidas en una estufa a una temperatura de 35°C durante 4-5 días.

3) Técnica de recuento de azospirilos viables

Se homogeniza la muestra del inoculante a través de agitación manual, se sanitiza el mismo con alcohol 70 %. En flujo laminar y con mechero prendido se extrae 10 mL de inoculante con jeringa y aguja estéril, colocándolo en un erlenmeyer con 90 mL de solución fisiológica estéril. Esta solución también se agita durante 15 minutos en un agitador de golpes.

Se retira el erlenmeyer del agitador, y a esa dilución se la denomina 10⁻¹. Se extrae 1 mL de esta dilución y se coloca en un tubo de

ensayo con 9 mL de solución fisiológica estéril. A esta dilución se la denomina 10⁻², luego se homogeniza esta dilución en un vortex durante 20 segundos. Esta operación se repite hasta llegar a la dilución 10⁻⁷.

Una vez realizadas las diluciones se procede a la siembra de las mismas. La siembra de las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ se realiza por duplicado y por extensión en superficie con espátula de Drygalski en placas de Petri. Se coloca con pipeta automática 100µL de cada dilución en el medio de la caja de Petri y se extiende con la espátula de Drygalski, previamente esterilizada.

El medio utilizado es el Medio RC para determinar la concentración bacteriana a través de unidades formadoras de colonias (UFC). Para la incubación se repite el proceso descrito en el punto 2.

4) Procedimiento para detección de contaminantes

a- Medio Sabouraud: medio utilizado para determinar presencia de hongos contaminantes.

b- Medio Trypticase soya agar: medio utilizado para determinar presencia de contaminantes bacterianos.

Para la realización de las diluciones, la siembra en placas y la incubación se utiliza la misma metodología descrita en los puntos 2 y 3.

5) Lectura de los resultados

Se contarán las cajas que presentan colonias entre 30 y 300 verificando su proporcionalidad entre diluciones. El resultado se expresa como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc·mL⁻¹).

6) Técnica de recuento por el Número más probable (NMP)

Esta determinación es utilizada para determinar la capacidad diazotrófica y microaerófila de colonias.



Se utilizan las mismas diluciones realizadas para la siembra en los medios sólidos (puntos 3 y 4), sembrando las diluciones 10^{-1} hasta 10^{-7} en medio de cultivo NFB semisólido. De cada dilución se harán cinco repeticiones. En este caso se siembra en cada tubo con 5 mL de medio NFB 100 μ L de la dilución correspondiente.

Para la incubación se llevaran los tubos a una estufa a una temperatura de 35°C hasta observar presencia de cambio de viraje del indicador y formación de película, contando a estos tubos como positivos.

CONCLUSIONES

Existen controversias al momento de explicar la variabilidad de la respuesta a la inoculación observada en los ensayos a campo.

Fages (1994), indica que estos problemas pueden deberse a diversas razones entre las cuales menciona el clima (lluvias, sequías, etc.), ausencia de limitantes nutricionales permitiendo a la planta expresar todo su potencial y por lo tanto minimizando el efecto promotor debido a la inoculación, problemas en la técnica

Tabla III. Valores sugeridos por nuestro Laboratorio para las pruebas de calidad arriba descritas.

Determinaciones		Valores sugeridos por el Laboratorio BPCV
pH		6.8 - 7.5
Recuento de azospirilos viables		$1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^9$ UFC por mL/g de inoculante
Detección de contaminantes	Medio Sabouraud	Ausencia de crecimiento de hongos
	Medio Tripticasa soya agar	Ausencia de crecimiento de bacterias de otro género
Recuento por el número más probable		$1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^9$ NMP de bacterias presuntivas

7) Identificación molecular

Se utilizan técnicas moleculares de REP-PCR y BOX-PCR para la caracterización de la o las cepa/s utilizada en el producto. Estas técnicas nos permiten identificar y caracterizar a las bacterias, dándonos un patrón distintivo para cada cepa. Una vez obtenidos los perfiles se los comparan con los patrones de las cepas pertenecientes a la Colección Azospirillum del INTA IMYZA, corroborando que el patrón de la cepa/producto concuerde con el patrón de la cepa/colección.

de inoculación, dosis empleada, diferentes texturas en los suelos, la cantidad de materia orgánica, el estado fisiológico de la bacteria al momento de inocular, la calidad del inoculante, utilización de cepa inapropiada, la cantidad de microorganismos autóctonos, la planta huésped, compatibilidad con pesticidas, etc.

Según Kloepper (1994), quien realizó una revisión de diversos trabajos en donde se discute a cerca de los aspectos de promoción de crecimiento de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), indica que los



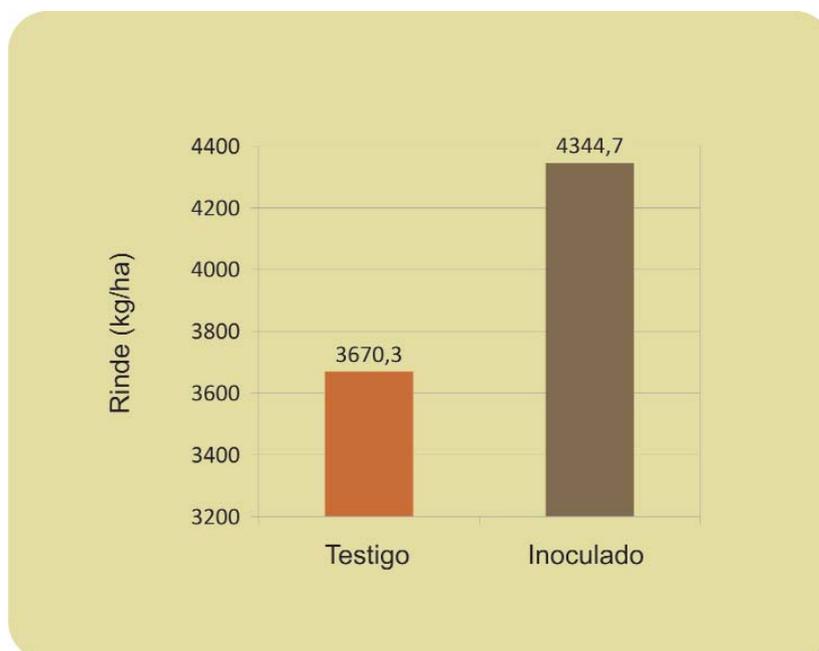
efectos de promoción se producen principalmente en las etapas tempranas del crecimiento de los cultivos y no necesariamente se traducen en incrementos en el rendimiento. Dentro de los efectos pre-rendimiento pueden incluirse mejoramiento de la emergencia de la semilla, del stand final, mayor vigor vegetativo, altura de planta, biomasa de raíces y tallos, contenido de nutrientes en el tejido vegetal, etc.

Otros autores (Okon y Labandera, 1994; Rodríguez Cáceres y Di Ciocco, 2003) indican que existe respuesta a la inoculación cuando el ambiente presenta limitaciones; mientras que otros investigadores (Díaz Zorita et al., 2008; González Montaner et al., 2008) detectaron que los aumentos en los rendimientos fueron más consistentes en sitios con rendimientos alcanzables de trigo superiores a los 2000 kg ha⁻¹ y en ambientes con mejores condiciones de fertilidad potencial.

Otras revisiones (Fuentes Ramírez and Caballero Mellado, 2006) atribuyen que la variabilidad e inconsistencia de los resultados a campo se debe a que se comparan resultados de diferentes años. Por lo tanto, en la comparación se incluyen diferentes fuentes de variabilidad inherentes a las diversas características del ambiente, edáficas y del cultivo así como también a las características propias del inoculante como son la formulación, cepa, número y estado fisiológico de las células bacterianas. Caballero Mellado (2006) afirma que las respuestas obtenidas están condicionadas al cumplimiento de requisitos que debe cumplir un inoculante bacteriano y que es necesario cuidar y regular con criterios estrictos las cepas, condiciones de propagación, producción de inoculantes y la calidad del producto terminado.

De los casos evaluados en esta revisión en el cultivo de trigo el 53% presentaron res-

Figura 2. Respuesta promedio a la inoculación en el cultivo de trigo.

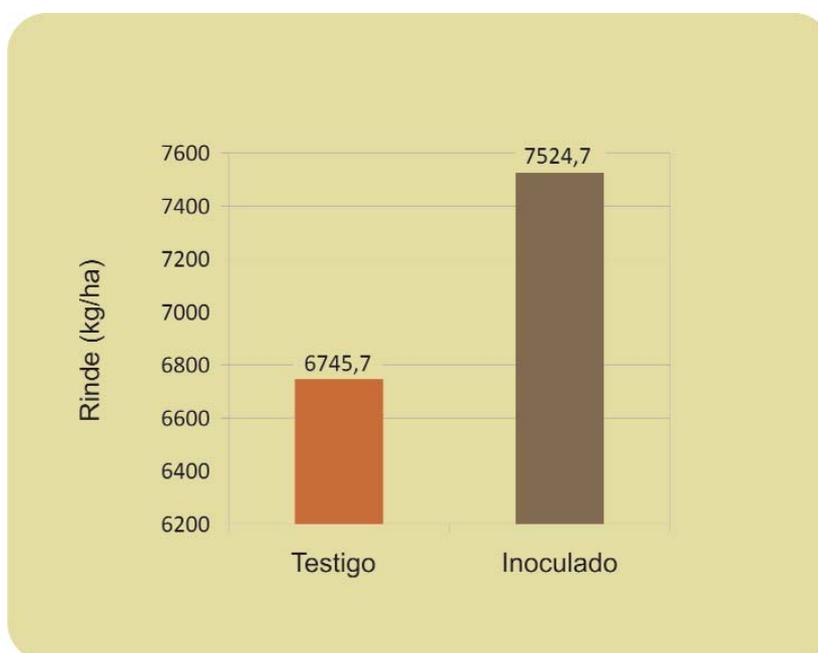




puestas positivas a la inoculación en el rinde. La respuesta en rendimiento promedio obtenida fue de $4377.7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (18%) para trigo y de $7524.7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (11.5%) para maíz (figuras 2 y 3). Para los ensayos en donde se evaluó la interacción con la fertilización se observó que en algunos la respuesta a la inoculación fue independiente de los niveles de

fertilizantes aplicados mientras que en otros existió interacción fertilizante inoculación. De estos últimos el porcentaje de incremento en rinde debido a la inoculación fue mayor en aquellos tratamientos no fertilizados pero en términos absolutos se consiguieron mejores rindes en los tratamientos fertilizados e inoculados.

Figura 3. Respuesta promedio a la inoculación en el cultivo de maíz.



BIBLIOGRAFÍA

- Bashan, Y. and Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36:591-608.
- Ben Dekhil, S.; Cahill, M.; Stackebrandt, E. and Sly, L. I. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:72-77.
- Bolletta A.; H. Krüger, y S. Venanzi. 2002. Respuesta del cultivo de trigo a la inoculación con biofertilizantes en el sur de la Provincia de Buenos Aires. INTA, Rivadavia, Vol. 1439, nº 1033. p 1-6.



Bono A.; J. Pérez Fernández, D. Funaro y A. Quiroga. 2003. Aplicación de microorganismos promotores de crecimiento. Trigo Actualización 2003. p 116-124.

Bottini, R.; Fulchieri, M.; Pearce, D.; Pharis, R. 1989. Identification of gibberellins A₁, A₂, and Iso-A₃ in cultures of *A. lipoferum*. Plant Physiol. 90:45-47.

Caballero Mellado, J. 2006. Potencial agronómico de *Azospirillum* y criterios en la producción de inoculantes. Taller sobre inoculantes: estado actual y perspectivas. Red Iberoamericana de biofertilizantes microbianos para la agricultura (BIOFAG). Septiembre 2006, Montevideo, Uruguay.

Cassán F.; Piccoli, P. and Bottini, R. 2003. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. Though gibberellins production. An alternative model to increase crop yield? Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación Argentina para la Sociedad. 2003. Pág.: 143-158. Editorial: Universidad Nacional de Santiago del Estero. ISBN: 987-99083-5-1.

Control de calidad de inoculantes formulados a base de *Azospirillum* sp. Documento de procedimientos N° 1. Red de Control de Calidad de Inoculantes (REDCAI). Ed. Asociación Argentina de Microbiología. 2008. Inédito.

Dardanelli, M.; Fernández de Córdoba, F.J.; Espuny, R.; Rodríguez Carvajal, M.A.; Soria Díaz, M.E.; Gil Serrano, A.M.; Okon, Y. and Megías, M. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. Soil Biology & Biochemistry 40:2713-2721.

Díaz Zorita M. 2008. Promotores biológicos del crecimiento en trigo: una opción para el manejo eficiente del cultivo. VII Congreso Nacional de Trigo. V Simposio Nacional de Cereales de Siembra Otoño-Invernal y I Encuentro del Mercosur. Resúmenes Conferencias. ISBN 978-950-863-102-2. D12.

Díaz-Zorita, M. and Fernández-Canigia. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. Eur. J. Soil Biol. 45:3-11.

Eckert, B.; Weber, O.; Kirchhof, G.; Halbritter, A.; Stoffels, M. and A. Hartmann. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:17-26.

Fages J. 1994. *Azospirillum* inoculants and field experiments. Chapter 6. *Azospirillum*/plant associations. Ed. Y. Okon. p 90.

Ferraris G. y L. Couretot. 2006a. Evaluación de la inoculación con *Azospirillum* spp en trigo bajo diferentes condiciones de cultivo. II año de ensayos Experiencias en el cultivo de trigo 2006. p 148-152.

Ferraris G. y L. Couretot. 2006b. Evaluación de la inoculación con *Azospirillum* spp bajo diferentes niveles de fertilidad Experiencias en el cultivo de trigo 2006. p 158-161.

Fornasero L. y M.A. Toniutti. 2003. Revista de Ciencia y Tecnología N 8. Agosto 2003. p 17-22.

Fuentes Ramírez L. y J. Caballero Mellado. 2006. Bacterial Biofertilizers. Chapter 5. In: PGPR: Biocontrol and biofertilization. Ed. Z.A. Siddiqui. Springer Science. Dordrecht, The Netherlands, p 143-172.

Funaro D. y A. Quiroga. 2005. Respuesta de maíz al tratamiento Nitragin Maíz con *Azospirillum* según niveles de fertilización. Campaña 2004/05. Resultados de ensayos de investigación y desarrollo aplicado. Nitragin.



- García de Salomone I. and J. Döbereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol Fertil Soils* 21:193-196.
- González Montaner, J.H.; Di Napoli, M.R.; Quattrocchio, A.; Andenoche, J.; Posborg, M. Y Dodorico, F.. 2008. Rizobacterias promotoras del crecimiento en trigo. Resultados de ensayos 2007/8. AACREA Región Mar y Sierras, JAT de Actualización "Trigo 2008", Azul (Bs. As.), p 17-21.
- Iosipenko, A. and Ignatov, V. 1995. Physiological aspects of phytohormone production by *Azospirillum brasilense* Sp. 7. *NATO ASI Ser. Ser. G.* 37:307-312.
- Khammas, K.M.; E. Ageron, P.A.; Grimont, D. and Kaiser, P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140:679-693.
- Kloepper J. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). Chapter 9. *Azospirillum/plant associations*. Ed. Y. Okon. p 139.
- Lin, S.Y.; Young, C.C.; Hupfer, H.; Siering, C.; Arun, A.B.; Chen, W.M.; Lai, W.A.; Shen, F.T.; Rekha, P.D. and Yassin, A.F. 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:761-765.
- Magalhães, F.M.M.; Baldani, J.I.; Souto, S.M.; Kuykendall, J.R. and Döbereiner, J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Cien.* 55:417-430.
- Mehnaz, S.; Weselowski, B. and Lazarovits, G. 2007a. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:620-624.
- Mehnaz, S.; Weselowski, B. and Lazarovits, G. 2007b. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2805-2809.
- Mousegne, F.; Paganini, A. y Gallego, K. 2005. Utilización de *Azospirillum*. Maíz. Resultado de experiencias 2004/05. Proyecto regional agrícola. p 25-28.
- Mousegne F. y Paganini, A. 2006. Utilización de *Azospirillum*. Campaña 2004/05. Experiencias en el cultivo de trigo 2006. p 48-51.
- Mousegne, F.; Lopez de Sabando, M.; Paganini, A. y Bondolfi, S. 2006. Evaluación de inoculantes biológicos en el cultivo de trigo. Campaña 2005-06. Experiencias en el cultivo de trigo 2006. p 69-74.
- Okon Y. y Labandera González, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Patten, C. and Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- Peng, G.; Wang, H.; Zhang, G.; Hou, W.; Liu, Y.; Wang, E.T. and Tan, Z. 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56:1263-1271.
- Perrig, D.; Boiero, L.; Masciarelli, O.; Penna, C.; Cassán, F. and Luna, V. 2007. Plant Growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*.



se, and their implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. On line: 10.1007/s00253-007-0909-9.

Puente, M.; Montecchia, M.S. y Peticari, A. 2005a. Evaluation of *Azospirillum* inoculant strains in wheat. 7th International Wheat Conference. p 211.

Puente, M.; Peticari, A. y Díaz Zorita, M. 2005b. Inoculación con *Azospirillum* en maíz, Reunión de Actualización Técnica "El cultivo del maíz en la Región" Río Primero.

Rademacher W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul.* 15:303-314.

Reinhold, B.; Hurek, T.; Fendrik, I.; Pot, B.; Gillis, M.; Kertzers, K.; Thielemans, D. and De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.)Kunth.]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:43-51.

Rimoldi, P.; Berwyn, A.; Luque, J. y Peticari, A. 2001. Producción de maíz en el Valle Medio del Río Chubut, Patagonia, Argentina: Fertilización mineral y biológica. p 105.

Rodríguez Cáceres, E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. and Environmental Biol.* p 990-991.

Rodríguez Cáceres E. y Di Ciocco, C.A. 2003. Factores que condicionan la respuesta de trigo a la inoculación con *Azospirillum brasilense* Az39 INTA en la pradera pampeana. *Revista de Ciencia y Tecnología* N 8. Agosto de 2003. p 9-16.

Steenhoudt, O., and Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microb. Rev.* 24:487-506.

Strzelczyk E.; Kamper M. and Li C. 1994. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60.

Tarrand, J.J.; Krieg, N.R. and Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* growth with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.

Ventimiglia, L.; Carta, H. y Rillo, S. 2000. Cosecha gruesa. Campaña 1999/2000. Resultados de experiencias. INTA Centro regional Buenos Aires Norte. EEA Pergamino, Unidad de extensión y experimentación adaptativa 9 de Julio. p 60-63.

Xie Ch. H. and Yokota, A. 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1435-1438.

Young, C.C.; Hupfer, H.; Siering, C.; Ho, M.J.; Arun, A.B.; Lai, W.A.; Rekha, P.D.; Shen, F.T.; Hung, M.H.; Chen, W.M. and Yassin, A.F. 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:959-963.





Capítulo 2

LAS PSEUDOMONAS: UN GRUPO HETEROGÉNEO CON DIVERSOS MECANISMOS PROMOTORES DEL DESARROLLO VEGETAL

Valverde, Claudio¹ y Ferraris, Gustavo².

¹ Profesor Asociado e Investigador Adjunto CONICET, Programa Interacciones Biológicas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Sáenz Peña 352, Bernal, B1876BXD, Buenos Aires, Argentina.

² Ingeniero Agrónomo, Magíster en Ciencias del Suelo. Área de Desarrollo Rural, INTA EEA Pergamino. Av. Presidente Frondizi, km 4.5, B2700WAA, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

e-mail: cvalver@unq.edu.ar

Dedicamos este capítulo al Dr. Norberto J. Palleroni, en reconocimiento de su significativo aporte a la diferenciación taxonómica de las pseudomonas y la introducción de enfoques moleculares en la taxonomía procariótica, por lo que ha sido reconocido en la comunidad científica internacional. El Dr. Palleroni, nacido en Buenos Aires, se graduó de Ing. Agrónomo en la UBA (1945), fue becario de Rotary International, becario Guggenheim y becario del CONICET. Se desempeñó como Profesor Titular de Microbiología y de Química Biológica de la Universidad Nacional de Cuyo (entre 1949 y 1965), como Profesor de Microbiología de la New York University Medical Center (desde 1987) y como Profesor de Investigación del Instituto Ag-Biotech de la Universidad de Rutgers (desde 1992). Ha publicado más de 130 trabajos de investigación y es autor de dos libros de Microbiología. En 1993 fue distinguido con el Premio Konex en Bioquímica y Microbiología. Ha sido nombrado Doctor Honoris Causa por la Universidad Nacional de Cuyo y por la Universidad de Buenos Aires, y Associate Member of the Bergey's Trust. En su honor, en el año 2005 se acuñó el nuevo género de alfa-proteobacterias *Palleronia* spp.

INTRODUCCION

Si hay un género con una taxonomía complicada y cambiante, ese es el género *Pseudomonas*. De hecho, debido a las importantes contribuciones de los estudios taxonómicos efectuados sobre este grupo de microorganismos, el propio Norberto Palleroni ha propuesto la existencia de dos eras en la taxonomía microbiológica moderna: la etapa BP ("*before Pseudomonas*") y la etapa AP ("*after Pseudomonas*") (Palleroni, 2003). No es nuestra intención dedicar un espacio exagerado a la clasificación del grupo ya que la taxonomía

está lejos de haber cristalizado el agrupamiento de este conjunto heterogéneo de microorganismos. Por otra parte, este capítulo (y esta compilación) pretende poner en discusión qué otros microorganismos cultivables habitantes del suelo, además de los tecnológicamente aceptados rizobios, pueden ser aprovechados por sus propiedades promotoras como estimulantes directos o indirectos del desarrollo y/o sanidad vegetal. Sin embargo, creemos pertinente comentar brevemente de qué estamos hablando al referirnos a las pseudomonas (sí,



sin itálicas ni mayúscula, lo que sería un hispanismo del término inglés "pseudomonads").

