

## Solubilización bacteriana de fosfatos y ensayos de inoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo

Diego M. Domínguez<sup>1</sup>; Raúl A. Rojo<sup>1</sup>; Marcelo J. Giménez,<sup>1</sup>; Valeria A. Autrán<sup>1</sup>; Lorena B. Guiñazú<sup>1</sup>; Carla V. Bruno<sup>1</sup>; Javier A. Andrés<sup>1\*</sup>.

1.- Departamento de Biología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

### Palabras Clave

Bacterias solubilizadoras de fosfatos,  
Inoculación,  
*Sinorhizobium*,  
*Pseudomonas*,  
*Bacillus*,  
calcio,  
hierro,  
alumnio

**RESUMEN.** El fósforo es el macronutriente limitante del crecimiento vegetal más importante en el suelo luego del nitrógeno. La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de fósforo total, pero sólo una pequeña proporción del mismo está inmediatamente disponible en la solución. En este contexto, los microorganismos juegan un papel fundamental mediando en la movilización de fosfatos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de solubilizar fosfatos desde diversas fuentes por las cepas *Sinorhizobium meliloti* B399, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y *Bacillus sp.* R19 y evaluarlos en ensayos de inoculación simple y mixta en alfalfa. Las cepas utilizadas crecieron en todos los medios de cultivo, aunque lo hicieron mejor en los medios suplementados con calcio. Mientras que *S. meliloti* B399 no mostró actividad solubilizadora, *P. fluorescens* CHA0 y *Bacillus sp.* R19 presentaron formación de halo de solubilización en los tres medios de cultivo donde el fosfato estuvo ligado al calcio. En ningún caso las cepas en estudio formaron halo de solubilización en los medios donde el fósforo estuvo ligado al hierro y al aluminio y el crecimiento en estos medios fue inferior al observado en aquellos donde el fósforo estuvo ligado al calcio. El efecto de la falta de disponibilidad de fósforo soluble sobre el crecimiento vegetal no pudo ser revertido por la simple inoculación con *S. meliloti* B399 pero sí ocurrió en los tratamientos con *P. fluorescens* CHA0 y *Bacillus sp.* R19 y cuando estas cepas fueron coinoculadas con *S. meliloti* B399. Se podría desarrollar un inoculante mixto conteniendo estas cepas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos a fin de ser utilizado en las prácticas agrícolas.

**Citar como:** Domínguez, D.; Rojo, R.; Giménez, M.; Autrán, V.; Guiñazú, L.; Bruno, C.; Andrés, J. (2019). Solubilización bacteriana de fosfatos y ensayos de inoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus* 3 (2): 01-12

Recibido: 10-11-18 - Aceptado: 27-3-19

\* **Autor para correspondencia:** Javier A. Andrés, Tel: 358-4676410 / 358-154869300 E-mail de contacto: jandres@ayv.unrc.edu.ar, Ruta Nac. 36 km 601 X5804BYA, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

**Financiamiento:** Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Programa Apoyo a Grupos de Reciente Formación (GRF)



## Bacterial solubilization of phosphates and inoculation trials of alfalfa in greenhouse conditions

### Keywords

Phosphate-solubilizing bacteria,  
Inoculation,  
Sinorhizobium,  
Pseudomonas,  
Bacillus,  
calcium,  
iron,

**Abstract.** Phosphorus is the limiting macronutrient most important for plant growth in the soil after nitrogen. Most agricultural soils contain large reserves of total phosphorus, but only a small proportion of it is immediately available in the solution. In this context, microorganisms play a fundamental role mediating the mobilization of phosphates. The aim of this work was to study the capacity to solubilize phosphates from diverse sources by the strains *Sinorhizobium meliloti* B399, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and *Bacillus sp.* R19 and evaluate them in simple and mixed inoculation trials in alfalfa. The strains used grew in all culture media, although they did better in media supplemented with calcium. While *S. meliloti* B399 showed no solubilizing activity, *P. fluorescens* CHA0 and *Bacillus sp.* R19 showed the formation of halo of solubilization in the three culture media where the phosphate was bound to calcium. In no case did the strains under study form a halo of solubilization in the media where phosphorus was bound to iron and aluminum and growth in these media was lower than that observed in those where phosphorus was bound to calcium. The effect of the lack of availability of soluble phosphorus on plant growth could not be reversed by simple inoculation with *S. meliloti* B399 but it did occur in the treatments with *P. fluorescens* CHA0 and *Bacillus sp.* R19 and when these strains were co-inoculated with *S. meliloti* B399. A mixed inoculant containing these nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing strains could be developed for use in agricultural practices.

aluminum

### INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un elemento crítico en los ecosistemas naturales y agrícolas de todo el mundo. Es el macronutriente limitante del crecimiento vegetal más importante en el suelo luego del nitrógeno ya que cumple un papel significativo en varios procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta, tales como fotosíntesis, transformación de azúcares en almidón y almacenamiento/transporte de la información genética. La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de P total pero su disponibilidad es baja, en parte debido a la alta reactividad del P con calcio (Ca), hierro (Fe) y aluminio (Al). Una importante porción de los fosfatos inorgánicos se adsorben en óxidos e hidróxidos de Fe y Al, minerales de arcillas y sustancias orgánicas las cuales contienen complejos de Fe o Al. Los compuestos orgánicos con P pueden ser mineralizados (o enzimáticamente ligados) a fin de tornar al P disponible para las plantas. Como resultado, las plantas dependen de los procesos de difusión y de una continua liberación

desde las fuentes insolubles a fin de poder cubrir sus demandas (Barber, 1995). Además, buena parte del P inorgánico aplicado al suelo como fertilizante es rápidamente inmovilizado y no queda disponible para las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999).

Los microorganismos del suelo pueden influir en la disponibilidad de P para las plantas, ya sea en su rol de descomponedores de la materia orgánica o como de movilizadores de P inorgánico. Numerosas especies bacterianas asociadas a la rizosfera pueden causar efectos benéficos sobre las plantas (Glick, 1995). Tales grupos bacterianos son conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), del inglés plant growth promoting rhizobacteria (Kloepper y Schroth, 1981). Entre ellas se incluyen a los microorganismos solubilizadores de P (reconocidos como PSM por su sigla en inglés) capaces de movilizar este mineral desde complejos y formas insolubles (Goldstein, 1986; Richardson y Simpson, 2011). Los mecanismos más comunes que permiten la movilización microbiana de P son

la secreción de ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos y enzimas fosfatasa que facilitan la conversión de formas insolubles hacia P disponible para las plantas (Richardson y Simpson, 2011).

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

Además, estos microorganismos pueden mejorar el crecimiento de las plantas incrementando la eficiencia de la fijación biológica del nitrógeno (FBN), aumentando la disponibilidad de otros elementos traza (como Fe y Zn) y produciendo sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Kucey *et al.*, 1989). La mayor parte de las investigaciones en el campo de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal se han centrado en conocer y mejorar el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), el cual involucra la simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias Gram negativas, colectivamente conocidas como rizobios, y que resulta en la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos en las cuales las bacterias fijan el N<sub>2</sub> a cambio de fuentes de carbono que reciben del vegetal.

La disponibilidad de P constituye uno de los principales limitantes para la FBN, afectando principalmente la formación de los nódulos. Diversos autores (Gyaneishwar *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2007; Wani *et al.*, 2007) han aportado sobre la respuesta positiva de la FBN a la disponibilidad de P en leguminosas tales como alfalfa (*Medicago sativa* L.), trébol (*Trifolium repens* L.), poroto (*Phaseolus vulgaris* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y gandul (*Cajanus cajan* (L) Mill.).

Plantas que crecieron en ambientes deficientes en P exhibieron un reducido suministro de carbohidratos a los nódulos lo que afectó el inicio de la nodulación, el crecimiento de los nódulos ya formados y disminución de la actividad nitrogenasa (Remans *et al.*, 2007). Los microorganismos solubilizadores de fósforo son rutinariamente aislados por métodos de cultivos en cajas de Petri conteniendo medios con fuente de P insoluble, como el empleado por Rosas *et al.* (2006) y el muy difundido medio descrito por Pikovskaya en 1948 (más conocido como medio PVK). Estas pruebas, de relativa eficiencia, se llevan

a cabo mediante la selección de los microorganismos que son capaces de producir un halo o zona clara alrededor de la colonia debido a la producción de ácidos orgánicos en el medio circundante.