Según describe el Manual Bergey de Microbiología Determinativa (Holt et al., 1994), las pseudomonas son bacilos Gram negativos rectos o levemente curvos, de 0.5-1.0 μ m de diámetro y 1.5-5.0 μ m de largo. Son capaces de desplazarse en medios líquidos así como sobre superficies con cierto grado de humedad por el movimiento rotatorio de sus flagelos de localización polar. No son capaces de generar células en letargo (esporos). Para obtener energía, oxidan compuestos orgánicos con un metabolismo respiratorio, generalmente aeróbico (oxígeno). Son muy versátiles en cuanto a la capacidad de utilizar sustratos como fuente de carbono y no requieren vitaminas, lo que explica en gran parte su culturabilidad en una variedad de medios de cultivo mínimos y definidos. Son incapaces de crecer a pH <5.0. Continúa el Manual Bergey afirmando que "el género está ampliamente distribuido en la naturaleza" y que "comprende especies patógenas para humanos, plantas o animales". Y finaliza la introducción con la (quizás poco feliz) frase "la especie tipo es *Pseudomonas aeruginosa*". Ahora se entenderá la sensación que provoca la sola mención de las pseudomonas como posibles insumos agrobiotecnológicos de liberación masiva. Dado que generalizar es, sin duda, simplificar, pero a la vez perder detalle y particularidades, veamos qué otros interesantes microorganismos tenemos a disposición dentro de las pseudomonas.

Las pseudomonas fueron clasificadas en primer término mediante propiedades morfológicas, de cultivo y fisiológicas. En los 70's, los estudios de hibridación ARNr-ADN sentaron las bases de la visión actual del grupo. Palleroni definió entonces cinco grupos de ARNr (I a V). El advenimiento del análisis comparativo de la secuencia del ARNr 16S dio lugar a la reclasificación de los grupos II-V en diferentes sub-grupos de lo que hoy se conoce como α - o β -proteobacterias, incluso con nombres genéricos

nuevos. Así se desprendieron, por ejemplo, los actuales géneros *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*, entre muchos otros "ex-*Pseudomonas*". El grupo ARNr I según Palleroni es el que mantiene el nombre genérico *Pseudomonas* (o *Pseudomonas sensu stricto*), está comprendido dentro de las -proteobacterias, e incluye las especies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida* (Anzai et al., 2000). Éstas últimas, a su vez, son las especies representativas de las llamadas pseudomonas fluorescentes, caracterizadas por la producción de pigmentos hidrosolubles de colores azul-verdosos a la luz UV. La colección de microorganismos DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) reúne al día de la fecha 192 especies y subespecies en el género *Pseudomonas*. Ciertamente, el inagotable panorama taxonómico se complicará por la consideración de nuevos marcadores moleculares, propuestos para clarificar la ubicación de especies en conflicto, como los genes *gyrB* (ADN girasa), *carA* (carbamoil-fosfato sintasa), *atpD* (ATP sintasa) y *recA* (proteína mediadora de recombinación de ADN) (Hilario et al., 2004).

Conscientes de que es imposible arrojar una definición tácita y sencilla de las pseudomonas, abandonamos el terreno taxonómico para movernos al de las propiedades biológicas de las pseudomonas en relación a la producción agrícola. Aquí, de la mano de la diversidad fenotípica y genotípica del grupo, también vamos a encontrar una variedad de efectos biológicos que se consideran actualmente actividades promotoras del desarrollo vegetal asociadas a distintas especies y aislamientos de pseudomonas. La potencialidad de las pseudomonas como herramientas biotecnológicas que permitirían aumentar la producción agrícola ya ha sido reconocida (Walsh et al., 2001; Haas and Défago, 2005; Montesinos, 2003; Gerhardson, 2002; Stockwell and Stack, 2007; Mark et al., 2006).



BENEFICIOS POTENCIALES

Existe un importante número de reportes y estudios científicos sobre aislamientos de pseudomonas con diferentes capacidades de mejorar el desarrollo vegetal. La mayoría de estos aislamientos han sido testeados en condiciones controladas de laboratorio o invernadero y, en algunos casos, se han observado efectos positivos de la inoculación en condiciones de campo (Tabla I). A pesar del comportamiento prometedor *in vitro*, la información disponible sobre la eficacia a campo de la mayoría de estos aislamientos es escasa en Europa y EEUU, en gran parte debido a las exigentes regulaciones de eficiencia y riesgo sanitario vigentes. En otros casos los resultados a campo han sido inconsistentes posiblemente a causa de cuestiones técnicas como formulación, empaque y modo de aplicación inapropiados que afectan la viabilidad y persistencia de las cepas (Gerhardson, 2002) o simplemente debido a que los mecanismos de acción son influenciados por variables aún no identificadas como tipo de suelo y variedad de cultivo (Mark et al., 2006). Debido a éste tipo de restricciones, algunos autores (Gerhardson, 2002) han pronosticado que muchas cepas de pseudomonas probióticas que tienen excelentes propiedades desde el punto de vista científico, nunca podrán ser explotadas biotecnológicamente. Sin embargo, es posible que el panorama no sea tan pesimista. *ver tabla I.*

Cuando se analiza comparativamente una lista de productos comerciales disponibles a base de pseudomonas (Tabla II), se advierte claramente que el número de inoculantes en el mercado internacional es relativamente limitado, y que está orientado principalmente a biocontrol de fitopatógenos de plantas ornamentales y frutales en invernaderos y post-cosecha. No se comercializan inoculantes con pseudomonas para cultivos extensivos, con la excepción de Cedomon® y Cerall®, a base de *P. chlororaphis*, que es proclamado como exitoso y está aprobado en varios países de la UE.

Según se advierte en la Tabla II, compilada sólo en base a la publicidad de bioinsumos a base de pseudomonas, el desarrollo y comercialización de éstos productos en la Argentina tiene una importante actividad (Tabla II). Es posible que el número de productos registrados o en vías de registro en el SENASA sea aún mayor. En general la promoción de la utilización de estos productos comerciales (biofertilizantes) se apoya en estudios impulsados por las propias empresas productoras en ensayos a campo con participación del INTA. *Ver tabla II.*

El beneficio agronómico medido como aumento en la productividad debe poder correlacionarse o explicarse con mecanismos probióticos. A partir de la información detallada en la Tabla I, se desprende que el mecanismo de acción dominante atribuido a las especies estudiadas de pseudomonas, es la producción de antibióticos, que son los factores clave del fenómeno multifactorial conocido como control biológico (o biocontrol) de fitopatógenos. Si bien la colonización radicular es una condición necesaria para el establecimiento de una cepa biocontrol en la rizósfera, se debate actualmente si los niveles de colonización medidos en las cepas más "agresivas" (1-5% de la flora total) alcanzan a desplazar otros microorganismos (entre ellos los no deseados) en la competencia por nutrientes exudados, y así explicar el control biológico. Por ello, el foco de los estudios sobre mecanismos de control biológico está puesto sobre la producción de antibióticos, la inducción de resistencia sistémica y posibles interacciones negativas específicas entre patógenos y antagonistas (Haas and Défago, 2005).

El control biológico no es sólo dependiente de las capacidades bacterianas, sino también de la especie vegetal y la práctica de cultivo. Basta mencionar el efecto de decaimiento del pietín ("*take-all decline*") por el monocultivo de trigo, que ha sido descrito exhaustivamente por grupos del USDA (Cook, 2007). A lo largo de décadas de estudio de

Tabla 1. Aislamientos de *Pseudomonas* spp. descritos en la bibliografía con capacidad de promover el crecimiento vegetal y/o prevenir enfermedades.

Especie	Aislamiento	Cultivo testeado	Actividad PGPR ¹	Ensayos a campo/Producto comercial	Referencias
<i>aeruginosa</i>	PUPa3	(antagonismo fúngico <i>in vitro</i>)	Antibiosis, AIA	-	Kumar et al., 2005
<i>brassicacearum</i>	Am3	Tomate	Reducción de etileno	-	Belimov et al 2007
<i>chlororaphis</i>	O6	Pepino, tabaco	RSI, antibiosis, AIA	-	Han et al., 2006, Kang et al., 2006
	PCL1391	Tomate	Antibiosis	-	Chin-A-Woeng et al., 2001a
	30-84 Ma342 Sr1	Trigo Cebada, avena Trigo	Antibiosis Antibiosis Antibiosis, solub. fosfatos	Ensayo a campo Ensayo a campo	Maddula et al., 2008 Johnsson et al., 1998 Carlier et al., 2008
<i>corrugata</i>	(n.i.)	Maíz	(n.i.)	Ensayo a campo	Kumar et al., 2007
<i>fluorescens</i>	CHA0	Tomate, pepino,	Antibiosis, ¿RSI?	-	Haas & Keel, 2003
	Pf-5	tabaco, trigo	Antibiosis	-	Raaijmakers et al., 2002
	F113	Algodón, trigo, pepino	Antibiosis	Ensayo a campo	Moenne-Loccoz et al., 1998
	Q8r1-96	Remolacha, arveja	Antibiosis	-	Raaijmakers & Weller, 2001
	SBW25 (n.i.)	Trigo Arveja, trigo Trigo, Maíz	¿Competencia? Competencia	Ensayo a campo Rizofos®	De Leij et al., 1995; Naseby et al., 2001 www.rizobacter.com.ar
	ACC50 Up61	Trigo Lotus, poroto, tomate	Solubilización de fosfatos, Control de patógenos Reducción de etileno Antibiosis	Ensayo a campo	de la Fuente et al., 2004
<i>putida</i>	UW4	Colza	Reducción de etileno	-	Cheng et al., 2007
<i>spp.</i>	DSS73	Remolacha	Antibiosis	-	Koch et al., 2002
	M18	Sandía	Antibiosis	-	Huang et al., 2004
	PCL1171	Trigo	Antibiosis	-	Van den Broek et al., 2003

¹ Se consigna el mecanismo principal al cual se atribuye el efecto probiótico de la cepa. AIA, ácido indol acético (auxina); RSI, resistencia sistémica inducida. desconocido. (n.i.), no se informa.

Tabla II. Productos del mercado internacional y nacional que declaran contener *Pseudomonas* spp. como principio activo.

Producto ¹	Origen ²	Contiene ³	Efecto biológico atribuido ⁴	Aplicaciones ⁵	Referencia
Cerall®, Cedomon®	Bioagri AB, Suecia	<i>P. chlororaphis</i> (n.d.)	Antibiosis, RSI, competencia	Trigo, cebada, triticale	www.bioagri.se
BlightBan A506	Nufarm, USA	<i>P. fluorescens</i> A506	Anticongelante, antibiosis	Frutales en floración	www.nufarm.com
SpotLess™	Eco Soil Systems, USA	<i>P. aureofaciens</i> Tx-1	Antibiosis	Césped	(discontinuo)
AtEze	Eco Soil Systems, USA	<i>P. chlororaphis</i> 63-28	Antibiosis	Ornamentales y hortalizas en invernaderos	(discontinuo)
Bio-Save® 10LP & 11LP	Jet Harvest Solutions, USA	<i>P. syringae</i> ESC-10 y ESC-11	Antibiosis	Frutales (post-cosecha)	www.jetharvest.com
Bio-Soil™	Jet Harvest Solutions, USA	<i>P. putida</i> (n.d.), <i>Bacillus</i> spp.	No especificado.	Hortalizas, ornamentales, césped	www.jetharvest.com
Bio-Seed™	Jet Harvest Solutions, USA	<i>P. fluorescens</i> PRA-25	No especificado.	Maíz, arveja, hortalizas	www.jetharvest.com
Biopromotor, Bioprotector	BacTo Agro Culture Care Ltd, India	Complejo microbiano que incluye <i>P. fluorescens</i> (n.d.)	Solubilización de fosfatos, antibiosis	(n.i.)	http://www.indiamart.com/biocontrolagents/

Continúa en la página siguiente





Producto ¹	Origen ²	Contiene ³	Efecto biológico atribuido ⁴	Aplicaciones ⁵	Referencia
Rizofos® Maíz, Rizofos® Trigo	Rizobacter, Argentina	<i>P. fluorescens</i> (n.d.)	Solubilización de fosfatos	Maíz, trigo	www.rizobacter.com.ar
Rhizoflo Premium	CKC, Argentina	<i>P. fluorescens</i> (n.d.) (y <i>Azospirillum brasilense</i>)	Solubilización de fosfatos, antibiosis	Maíz, sorgo, girasol, trigo	www.ckc.com.ar
Rizogrowth AZP	Weizur, Argentina	Complejo microbiano que incluye <i>P. fluorescens</i> (n.d.)	Solubilización de fosfatos	Gramíneas	www.weizur.com
Bio-Bloemen	Química Bloemendal, Argentina	Complejo microbiano que incluye <i>P. fluorescens</i> (n.d.)	Bioestimulante, antibiosis	(n.i.)	www.biobloemen.com.ar
En desarrollo	Lab. Biagro SA, Argentina	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>Aurantiaca</i> (n.d.)	Antibiosis, solub. fosfatos, otros?	Trigo	www.biagro.com.ar
DEGfértil PGPR	Laboratorios DEGSER, Argentina	<i>P. fluorescens</i> (n.d.) (y <i>Azospirillum brasilense</i>)	Solubilización de fosfatos	Soja, girasol, maíz, trigo, sorgo, cebada	www.laboratoriosdegser.com

(n.i.), no se informa. ¹ Denominación comercial del producto. ² Empresa productora. ³ Cepas declaradas como ingrediente del producto. (n.d.), no se declara la cepa utilizada. ⁴ RSI, resistencia sistémica adquirida. ⁵ Según recomendaciones de uso del fabricante.



las poblaciones de pseudomonas asociadas a lotes de trigo, se ha establecido una firme correlación entre la supresión del pietín y la preponderancia de poblaciones de pseudomonas productoras de los antibióticos diacetilfloroglucinol y fenazinas (Cook, 2007). En nuestro país, todavía no disponemos de datos sobre el efecto del cultivo y de las rotaciones sobre las poblaciones de pseudomonas y su posible correlación con la incidencia de enfermedades.

Además del biocontrol, también se han descrito otros mecanismos probióticos como la reducción de niveles de etileno provocados por estrés y el aumento de la disponibilidad de fósforo (Tabla I). De hecho, es posible que más de un mecanismo contribuya simultáneamente a la promoción del crecimiento y/o sanidad vegetal *in situ*. La identificación de tales rasgos probióticos sienta las bases para la generación de formulaciones mixtas (Dunne et al., 1998) y/o estrategias de combinación de rasgos en una misma cepa mediante transferencia genética (Chin-A-Woeng et al., 2001b; Bainton et al., 2004).

Es importante remarcar que el estudio de potenciales actividades PGPR se realiza usualmente con ensayos cuali o cuantitativos en condiciones controladas, cuyos resultados positivos conducen a la postulación de una cepa para su uso como PGPR. Pero el camino desde la observación de una actividad PGPR *in vitro* a la medición de un efecto positivo en condiciones de campo, requiere atravesar necesariamente estudios que, por ejemplo, demuestren la pérdida del efecto por una mutación en los determinantes genéticos, o la transferencia de una capacidad probiótica a otra cepa que no la posea. Son pocos los casos (revisados en Haas and Keel, 2003) en los que se ha logrado este tipo de evidencias experimentales que soportan el mecanismo de acción de una cepa con interesantes actividades biológicas *in vitro*.

BENEFICIOS AGRONÓMICOS OBTENIDOS EN LA REGIÓN PAMPEANA ARGENTINA

Si bien las experiencias realizadas hasta el momento están circunscriptas a un número acotado de ambientes, y hace falta ampliar el set de datos disponibles para efectuar recomendaciones de uso más certeras y ajustadas, se dispone de información regional, especialmente proveniente del centro-norte de Buenos Aires y Sur de Santa Fe, que merced a sus alentadores resultados justifica la realización de estudios más profundos. Para ilustrar el tipo de respuestas observadas se describen a continuación los resultados de un grupo de experiencias de inoculación de cultivos de trigo y maíz en la región pampeana.

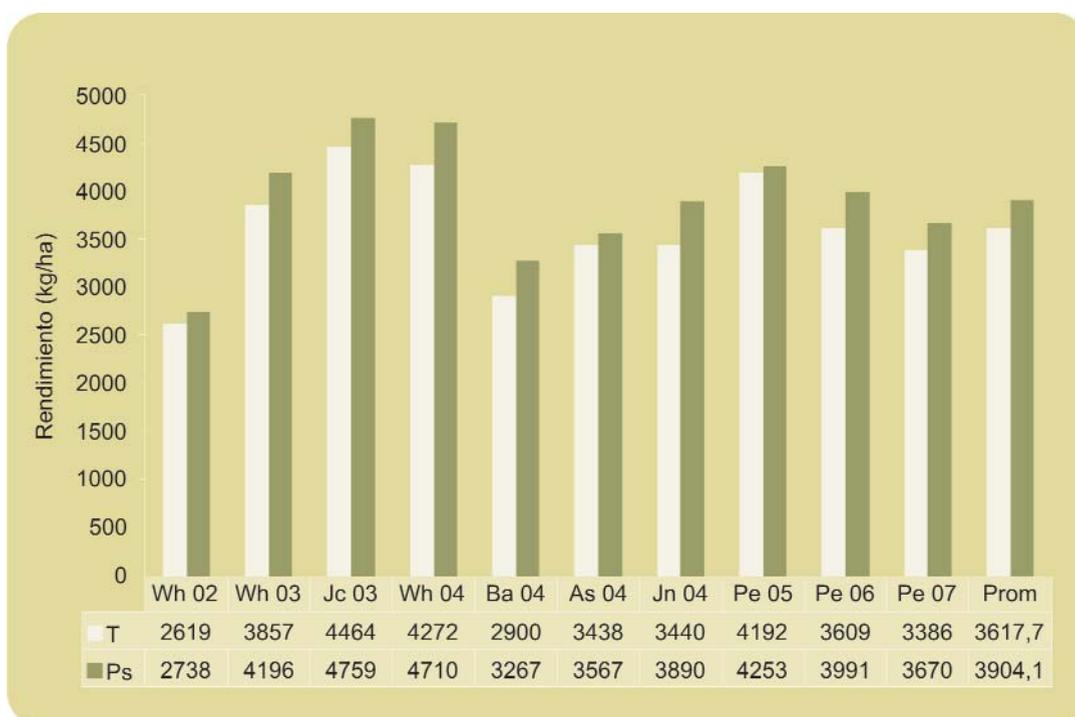
Experiencias realizadas en Trigo

El trigo es el cultivo del que, en nuestro país, se cuenta con mayor información sobre los efectos agronómicos del uso de pseudomonas. Ensayos pioneros realizados en las localidades de Pergamino y Chivilcoy durante los años 2000, 2001 y 2002, mostraron incrementos medios de rendimiento de $310 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (García y Bach, 2003a). En este grupo de seis ensayos, los resultados más consistentes se observaron cuando la inoculación fue acompañada de una adecuada fertilización con nitrógeno (N) y fósforo (P). En el mismo sentido, en un grupo de 10 ensayos realizados durante 5 campañas agrícolas en el centro-norte de Buenos Aires y Sur de Santa Fe, se cuantificó una respuesta media a la práctica de inoculación con pseudomonas de $286 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, lo cual representa un incremento de 7,3 % (Ferraris y Couretot, 2008a; Figura 1). Cada uno de estos sitios representa a su vez, el promedio de diferentes estrategias de fertilización, con o sin agregado de N y P.

Vale observar que, si bien los incrementos de rendimiento fueron ajustados, no se observaron casos con diferencia negativa o nula.



Figura 1. Rendimiento ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de tratamientos testigo e inoculados con *Pseudomonas fluorescens* en trigo entre los años 2002 y 2007 en el centro-norte de Buenos Aires y sur de Santa Fe. Las abreviaturas representan localidades Wh (Wheelwright, Santa Fe), Jc (Juncal, Santa Fe), Ba (Baigorrita, Buenos Aires), As (Ascensión, Buenos Aires), Jn (Junín, Buenos Aires), Pe (Pergamino, Buenos Aires) y el promedio de todas las localidades (Prom).



Una relación entre el rendimiento de los tratamientos -testigos e inoculados- con un índice ambiental expresado por el rendimiento medio del sitio nos permite evaluar la interacción existente entre respuesta y rendimiento (Figura 2). Los tratamientos inoculados superaron a los testigos en todo el rango de rendimientos evaluados. Los parámetros de los modelos ajustados para ambos tratamientos -pendiente y ordenada al origen- no difirieron entre sí ($P>0,10$), aunque la pendiente >1 para los rendimientos de los inoculados estaría expresando un ligero incremento de la diferencia sobre los testigos a niveles más altos de producción.

Si bien no se pudo establecer una función que relacione la respuesta a la inoculación con pseudomonas y las variables de suelo o cultivo evaluadas, un análisis a través de un gráfico biplot nos permite definir marcadas tendencias (Figura 3). El eje horizontal (1) discrimina variables de suelo y clima (izquierda) de los rendimientos (derecha). El eje vertical (2) por su parte, discrimina variables de suelo (arriba) de las precipitaciones (abajo). Por otra parte, los puntos azules representan cada uno de los diez experimentos analizados, y los vectores a las variables analizadas. Los vectores orientados en un mismo sentido



indican parámetros asociados de manera positiva, siendo la correlación más fuerte cuanto más cerrado sea el ángulo entre ambos vectores. En cambio, los orientados en sentido contrario indican una asociación fuerte pero inversa. Cuando dos vectores forman un ángulo recto, las variables que representan no están asociadas. De esta manera, se observa que la respuesta absoluta expresada en $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Rabs) se relacionó de manera positiva y estrecha con el nivel de rendimiento y en forma estrecha e inversa con las lluvias totales entre junio y noviembre. La asociación positiva con la productividad sería explicada por la mayor demanda de nutrientes generada por un cultivo de alto rendimiento. En cambio, el incremento de respuesta asociado a menores precipitaciones se basa en la ventaja competitiva para la adquisición de agua y nutrientes que tendrían los

tratamientos inoculados, otorgada por un mayor crecimiento aéreo y radicular inicial temprano. Por otra parte, en este grupo de ensayos no se observó relación alguna entre respuesta y el contenido de materia orgánica (MO), N (kg N/ha) o Fósforo (P) en suelo (Figura 3- ver *página siguiente*) o los niveles de N y P agregados por fertilización (datos no graficados para facilitar la observación de la Figura 3). Si bien la inoculación con pseudomonas no permitió sustituir fertilizante fosforado o nitrogenado, sí permitió incrementar su eficiencia de uso (Figura 4 - ver *página siguiente*).

Experiencias realizadas en Maíz

Si bien existe menor información disponible para este cultivo, en términos relativos la

Figura 2. Relación entre los rendimientos del tratamiento y la media del sitio experimental. Evaluación de la respuesta a *Pseudomonas fluorescens* en trigo, años 2002 a 2007.

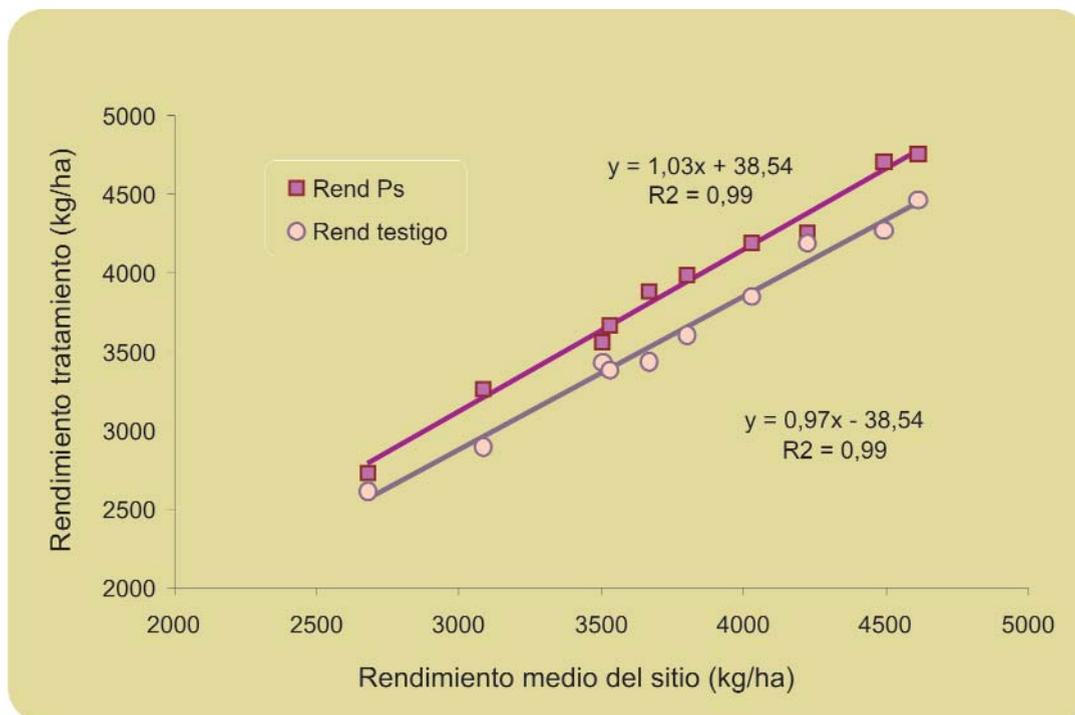




Figura 3. Respuesta absoluta a la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* (Rabs) y su asociación positiva con los rendimientos medios del sitio (Rmedio) y negativa con las lluvias (lluvias) durante el período junio-diciembre.

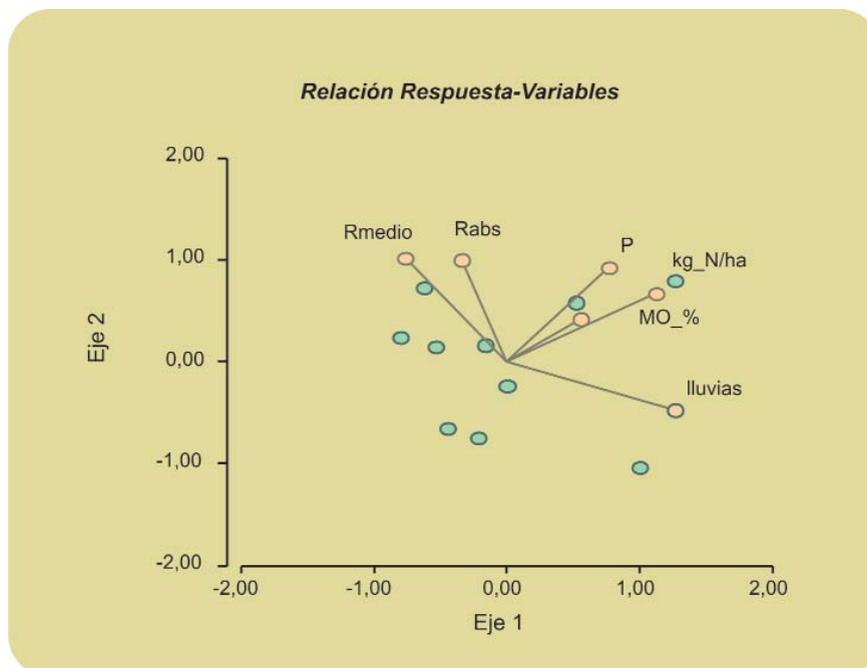
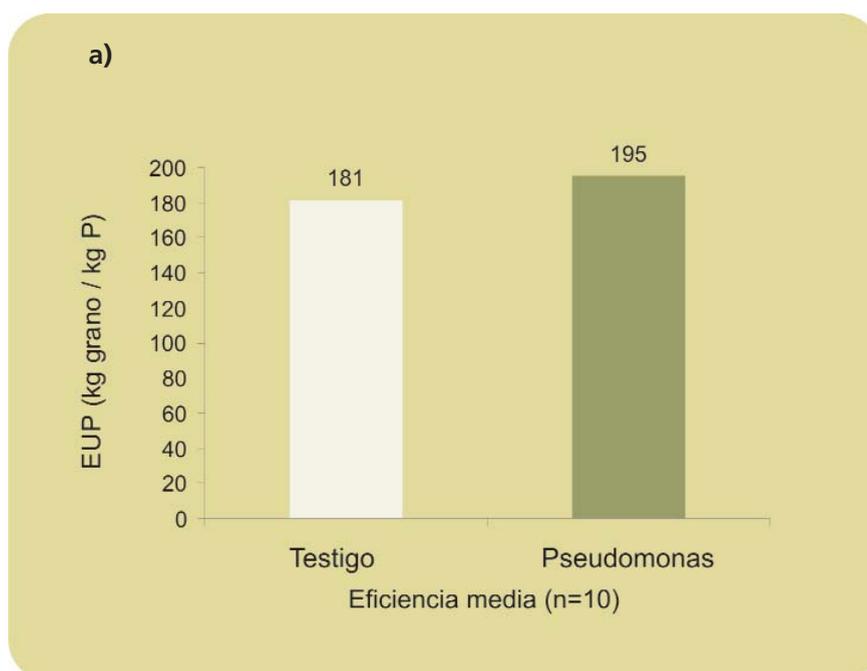
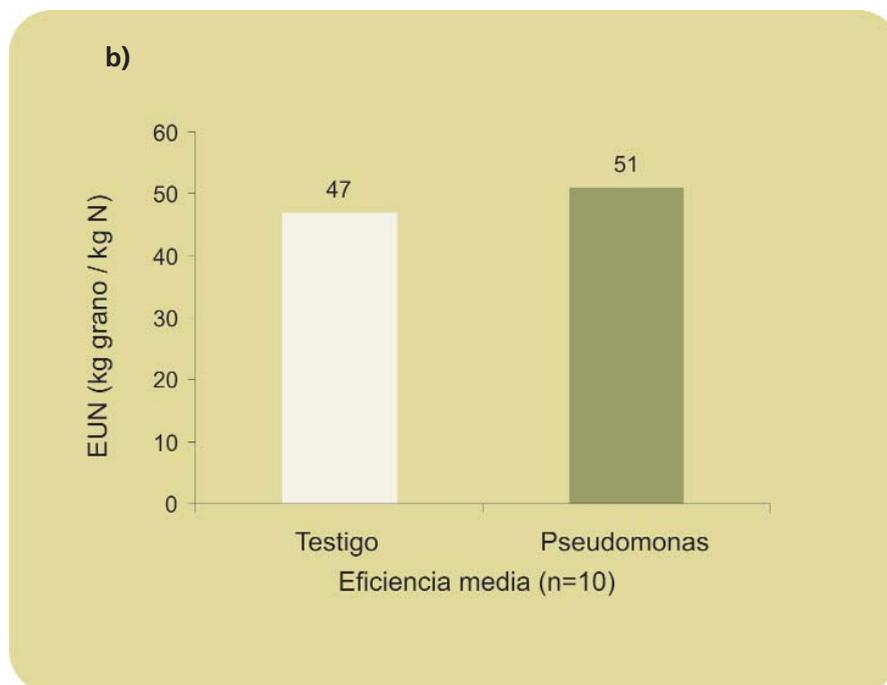


Figura 4. Eficiencia de uso de a) fósforo (P) y b) nitrógeno (N) en tratamientos testigos e inoculados con *Pseudomonas fluorescens* en Trigo. Cada columna es media de diez experimentos realizados entre los años 2002 y 2007 en el centro-norte de Buenos Aires y Sur de Santa Fe.





respuesta en rendimiento al uso de pseudomonas pareciera ser similar a la observada en trigo. Los primeros ensayos generados a campo en Región Pampeana fueron realizados por García y Bach (2003b). Estos autores informaron una diferencia positiva de $690,3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, como media de 6 ensayos realizados en tres campañas en la provincia de Buenos Aires.

Un grupo de 9 ensayos en los que se testearon dos niveles de inoculación -testigo y tratado con pseudomonas- bajo diferentes dosis de fertilizante nitro-fosforado, realizados por Ferraris y Couretot (2008b) entre los ciclos 2004/05 y 2007/08, mostraron una respuesta media de $622 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, lo que representa una diferencia porcentual de 6,96 % (Figura 5). Los modelos de respuesta para testigo y fertilizado así como sus pendientes no difieren entre sí, lo que permite aseverar que las dife-

rencias son constantes en una amplia ventana de rendimientos, como la abarcada por esta serie de experimentos (Figura 6). La respuesta no estuvo asociada a la dosis de fertilizante aplicado y, en algunos casos, se relacionó de manera inversa con el nivel de P en suelo. Este tipo de relaciones fueron observadas por Satorre (2007). En un grupo de siete experiencias a campo distribuidas en una amplia zona geográfica, este autor observó respuestas positivas a pseudomonas en sitios con bajo nivel de P en suelo y respuesta a su agregado mediante fertilización. En cambio, no logró determinar efectos positivos del inoculante en sitios que no respondían a P. En el trabajo presentados en la Figura 6 se observó además, un incremento en la eficiencia de uso de los nutrientes. Esta fue de 516 y 552 kg maíz kg P^{-1} y de 148 y 159 kg maíz kg N^{-1} para los tratamientos testigos e inoculados, respectivamente.



Figura 5. Rendimiento ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de tratamientos testigo e inoculados con *Pseudomonas fluorescens* en maíz entre las campañas 2004/05 y 2007/08 en el centro-norte de Buenos Aires. Las abreviaturas representan localidades Junín (Junín, Buenos Aires), Perg (Pergamino, Buenos Aires), Arrec (Arrecifes, Buenos Aires).

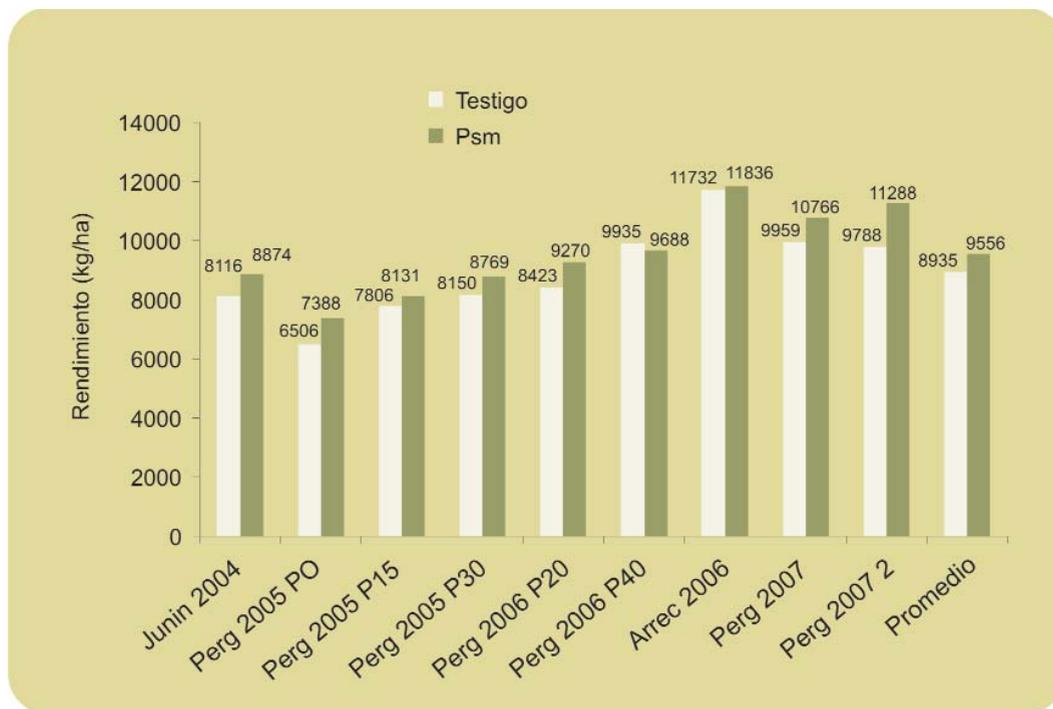
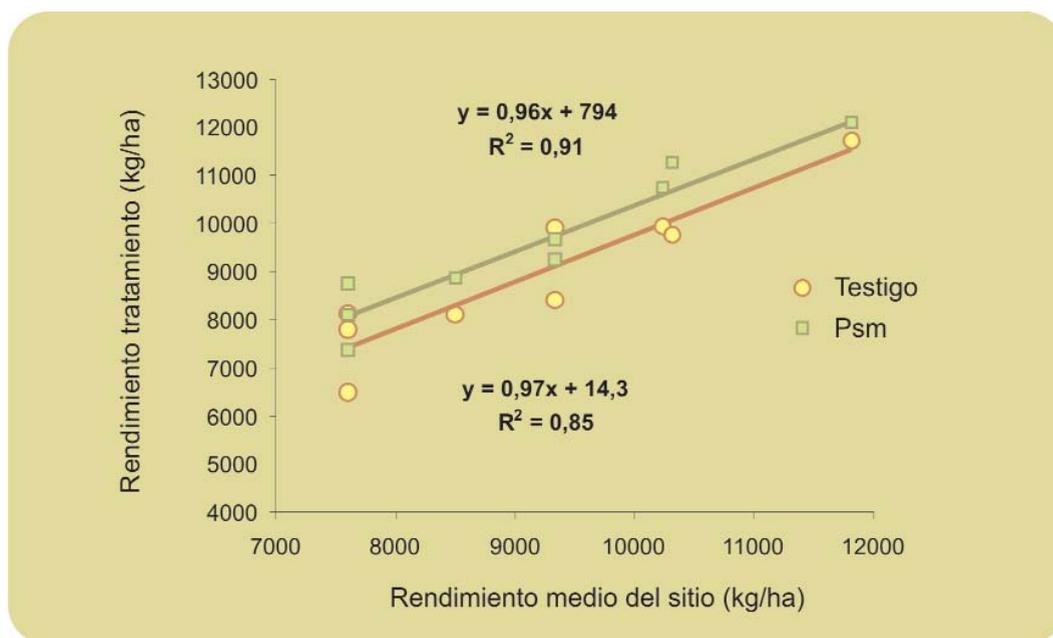


Figura 6. Relación entre los rendimientos del tratamiento y la media del sitio experimental. Evaluación de la respuesta a *Pseudomonas fluorescens* en maíz, sitios agrícolas 2004/05 a 2007/08.





INOCUIDAD

Una característica deseada para un microorganismo que se propone como ingrediente de un producto de uso agronómico es que sea inocuo, ya sea para otros organismos presentes en el ambiente dónde se introduce como también para los operarios que producen y manipulan el microorganismo a densidades celulares elevadas ($>10^9$ UFC/mL). Si bien se han aislado y caracterizado cepas de *P. aeruginosa* (Kumar et al., 2005) y *Burkholderia cepacia* (Blaha et al., 2006) con propiedades probióticas promisorias, estas especies engloban subespecies rizoféricas así como cepas patógenas oportunistas de humanos (Stockwell and Stack, 2007), clasificadas como de grupo de riesgo 2. Está claro que el registro de insumos agrobiotecnológicos formulados con este tipo de especies es, *a priori*, impracticable.

¿Qué sabemos sobre la inocuidad del (¿inagotable?) resto de las pseudomonas? Tal como se mencionó en la Introducción, el género *Pseudomonas* es muy heterogéneo con una distribución primariamente ambiental, de manera que en entornos complejos como el suelo co-existen especies patógenas oportunistas en humanos como *P. aeruginosa*, especies fitopatógenas como *P. syringae*, especies entomopatógenas (*P. entomophila*), especies comensalistas, y ciertamente especies probióticas (Tabla 1).

Según la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ), varias cepas de *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. chlororaphis* están catalogadas como especies de grupo de riesgo 1. Esto quiere decir que no son patógenos naturales de humanos que gozan de buen estado de salud. Habitualmente, *P. fluorescens* y *P. putida*, no crecen a 37-42 °C, por lo que existe una barrera térmica natural para su proliferación en humanos. Sin embargo, en ciertas situaciones particulares con compromiso inmunológico

secundario a patologías oncológicas, hematólogicas, procedimientos invasivos (catéteres, transfusiones) y lesiones traumáticas, se han reportado casos de aislamientos clínicos de pseudomonas fluorescentes (Dalamaga et al., 2005; Essex et al., 2004; Franzetti et al., 1992; Hsueh et al., 1998; Pappas et al., 2006; Siebor et al., 2006). De lo anterior se desprende que no sería válido extender una calificación de patogenicidad o inocuidad de amplio espectro para un aislamiento de pseudomonas basado simplemente en su identificación o aproximación taxonómica. Será necesario desarrollar y consensuar ensayos que permitan asignar tales calificaciones al enfrentar al aislamiento de interés con diferentes organismos como por ejemplo bacterias (estudios de impacto sobre microflora; Mark et al., 2006), hongos micorrícicos (interferencia de micorrización), protozoarios (toxicidad), especies vegetales (inhibición de germinación, reacción de hipersensibilidad en hojas) y animales (dosis letal por administración oral en ratas, ausencia de reacciones dérmicas, oculares y respiratorias en conejos) (Montesinos 2003).

Cepas patrón o de referencia

¿Qué se entiende por cepa patrón o de referencia en el contexto de la producción de productos agrobiotecnológicos? Se podría argumentar que una cepa patrón es un aislamiento microbiológica- y genéticamente caracterizado, que posee una actividad PGPR medible tanto en condiciones controladas como a campo y que ha sido documentada en publicaciones científicas. Se asume que las cepas han sido identificadas en base a criterios de superioridad relativa en ensayos de selección utilizando un gran número de aislamientos. Tales cepas, convenientemente catalogadas y depositadas en ceparios públicos, son accesibles entonces al sector privado para su producción a escala industrial. Así, por ejemplo, las cepas *Bradyrhizobium*



japonicum E109, USDA110 y SEMIA5080, y los aislamientos *Azospirillum brasilense* Az39 y Cd, son considerados de referencia y recomendados para su explotación comercial. En cuanto al grupo pseudomonas, en la Argentina no se dispone de cepas con propiedades PGPR de referencia o recomendadas para la formulación de inoculantes. A pesar de ello, existe un importante número de productos comerciales disponibles y en desarrollo (Tabla II) formulados con aislamientos obtenidos por el sector privado. A pesar que la utilización de cepas de referencia no es obligatoria, sería recomendable que los aislamientos de pseudomonas que se utilizan actualmente sean sometidos a un proceso de caracterización microbiológica, genética, de efectividad y de inocuidad, y convenientemente registrados ante autoridades de control y conservado en cepario bajo confidencialidad de la identidad de la cepa si así fuera requerido por el interesado.

ESTABILIDAD GENÉTICA

Es importante reconocer que el genoma de una bacteria es intrínsecamente inestable y dinámico. Por lo tanto en un cultivo puro desarrollado en óptimas condiciones, siempre existirá una población mayoritariamente "salvaje" y un conjunto de variantes "mutantes" con fenotipos indetectables o silenciosos, o eventualmente con fenotipos notables pero en muy baja proporción. En tanto no afecten las propiedades PGPR características de la cepa, no es motivo de preocupación. Para evitar la acumulación y enriquecimiento progresivo de mutantes con características indeseables, es recomendable evitar el subcultivo periódico de las cepas utilizadas como fuente de inóculos para la producción a escala, y recurrir en cambio a la recuperación de material conservado por métodos que aseguren la estabilidad genética como la liofilización o

congelamiento a muy bajas temperaturas en presencia de crioprotectores (García López and Uriburu Fernández, 2000).

Algunas cepas de pseudomonas experimentan el fenómeno conocido como cambio de fase, que genera polimorfismo de colonias, en ciertos casos acompañado de modificación de características fisiológicas (Van den Broek et al., 2005). Los cambios de fase usualmente son la consecuencia de rearrreglos genéticos, en general reversibles. Este tipo de fenómenos puede ser crítico cuando una de las fases pierde una capacidad probiótica. Para la cepa *P. fluorescens* CHA0, se ha reportado que el crecimiento en condiciones poco competitivas (medios de cultivo ricos) y el escalado favorecen la acumulación de mutantes afectados en reguladores globales de la actividad biocontrol (Duffy and Défago, 2000; Bull et al., 2001). El mismo tipo de mutantes se han aislado para otras especies de pseudomonas a partir de ambientes naturales (van den Broek et al., 2005), lo que induciría a imaginar una función ecológica para el fenómeno de variación de fase. De hecho, se han aislado mutantes de pseudomonas fluorescentes a partir de la rizósfera, luego de la inoculación con un cultivo puro monofásico. Esto sugiere que existiría una selección diferencial de variantes de fase por parte de la planta (Sánchez-Contreras et al., 2002). La recuperación del fenotipo (y genotipo) original por reversión de la fase sólo se ha descrito en unos pocos casos de pseudomonas rizosféricas (van den Broek et al., 2005). Dado que la preservación de las actividades probióticas es esencial en el producto formulado y en virtud de la posibilidad de acumulación de variantes de fase, es recomendable realizar estudios de estabilidad en diferentes etapas del proceso de producción industrial, distribución y almacenamiento para evitar la reducción de la eficiencia del producto.