La alfalfa es la principal especie forrajera del país y la base de la producción de carne y leche en la Región Pampeana. La difusión del cultivo se apoya en sus altos rendimientos de materia seca, su excelente calidad forrajera y su gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (suelo, clima y manejo). Por otro lado, su capacidad para la fijación del nitrógeno atmosférico gracias a la simbiosis con *S. meliloti*, la convierten también en un importante componente de la sustentabilidad de los sistemas productivos (Basigalup y Rossanigo, 2007). La gran difusión de su cultivo se debe también a su adaptabilidad a diferentes ambientes y al importante rol que juega en sostener la estructura y fertilidad de los suelos, especialmente cuando puede desarrollar la simbiosis fijadora de N<sub>2</sub> (Viglizzo, 1995; Guiñazú *et al.*, 2011).

La mayor superficie cultivada corresponde a la región pampeana subhúmeda y semiárida en donde las principales limitantes para la FBN son la disponibilidad de agua, acidez del suelo y bajo niveles de fósforo soluble (Hijano y Basigalup, 1995; Urioste *et al.*, 1996). Durante los últimos años, el avance de soja y otros cultivos sobre las pasturas ha provocado no sólo una intensificación de los sistemas pastoriles sino también su desplazamiento parcial hacia zonas con mayores limitaciones edáficas y/o climáticas. En ese contexto, el desarrollo de cultivares adaptados a esas condiciones adversas y el desarrollo de productos biotecnológicos que involucren microorganismos rizosféricos reviste un gran interés a efecto de optimizar la FBN, incrementar la absorción de agua y nutrientes y proteger al cultivo ante agentes patógenos (Guiñazú *et al.*, 2012).

Nuestros objetivos fueron: 1) Estudiar la capacidad de solubilizar P desde diversas fuentes por microorganismos nativos y cepas de referencia y 2) Evaluar el efecto de la inoculación combinada de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y solubilizadoras de P, previamente seleccionadas, sobre parámetros del crecimiento de alfalfa. La finalidad fue establecer si este tipo de co-inoculación puede constituirse en una alternativa para el manejo del cultivo en regiones con limitaciones edáficas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos:

Las cepas utilizadas en el ensayo de co-inoculación fueron seleccionadas según su capacidad de solubilizar fosfatos a partir de diferentes compuestos. Se evaluaron 5 cepas nativas y 2 de referencia. Las cepas nativas fueron aisladas en el campo experimental de la UNRC (Universidad Nacional de Río Cuarto, Provincia de Córdoba, República Argentina, 33°10'76" S, 64°29'86" O) localizado en una zona de transición entre las ecorregiones de la llanura del espinal y la llanura pampeana (Brown y Pacheco, 2005). Estas cepas, que cuentan con antecedentes de haber sido empleadas en diferentes ensayos de promoción del crecimiento vegetal, fueron: *Bacillus* sp. R19, aislado desde la rizosfera de soja (Olmedo, 2002) y *Bacillus* sp. TO1 proviene de rastrojo de soja (Audisio *et al.*, 2005). Ambas cepas se caracterizan por la producción de antibióticos con capacidad antifúngica. *B. japonicum* A86, fijador de nitrógeno atmosférico y simbiote de soja, presenta alta tolerancia al fungicida thiram (Andrés *et al.*, 1998), *P. putida* SP22, aislada de rizosfera de soja, es una solubilizadora de P ya empleada en ensayos de inoculación mixta en soja y alfalfa (Rosas *et al.*, 2006) y *P. putida* PC12, aislada de rizosfera de tomate (*Solanum lycopersicum*), fue utilizada en ensayos de control biológico en tomate (Pastor *et al.*, 2012).

Como cepas de referencias se emplearon *S. meliloti* B399, fijador de nitrógeno atmosférico y simbiote de alfalfa, cepa recomendada por INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina) para la formulación de inoculantes para alfalfa en la República Argentina (Guiñazú *et al.*, 2010) y *P. fluorescens* CHAO que es una cepa de referencia internacional en el campo de los microorganismos PGPR, con probada capacidad de producción de antibióticos y fitohormonas (Maurhofer *et al.*, 1992).

Estas cepas, mantenidas en medio TSA (Agar Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) diluido al 25%, se sembraron en cajas de Petri que contenían los diferentes medios a evaluar, presentando fuentes de fósforo insoluble, bajo las formas de fosfatos de Ca, Al y Fe.