Finalmente, son varios los mecanismos de transferencia horizontal de información genéti-



ca que contribuyen a la plasticidad y dinamismo que caracteriza a las especies procarióticas, entre ellos la transferencia de plásmidos, la transformación y la transducción vía partículas fágicas. Estos fenómenos, que implican cambios de información de mayor magnitud que la variación de fase, son inherentes a la interacción microbiana en ambientes complejos como es el suelo o la rizósfera, y por lo tanto son incontrollables. Ello no implica la imposibilidad de intervenir genéticamente un microorganismo para mejorar o incorporar propiedades PGPR, sino que fuerza a evitar el uso de plásmidos y obliga a recurrir a estrategias de recombinación que no dejen cicatrices indeseables como genes que codifican resistencia a antibióticos.

TRAZABILIDAD

¿Cómo seguir el rastro de un microorganismo en el ambiente en que se lo libera? Para las pseudomonas no se dispone de procedimientos establecidos. Los métodos microbiológicos no son indicados dada la ubicuidad y diversidad de pseudomonas que se encuentra en ambientes naturales. De esta forma, las herramientas moleculares son una alternativa viable. Para ello, habría que determinar marcadores moleculares específicos de cada cepa utilizada en un inoculante (Montesinos, 2003). Esta tarea a priori no es sencilla y requeriría la obtención de patrones de "huella molecular" característicos basados en la amplificación por PCR de fragmentos de ADN, en lo posible generados con distintos protocolos complementarios (REP, ERIC, BOX, RFLP de espaciador 16S-23S; McSpadden-Gardener et al., 2000). Así, ante la necesidad de identificar un aislamiento obtenido de diferentes fuentes se podría recurrir al banco de datos de huellas moleculares, pero sería poco práctico para intentar cuantificar la carga de una cepa determinada en muestras vegetales o de suelo. En este sentido, la secuenciación de fragmentos

diferenciales obtenidos a partir de cualquiera de los métodos de tipificado molecular permitiría el diseño de protocolos de PCR cuantitativa en tiempo real, un método sensible y específico para la estimación de carga genética en muestras ambientales (Mavrodi et al., 2007).

Bajo condiciones controladas de experimentación con microorganismos, como aquellas que se utilizan en ensayos en cámaras de cultivo de plantas o invernáculos, el uso de marcadores moleculares que permiten crecimiento diferencial (resistencia a antibióticos) o identificación rápida mediante microscopía de fluorescencia (genes que codifican proteínas autofluorescentes), es una herramienta muy utilizada (Bloemberg et al; 2001; Koch et al., 2001). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el uso de este tipo de marcadores no es recomendado en la liberación masiva del microorganismo de interés al ambiente. Este tipo de marcadores serviría en cambio para estudios básicos de caracterización de la interacción de la cepa de interés con plantas hospedadoras y otros organismos de la rizósfera y suelo (colonización radicular, distribución sistémica, predación y supervivencia). Una alternativa más segura podría ser la incorporación de etiquetas genéticas neutras que permitan la determinación de presencia y estimar la carga génica por técnicas moleculares como PCR en tiempo real cuantitativa. Para *E. coli*, se dispone de procedimientos recombinantes establecidos que permitirían etiquetar cepas sin introducir marcadores genéticos (Tischer et al., 2006); estos procedimientos deberían adaptarse para su aplicación a las pseudomonas.

Para resumir, las herramientas de tipificación e identificación basadas en marcadores moleculares propios podrían servir como metodología para realizar control de calidad desde la producción, distribución y almacenamiento de un inoculante, hasta la verificación de la identidad de re-aislamientos obtenidos desde semillas, raíces, rizósfera y eventualmente



suelo, o incluso para la determinación cuantitativa de la carga de una cepa inoculada en el mismo tipo de muestras.

FORMULADO

Para su comercialización, un agroinsumo biológico basado en pseudomonas requiere la producción de biomasa a escala industrial y una formulación adecuada que permita su depósito, distribución, aplicación sencilla y persistencia, con la menor pérdida de actividad biológica posible (Montesinos, 2003). Una de las desventajas que se atribuyen a las cepas de pseudomonas fluorescentes que contribuyeron notablemente al entendimiento de los mecanismos probióticos, es su pérdida de viabilidad durante el almacenamiento (Haas and Défago, 2005; Walsh et al., 2001), lo que fuerza a cargar los productos con altos títulos para proveer suficientes células viables al momento de aplicación. La tecnología de la formulación es probablemente una de las áreas de desarrollo de agroinsumos que requiere mayor esfuerzo de investigación para aumentar la eficacia (Stockwell and Stack, 2007). Este punto se ilustra con la escasa literatura disponible sobre estudios básicos de formulación de pseudomonas que se han utilizado como modelo de mecanismos probióticos (Moenne-Loccoz et al., 1999; Russo et al., 1996; 2001), y constituye uno de los principales desafíos en el desarrollo de nuevos productos basados en pseudomonas.

CONCLUSIONES

De la mano de una creciente demanda de productos biológicos y el reconocimiento de las potenciales actividades probióticas de las pseudomonas, la industria de inoculantes ha tomado la delantera en la producción y comercialización de inoculantes que se formulan con cepas que no se encuentran disponibles en bancos públicos y de las cuáles se des-

conoce su origen y las estrategias de selección que se utilizaron para su identificación. Aún así, los resultados de su aplicación en ensayos a campo son alentadores y estimulan a profundizar la selección de cepas locales y el desarrollo de formulaciones que se adapten a diferentes cultivos, diferentes zonas climáticas y tipos de suelo. La información publicada sobre las propiedades potencialmente benéficas de las pseudomonas proviene de estudios básicos que se realizan desde hace décadas sobre aislamientos que han sido obtenidos principalmente en Europa y EEUU (Tabla I). Si bien en la interacción entre pseudomonas y las raíces de las plantas colonizadas no se ha detectado el nivel exquisito de especificidad conocido para la simbiosis rizobio-leguminosa, hay indicios de efectos de la variedad de cultivo sobre las poblaciones de pseudomonas que sugerirían la existencia de grados de especificidad. Por ello, además del *screening* del mecanismo probiótico buscado, sería deseable seleccionar cepas locales con buena capacidad de colonización del cultivar de interés y debería incorporarse esta característica como criterio de selección (p.ej., aislamiento a partir de la superficie radicular o incluso, de tejidos subepidérmicos en la búsqueda de cepas endofíticas). Los aislamientos así obtenidos deberían entonces someterse a estudios de caracterización microbiológica, fisiológica y genética, a ensayos de inocuidad y a pruebas piloto de efectividad como PGPR en condiciones controladas.

Estos estudios sentarían las bases para la etapa siguiente de puesta a punto de la producción a escala, la formulación y el almacenamiento, los estudios de impacto ambiental y de trazabilidad, y los ensayos de efectividad a campo, para dar paso al registro del producto ante las autoridades fitosanitarias competentes. Para el desarrollo de nuevos productos biológicos, nuestro país ofrece una situación particularmente interesante, por la enorme capacidad de desarrollar ensayos a campo y



por la experiencia acumulada en el desarrollo de inoculantes a nivel industrial. Es de esperar que las instituciones académicas y la industria, en interacción, reconozcan esta oportunidad y tomen el desafío de invertir el tiempo y recursos necesarios para la selección, caracterización y formulación de cepas de *Pseudomonas* locales, y eventualmente, de su mejoramiento

mediante el aprovechamiento del conocimiento genómico disponible y de herramientas moleculares que permitirían, por ejemplo, la combinación de propiedades PGPR o la marcación genética para facilitar la trazabilidad utilizando procedimientos de ingeniería genética biológicamente seguros.

BIBLIOGRAFÍA

Anzai, Y.; Kim, H.; Park, J.Y.; Wakabayashi, H. and Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:1563-1589.

Bainton, N.J.; Lynch, J.M.; Naseby, D. and Way, J.A. 2004. Survival and ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* genetically engineered with dual biocontrol mechanisms. *Microbial Ecology*, 48:349-357.

Belimov, A.A.; Dodd, I.C.; Safronova, V.I.; Hontzeas, N. and Davies, W.J. 2007. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany*, 58:1485-1495.

Blaah, D. ; Prigent-Combaret, C. ; Mirza, M.S. and Moënne-Loccoz, Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 56:455-470.

Bloemberg, G.V.; Wijffjes, A.H.; Lamers, G.E.; Stuurman, N. and Lugtenberg, B.J. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13:1170-1176.

Bull, C.T.; Duffy, B.; Voisard, C.; Défago, G.; Keel, C. and Haas, D. 2001. Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79:327-336.

Carlier, E.; Rovera, M.; Rossi Jaume, A. and Rosas, S.B. 2008. Improvement of growth, under field conditions, of wheat inoculated with *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-008-9791-6.

Cheng, Z.; Park, E. and Glick, B.R. 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, 53:912-918.

Chin-A-Woeng, T.F.; van den Broek, D.; de Voer, G.; van der Drift, K.M.; Tuinman, S.; Thomas-Oates, J.E.; Lugtenberg, B.J. and Bloemberg, G.V. 2001a. Phenazine-1-carboxamide production in



the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14:969-979.

Chin-A-Woeng, T.F.; Thomas-Oates, J.E.; Lugtenberg, B.J. and Bloemberg, G.V. 2001b. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14:1006-1015.

Cook, R.J. 2007. Tell me again what it is that you do. *Annual Reviews of Phytopathology*, 45:1-23.

Dalamaga, M.; Karmaniolas, K.; Chavelas, C.; Liatis, S.; Matekovits, H. and Migdalis, I. 2005. *Pseudomonas fluorescens* cutaneous abscess and recurrent bacteremia following a dog bite. *International Journal of Dermatology*, 44:347-349.

De La Fuente, L.; Thomashow, L.; Weller, D.; Bajsa, N.; Quagliotto, L.; Chernin, L. and Arias, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology*, 110:671-681.

De Leij, F.; Sutton, E.J.; Whipps, J.M.; Fenlon, J.S. and Lynch, J.M. 1995. Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. *Applied & Environmental Microbiology*, 61:3443-3453.

Duffy, B.K. and Défago, G. 2000. Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied & Environmental Microbiology*, 66:3142-3150.

Dunne, C.; Moenne-Loccoz, Y.; McCarthy, J.; Higgins, P.; Powell, J.; Dowling, D.N. and O'Gara, F. 1998. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathology*, 47:299-307.

Essex, R.W.; Charles, P.G. and Allen, P.J. 2004. Three cases of post-traumatic endophthalmitis caused by unusual bacteria. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 32:445-447.

Ferraris, G. y Couretot, L. 2008a. Respuesta a la inoculación con diferentes cepas comerciales y precomerciales de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR). En: Trigo: Resultados de Unidades demostrativas. Proyecto Regional Agrícola. Área de Desarrollo Rural, AERs Pergamino y General Villegas (en prensa).

Ferraris, G. y Couretot, L. 2008b. Evaluación de promotores de crecimiento comerciales y experimentales en maíz. Una revisión de los experimentos realizados. En: Maíz: Resultados de Unidades demostrativas. Proyecto Regional Agrícola. Área de Desarrollo Rural, AERs Pergamino y General Villegas (en prensa).

Franzetti, F.; Cernuschi, M.; Esposito, R. and Moroni, M. 1992. *Pseudomonas* infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Journal of Internal Medicine*, 231:437-443.

García, R. y Bach, T. 2003a. Efecto de la inoculación con *Pseudomonas* sobre el rendimiento de trigo. Informe técnico 324, INTA - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Buenos Aires Norte, Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. p 19.

García, R. y Bach, T. 2003b. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento sobre el rendimiento de maíz. Informe técnico 325, INTA - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Buenos Aires Norte, Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. p 26.



García López, M.D. y Uruburu Fernández, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actas de la Sociedad Española de Microbiología*, 30:12-16.

Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20:338-343.

Haas, D. and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41:117-153.

Haas, D. and, Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3:307-319.

Han, S.H.; Lee, S.J.; Moon, J.H.; Park, K.H.; Yang, K.Y.; Cho, B.H.; Kim, K.Y.; Kim, Y.W.; Lee, M.C.; Anderson, A.J. and Kim, Y.C. 2006. GacS-dependent production of 2R,3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19:924-930.

Hilario, E.; Buckley, T.R. and Young, J.M. 2004. Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86:51-64.

Holt, J.G. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins; 9th edition. ISBN 0683006037.

Hsueh, P.R.; Teng, L.J.; Pan, H.J.; Chen, Y.C.; Sun, C.C.; Ho, S.W. and Luh, K.T. 1998. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:2914-2917.

Huang, X.; Zhu, D.; Ge, Y.; Hu, H.; Zhang, X. and Xu, Y. 2004. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiology Letters*, 232:197-202.

Johnsson, L.; Hökeberg, M. and Gerhardson, B. 1998. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA342 against cereal seed-borne diseases in field experiments. *European Journal of Plant Pathology*, 104:701-711.

Kang, B.R.; Yang, K.Y.; Cho, B.H.; Han, T.H.; Kim, I.S.; Lee, M.C.; Anderson, A.J. and Kim, Y.C. 2006. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Current Microbiology*, 52:473-476.

Koch, B.; Jensen, L.E. and Nybroe, O. 2001. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods*, 45:187-195.

Koch, B.; Nielsen, T.H.; Sørensen, D.; Andersen, J.B.; Christophersen, C.; Molin, S., Givskov, M.; Sørensen, J. and Nybroe, O. 2002. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Applied & Environmental Microbiology*, 68:4509-4516.

Kumar, R.S.; Ayyadurai, N.; Pandiaraja, P.; Reddy, A.V.; Venkateswarlu, Y.; Prakash, O. and Sakthivel, N. 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Applied Microbiology*, 98:145-154.



- Kumar, B.; Trivedi, P. and Pandey, A. 2007. *Pseudomonas corrugata*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. *Soil Biology & Biochemistry*, 39:3093-3100.
- Maddula, V.S.; Pierson, E.A. and Pierson, L.S. 3rd. 2008. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30-84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *Journal of Bacteriology*, 190:2759-2766.
- Mark, G.L.; Morrissey, J.P.; Higgins, P. and O'Gara, F. 2006. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 56:167-177.
- Mavrodi, O.V.; Mavrodi, D.V.; Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 2007. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by real-time PCR. *Applied & Environmental Microbiology*, 73: 5531-5538.
- McSpadden Gardener, B.B.; Schroeder, K.L.; Kaloger, S.E.; Raaijmakers, J.M.; Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Applied & Environmental Microbiology*, 66:1939-1946.
- Moënné-Loccoz, Y.; Powell, J.; Higgins, P.; McCarthy, J. and O'Gara, F. 1998. An investigation of the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on the growth of sugarbeet and the performance of subsequent clover-Rhizobium symbiosis. *Applied Soil Ecology*, 7:225-237.
- Moënné-Loccoz, Y.; Naughton, M.; Higgins, P.; Powell, J.; O'Connor, B. and O'Gara, F. 1999. Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Applied Microbiology*, 86:108-116.
- Montesinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6: 245-252.
- Naseby, D.C.; Way, J.A.; Bainton, N.J. and Lynch, J.M. 2001. Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 90:421-429.
- Palleroni, N.J. 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology SGM*, 149:1-7.
- Pappas, G. ; Karavasilis, V. ; Christou, L. and Tsianos, E.V. 2006. *Pseudomonas fluorescens* infections in clinical practice. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 38:61-70.
- Raaijmakers, J.M. and Weller, D.M. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied & Environmental Microbiology*, 67:2545-2554.
- Raaijmakers, J.M.; Vlami, M. and de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81:537-547.
- Russo, A.; Moënné-Loccoz, Y.; Fedi, S.; Higgins, P.; Fenton, A.; Dowling, D.N.; O'Regan, M. and O'Gara, F. 1996. Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 44:740-745.



Russo, A.; Basaglia, M.; Tola, E. and Casella, S. 2001. Survival, root colonisation and biocontrol capacities of *Pseudomonas fluorescens* F113 LacZY in dry alginate microbeads. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27:337-342.

Sánchez-Contreras, M.; Martín, M.; Villaceros, M.; O'Gara, F.; Bonilla, I. and Rivilla, R. 2002. Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, 184:1587-1596.

Satorre, E. 2007. Manejo de la nutrición: El uso de inoculantes en el cultivo de maíz. pp 20-22. En: Centro de desarrollo y transferencia de tecnología del cultivo de maíz. Análisis de campaña 2006/07. Dekalb. p 48.

Siebor, E.; Llanes, C.; Lafon, I.; Ogier-Desserrey, A.; Duez, J.M.; Pechinot, A.; Caillot, D.; Grandjean, M.; Sixt, N. and Neuwirth, C. 2006. Presumed pseudobacteremia outbreak resulting from contamination of proportional disinfectant dispenser. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 38:68-70.

Stockwell, V.O. and Stack, J.P. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*, 97:244-249.

Tischer, B.K.; von Einem, J.; Kaufer, B. and Osterrieder, N. 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, 40:191-197.

Van den Broek, D.; Chin-A-Woeng, T.F.; Eijkemans, K.; Mulders, I.H.; Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J. 2003. Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16:1003-1012.

Van den Broek, D.; Chin-A-Woeng, T.F.; Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J. 2005. Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *Journal of Bacteriology*. 187:593-600.

Walsh, U.F.; Morrissey, J.P. and O'Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12:289-295.





Capítulo 3

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL PERTENECIENTES AL GÉNERO *Bacillus* Y OTROS MUY RELACIONADOS

Benintende, Graciela B.

Ingeniera Agrónoma. Área Bioinsumos Microbianos, IMYZA, INTA, CC 25 (1712) Castelar, Buenos Aires, Argentina.

e-mail: gbenintende@cnia.inta.gov.ar

INTRODUCCION

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas como PGPR (*promoting growth plant rhizobacteria*), han sido definidas como aquellas bacterias de vida libre, habitantes del suelo, rizosfera, rizoplano y filosfera, que bajo ciertas condiciones resultan benéficas para las plantas (Bashan y Bashan, 2005).

Entre ellas, ciertas especies del género *Bacillus* son de crecimiento frecuente en los suelos, en forma libre y también asociadas a las raíces. Aunque no constituyen la flora más abundante, numerosos estudios indican su presencia en la rizosfera de plantas tanto leñosas como herbáceas, lo que condujo a pensar que podrían jugar un papel clave en el mantenimiento de una microflora acompañante del sistema radical permitiendo el crecimiento vigoroso de las plantas y el mantenimiento de una fisiología saludable.

Los primeros estudios de estas PGPR fueron focalizados sobre algunas especies biocontroladoras, entre ellas *Bacillus subtilis*, un efectivo antagonista de patógenos del suelo (Kloepper et al., 1989).

Diferentes especies del taxón bacteriano considerado en este Capítulo, que incluye los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Alicyclobacillus* and *Aneurinibacillus*, fueron reportadas como promotoras del crecimiento de una gran cantidad de plantas (De Freitas et al., 1997; Kokalis-Burelle et al., 2002).

La mayoría de las investigaciones realizadas se han enfocado a la elucidación de los mecanismos involucrados en el control biológico y relativamente poco en el conocimiento relacionado con la promoción directa. Sea cual fuere el mecanismo por el cual estas bacterias promueven el desarrollo vegetal, existen numerosos antecedentes que demuestran su potencial como herramientas biológicas para la producción agropecuaria.

Cabe mencionar que en la actualidad el uso de microorganismos para el control de plagas y enfermedades representa sólo el 1.4% del mercado global de productos. Los bioinsecticidas generados a partir de *B. thuringiensis* para el control de plagas y vectores, son los más abundantes en el mercado. Una de las causas de su éxito es la facilidad para su formulación. Entre las especies biocontroladoras de enfermedades, *B. subtilis* es sin lugar a dudas la de mayor difusión, muy probablemente debido además de esa misma razón, a que posee una alta adaptación a diferentes condiciones de pH, temperatura y humedad.

En este capítulo se describen las características más sobresalientes del grupo *Bacillus*, la importancia de una precisa identificación de las especies y sin pretender realizar un análisis exhaustivo, se presentan sólo algunos de los antecedentes sobre la utilización actual y



potencial de las especies del taxón, como agentes biocontroladores y biofertilizantes.

DESARROLLO

Bacterias aeróbicas esporuladas

El género *Bacillus*, un grupo extenso y muy heterogéneo que abarcaba más de 80 especies de bacterias (Euzéby, 2008), permaneció intacto hasta el año 2004, cuando fue dividido en varias familias y géneros en base a estudios del RNA de cadena simple (Blackwood et al., 2004).

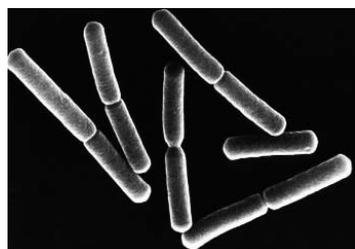
Previamente, mediante análisis filogenéticos algunas especies del género habían sido reclasificadas en nuevos géneros incluyendo a *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Geobacillus* (Dong and Cote, 2003).

Con el propósito de dar una mínima definición, al referir a este grupo de microorganismos, se hace alusión a aquellas bacterias Gram+, que forman endosporas y que crecen en presencia de O₂ y se las designa básicamente como "bacterias aeróbicas esporuladas".

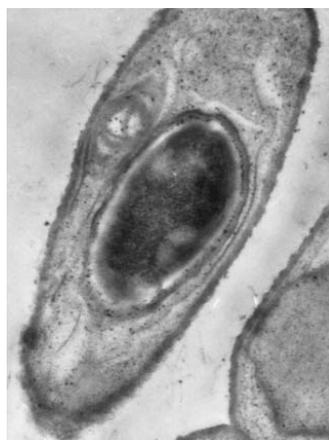
Una característica sobresaliente de estas bacterias, es la posibilidad de formar esporas (del griego: semilla) frente a condiciones inadecuadas ambientales o de nutrición. La espora es un tipo especializado de célula que se forma dentro de la célula madre o esporangio (Figura 1). Son células criptobióticas es decir que no poseen ninguna actividad metabólica y son muy resistentes a diferentes efectos como calor, desecación, congelación, contacto con productos tóxicos, etc. El principal papel ecológico de las esporas consiste en su capacidad de supervivencia en estado de sequedad y/o ausencia de medio nutritivo (Davis, 1978). De hecho, es normal poder recuperar estas bacterias a partir de muestras de suelos conservados secos por más de 50 años.

Esta característica facilita la conservación de los cultivos de este grupo de bacterias, los que pueden permanecer viables por largos períodos bajo diferentes y simples formas de preservación (Gherna, 1994). Entre ellas resultan particularmente prácticas la impregnación de tiras de papel de filtro en una suspensión de esporas y su almacenamiento luego de secadas, así como el fraccionamiento directo de suspensiones de esporas libres de medio de cultivo.

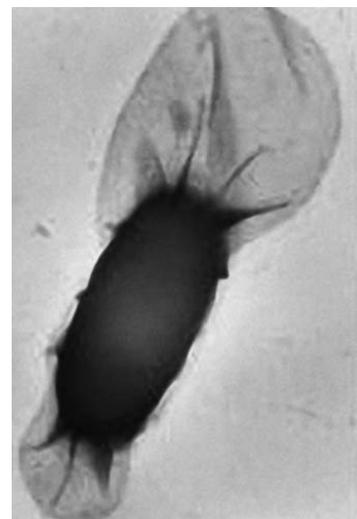
Figura. 1. Visualización de células vegetativas 10.000x (A), esporangio 12.000x (B) y espora 13.000x (C), de *Bacillus* sp. al microscopio electrónico.



A)



B)



C)



Identificación

La ubicuidad que presentan estas bacterias queda demostrada por la posibilidad de aislarlas desde los más diversos ambientes, posiblemente a raíz de la dispersión aérea de sus esporas. Sus capacidades metabólicas son muy diversas y han atraído el interés debido a su participación en numerosas interacciones que permiten su aprovechamiento. Una gran cantidad de especies intervienen en procesos de degradación de diversos sustratos animales o vegetales (celulosa, almidón, proteínas, pectinas, hidrocarburos, etc.), en la producción de antibióticos y en el biocontrol de plagas y enfermedades entre otros.

Desafortunadamente muchas especies del taxón presentan gran importancia desde el punto de vista clínico, pudiendo resultar de extrema patogenicidad, particularmente algunas de las incluidas en el grupo 1, el de *Bacillus cereus* (que abarca además de *B. cereus*, a *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides*, y *B. weihenstephanensis*) (Sauka y Benintende, 2008). Ellas se caracterizan por exhibir una gran similitud bioquímica, morfológica y aún genética, lo que dificulta su precisa identificación.

La identificación de *Bacillus* spp, requiere de observaciones morfológicas, de pruebas bioquímicas y de análisis moleculares. Eventualmente son necesarios además estudios toxicológicos para verificar la patogenicidad de las cepas (Gordon et al., 1973;

Berkeley et al., 1984, Claus y Berkeley, 1986).

Rol de diferentes especies del grupo *Bacillus* como PGPR

Diferentes especies de *Bacillus* han sido reportadas como PGPR de una amplia gama de especies vegetales (De Freitas et al., 1997; Kokalis-Burelle et al., 2002). Sin embargo sólo se han demostrado fehacientemente sus capa-

dades como agentes biocontroladores de numerosas enfermedades, promoviendo en tal sentido el crecimiento de las plantas.

En la Tabla I se mencionan algunas de las especies del grupo *Bacillus* que han sido descritas con potencial capacidad PGPR. Algunas de ellas han sido registradas como ingrediente activo de productos registrados en la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/>. Acceso 2008).

Tabla I. Especies del grupo *Bacillus* con potencial capacidad PGPR.

Especie	Actividad relacionada descrita
<i>B. amyloliquefaciens</i>	BC - FH
<i>B. cereus</i>	BC
<i>B. circulans</i>	BC
<i>B. licheniformis</i>	BC - FH
<i>B. lentimorbus</i>	BC
<i>B. megaterium</i>	PSB - BC
<i>B. mucilaginosus</i>	PSB
<i>B. mycooides</i>	BC
<i>B. pasteurii</i>	?
<i>B. pulvifaciens</i>	?
<i>B. pumilus</i>	BC - FH
<i>B. subtilis</i>	BC - FH
<i>B. sphaericus</i>	BC
<i>B. thuringiensis</i>	BC
<i>Brevibacillus spp.</i>	BC
<i>Paenibacillus macerans</i>	AZO
<i>P. polymyxa</i>	AZO, FH, PSB

BC= biocontrolador; AZO= diazótrofo; FH= productor de fitohormonas y PSB= solubilizador de fósforo.

Producción de fitohormonas

Algunas de las especies del grupo bacteriano considerado en este capítulo, son capaces de



producir ciertos compuestos que regulan el crecimiento vegetal. El efecto de ellos sobre las plantas puede ser directo mejorando su crecimiento o indirecto, favoreciendo la nutrición de la planta promoviendo un mayor desarrollo radicular y resulta muy dificultoso distinguir entre ellos (Fuentes-Ramirez and Caballero-Mellado, 2005). Un gran número de ensayos ha demostrado que la actividad bacteriana eleva los niveles de fitohormonas en las plantas, ya sea por la misma síntesis bacteriana, como mediante la inducción ejercida por las bacterias para que las plantas sintetizen dichas sustancias.

Paenibacillus polymyxa es generadora de algunas fitohormonas como las auxinas y citoquininas (Lebuhn et al., 1997; Timmusk, et al., 1999). *Bacillus pumilus* y *B. licheniformis* parecerían ser las responsables de promover el crecimiento de plantas mediante la producción de giberelinas (Gutiérrez Manero et al., 2001).

Solubilizadores de Fósforo

Las bacterias solubilizadoras de fósforo pueden aumentar el contenido de este nutriente en los tejidos vegetales, por lo que han sido clasificadas como PGPR (Toro et al., 1997). La acción bacteriana solubiliza las principales formas minerales de aquel elemento presentes en el suelo escasamente solubles o insolubles (Igal et al., 2001).

Entre las bacterias solubilizadoras de fósforo más conocidas, se encuentran especies pertenecientes al género *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pulvifaciens*, *B. circulans* y *P. polymyxa* (Rojas et al., 2001).

Algunas han sido aplicadas como inoculantes para aumentar la productividad de cultivos. Su efectividad varía con el tipo de suelo, contenido de P, etc. (Khan et al., 2007).

Se han desarrollado inoculantes comerciales usando cultivos mixtos de bacterias. Algunos

ejemplos son: Phylazonit-M® (Hungría), un producto conteniendo *B. megaterium* y *Azotobacter chroococcum*, el cual permitiría un aumento del suministro de N y P a la planta, y el producto KYUSEI EM® (EM Technologies, Inc.), que incluye bacterias del ácido láctico. Existe considerable evidencia que apoya el rol específico de *Bacillus* spp. en la solubilización del fósforo. Sin embargo, no todos los ensayos de laboratorio o de campo han dado resultados positivos. La eficiencia de la inoculación variaría con el tipo de suelo, el cultivar específico y otros numerosos parámetros. El contenido de P en el suelo sería probablemente uno de los factores cruciales en determinar la efectividad del inoculante (Rodríguez y Fraga, 1999).

Diazótrofos

Entre las especies bacterianas del grupo, *Paenibacillus macerans* y *P. polymyxa* son descriptos como fijadoras de nitrógeno. *P. macerans* es una especie bastante abundante en suelos y material vegetal en degradación. Su capacidad fijadora de nitrógeno se mantiene sólo bajo condiciones anaeróbicas, ya que no posee ningún mecanismo de protección de la enzima nitrogenasa frente al oxígeno.

Paenibacillus polymyxa también ha sido relacionado por su habilidad fijadora de N₂ (Vessey, 2003). Otros autores (Cakmakci et al., 2007) demostraron que la inoculación de cebada con *P. polymyxa* entre otras especies de *Bacillus* sp., tenía un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, el cual no correlacionaba solamente con la habilidad fijadora de nitrógeno de las bacterias; debiéndose a una suma de factores, sumándose al anterior la capacidad solubilizadora de fósforo y la producción de hormonas ejercida por las especies aplicadas.

Otros investigadores señalan que el principal rol en el que intervendría *P. polymyxa*, está fuertemente ligado a su alta capacidad productora de compuestos antibióticos y exopoli-



sacáridos, actuando definitivamente como agente biocontrolador (Haggad, 2007).

Biocontroladoras

La promoción indirecta del crecimiento vegetal ocurre cuando las PGPR previenen o disminuyen el efecto deletéreo de microorganismos fitopatógenos.

Diferentes especies del grupo *Bacillus* juegan un rol activo en la supresión de microorganismos fitopatógenos. Básicamente dicho mecanismo de supresión está mediado por la secreción de metabolitos extracelulares que resultan inhibitorios de los agentes patógenos aún a bajas concentraciones. Un detallado estudio de dichos compuestos puede encontrarse en Fernando et al., 2005.

Otros mecanismos detectados también en especies del género, involucran procesos relacionados a la inducción de la resistencia de la planta. Siddiqui (2005) realizó un detallado compendio de los efectos ocasionados por numerosas especies de PGPR, sobre enfermedades bacterianas, virales y fúngicas vegetales. La mayoría de las experiencias demuestran la habilidad de las distintas especies para el biocontrol de dichas enfermedades indicando un alto potencial para su empleo. Sin embargo, en la mayoría de los casos se considera necesario un mayor número de ensayos conducidos bajo condiciones naturales, antes de proceder a su desarrollo y recomendación como productos de biocontrol.

Datos más contundentes y definitivos se encuentran sobre varias formulaciones a base de *B. subtilis*, que han sido empleadas en numerosos cultivos hortícolas, ornamentales y extensivos, resultando en una significativa inducción de la resistencia ante diferentes fitopatógenos. Entre el 60 y 75% del cultivo de algodón en los EEUU es tratado con esta bacteria, así como otros cultivos como maní, soja y maíz (Nakkeeran et al., 2005).

Datos similares han sido mencionados para otras especies como *B. amyloliquefaciens*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, y

B. sphaericus ejerciendo un control prolongado de enfermedades del suelo producidas por numerosos fitopatógenos fúngicos, principalmente por *Rhizoctonia* y *Fusarium*.

CONCLUSIONES

La producción agropecuaria está en permanentes cambios, que involucran entre otras, la necesidad de herramientas alternativas de protección y fertilización. Los inoculantes (biofertilizantes) y biocontroladores están siendo explorados mundialmente como medida contra la contaminación ambiental y reducción de los costos de producción, en sistemas agropecuarios sustentables. Paralelamente, la producción orgánica requiere de nuevas herramientas de protección contra plagas y enfermedades, así como para el adecuado suministro de nutrientes.

Las bacterias que ocasionan o promueven el desarrollo vegetal han sido reunidas en un grupo llamado "bacterias promotoras del crecimiento vegetal", o más abreviadamente con las siglas PGPR. Diferentes especies del taxón bacteriano considerado en este Capítulo, que incluye los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Alicyclobacillus* and *Aneurinibacillus*, fueron reportadas como promotoras del crecimiento de una gran cantidad de plantas. Ellas presentan varios mecanismos para promover dicho desarrollo vegetal y son frecuentemente reportadas como fijadoras de Nitrógeno atmosférico, productoras de fitohormonas (giberelinas, auxinas, citocininas, etileno, ácido indol-3-ácetico), solubilizadoras del fósforo y productoras de metabolitos antimicrobianos.

Sin embargo, se sabe poco sobre su actividad reguladora del crecimiento vegetal, con excepción de la producción de algunos compuestos antifúngicos. En términos generales el efecto benéfico que ocasionan es resultado de la suma de diferentes procesos que estas bacterias llevan a cabo. El accionar como agente biocontrolador de fitopatógenos fúngicos ha sido extensamente detallado y demostrado para varias especies.



Particularmente estas bacterias son organismos capaces de vivir y proliferar en ambientes de elevada temperatura y son especialmente fáciles de formular ya que resisten más que otros microorganismos, condiciones ambientales desfavorables tales como elevadas temperaturas, desecación,

pH extremos y contacto con otros plaguicidas y fertilizantes. Por esta razón, algunos autores señalaron que, entre los productos formulados con especies de PGPR, aquellos conteniendo *Bacillus* spp. ganan al momento de la comercialización (Nakeeran et al., 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- Bashan, Y. and Bashan, L. E. 2005. Bacteria / Plant Growth-Promoting. In: D. Hillel Ed. Encyclopedia of soils in the environment. Ed Elsevier, Oxford, U.K. V 1. p 103-115.
- Berkeley, R.C.W.; Logan, N.A.; Shute, A. and Capey, A.G. 1984. Identification of *Bacillus* species. In: Bergan, T. Methods in Microbiology V 16. Academic Press. London. p 291- 328
- Blackwood, K. S.; C. Y. Turenne; D. Harmsen, and A. M. Kabani. 2004. Reassessment of Sequence-Based Targets for Identification of *Bacillus* Species. J. Clin. Microbiol. 42(4):1626-1630.
- Cakmakci, R.; M.F.Domnez and U. Erdogan. 2007. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Barley Seedling Growth, Nutrient Uptake, Some Soil Properties, and Bacterial Counts. Turk J Agric For 31:189-199.
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore. V 2. p 1105-1139.
- Davis, B.D. 1978. Fisiología Bacteriana. En: Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., McCarty, M. Eds. Tratado de Microbiología, Ed Salvat Barcelona. p 19-153.
- De Freitas, J. R.; Banerjee, M. R.; and Germida, J. J. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biol. Fert. Soils. 24:358-364.
- Dong, X.; and J. C. Cote. 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:695-704.
- Euzéby, J.P. 2008. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Bacillus* (<http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html>).
- Fernando, W.G.D; Nakkeeran; S and Zhang, Y. 2005. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relations in biocontrol of plant diseases. In: Siddiqui, Z. A. Ed. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. Netherlands. p 67-109.
- Fuentes-Ramirez, L.E. and Caballero-Mellado, J. 2005. Bacterial Biofertilizers. In Siddiqui, Z. A. Ed. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. Netherlands. p 143-172.
- Gherna, R.L. 1994. Culture preservation. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. Eds. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC. p 278-292.
- Gordon, R.E.; Haynes, W.C. and Pang, C.H.N. 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook N 427. U.S. Department of Agriculture, Washington DC. p 283.



Gutierrez-Manero, F. J.; Ramos-Solano; B.; Probanza; A.; Mehouchi, J.; Tadeo, F. R.; and Talon, M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiological active gibberellins, *Physiol. Plantarum* 111:206-211.

Haggad, W.M. 2007. Colonization of exopolysaccharide-producing *Paenibacillus polymyxa* on peanut roots for enhancing resistance against crown rot disease. *African J. Biotechnol*, 6:1568-1577.

Igual, J.M.; A. Valverde; E. Cervantes y E. Velázquez. 2001. Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*. 21:561-568.

Khan, M.S.; A. Zaidi y P.A. Wani. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 27:29-43.

Kloepper, J. W.; Lifshitz, R.; and Zablotowicz, R. M. 1989 Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*. 7:39-44.

Kokalis-Burelle, N.; Vavrina, C. S.; Roskopf, E. N.; and Shelby, R. A. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida, *Plant Soil* 238:257-266.

Lebuhn, M.; Heulin, T.; and Hartmann, A. 1997. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol. Ecol*. 22:325-334.

Nakeeran, S.; W.G. Dilantha Fernando and Z.A. Siddiqui. 2005. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations and its Scope in Commercialization for the Management of Pests and Diseases. In: Siddiqui Z.A. Ed. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordrecht, The Netherlands. p 257-296.

Rodríguez, H. y R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17:319-339.

Rojas, A.; Holguin, G.; Glick, B.R.; Bashan, Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 35 (2), 181-187.

Sauka, D.H. y Benintende, G.B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Arg. Microbiol*. 40:124-140.

Siddiqui, Z.A. 2005. PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. In: Siddiqui Z.A. Ed. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordrecht, The Netherlands. p 111-142.

Timmusk, S.; Nicander, B.; Granhall, U. and Tillberg, E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*, *Soil. Biol. Biochem*. 31:1847-1852.

Toro, M.; R. Azcón y J.M. Barea. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol*. 63:4408-4412.

Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant Soil* 255:571-586.





Capítulo 4

LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES COMO BIOINOCULANTES

Godeas, Alicia

Investigadora principal CONICET. Profesora titular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 4to piso. Pabellón 2. Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

e-mail: aliciagodeas@yahoo.com

INTRODUCCION

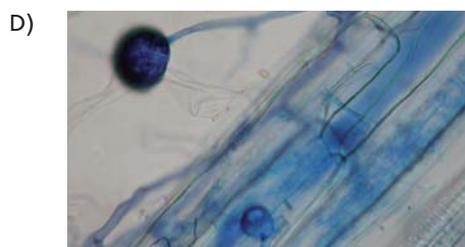
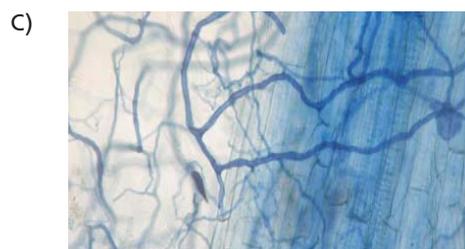
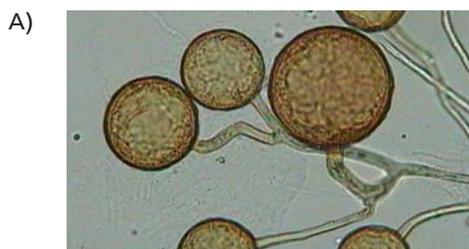
La mayoría de las plantas terrestres tienen en sus raíces una asociación simbiótica con las Glomerales, un grupo de hongos filamentosos presente en el suelo. Estos organismos se encuentran formando parte de la microflora de un determinado sitio, en dos formas infectivas, como esporas (Fig 1 a, b) y como hifas (Fig 1 c, d). Constituye una asociación benéfica para el crecimiento y salud vegetal. Cuando se produce la simbiosis, la planta aporta fotosintatos y el hongo, nutrientes insolubles tales como fósforo (P), cobre (Cu) y zinc (Zn).

Figura 1. Estructuras características de raíces de trébol colonizadas por *Glomus* sp. (A) Esporas 400x. (B) Esporas con micelio 100x. (C) Micelio externo 100x. (D) Detalle de la colonización 400x.

Como resultado de esta asociación se producen hifas que crecen sincronizadamente con la raíz, algunas de ellas especializadas (arbusculos) (Fig 1 d) a nivel de los cuales se produce el intercambio de nutrientes. Esta colonización recibe el nombre de micorriza (hongo-raíz). La importancia de esta asociación se debe a que por medio de ella se produce un contacto más amplio entre el suelo y la planta.

El hongo actúa como agente de transporte de nutrientes desde la solución del suelo y a través de las hifas explora un volumen mayor que el de una raíz sin simbiosis.

El suelo posee inóculo nativo o autóctono que coloniza las raíces de las plantas nativas o cultivadas que se introducen en el lugar. Este





inóculo nativo puede ser reemplazado por otro más eficiente seleccionado previamente.

La inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA o AMF: sigla proveniente del inglés Arbuscular Mycorrhizal Fungi) tiene un valor potencial para aumentar la producción de los cultivos y desde los '70 se ha tratado de aplicar esta herramienta. Sin embargo, la dificultad en la producción de inóculo debido a su naturaleza biotrófica ha sido el mayor obstáculo para poner la inoculación en práctica (Saito and Marumoto, 2002).

Cualquier inoculante micorrícico se inicia en maceta con sustrato estéril y plántulas producidas a partir de semillas de especies hospedantes a las cuales se le agrega inóculo total formado por esporas, raíces colonizadas o una mezcla de ambas. Las jóvenes plántulas son colonizadas y durante su desarrollo las raíces y la rizósfera se enriquecen de propágulos. Esta metodología permite iniciar una línea de inóculo primaria.

La forma más común de reproducir inóculo es en contenedores, usando medios sin suelo tales como corteza, perlita, vermiculita o arcilla expandida pura o formando parte de mezclas, la producción de inóculo en estos medios es alta, en niveles de P bajos o moderados. Métodos adicionales para reproducir el inóculo son la hidroponía, la técnica del film de nutrientes (aeroponía) donde se bañan las raíces con soluciones nutritivas permitiendo una buena aireación de las mismas. Todas estas técnicas tienen como dificultad máxima mantener la pureza del inóculo.

Si bien estos hongos no se han podido cultivar en medios artificiales, su cultivo ha sido exitoso usando raíces de zanahoria transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, una bacteria gram negativa del suelo que induce la formación de ramificaciones en raíces de dicotiledóneas. Este sistema permite la propagación en condiciones axénicas de las micorrizas arbusculares. Sin embargo, hay una serie de obstáculos en la propagación masiva de estos cultivos.

El sistema axénico ha sido desarrollado en laboratorio por Strullu y Romand (1986, 1987) y Becard y Fortín (1988); sin embargo, la producción a mayor escala se debe a Adholeya et al. (2005) obteniendo concentraciones de propágulos de 250.000-30.000 por 100 mL de medio de crecimiento después de 3 meses.

IMPACTO EN LA AGRICULTURA

Como las plantas colonizadas son capaces de obtener nutrientes del suelo y poseen una mayor resistencia al stress ambiental, esta simbiosis fúngica tiene características de biofertilizante y protector de los cultivos. El aumento de la absorción de los nutrientes hace pensar en la reducción de la aplicación de fertilizantes químicos, y la protección ante las enfermedades, en la reducción de pesticidas alcanzándose en ambos casos un nivel similar de productividad.

Además, con un apropiado manejo de las micorrizas es posible también mantener la calidad del suelo y la sustentabilidad mientras se protege el ambiente a largo plazo disminuyendo la contaminación de las aguas superficiales por reducción de los químicos y se reducen los costos de producción al disminuir los costos de las labores agrícolas, mientras se mantienen los campos a su más alto nivel.

Un germoplasma micorrícico de alta calidad es necesario para soportar y acelerar el uso de micorrizas como biofertilizante en la agricultura.

DISPONIBILIDAD Y COSTO DEL INOCULO MICORRÍICO

Las fuentes de inoculantes micorrícicos aumentan diariamente. Varios años atrás solo 2 compañías norteamericanas eran las únicas proveedoras de inoculantes micorrícicos.

En la actualidad las empresas han crecido en número (Tabla I) y los costos varían entre 2 US\$

Tabla 1. Algunos de los inoculantes micorrízicos producidos, ordenados según país. Nombre del producto y características de los mismos de acuerdo con la información disponible en internet.