Se utilizaron tres medios de cultivo, dos no definidos (con extracto de levadura): PS (Frioni, 1992, Rosas *et al.*, 2006) y PVK (Pikovskaya, 1948), y uno definido (con sulfato de amonio): NBRIP (Nautiyal,

1999). Los tres medios fueron adicionados con 3 diferentes fuentes de P insoluble:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$ . De tal manera, se generaron 9 tratamientos con 3 repeticiones para las 7 cepas ensayadas.

Se incubó a 28 °C y diariamente se observó la evolución del crecimiento, midiendo en mm el diámetro de la colonia formada y el ancho del halo de solubilización que se iba generando desde el borde de crecimiento de la colonia y hasta su límite con el medio de cultivo.

Para evaluar la posibilidad de realizar inoculaciones mixtas se probó la coexistencia de 2 de las mejores cepas solubilizadoras, *P. fluorescens* CHAO y *Bacillus* sp. R19, con *S. meliloti* B399 mediante cultivos en medio YEMA y TSA diluido 25%

Las cepas se sembraron por estriado hasta el centro de la caja de Petri, cada una cubriendo una mitad de la superficie del medio de cultivo. Se realizaron siembras simultáneas y espaciadas, en este último caso, la segunda cepa se sembró una vez que se observó el crecimiento de la primera. Los medios sembrados se incubaron a 28°C durante un tiempo mínimo de 48h.

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

Las semillas de alfalfa fueron desinfectadas por agitación durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (dilución en base a la formulación comercial 55 g.l<sup>-1</sup>). Para los ensayos de inoculación, fueron sembradas bajo condiciones asépticas en bolsas de polietileno negro de 14 cm de alto por 10 cm de ancho, conteniendo cada una 1kg del soporte perlita/arena (2:1). Las plantas fueron inoculadas 2 días luego de la emergencia. Para ello, *S. meliloti* B399 se cultivó en medio YEM (Vincent, 1970) siguiendo el procedimiento microbiológico standard hasta alcanzar una concentración de 10<sup>9</sup> bacterias.ml<sup>-1</sup>, mientras que *P. fluorescens* CHAO y *Bacillus* sp. R19, cepas seleccionadas para esta experiencia en base a los resultados de las pruebas de solubilización de P y coexistencia con *S. meliloti*, se realizaron en medio TSB (Caldo Tripticasa Soya – Laboratorio Britania, Argentina) diluido al 25% hasta alcanzar una concentración de 10<sup>6</sup> bacterias.ml<sup>-1</sup>

La inoculación se realizó aplicando en el sitio de siembra 2 ml del cultivo bacteriano (en fase exponencial tardía – comienzo de fase estacionaria) sobre el sistema radical de cada plántula.

Las plantas fueron regadas alternativamente con agua destilada y solución de Jensen libre de N (Vincent, 1970) modificada en su fuente de P. En los tratamientos donde se evaluó solubilización se reemplazó el  $\text{CaHPO}_4$  y el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  por  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Los controles no inoculados, y también aquellos donde no está presente la cepa fijadora de  $\text{N}_2$ , fueron regados con la adición de 0.5%  $\text{KNO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$  de solución de Jensen como fuente de N y manteniendo su fuente original de P soluble en un caso y reemplazada por insoluble en otro.

El ensayo incluyó los siguientes tratamientos:

- Control N + P insoluble
- Control N + P soluble
- *S. meliloti* + P insoluble
- *S. meliloti* + P soluble
- *P. fluorescens*
- *Bacillus* sp.
- *S. meliloti* + *P. fluorescens*
- *S. meliloti* + *Bacillus* sp.

La experiencia se llevó a cabo en cámaras bajo condiciones controladas de luz, temperatura y pH (Ciclo de 16 hs de luz a  $28 \pm 2$  °C y 8 hs de oscuridad a  $16 \pm 2$  °C y bajo una intensidad lumínica de  $220 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y pH 7).

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

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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos:

La cepa *S. meliloti* B399 presentó un crecimiento limitado en todos los medios ensayados y en ningún caso pudo observarse formación de halo de solubilización. Este resultado es coincidente con el obtenido por Guiñazú *et al.* (2011), donde ya se reportó que esta cepa no solubilizaba P ligado a Ca (tabla 1).

Por su parte, *P. fluorescens* CHA0 y *Bacillus* sp. R19 mostraron un buen crecimiento, y formación de halo de solubilización, en los tres medios de cultivo donde el fosfato está ligado al calcio. Un menor crecimiento, con ausencia de halo, pudo observarse cuando el fósforo se encuentra ligado al hierro y al aluminio (tablas 2 y 3).