País	Empresa	Nombre del producto	Formulación - Tipo/SP	Número de Propágulos	Otros
Argentina	Biominales SRL	Fosfoactiv	Mixto + <i>Azospirillum</i> + <i>Rhizobium</i>	N/I	Hormonas de crecimiento vegetal + micronutrientes.
	Crinigan SA	Crinigan	N/I	N/I	N/I
Canadá	Premier tech	Pro mix BX	<i>G. intraradices</i>	N/I	N/I
	Reforestation technologies Int	AM120	<i>G. intraradices</i>	120 propágulos/cm ³	N/I
Chile	Bio Triton SA	Mycosym tri-ton	Mixto de especies <i>Glomus</i>	200 Propágulos infectivos /cm ³	N/I
EEUU	Becker Underwood	Rhizanova	Mixto: <i>Glomus</i> sp y <i>Gigaspora</i> sp.)	80 propágulos/g	Ácidos húmicos, Nutrientes orgánicos.
	Bio-organics	Inoculante micorrízico	Inoculo mixto: <i>G. aggregatum</i> , <i>G. clarum</i> , <i>G. G. mosseae</i> , <i>Gi. margarita</i> y <i>Paraglomus brasilianum</i>	50 propágulos/cm ³	N/I





País	Empresa	Nombre del producto	Formulación - Tipo/SP	Número de Propágulos	Otros
EEUU	Bioscientific Inc	Bu Rize	Monoespecifico <i>G. intraradices</i>	2 propágulos vivos/cm ³	N/I
	Bio Terra Technology	Bioterra Plus	Mixto. (<i>Gi. rosea</i> , <i>G. deserticola</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>G. eutunicatum</i> ,	N/I	N/I
	Plant Haealth Care Inc	Mycor	Mixto (<i>Entrophospora columbiana</i> , <i>G. clarum</i> , <i>G. eutunicatum</i> , <i>G. intraradices</i>)	530 propágulos por libra	Formonetrina.
Japón	Central Glass Co	Cerakingkong	<i>G. intraradices</i>	N/I	N/I
Malasia	Malaysian Agri Hi-Tech	Mycogold	N/I	N/I	N/I

G.: *Glomus*, Gi.: *Gigaspora*, N/I No informa.



y 40 US\$ el kilogramo de inóculo micorrícico. Los costos de aplicación varían con la marca del producto y su uso es aconsejable sólo cuando la respuesta del cultivo llega a compensar los costos del proceso de inoculación.

CEPAS MÁS FRECUENTEMENTE UTILIZADAS

Las micorrizas arbusculares carecen de especificidad pero su utilización está modificada por su especificidad ecológica. Los formulados que contienen más de una especie son más exitosos que los mono-específicos. Las condiciones nutricionales del suelo juegan un rol importante en la introducción y supervivencia de especies exóticas. En la elección del inoculante se debe tener en cuenta que en los suelos con alta fertilidad aquellos en base a especies del género *Glomus* son los más exitosos. En contraste, los inoculantes con base de especies de los géneros *Scutelospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora* dan mejores resultados en suelos con baja cantidad de nutrientes y poco aireados.

Algunas especies tal como *Glomus intraradices* son usados en un amplio rango de suelos agrícolas mientras que las especies de *Acaulospora* están restringidas a suelos ácidos tropicales. Debido a la tolerancia de *G. intraradices* y especies afines, frecuentemente se las utiliza en la mayoría de las formulaciones de inoculantes.

RESPUESTA AGRONÓMICA

Existen plantas con diferente dependencia micorrícica. Familias como las leguminosas, compuestas y las gramíneas, sobre todo aquellas cultivadas, son dependientes en menor o mayor grado de la simbiosis (Al Karaki et al., 2004). Familias de plantas como las crucíferas, amarantáceas, ciperáceas entre otras, no son colonizadas por las micorrizas arbusculares. El éxito de la inoculación en términos de respues-

ta de la planta depende de la cepa introducida y las características del suelo siendo los niveles de fósforo el factor determinante (Johnson et al., 1992). Niveles de fósforo por encima de 20 ppm reduce el número de esporas y la colonización de la raíz no observándose respuesta.

La complejidad del ambiente biológico del suelo dada por artrópodos fungívoros y microflora del suelo modula esta respuesta. Las condiciones físico químicas del suelo dadas por el pH, temperatura y textura gobiernan también el efecto de la inoculación.

La dependencia micorrícica está relacionada con la especie de planta y los niveles de P presentes en el suelo.

TRAZABILIDAD MICROBIOLÓGICA

Las micorrizas arbusculares son habitantes normales del suelo, solo es posible la trazabilidad microbiológica de la cepa incorporada utilizando métodos de biología molecular que permiten caracterizar con precisión la especie incorporada y seguirla posteriormente en la raíz y en el suelo (Di Bonito et al., 1995, Daniell et al., 2001, Anderson and Cairney, 2004, Saito et al., 2004).

CONCLUSIONES

La aplicación de las micorrizas arbusculares en cultivos extensivos es aún muy difícil por lo complicado de su reproducción en medios axénicos, más cercano se encuentra la incorporación de esta tecnología a cultivos que tienen un período de invernadero, ya sea como plantines de semilla (Saggin and Ribeiro da Silva, 2006) o como estacas (Marin, 2006). En estos casos los cultivos salen del invernadero con una colonización alta que les permite adaptarse mejor a las condiciones de campo. La micorriza nativa



reemplaza al inoculante; pero sin embargo, la posibilidad de sobrevivir de los plantines es mayor por la protección de estos en la primera etapa de crecimiento en condiciones no controladas. La incorporación de estos microorganismos es importante también en especies de plantas micropropagadas.

Los mayores problemas que presentan estos inoculantes son: a) la pureza del inóculo, b) la permanencia de este en el suelo, y c) costo del inoculante.

Los inoculantes tal como se fabrican en diferentes países necesariamente deben pasar un control de calidad de pureza del inóculo muy estricto ya que pueden ser portadores de enfermedades de origen bacteriano o fúngico.

La tecnología de producción axénica necesita el desarrollo necesario para la producción

masiva de inoculantes que llevará a una reducción de los costos ya que esto constituye uno de los obstáculos mayores de su aplicación (Adholeya et al., 2005).

La permanencia en el suelo en general es baja, siendo este reemplazado por la población micorrícica existente. Hasta donde se sabe no existen trabajos generalizados de seguimiento del inoculante.

El costo de la producción de inóculo es un serio problema porque muchas veces no es competitivo en precio con la fertilización fosforada. Si bien los productores entienden la importancia de los sistemas agrícolas sustentables la reducción de agregado de P por el uso AM inóculo fúngico esto no justifica su uso en términos económicos excepto en los casos de cultivos de alto valor (Saito and Marumoto, 2002).

BIBLIOGRAFÍA

- Adholeya, A.; Tiwari, P. and Singh, R. 2005. Large-scale inoculum production of arbuscular mycorrhizal fungi on roots and organs and inoculation strategies. En: *In vitro culture of mycorrhizas*. 315-338. Ed: S Declerck, D-G. Strullu y A. Fortin. Springer. Berlin.
- Al-Karaki, G.; McMichel, B.; Zak, J. 2004. Field response of wheat to AM fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14:263-269.
- Anderson, I. and Cairney, J. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ microbiol* 6:769-779.
- Becard, G. and Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular arbuscular mycorrhizal formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108:211-218.
- Daniell, T.J.; Husband, R.; Fitter, A.H.; Young, J.P.W. 2001. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol Ecol* 36:203-209.
- Di Bonito, R.; Elliott, M.L.; Des Jardin, E.A. 1995. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with PCR. *Appl Environ microbiol* 61:2809-2810.
- Johnson, N.C.; Tilman, D. and Wedin, D. 1992. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology* 73:2034-2042.
- Marin, M. 2006. Arbuscular mycorrhizal inoculation in nursery practice. En: *Handbook of microbial biofertilizers*. 289-324. Ed: MK Rai. The Haworth Press Inc. Nueva York.
- Saggin, O.J. and Ribeiro da Silva, E.M. 2006. Production of seedlings inoculated with Arbuscular mycorrhizal fungi and their performance after outplanting. En: *Handbook of microbial bioferti-*



zers. 353-394. Ed: MK Rai. The Haworth Press Inc. Nueva York.

Saito, K.; Suyama, Y.; Sato S. and Sugawara K. 2004. Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14:363-373.

Saito, M. and Marumoto, T. 2002. Inoculation with arbuscular Mycorrhizal fungi: the status quo in Japan and the future prospects. *Plant soil* 244: 273-279.

Strullu, G.D. and Romand, C. 1987. Culture axenique des vesicules isolees a partir d'endomycorrhizes et reassociation in vitro a des racines de tomate. *CR Acad Sci Paris* 305:15-19.

Strullu, G.D. and Romand, C. 1986. Methodes d'obtention d'endomycorrhizes a vesicules et arbuscules en conditions axeniques. *CR Acad Sci Paris* 303:245-250.





Capítulo 5

EMPLEO DE *Azotobacter* COMO INOCULANTE EN CULTIVOS EXTENSIVOS

Rubio, Esteban Julián y Peticari, Alejandro.

Ingenieros Agrónomos. Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), IMYZA, CNIA, INTA Castelar. Los Reseros y Las Cabañas s/n (1712), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

e-mail: erubio@cnia.inta.gov.ar

INTRODUCCION

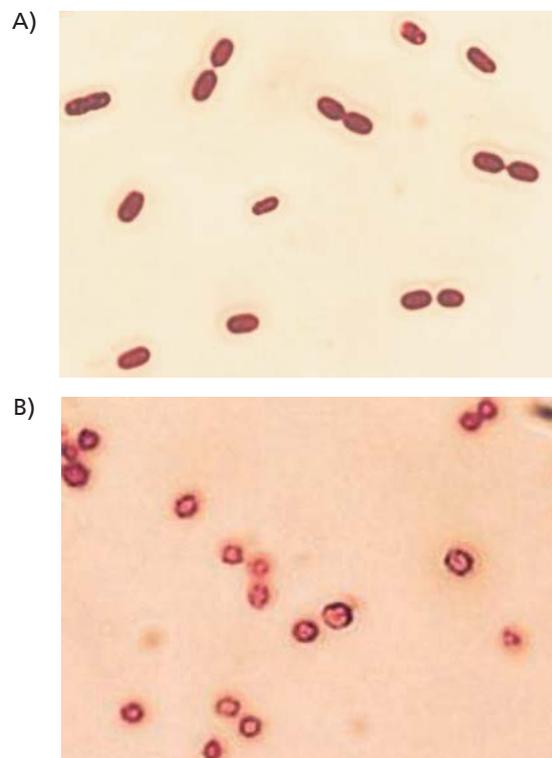
Azotobacter es uno de los primeros microorganismos que ha sido empleado en la inoculación de los cultivos como promotor de crecimiento. En la ex-Unión Soviética se desarrolló un extenso programa de inoculación con *Azotobacter* durante las décadas del 30, 40 y 50 (Mishustin y Naumova, 1962). Luego, debido a la inconsistencia en los resultados, su empleo como inoculante disminuyó. Sin embargo, algunos países tales como Egipto, Pakistán, Cuba e India continuaron estudiando y promoviendo su uso.

Características generales del Género *Azotobacter*

Las bacterias del género *Azotobacter* son fijadoras de nitrógeno de vida libre que se encuentran generalmente en suelos de pH levemente ácido a alcalino. Poseen células gram negativas, de gran tamaño y formas que pueden variar desde bacilos rectos con bordes redondeados, elipsoidales hasta cocos dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo. Son aerobios estrictos, de crecimiento heterotrófico y existen especies móviles y no móviles. Ante factores ambientales adversos tales como la desecación y la radiación UV, tienen la capacidad de formar estructuras de resistencias denominadas quistes (Kennedy et al., 2005) (figura 1).

Según la edición 2005 del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Kennedy et al., 2005), el género *Azotobacter* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* de la subclase *gamma-Proteobacterias*. Las especies comprendidas en el género son siete: *A. chroo-*

Figura 1. Tinción de gram de *Azotobacter* sp. a) Células vegetativas, b) Quistes.





coccum, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* y *A. salinestris*. La especie aislada con mayor frecuencia de los suelos es *A. chroococcum*. Rubio et al., (2007), aislaron cepas pertenecientes a las especies *A. chroococcum*, *A. salinestris* y, en menor proporción *A. armeniacus*, de suelos de diferentes regiones de la República Argentina.

La capacidad de *Azotobacter* de estimular el crecimiento de las plantas ha sido comprobada por numerosos investigadores. Además de la fijación de nitrógeno, otras propiedades tales como la capacidad de solubilizar fosfatos, la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas, sideróforos y sustancias antifúngicas son considerados como responsables del efecto positivo sobre los vegetales. Algunos autores postulan que la producción de auxinas y otros reguladores del crecimiento vegetal podrían ser el mecanismo principal que explicaría los efectos beneficiosos de *Azotobacter* (Zahir et al., 2005). Sin embargo, de manera similar a lo que ocurre con otras bacterias PGPR, la promoción del crecimiento sería consecuencia de la acción sinérgica de varios mecanismos (Behl et al., 2006).

EFFECTO DE *Azotobacter* SOBRE EL RENDIMIENTO

Es extensa la literatura en la que se cita el efecto positivo de la inoculación con *Azotobacter* sobre el rendimiento de diferentes cultivos. En 1926, investigadores rusos desarrollaron un inoculante a base de *Azotobacter*, denominado "*Azotobacterin*", el cuál fue empleado ampliamente en la ex-Unión Soviética. A fines de la década del 50, en el mismo país, se hicieron numerosos ensayos a campo con el objetivo de evaluar la efectividad del *Azotobacter*. Alrededor de un tercio de los ensayos presentaron incrementos en los rendimientos, los cuáles fueron aproximadamente de un 10 % (Mishustin y Naumova, 1962). Si bien este porcentaje era menor de lo reportado en los primeros ensayos, no deja de ser un beneficio importante en el rendimiento.

Además del efecto directo sobre el rendimiento, algunos investigadores observaron que inoculando con este microorganismo se puede reducir la fertilización nitrogenada del cultivo. Zambre et al. (1984), evaluaron *Azotobacter* en un ensayo a campo en trigo y diferentes dosis de N y obtuvieron un rendimiento similar entre el tratamiento inoculado con 90 kg/ha de N y el no inoculado fertilizado con 120 kg/ha de N, lo cual significaría la posibilidad de disminuir la dosis de fertilización en 30 kg/ha de N sin afectarse el rendimiento.

En la tabla I se presenta un resumen de los ensayos de campo publicados en revistas científicas de la década del 80 en adelante, en los cuáles se obtuvieron resultados positivos en la inoculación de cultivos extensivos con *Azotobacter*. Se incluyen además dos ensayos realizados en las últimas campañas en Argentina por el Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV). En la búsqueda bibliográfica realizada, no se han encontrado otros reportes de ensayos a campo realizados en el país con *Azotobacter*. El rango de los incrementos en el rendimiento reportados es muy amplio y varía desde un 5 % hasta un 474%. En algunos casos, la inoculación además incrementó la absorción de N por parte del cultivo, así como su porcentaje en grano. Lamentablemente, luego de las experiencias realizadas en la ex-Unión Soviética, no se han publicado trabajos en los cuáles se hayan realizado ensayos a campo con continuidad agronómica (más de dos años de experimentación).

Desde el año 2004 y hasta la actualidad, en el Laboratorio de BPCV se realizan aislamientos de *Azotobacter* de diferentes suelos del país con el objetivo de seleccionar cepas de dicho género para el desarrollo de un inoculante para los cultivos de trigo y maíz.

Patogenicidad

Desde el descubrimiento del género *Azotobacter*, hace ya más de 100 años, no

Tabla I. Ensayos a campo de cultivos extensivos inoculados con Azotobacter. *la fertilización se aplicó a todos los tratamientos ** nd: dato no disponible ***s: incremento estadísticamente significativo, ns: incremento estadísticamente no significativo.

Cultivo	País	Forma de inoculación	Nº de años	Fertilización*	Incremento %		Fuente
					Rendimiento	Ntotal Ngrano	
Trigo	India	Semilla	1	NPK SinN	19,2 s** 5 ns	nd*** nd	3 3 Zambreet al., 1984
Trigo	Egipto	Semilla	1	NP SinN	9 ns	nd	nd Ishacet al., 1986
Trigo	Pakistán	Semilla	1	NPK	44,1 s	nd	nd Khalidet al., 1999
Trigo	Argentina (Castelar, Bs As.)	Semilla	1	no	4,7 ns 18,3 s	35 nd	12,8 nd IMYZA(2006)
Trigo	Argentina (Pieres, Bs As.)	Semilla	1	no	6,5 ns	nd	nd IMYZA(2006)
Trigo	India	Semilla	2	no	78 s	35	61 Khan y Zaidi, 2007
Trigo	Turkia	Semilla	1	no	84 s	nd	30 Kizilkaya, 2008
Maíz	Pakistan	Base planta a 16 días de siembra	1	NPK	13 s	24,6	nd Zahiret al., 2005
Maíz	Pakistán	Semilla	1 1	NP no	15,89 s 19,7 s	42,7 32,8	1 11 Hussain et al., 1987
Maíz	India(Sitio subtropical) India(Sitio templado)	Semilla	1 1	no no	474 s 17,3 ns	131 nd	nd nd Pandey et al., 1998
Arroz	India	Foliar	1	PK	7,6 s	nd	nd Kannayan et al., 1980
Arroz	Egipto	nd	nd	nd	20 s	nd	nd Kennedy et al., 2004

*la fertilización se aplicó a todos los tratamientos ** nd: dato no disponible.

***s: incremento estadísticamente significativo, ns: incremento estadísticamente no significativo.



se han citado casos de patogenicidad en humanos, animales ni vegetales. Tampoco casos de daño al ecosistema en los lugares que ha sido empleada durante varios años como inoculante (ex-Unión Soviética, India, Egipto, Pakistán, Cuba).

Formulaciones comerciales

No existen actualmente productos comerciales registrados en el SENASA que tengan en su formulación *Azotobacter*. En otros países existen formulaciones tanto sólidas (en turba, vermiculita, compost, lignita) como líquidas. Los inoculantes líquidos, más comunes en los últimos años, se basan en la capacidad de *Azotobacter* de producir quistes, propiedad que permite una mayor sobrevivencia de la bacteria en el tiempo.

Control de calidad

No se pueden establecer hasta no contar con cepas y formulados. De todas maneras, el control de calidad de los inoculantes en base a *Azotobacter* en otros países es similar al realizado con otros inoculantes bacterianos, tales como los formulados con *Azospirillum*. La utilización de técnicas moleculares como el análisis de restricción del gen ribosomal 16S amplificado por PCR (ARDRA) y el BOX-PCR permiten la identificación a nivel de especie y cepa respectivamente. (Rubio et al., 2007).

Es importante destacar que los controles de la efectividad dependerán del mecanismo de promoción del crecimiento a través del cual fue seleccionada la cepa. Por lo tanto, es útil medir fijación de N, solubilización de fosfatos, estimulación del crecimiento radicular, producción de ácido indolacético, etc. A manera de ejemplo, se presentan en la Tabla II, los parámetros de calidad fijados por el Indian Standards Institution (ISI) para *Azotobacter* en la India.

Tabla II. Algunos parámetros de calidad establecidos por el Bureau of Indian Standard para inoculante a base de *Azotobacter* (Mishra 2008).

Parámetro	Inoculante a base de <i>Azotobacter</i>
Nº de células viables dentro de los 15 días de fabricación	Mayor a $1 \cdot 10^7$
Nº de células viables dentro de los 15 días antes del vencimiento	Mayor a $1 \cdot 10^6$
Período de vencimiento	6 meses a partir de la fecha de fabricación
Contaminación permitida	Sin contaminación en la dilución 10^6
pH	6,5 - 7,5
Test de eficiencia	Capaz de fijar 10 mg de N por g de sacarosa consumida

CONCLUSIONES

El empleo de esta bacteria en Argentina está en pleno proceso de investigación tanto en estudios básicos como aplicados. Se destaca su importancia como fijador de N₂ en el suelo, como productor de fitohormonas y por su capacidad de solubilizar fosfatos.

De la información documentada se observa que la inoculación de cultivos extensivos con *Azotobacter*, bajo ciertas condiciones, produce incrementos en los rendimientos de cultivos de trigo y maíz. No hay suficiente evidencia reportada en las condiciones de cultivo en Argentina.



BIBLIOGRAFÍA

Behl, R. K.; Narula, N.; Vasudeva, M.; Sato, A.; Shinano, T. and Osaki, M. 2006. Harnessing wheat genotype x *Azotobacter* strain interactions for sustainable wheat production in semi arid tropics. *Tropics*. 15 (1): 121-133.

Hussain, A.; Arshad, M.; Hussain, A.; and Hussain, F. 1987. Response of maize (*Zea mays*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. *Biol. Fertil. Soils* 4:73-77.

Ishac, Y. Z.; El-Haddad, M. E.; Daft, M. J.; Ramadan, E. M. and El-Demerdash, M. E. 1986. Effect of seed inoculation, mycorrhizal infection and organic amendment on wheat growth. *Plant Soil* 90: 373-382

Kannaiyan, S.; Govindarajan, K. and Lewin, H.D. 1980. Effect of foliar. spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. *Plant Soil*. 56:487-490

Kennedy, C.; Rudnick, P.; MacDonald, M. and Melton, T. 2005. Genus III: *Azotobacter*. En: Garrity (ed.). *Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Vol. Two. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. pp. 384-402.

Kennedy, I.R.; Choudhury, A.T.M.A. and Kecskes, M.L. 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 Z. A.; Waseem, A. and Arshad, M. 1999. *Azotobacter* and L-tryptophan application for improving wheat yield. *Pak. J. Bio. Sci.*, 2: 739-742

Khan, M.S. and Zaidi, A. 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.

Kizilkaya, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering* 33: 150-156.

Mishra, B. 2008. Quality Control of Biofertiliser and organic manures. ISI Standards Specifications for *Azotobacter*. Disponible en <http://www.sameti.org/ORGANICFARMING/Quality%20control%20bioferts-1.pdf>. 20 de enero de 2009.

Mishustin, E. N. and Naumova, A. N. 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mechanism of action. *Mikrobiologija*, 31: 543-545.

Pandey, A.; Sharma, E. and Palni, L. M. S. 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming system of the Sikkim Himalaya. *Soil. Biol. Biochem*. 30: 379-384.

Rubio, E. J.; Montecchia, M. S.; Peticari A. y Correa O. S. 2007. Diversidad De *Azotobacter*. En *Suelos Argentinos. VI Reunión Nacional Científico Técnica de Biología del Suelo y VI Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Libro de Resúmenes. Universidad Nacional de Río Cuarto.* p.159

Zahir, A. Z.; Asghar, H. N.; Akhtar, M. J. and Arshad, M. 2005. Precursor (L-tryptophan)-Inoculum (*Azotobacter*) Interaction for Improving Yields and Nitrogen Uptake of Maize. *J. of Plant Nutrition*. 28: 805-817.

Zambre, M. A.; Konde, B. K. and Sonar, K.R. 1984. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. *Plant Soil*. 79: 61-67.





Capítulo 6

EL FUTURO DE LOS INOCULANTES: HACIA EL DESARROLLO DE CONSORCIOS MICROBIANOS PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.

Fischer, Sonia¹ y Jofré, Edgardo^{1*}

¹Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Docentes de la Universidad Nacional de Río Cuarto e Investigadores de CONICET.

*Corresponding author: Present address: Edgardo Jofré. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36- Km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Phone: 54 (358) 4676438; Fax: 54 (358) 4676230.

e-mail: ejofre@exa.unrc.edu.ar

INTRODUCCION

Según estimaciones de la FAO, para el 2.030 las necesidades de alimento ascenderán a 9300 millones de toneladas anuales en el mundo. En el 2.000, esa cifra era de 5.500 millones de toneladas.

Teniendo en cuenta que nuestro país está entre los principales exportadores mundiales de granos, Argentina se enfrenta al desafío de aumentar considerablemente la productividad agrícola (Bolsa de cereales de Córdoba, 2005).

La superficie total de la Argentina es de 274 millones de hectáreas, de las cuales 142 millones están bajo pasturas o praderas permanentes, 34 millones bajo cultivos anuales y un millón de hectáreas bajo cultivos perennes (FAO, 2004).

La agricultura moderna ha multiplicado los impactos negativos sobre el medio ambiente debido al empleo de fertilizantes químicos, para incrementar la productividad agrícola y de pesticidas, para el control de plagas y enfermedades de los cultivos. El uso de fertilizantes en la agricultura argentina se incrementó casi ocho veces en los últimos 15 años, alcanzando unos 1,6 millones de toneladas

anuales. Los productos más empleados son los que proveen nitrógeno (57%) y fósforo (36%), aplicándose fundamentalmente en cultivos de trigo y maíz, incrementado considerablemente, de esta manera, los costos de los cultivos extensivos. Existen evidencias que hacen pensar que los suelos están perdiendo más nutrientes que los repuestos por la fertilización, con lo cual, en los próximos años se esperaría una reducción marcada de estos nutrientes en los suelos agrícolas (Satorre, 2005).

La posibilidad de utilizar mezclas (consorcio) con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) que interactúen sinérgicamente, es una tecnología muy poco explotada y los beneficios que esta aporta parecen ser mayores en comparación con las inoculaciones simples.

Estudios de inoculación en plantas indican que algunas mezclas de PGPR, que interactúan entre ellas de manera sinérgica, proveen nutrientes a la planta, remueven productos inhibitorios y se estimulan unas a otras mediante actividades físicas o bioquímicas, que podrían aumentar algunos aspectos benéficos de su fisiología, como por ejemplo, la fijación de nitrógeno (Bashan, 1998).



CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Desde la década del 80, las rizobacterias y otros microorganismos de suelo han sido estudiados como posibles reemplazantes de químicos usados tanto como fertilizantes, como así también, para el control de un amplio rango de enfermedades de plantas. Estas rizobacterias, conocidas colectivamente como PGPR, son microorganismos de suelo e incluyen especies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Glick, 1995). Estas PGPR afectan el crecimiento de la planta de forma directa o indirecta. En cuanto a la promoción directa, las PGPR pueden: fijar nitrógeno; producir sideróforos, que solubilizan y secuestran el hierro del suelo y lo proveen a la planta; sintetizar distintas fitohormonas, que actúan en varias etapas del crecimiento de los vegetales; pueden tener mecanismos para la solubilización de minerales, tales como el fósforo; producir la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminasa, que hidroliza el ACC (un precursor del etileno) y por lo tanto disminuye los niveles de etileno en las plantas en desarrollo; y/o sintetizar compuestos volátiles como acetoina y el 2,3-B, que estimulan el crecimiento de la planta. (Jacobson et al., 1994; Glick, 1995; Ryu, 2003, 2004; Lugtenberg et al., 2004; Mayak et al., 2004; Ping et al., 2004).

Los estímulos indirectos, incluyen una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe el crecimiento de los fitopatógenos entre ellos, la producción y secreción de sideróforos, que secuestra el hierro disponible en la rizósfera y como resultado previene que cualquier patógeno vecino prolifere debido a la falta de hierro; la producción de un amplio rango de compuestos antimicrobianos (Ongena et al., 2005b); de cianuro de hidrógeno, que inhibe algunos hongos; la hidrólisis de ácido fusárico, que es el agente causante

de daños en plantas infectadas con *Fusarium* e hidrólisis de la pared celular de hongos patógenos (Glick, 1995; Lugtenberg et al., 2004); la competición por nutrientes y nichos convenientes en la superficie de la raíz (Bais et al., 2004; Timmusk et al., 2005); la activación de sistemas de defensa del hospedador mediante resistencia sistémica inducida (Ongena et al., 2005a).

TIPOS DE INTERACCIONES ENTRE MICROORGANISMOS PGPR

En la actualidad existe un interés cada vez mayor en entender las actividades cooperativas que existen en las poblaciones microbianas de la rizosfera y cómo aquellas pueden ser aplicadas a la agricultura (Barea et al., 2005).

Existen diversos tipos de interacciones entre organismos que habitan la rizosfera, entre los cuales podemos mencionar:

Bacterias PGPR de vida libre y fijadores de nitrógenos simbióticos

Cepas pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* pueden interactuar simbióticamente con leguminosas y formar nódulos en las raíces; en estos nódulos se lleva a cabo el proceso de fijación del nitrógeno (Relic et al., 1994). Algunas PGPR, como por ejemplo *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Serratia* y *Aeromonas* (Saxena et al., 2006), pueden mejorar la nodulación y la fijación de nitrógeno en plantas de leguminosas (Barea et al., 2005).

Estudios de coinoculación con PGPR de vida libre y *Rhizobium* han demostrado incrementos en el peso seco radical y de la parte aérea, el vigor de la planta, la nodulación y el nitrógeno fijado en varias leguminosas. Una de las coinoculaciones más ensayada es la de



Azospirillum-Rhizobium. El mecanismo por el cual *Azospirillum* actúa como un "colaborador" en la interacción *Rhizobium*-leguminosa es mediante la producción de fitohormonas, que promueven la diferenciación de células epidérmicas en los pelos radicales, incrementando de esta manera el número de sitios potenciales para la infección rizobiana; lo que conduce a un mayor número de nódulos (Andreeva et al., 1993). Así por ejemplo, experimentos a campo con lenteja han demostrado que la coinoculación de *Azospirillum-Rhizobium* aumentó significativamente el número total y peso de los nódulos, dando un importante incremento en la producción (Yadav et al., 1992). Recientemente, Remans et al. (2008a) evaluaron el efecto de la coinoculación de *Rhizobium-Azospirillum* sobre la producción de dos variedades de poroto (BAT477 y DOR364). En el caso del genotipo DOR364, hubo un 29% de aumento en la producción y un incremento en el nitrógeno fijado cuando se inoculó con ambas cepas comparado con la inoculación simple con *Rhizobium*. Sin embargo, para la variedad BAT477 la coinoculación redujo la producción y el nitrógeno fijado, por lo que el efecto de *Azospirillum* sobre la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* parecería ser dependiente del genotipo de la planta huésped (Remans et al., 2007, 2008b). Por otro lado, Burdman et al. (1996) demostraron que *A. brasilense* también puede estimular la nodulación en poroto debido a que incrementa la secreción de flavonoides, compuestos fenólicos inductores de genes *nod*, en la leguminosa. Del mismo modo, *Serratia proteamaculans* 1-102 produce activadores inducibles de flavonoides que causan un efecto positivo en el intercambio de señales entre plantas de soja y *Bradyrhizobium* (Bai et al., 2002). En soja, la coinoculación de *P. fluorescens* 2137 y *B. japonicum* A1017 incrementó la colonización de *B. japonicum* A1017 en las raíces, el número de nódulos y la actividad de reducción del acetileno (ARA), se cree que *P. fluorescens*

2137 podría liberar sustancias que estimulan el crecimiento de la población rizobiana. Sin embargo, la coinoculación con *P. fluorescens* WCS365 mostró una disminución en el número de nódulos y ARA, a pesar de la leve estimulación del crecimiento de *B. japonicum* en las raíces, indicando que el efecto de la inoculación es dependiente de la cepa (Chebotar et al., 2001). Bai et al. (2003) evaluaron a campo el efecto de la coinoculación de *B. japonicum* cepas 532C o USDA110 con una de las tres cepas nativas de *Bacillus* (*B. subtilis* NEB4, *B. subtilis* NEB5 o *B. thuringiensis* NEB17) en plantas de soja. Los resultados obtenidos permitieron concluir que las cepas de *Bacillus* podrían estar produciendo reguladores u otros activadores que causaron una promoción en el crecimiento radical, lo cual resultó en una nodulación aumentada.

Bacterias fijadores de nitrógeno simbiótico y un agente de control biológico

El desarrollo de inoculantes para control biológico de enfermedades en plantas está basado en el uso de una sola cepa, sin embargo, una manera de mejorar el biocontrol en la rizosfera es la utilización de mezclas microbianas que tengan modos de acción diferentes o complementarios, ya que las interacciones múltiples es la situación que normalmente se puede encontrar en la rizósfera (Whipp, 2001).

Muchas de las rizobacterias usadas como agentes de control biológico estimulan la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Saxena et al., 2006). Así por ejemplo, Sindhu y Dadarwal (2001) demostraron que la coinoculación con *Pseudomonas* nativas y *Mesorhizobium* sp. *cicer* Ca181, aumenta la biomasa de los nódulos de leguminosas, debido a que, *Pseudomonas* es capaz de suprimir enfermedades fúngicas y *Mesorhizobium* de promover la nodulación. Por otro lado, cepas nativas del género *Pseudomonas* inhibieron el crecimiento de hon-



gos fitopatógenos e incrementaron el número de nódulos en garbanzos cuando se coinoculó con rizobios (Sindhu et al., 1999, 2002).

Bacterias de vida libre

Recientemente, ha despertado un gran interés la utilización de 2 o más cepas bacterianas de vida libre, con capacidades PGPR complementarias, para la formulación de inoculantes los cuales podrían ser usados en cereales y otras gramíneas. Así por ejemplo, se ha demostrado, en estudios a campo, que la inoculación combinada de *Azospirillum brasilense* y las bacterias solubilizadoras de fósforo *Pseudomonas striata* o *Bacillus polymyxa*, incrementan significativamente el número de granos, la materia seca y la captación de fósforo y nitrógeno, comparado con la inoculación simple (Alagawadi and Gaur, 1992). Por otro lado, la coinoculación de 3 cepas PGPR *Bacillus pumilus* INR7, *Bacillus subtilis* GB03 y *Curtobacterium flaccumfaciens* ME1 mostraron un mayor control contra varios patógenos en plantas de pepino, en comparación con las inoculaciones simples; así también, la evaluación a campo de semillas tratadas con las 3 PGPR demostró una promoción en el crecimiento de la planta y una reducción en las enfermedades, equivalente al uso del elicitador sintético Actigard aplicado como pulverizador (Raupach and Kloepper, 1998). Otro ejemplo, es la supresión de enfermedades en pepino causadas por el fitopatógeno *Fusarium* que fue mejorada cuando se uso una combinación de *Paenobacillus* spp. y *Streptomyces* comparado con la inoculación simple (Singh et al., 1999).

COMPATIBILIDAD ENTRE CEPAS

A la hora de formular un inoculante mixto se debe tener en cuenta la compatibilidad que existe entre las cepas del consorcio, de

manera de evitar fracasos cuando se utilicen a campo. En este sentido, un primer paso para analizar la compatibilidad entre cepas, es el estudio de antibiosis in vitro, para determinar si alguna de las cepas produce algún compuesto antimicrobiano que afecte el crecimiento del otro miembro del consorcio. Así por ejemplo, Fuhrmann y Wollum (1989) observaron que los sideróforos producidos por algunas *Pseudomonas* privaban de hierro a *Bradyrhizobium*, limitando el crecimiento de esta bacteria, con lo cual estas cepas no podrían ser usadas para la coinoculación. Por otro lado, cepas de *Streptomyces* productoras de antibióticos utilizadas en el control biológico de enfermedades de alfalfa, inhiben in vitro el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti*, además de tener un efecto negativo en el crecimiento de la planta cuando se coinocula; a pesar de que el número de nódulos no está disminuido significativamente es probable que el número de *S. meliloti* por nódulo o su tasa metabólica esté reducido, lo que llevaría a una disminución del nitrógeno fijado (Samac et al., 2003).

Otro aspecto a considerar, es la utilización de distintas fuentes de carbono para luego determinar el índice de solapamiento de nicho (NOI), definido como el número de fuentes de carbono utilizadas por ambas cepas como una proporción del número total de fuentes de carbono utilizadas por una de las cepas (Wilson and Lindow, 1994a).

$$\text{NOI} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de fuente de Carbono utilizadas por ambas cepas}}{\text{N}^\circ \text{ Total de Fuentes de Carbono utilizadas por una de las cepas}}$$

La completa coexistencia de una cepa bacteriana con otra es definida como "la capacidad de una cepa de alcanzar el mismo tamaño de



población en presencia o ausencia de la otra cepa" (Wilson and Lindow, 1994b). Cuando hay una competición completa, las poblaciones están limitadas por los mismos recursos; mientras que un alto nivel de coexistencia entre cepas sugiere la existencia de diferentes nichos. Un índice de NOI alto, indica un alto grado de similitud ecológica entre las cepas y en consecuencia, no podrían coexistir en el mismo nicho ecológico (Wilson and Lindow, 1994b). El nitrógeno también podría llegar a ser un recurso nutricional limitante, por lo que la utilización de distintas fuente de nitrógeno debería también ser analizada.

TRAZABILIDAD MICROBIOLÓGICA

Todas las cepas tienen una huella genómica que la distingue de otras; de manera que, una vez liberados los microorganismos del consorcio al suelo, éstos pueden ser recuperados y distinguidos de la microflora nativa. Una manera rápida y que no genera mayores inconvenientes es la generación de perfiles de ADN, mediante amplificaciones por PCR utilizando cebadores BOX, ERIC, o REP (correspondientes a elementos de DNA repetitivos presentes en localizaciones características en el genoma de procariontes), esto genera perfiles genéticos reproducibles y altamente específicos para cada cepa (De Bruijn, 1992). Una de las grandes ventajas de este método es que los fingerprints pueden ser generados no sólo de ADN purificado sino también directamente de lisados crudos, cultivos líquidos o colonias de placas como así también, por ejemplo, de nódulos radicales (Radermaker and Bruijn, 1996). Otra técnica que se puede utilizar es AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) que combina el uso de enzimas de restricción, para generar fragmentos genómicos característicos, con amplificaciones mediante PCR de subconjunto de aquellos fragmentos, generando un perfil de ADN complejo; sin embargo esta técnica es más costosa y compleja (Jansen et al., 1996; Vos et al., 1995).

RESPUESTA AGRONÓMICA A LA COINOCULACIÓN

Algunos estudios agronómicos han sido llevados a cabo en cereales para evaluar la efectividad de los inoculantes mixtos. Así por ejemplo, la inoculación de trigo con un consorcio de *A. brasilense* Sp245 y *Rhizobium leguminosarum* bv *Trifolii* demostró que la inoculación dual fue superior a la individual, más aún cuando se agregó 50 Kg de N ha⁻¹. Esta mezcla bacteriana produjo un aumento en la materia seca de la parte aérea y del grano del 33% y 22%, respectivamente, comparado con plantas sin inocular (Galal et al., 2001). La efectividad de esta coinoculación, es probablemente, debido a la producción de auxinas por parte de *Azospirillum* que altera la morfología radical y a la capacidad de *R. leguminosarum* de ingresar a través de los sitios donde emergen las raíces laterales, a plantas trigo por un mecanismo denominado "crack entry", como previamente había sido demostrado para trigo arroz y maíz por Webster et al. (1997).

Por otro lado, la inoculación de trigo con una mezcla de *Azospirillum lipoferum* y *Bacillus megaterium* (cepas solubilizadoras de fosfato) aumentó el peso seco aéreo y la producción de nitrógeno total. Además, el contenido de fósforo en la parte aérea incrementó en un 53% y 37% comparado con las plantas sin inocular y las inoculadas sólo con *A. lipoferum*, respectivamente. La respuesta de la planta a la inoculación con *Azospirillum* probablemente se deba no a uno, sino a varios mecanismos, incluidos la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas, la actividad nitrato reductasa, etc (El-Komy, 2005).

En Argentina, se han llevado a cabo experimentos a campo que avalan la efectividad de las coinoculaciones. Así por ejemplo, la inoculación de semillas de maíz con *P. fluorescens* (bacteria solubilizadora de fósforo) y *A. brasilense*, produjo un aumento en el contenido de fósforo de las plantas, esta mayor concen-



tración de fósforo puede ser debido a un aumento en la biomasa radical inducido por *Azospirillum* y por lo tanto, mayor exploración de suelo, y a la solubilización de fósforo del suelo que promueve *Pseudomonas*. El rendimiento del maíz fue 7% mayor al testigo cuando el inoculante contenía las dos cepas, mientras que hubo solo un 4% de incremento en el rendimiento de plantas inoculadas solo con *Pseudomonas* (Faggioli et al., 2007). En la tabla I se presentan los resultados obtenidos con diferentes consorcios bacterianos.

TIPO DE FORMULACIONES EXISTENTES

A pesar de que los estudios sobre coinoculaciones son bastantes recientes, ya se han lanzado al mercado inoculantes nacionales formulados en base a dos PGPR: *P. fluorescens*, que facilita la solubilización del fósforo del suelo, estimula el crecimiento y brinda protección fitosanitaria y *A. brasilense*, que aporta nitrógeno promoviendo un mayor desarrollo radical y vegetativo y una mejor respuesta del cultivo a distintos factores de estrés.

Tabla I. Resultados obtenidos con diferentes consorcios bacterianos.

Consorcio	Cultivo	Resultados	Referencias
<i>A. brasilense</i> <i>R. leguminosarum</i>	Trigo	Aumento del 33% y 22% de la materia seca de la parte aérea y grano, respectivamente.	Galal et al., 2001
<i>A. lipoferum</i> <i>B. megaterium</i>	Trigo	Aumento del 27% y 100% en la altura y materia seca de la parte aérea, respectivamente.	El - Komy (2005)
<i>P. fluorescens</i> <i>A. brasilense</i>	Maiz	Aumento del 7% en el rendimiento	Faggioli et al. 2007

BIBLIOGRAFÍA

- Alagawadi, A.R. and Gaur, A.C. 1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. *Trop. Agric.* 69:347-350.
- Andreeva, I.N.; Red'kina, T.V. and Ismailov, S.F. 1993. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium* legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russ. J. Plant Physiol.* 40:901-906.
- Bai, Y.; Souleimanov, A. and Smith, D.L. 2002. An inducible activator produced by a *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth-promoting activity under greenhouse conditions. *J. Exp. Bot.* 53:1495-1502.
- Bai, Y.; Zhou, X.; and Smith, D. 2003. Crop ecology, management & quality. Enhanced Soybean Plant Growth Resulting from Coinoculation of Bacillus Strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 43:1774-1781.



Bais, H.P.; Fall, R. and Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134:307-319.

Barea, J.M.; Pozo, M.J.; Azcón, R. and Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56:1761-1778.

Bashan, Y. 1998. Inoculation of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech. Adv.* 16:729-770.

Bolsa de cereales de Córdoba. 2005. Se consolida la demanda mundial de cereales y oleaginosas. <http://www.bccba.com.ar/bcc/index.asp?idCanal=1370>

Burdman, S.; Volpin, H.; Kigel, J.; Kapulnik, Y. and Okon, Y. 1996. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3030-3033.

Chebotar, V.K.; Asis, C.A. and Akao, S. 2001. Production of growth promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Biology and Fertility of Soils.* 34:427-432.

De Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2180-2187.

El-Komy, H. 2005. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for Successful Phosphorus and Nitrogen Nutrition of Wheat Plants. *Food Technol. Biotechnol.* 43:19-27.

Faggioli, V.; Cazorla, C.; Vigna, A. and Berti, M. 2007. Fertilizantes biológicos en maíz Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. <http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/suelos/fertbio07res.htm>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004. Uso de fertilizantes por cultivo en Argentina. Primera edición. Roma- ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/fer-tuseargent_s.pdf

Fuhrmann, J. and Wollum, A. 1989. In vitro growth responses of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean rhizosphere bacteria. *Soil Biol Biochem.* 21:131-135

Glick, B. 1995. Review: the enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol.* 41:109-117.

Galal, Y.; El-Ghandour, I. and El-Akel, E. 2001. Stimulation of wheat growth and N fixation through Azospirillum and Rhizobium inoculation: A field trial with techniques. In: *Plant nutrition-Food security and sustainability of agro-ecosystems*. W. J. Horst et al. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. p 666-667.

Jacobson, C.; Pasternak, J. and Glick, B. 1994. Partial purification and characterization of ACC deaminase from the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Can. J. Microbiol.* 40:1019-1025.

Jansen, P.; Coopman, R.; Huys, G.; Swings, J.; Bleeker, M.; Vos, P.; Zabeau, M. and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting methods AFLP as new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol.* 142:1881-1893.



Lugtenberg, B.; Bloemberg, G.; Bolwerk, A.; van den Broek, D.; Cazorla-lopez, F.; Chin-A-Woeng, T.; Eijkemans, K.; Kamilova, F.; Kuiper, I. and Mulders, I. 2004. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St Paul, Minnesota, USA. p.305-309.

Mayak, S.; Tirosh, T. and Glick, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. and Biochem.* 42:565-572.

Ongena, M.; Duby, F.; Jourdan, E.; Beaudry, T.; Jadin, V.; Dommes, J. and Thonart, P. 2005a. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing growth resistance associated with differential gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:692- 698.

Ongena, M.; Jacques, P.; Toure, Y.; Destain, J.; Jabrane, A. and Thonart, P. 2005b. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 29-38.

Ping, L. and Boland, W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *TRENDS in Plant Science.* 9(6):263-266.

Radermaker, J. and Bruijn, F. 1996. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: DNA markers: protocols, applications and overviews J. Caetano-Anollés, G, Gresshoff, P.M (eds) p. 151-171. New York, NY: J Wiley & Sons, Inc.