Si bien los ensayos de solubilización de P normalmente se realizan a partir de fosfatos de calcio, por ser las formas predominantes en los suelos del centro de Argentina, es interesante analizar la capacidad de las cepas bacterianas de solubilizar P desde otras fuentes. Bashan *et al.* (2013) sostienen que los suelos varían grandemente en pH y otros factores químicos, por lo que estudiar únicamente una fuente de P no puede considerarse como un factor de selección universal para los PSM.

Los resultados obtenidos en los medios tradicionalmente usados para la detección de la solubilización de fosfatos (medios SP y PVK) pudieron ser reproducidos en el medio NBRIP. Este medio de cultivo definido, cuya denominación viene de la sigla en inglés del Instituto Nacional de Investigación en Botánica de la India, fue propuesto como alternativo al medio PVK para la detección de microorganismos solubilizadores de P (Nautiyal, 1999). Una crítica que se le suele formular a los medios tradicionales es la presencia de extracto de levadura, ya que siempre es deseable trabajar con medios en los que se conoce exactamente su composición cuando se procura dilucidar el papel de los microorganismos en la mineralización o solubilización de nutrientes.

**Tabla 1.** Ensayo de solubilización bacteriana de fosfato de calcio en diferentes medios de cultivo

Cepa bacteriana	Diámetro de la colonia (mm)			Ancho de halo (mm)		
	Medios					
	SP	PVK	NBRIP	SP	PVK	NBRIP
<i>P. fluorescens</i> CHA0	17.7±5.5	13.3±3.5	10.5±2.1	4.0±0.8	4.3±0.7	2.2±0.3
<i>Bacillus sp.</i> R19	22.17±9.1	14.6±2.1	13.0±3.4	4.1±0.1	3.6±1.1	4.0±1.0
<i>S. meliloti</i> B399	3.8±1.2	3.6±0.5	3.6±0.5	-	-	-
<i>P. putida</i> SP22	31.3±1.0	17.0±1.4	13.7±0.3	9.1±2.0	6.5±0.7	3.7±0.3
<i>P. putida</i> PCI2	19.1±1.1	10.5±0.7	10±1.4	1.2±0.5	2.0±0.1	2.1±0.1
<i>Bacillus sp.</i> TO1	22.3±4.9	29.1±8.1	6.3±1.1	-	-	1.2±0.1
<i>B. japonicum</i> A86	13.7±3.5	14.3±2.2	14.2±2.6	3.2±0.1	3.6±0.5	4.1±0.7

**Tabla 2.** Ensayo de solubilización bacteriana de fosfato de hierro en diferentes medios de cultivo

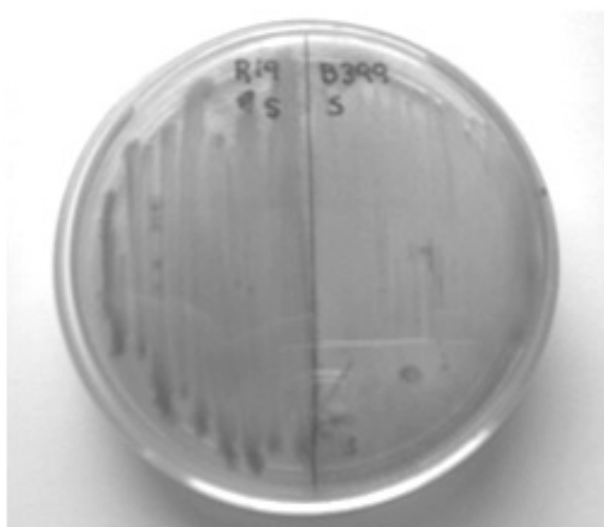
Cepa bacteriana	Diámetro de la colonia (mm)		
	Medios		
	SP	PVK	NBRIP
<i>P. fluorescens</i> CHA0	1.5±0.1	5.0±0.1	2.5±0.1
<i>Bacillus sp.</i> R19	6.6±0.5	4.5±0.8	4.6±2.5
<i>S. meliloti</i> B399	2.5±1.1	1.8±0.2	1.8±0.2
<i>P. putida</i> SP22	2.5±0.5	6.5±2.1	5.5±2.1
<i>P. putida</i> PCI2	7.2±0.9	3.0±0.1	3.5±0.7
<i>Bacillus sp.</i> TO1	3.0±8.2	5.1±0.2	1.8±0.1
<i>B. japonicum</i> A86	5.7±0.9	2.6±0.5	3.0±1.6

**Tabla 3.** Ensayo de solubilización bacteriana de fosfato de aluminio en diferentes medios de cultivo

Cepa bacteriana	Diámetro de la colonia (mm)		
	Medios		
	SP	PVK	NBRIP
<i>P. fluorescens</i> CHA0	4.3±1.5	3.3±0.5	3.5±0.7
<i>Bacillus sp.</i> R19	6.0±2.1	2.6±1.1	3.0±1.7
<i>S. meliloti</i> B399	3.1±0.6	1.8±0.2	1.5±0.3
<i>P. putida</i> SP22	3.2±1.7	-	-
<i>P. putida</i> PCI2	6.5±0.5	-	5.7±1.3
<i>Bacillus sp.</i> TO1	16.1±3.5	6.3±0.5	2.8±0.7
<i>B. japonicum</i> A86	6.7±1.8	2.6±0.4	2.5±1.3

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

En los ensayos de coexistencia de la cepa bacteriana *S. meliloti* B399 con *Bacillus* sp. R19 y con *P. fluorescens* CHA0 se observó que ambas cepas crecieron sin presentar efecto antagónico alguno sobre la cepa fijadora de nitrógeno, tanto en las experiencias de siembra simultánea como espaciada en los dos medios de cultivo empleados (figura 1).



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

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

*S. meliloti* B399 fue capaz de nodular alfalfa en presencia de una fuente de fósforo soluble, no observándose diferencias significativas en los parámetros de crecimiento vegetal evaluados respecto del control nitrógeno N + P soluble. El efecto de la falta de disponibilidad de fósforo soluble sobre el crecimiento vegetal (control N + P insoluble) no pudo ser revertido por la simple inoculación con *S. meliloti* (tabla 4). Esta cepa no mostró capacidad de solubilizar fosfatos en los ensayos a nivel de laboratorio y ello se pone aquí de manifiesto en su incapacidad de aportar P soluble para el crecimiento vegetal. En otros estudios realizados con la cepa *S. meliloti* 3DOh13 se pudo demostrar la capacidad de solubilizar P y sustentar las necesidades del cultivo de alfalfa (Rosas *et al.*, 2006).

La inoculación de alfalfa con las cepas *P. fluorescens* CHA0 y *Bacillus* sp. R19 en condiciones de baja disponibilidad de fósforo favoreció el crecimiento ve-

getal, notándose un aumento en cuanto a longitud de raíces, peso seco de raíces y área radical con respecto a los tratamientos con P insoluble.

Los tratamientos de coinoculación *S. meliloti* + *P. fluorescens* y *S. meliloti* + *Bacillus* sp. mostraron resultados no significativamente diferentes a la inoculación simple con *S. meliloti* en presencia de P soluble, lo que indicaría que la solubilización de P por las cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* ensayadas es suficiente para sustentar el crecimiento vegetal y la nodulación por *S. meliloti*.

Diversos autores han aportado sobre el efecto positivo de la inoculación combinada de rizobios con bacterias de vida libre de los géneros *Pseudomonas* (Knigh y Langson-Unkefer, 1988; Fernández *et al.*, 2007) y *Bacillus* (Sindhu *et al.*, 2002; Hajjam y Cherkaoui, 2017) sobre distintas leguminosas. Estos efectos abarcan: inicio más temprano de la nodulación, incremento en el número de nódulos, incrementos en la tasa respiratoria de raíces y de la actividad nitrógenasa, mejor absorción de agua y nutrientes y un mejor estado general de la planta.