Raupach, G. and Kloepper, J. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology.* 88:1158-1164.

Relic, B.; Perret, X.; Estrada-Garcia, M.T.; Kopcinska, J.; Golinowski, W.; Krishnan, H.B.; Pueppke, S.G. and Broughton, W.J. 1994. Nod factors of Rhizobium are a key to the legume door. *Mol Microbiol.* 13:171-178.

Remans, R.; Croonenborghs, A.; Torres Gutierrez, R.; Michiels, J. and Vanderleyden, J. 2007. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *Eur J Plant Pathol.* 119:341-351.

Remans, R.; Ramaekers, L.; Schelkens, S.; Hernandez, G.; Garcia, A.; Reyes, J.; Mendez, N.; Toscano, V.; Mulling, M.; Galvez, L. and Vanderleyden, J. 2008a. Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil.* DOI 10.1007/s11104-008-9606-4.

Remans, R.; Beebe, S.; Blair, M.; Manrique, G.; Tovar, E.; Rao, I.; Croonenborghs, A.; Torres-Gutierrez, R.; El-Howeity, M.; Michiels, J. and Vanderleyden, J. 2008b. 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.

Ryu, C. M. 2003. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:4927-4937.

Ryu, C. M. 2004. Bacterial volatiles induce systematic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134:1017-1026.

Satorre, E. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy.* 15:24-31 <http://www.agro.uba.ar/users/dsorlino/Satorre%20Anexo%203%20en%20colores.pdf>

Samac, D.A.; Willert, A.M.; McBride, M.J. and Kinkel, L.L. 2003. Effects of antibiotic producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Appl. Soil Ecol.* 22:55-66.



Saxena, A.; Shende, R. and Grover, M. 2006. Interactions Among beneficial Microorganisms. In: Microbial Activity in the Rhizosphere. Mukerji, K.G., Manoharachary, C. and Singh, J (eds.) Soil Biology, 7. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Sindhu, S.S.; Gupta, S.K. and Dadarwal, K.R. 1999. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. On pathogenic fungi and enhancement of plant growth in green gram (*Vigna radiata*). Biol. Fertil. Soils. 29: 62-68.

Sindhu, S.S.; Suneja, S.; Goel, A.K.; Parmar, N. and Dadarwal, K.R. 2002. Plant growth promoting effects of *Pseudomonas* sp. on coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer strain under sterile and 'wilt sick' soil conditions. Appl. Soil Ecol.19:57-64.

Sindhu, Sand Dadarwal, K. 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. Microbiological research. 156:353-358.

Singh, P., Shin, Y., Park, C. and Chung, R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology. 89:92-99.

Timmusk, S., Grantcharova, N. and Wagner, E.G. 2005. *Paenibacillus polymixa* invades plant roots and forms biofilms. Appl Environ Microbiol. 71:7292-7300.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, J. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23:4407-4414.

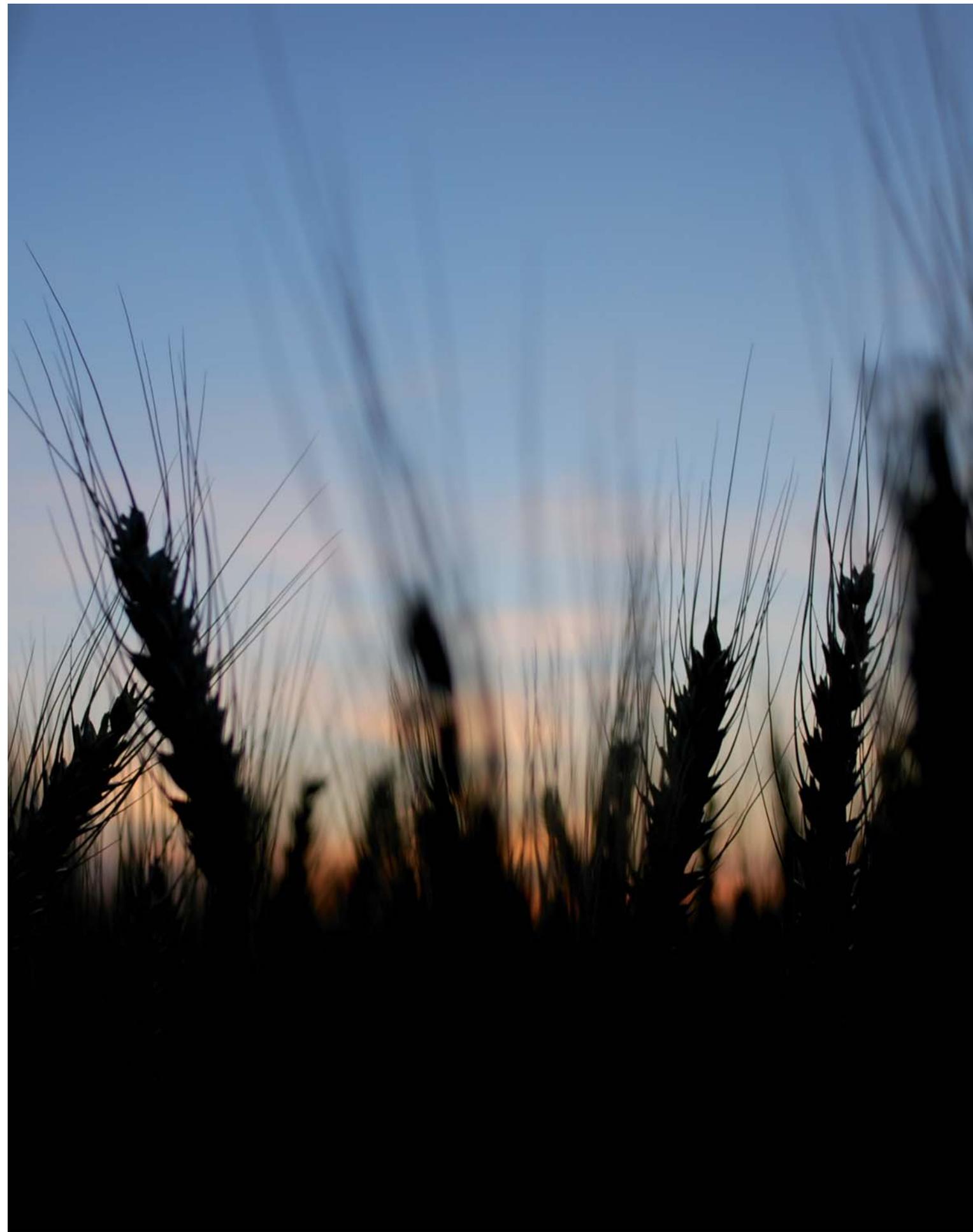
Webster, G., Gough, C., Vasse, J., Batchelor, C.A., O'Callaghan, K.J., Kothari, S.L., Davey, M.R., Denarie, J. and Cocking, E.C. 1997. Interactions of rhizobia with rice and wheat. Plant Soil. 194:115-122.

Wilson, M., and S. E. Lindow. 1994a. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice⁺) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (Ice⁻) biological control agent. Appl. Environ. Microbiol. 60:3128-3137.

Wilson, M., and S. E. Lindow. 1994b. Coexistence among Epiphytic Bacterial populations Mediated through Nutritional Resource Partitioning. Appl. Environ. Microbiol. 60:4468-4477.

Whipp, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. of Exp. Botany. 52:487-511.

Yadav, K., Prasad, V., Mandal, K., and Ahmad, N. 1992. Effect of coinoculation (*Azospirillum* and *Rhizobium strains*) on nodulation, yield, nutrient uptake and quality of lentil in calcareous soil [*Lens culinaris*]. LENS Newsl. 19:29-31.





Consideraciones Finales

Perticari, A.; Puente, M. y García, J.

Ingenieros Agrónomos. Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), IMYZA, CNIA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina. Los Reseros y Las Cabañas s/n (1712), Castelar.

e-mail: aperticari@cnia.inta.gov.ar

CONTEXTO GENERAL DE LOS MICROORGANISMOS PGPM DESCRIPTOS

Existen numerosos microorganismos benéficos en la rizósfera de las plantas que pueden ser utilizados para obtener mejoras en la producción de los cultivos. Los efectos a través de los cuales ejercen estos beneficios pueden ser directos sobre el crecimiento de las plantas o indirectos, a través del control biológico (Avis, 2008). En esta edición se ha compilado sólo una parte de todos los reportados en la bibliografía y se han revisado aquellos que están siendo más estudiados y utilizados como principios activos de los inoculantes registrados en nuestro país. Se consideraron aquellos cuyo mecanismo de acción favorece directamente a la planta. Fueron excluidos de este documento especies o géneros de microorganismos que poseen la capacidad de promover el crecimiento y al mismo tiempo tienen actividad patogénica en plantas, animales y seres humanos que se describen con bastante frecuencia en la literatura; como es el caso de *Pantoea*, *Enterobacter* (Aguado García y Lumbreras Bermejo, 1998), *Erwinia* (Smith et al., 1992). Tampoco se hicieron consideraciones de las distintas estrategias de aplicación y formulaciones empleadas para las distintas especies promotoras del crecimiento vegetal descritas en el documento.

Cabe destacar que existen otros microorganismos que presentan características promisorias como promotores de crecimiento vegetal pero aún no se han desarrollado en nuestro país in extenso como tales. Este es el caso de bacterias fijadoras de N₂ como *Rhizobium* y sus géneros (Avis et al., 2008), *Herbaspirillum* sp. (Bastián et al., 1998), *Azoarcus* sp. (Hurek

et al., 2002), *Gluconacetobacter* sp. (Vessey, 2003), *Beijerinckia* sp. (Polyanskaya et al., 2000), *Derrxia* sp. (Dobereiner and Pedrosa, 1987), cianobacterias (Hashem, 2001), hongos solubilizadores de P como *Penicillium* sp. (Whitelaw et al., 1997) o coinoculantes con hongo, levadura y bacteria (*Endogone* sp., *Derrxia* sp. y *Saccharomyces* sp.) (El-Sayed Shalaby. and El-Nady, 2008).

PRODUCTOS REGISTRADOS CON PGPM

En la reunión de la RED BIOFAG del 06/11/2008 se define como **Inoculante** a todo producto cuyo principio activo sean microorganismos vivos, no patógenos de humanos, animales o plantas, ni patógenos oportunistas del hombre, que favorecen la nutrición y/o el desarrollo de las plantas. Excluye los denominados agentes de control biológico, biofungicidas, bionematicidas, bioinsecticidas y productos de similar actividad que favorecen la salud de las plantas (Red BIOFAG, 2008).

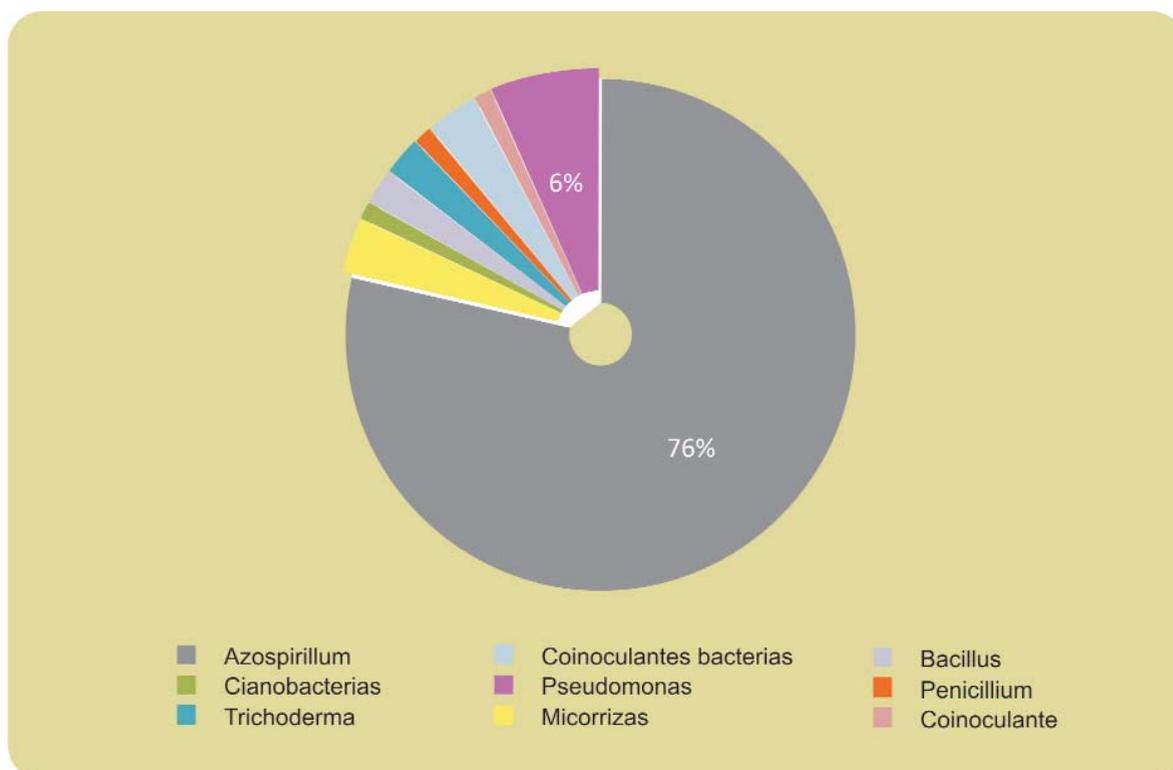
Los inoculantes, también denominados fertilizantes biológicos, se encuentran dentro del ámbito de la Coordinación General de Agroquímicos y Biológicos dependiente del SENASA. Esta Coordinación dirige las tareas relacionadas con la aprobación, restricción o prohibición de la producción, comercialización o el uso; y participa en la fiscalización de la distribución, despacho, conservación y condiciones de venta de productos agroquímicos o biológicos (Corvalán et al., 2006).



Según la información aportada por este organismo existen en la actualidad aproximadamente 90 productos registrados como fertilizantes biológicos en base a distintos microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Los formulados en base al género *Azospirillum* son los más abundantes con más de 70 registros incluyendo inoculantes para otros cultivos como girasol, algodón, etc. En segundo lugar se ubica el género *Pseudomonas* con 6 registros (figura 1).

Bacillus, etc. Si están encuadrados dentro de los requisitos de eficiencia agronómica y en las propias descripciones de presentación de cada producto presentado por la empresa que inscribe el mismo. Esto incluye concentraciones, protocolos e identificación de cepas. Es decir, ante una exigencia de control de calidad deben responder con lo descripto al realizar el registro; por ejemplo si se declara un número de bacterias presentes para la elaboración de $1 \cdot 10^9$ y de $1 \cdot 10^8$ al vencimiento,

Figura 1. Participación según el microorganismo en el total de los fertilizantes biológicos registrados en Argentina.



NORMATIVA VIGENTE

Actualmente no existe una normativa específica donde se describan los requisitos para microorganismos utilizados en la elaboración de inoculantes distintos a rizobios, sea el caso de *Azospirillum*, *Pseudomonas*, micorrizas,

el número exigible por el organismo fiscalizador es este.

Si bien es deseable la mejora de los productos existentes en aspectos específicos (viabilidad de los microorganismos en los productos formulados, estado de competencia asociativa de los



microorganismos en el producto, etc.), **son prioritarios en este momento los aspectos normativos para consensuar a nivel nacional y regional estándares de trazabilidad y mejor control de calidad de los productos existentes** (más allá de las exigencias que ya hayan implementando por iniciativa de las empresas productoras), en particular para productos diferentes a los elaborados en base a rizobios.

EMPLEO A NIVEL PRODUCTIVO

El productor agrícola argentino es ávido en el uso de tecnologías y está abierto al uso de microorganismos para mejorar su producción. Se observa que lentamente crece la adopción de este tipo de inoculantes elaborados con promotores de crecimiento tanto en maíz como en trigo. Se considera que el área inoculada en la actualidad con formulados elaborados en base a *Azospirillum*, *Pseudomonas* y otros microorganismos o sus combinaciones representa actualmente un 6-7% del área sembrada de trigo y maíz en Argentina.

AVANCES INTERNACIONALES

La suma de condicionamientos económicos y ambientales internacionales crea un marco de alto requerimiento del uso de tecnologías amigables y de bajo costo. Esto se refleja en el creciente y permanente interés en el empleo de microorganismos para mejorar la productividad de todo tipo de cultivos en todos los continentes, en particular Asia y América Latina. En los últimos años se ha incrementado en forma significativa la edición de libros, la realización de congresos y la publicación de investigaciones científicas sobre este tema. En estos estudios se aplican todas las tecnologías o herramientas de investigación disponibles (biología molecular, bioinformática, metagenómica, etc.). Esto permite que conozcamos cada vez con más detalle que está pasando

con los microorganismos en el suelo, en la rizósfera, en la filósfera y en el aire. Se están descubriendo día a día nuevas especies de microbios con posibilidades de uso, en particular para ambientes con limitantes. Como así también sus acciones promotoras y/o los metabolitos producidos. Son frecuentes los estudios que describen la evaluación de la respuesta agronómica de los inoculantes con PGPM en distintos tipos de ambientes, algunos de ellos, extremos (salinidad, sequía, etc.); y la posibilidad de reducción del uso de fertilizantes químicos cuando se combina su uso con los inoculantes. Son escasos los estudios dedicados a formulaciones y aplicación de inoculantes, esto ofrece una oportunidad para la Argentina ya que consideramos que hay una gran fortaleza científica en estos aspectos.

PERSPECTIVAS A FUTURO

En un contexto de necesidad de aumentar la productividad con altos costos de fertilización química, el empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal adquiere relevancia y tiene amplias posibilidades de insertarse en el sistema de producción de maíz y trigo actual y futuro. Para que su empleo tenga credibilidad en el sector productivo no deberían acelerarse los tiempos de desarrollo y de evaluación de los inoculantes elaborados con microorganismos solos o combinados. Esto implica:

1. La generación de inoculantes a partir de cepas seleccionadas por su eficacia en su capacidad promotora en las condiciones de empleo.
2. La obtención de formulados que permitan mantener un adecuado nivel poblacional de la cepa selecta tanto en el almacenamiento, como en el sitio de aplicación, sea suelo y/o semilla.
3. Desarrollar protocolos de control de calidad para la trazabilidad permanente del producto inoculante.



4. La evaluación agronómica exhaustiva en los diferentes sitios productivos, con y sin fertilizantes aplicados en conjunto, a fin de generar información que permita determinar niveles de respuesta esperada de acuerdo al potencial de producción y el ambiente.

5. Evaluación de la compatibilidad con los agroquímicos de uso habitual en los cultivos

que puedan afectar o no la sobrevivencia del microorganismo.

6. Evaluar las interacciones planta-microorganismos en condiciones controladas y en condiciones productivas.

El cumplimiento de estas etapas permitiría la obtención de tecnologías acordes a los requerimientos de los cultivos de trigo y maíz.

BIBLIOGRAFÍA

Aguado García J.M. y Lumbreras Bermejo C. 1998. Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. 7:3622-3628.

Avis, T.; Gravel, V.; Antoun, H. and Tweddell Russell J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry*. 40:1733-1740.

Bastián, F.; Cohern, A.; Piccoli, P.; Luna, V.; Baraldi, R. and Bottini, R. 1998. Production of indol-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. *Plant Growth Regul.* 24:7-11.

Corvalán, D.; Dubois, M.; Medana, M.; Peticari, A.; Racca, R. y Ruiz, O.A. 2006. Capítulo 1: Situación actual y perspectivas del mercado de semillas y biofertilizantes en la Argentina. Red BIO-FAG. Biofertilizantes en Iberoamérica: Visión técnica, científica y empresarial. (Ed. Izaguirre-Mayoral, M.L.; Labandera, C. y Sanjuan, J.). p 4-15.

Dobereiner, J. and Pedrosa, F.A. 1987. Nitrogen fixing bacteria in nonleguminous Plants. Science Tech Publishers, Madison.

El-Sayed Shalaby, M. and El-Nady, M.F. 2008. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a bio-control agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biologica Szegediensis*. 52(2):271-275.

Hashem, M. A. 2001. Problems and prospects of cyanobacterial biofertilizer for rice cultivation. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:881-888.

Hurek, T.; Handley, L.; Reinhold-Hurek, B. and Piché, Y. 2002. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:233-242.

Polyanskaya, L. M.; Vedina, O. T.; Lysak, L. V. and Zvyagintev, D. G. 2000. The growth-promoting effect of *Beijerinckia mobilis* and *Clostridium* sp. Cultures on zone agricultural crops. *Microbiol.* 71:109-115.

Red BIOFAG. 2008. Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente. "Normativa Iberoamericana para Inoculantes Formulados con Bacterias Rizosféricas Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)". En: [http:// www.biofag.org.ar](http://www.biofag.org.ar).



Smith I.M., Lelliott, R.A.; Phillips, D.H. and Archer S.A. 1992. Capítulo 7: Bacterias II *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia* y otras bacterias. En: Manual de enfermedades de las plantas.

Vessey J. K. 2003. Plant growth promoting Rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255:571-586.

Whitelaw M. A.; Harden T. J. and Bender G. L. 1997. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. *Australian Journal of Soil Research*. 35(2)291-300.

Esta obra se encuentra enmarcada dentro del **Proyecto INOCULAR** que es un Convenio de Asistencia Técnica entre INTA y empresas privadas productoras de inoculantes. Este proyecto, que desde sus comienzos se ha abocado a la evaluación y difusión de inoculantes a base de Rhizobium, abarca a partir del año 2008 también el estudio y la difusión de los beneficios de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal "PGPM".

Esta publicación fue lograda por el aporte de investigadores de distintas instituciones y unidades del país quienes integran la Comisión Científico Técnica del Proyecto Inocular PGPM. La obra está conformada por 6 capítulos y las consideraciones finales. En ella se presentan las principales características de los microorganismos *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micorrizas* y combinaciones de éstos. Además, se revisan los beneficios obtenidos por su uso en los cultivos de trigo y maíz y se incluyen consideraciones prácticas para el uso adecuado de estos microorganismos. La correcta utilización tiene importantes implicancias en la sustentabilidad de los sistemas de producción ya que complementa a la fertilización convencional posibilitando un empleo más eficiente de los fertilizantes químicos.

ISBN N° 978-987-1623-46-4



Ministerio de
Agricultura, Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Rivadavia 1439 (C1033AAE) - Buenos Aires