**Tabla 4.** Ensayo de inoculación de alfalfa con bacterias solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno

Tratamiento microbiano	Longitud de tallos (cm)	Peso seco de parte aérea (mg.planta <sup>-1</sup> )	Longitud de raíz (cm)	Peso seco de raíz (mg.planta <sup>-1</sup> )	Superficie radical (ml NaOH)	Número de nódulos.planta <sup>-1</sup>
Control N + P insoluble	15.46±1.13a	40.5±3.6a	14.36±2.45a	10.7±2.2a	0.87±0.12a	0a
Control N + P soluble	18.24±1.44abc	49.1±2.7b	18.40±1.85ab	25.2±1.8b	0.95±0.15a	0a
<i>S. meliloti</i> + P insoluble	12.75±2.44a	37.2±3.1a	17.87±4.30ab	24.7±2.6b	0.92±0.31a	0.3±0.2a
<i>S. meliloti</i> + P soluble	19.16±2.25bc	50.3±2.2b	24.45±1.32b	38.4±2.6c	1.46±0.22b	1.2±0.3b
<i>P. fluorescens</i>	22.27±2.60c	51.8±3.1b	25.61±2.41b	50.1±1.7d	2.17±0.45c	0a
<i>Bacillus sp.</i>	22.02±1.43c	50.6±2.5b	26.60±2.54b	50.6±1.9d	2.99±0.51c	0a
<i>S. meliloti</i> + <i>P.fluorescens</i>	18.80±2.01b	49.4±2.2b	24.63±3.11b	44.0±3.1cd	1.29±0.26b	1.9±0.4c
<i>S. meliloti</i> + <i>Bacillus sp.</i>	17.71±1.12b	53.2±3.5b	26.23±4.55b	49.2±2.4cd	1.62±0.14b	1.3±0.1b

Los datos presentados se obtuvieron a los 50 días de realizada la siembra. Cada tratamiento se realizó por triplicado y los valores mostrados representan la media de 12 plantas por tratamiento. Los valores dentro de la misma columna y seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Duncan.

En cuanto al número de nódulos, fue mayor la cantidad en el tratamiento coinoculado *S. meliloti* + *P. fluorescens*, lo que lo que evidencia el efecto positivo de la inoculación combinada de rizobios con bacterias de vida libre del género *Pseudomonas*, en coincidencia con Knigth y Langson-Unkefer (1988) y Rosas *et al.* (2006). Plazinski y Rolfe (1985) sostienen que algunas cepas PGPR son capaces de estimular sitios adicionales de infección en las raíces que podrán ser ocupados por los rizobios. El efecto promotor de la nodulación por *Bacillus*, que fuera citado por Sindhu *et al.* (2002), no se observó en esta experiencia.

## CONCLUSIONES

En nuestro trabajo, las inoculaciones de alfalfa con la cepa fijadora de N<sub>2</sub> *S. meliloti* B399 y las cepas *P. fluorescens* CHA0 y *Bacillus sp.* R19, con capacidad de solubilizar P previamente determinada en ensayos de laboratorio, mostraron un incremento en los parámetros de crecimiento vegetal analizados en condiciones de baja disponibilidad de P.

Nuestros resultados indican que la co-inoculación de alfalfa puede constituirse en una recomendable

práctica agrícola en suelos con limitaciones nutricionales, constituyendo una alternativa al uso de fertilizantes químicos, reduciendo los costos que los mismos implican y propiciando un menor impacto ambiental.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba



## REFERENCIAS

- Andrés, J. A.; Correa, N. S. y Rosas, S. B. (1998). Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram. Isolation of fungicide resistant strains. *Biology and Fertility of Soils* 26:141-145. <https://link.springer.com/article/10.1007/s003740050357>
- Audisio, A. V.; Andrés, J. A.; Avanzini, G. V.; Caprini, A. E.; Thuar, A. M. y Olmedo, C. A. (2005). Biocontrol de hongos patógenos de maní por la aplicación de rizobacterias. En: Libro de la V Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos – V Encuentro sobre fijación Biológica de Nitrógeno. Universidad Nacional de Jujuy. Versión CD-ROM.
- Barber, Stanley A. (1995). Soil nutrient bioavailability (Second Edition). John Wiley, New York, USA. 414pp. [https://econpapers.repec.org/article/eeeagisys/v\\_3a54\\_3ay\\_3a1997\\_3ai\\_3a2\\_3ap\\_3a266-268.htm](https://econpapers.repec.org/article/eeeagisys/v_3a54_3ay_3a1997_3ai_3a2_3ap_3a266-268.htm)
- Bashan, Yoav; Kamnev, Alexander y de-Bashan, Luz E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* 49: 465–479. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-012-0737-7>
- Basigalup, D. H. y Rossanigo R. (2007). Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. En: Basigalup, Daniel editor. *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina, pp. 15-24. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-el\\_cultivo\\_de\\_la\\_alfalfa\\_en\\_la\\_argentina.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-el_cultivo_de_la_alfalfa_en_la_argentina.pdf)
- Brown, A. y Pacheco S. (2005). Propuesta de actualización del mapa ecorregional de la Argentina. En: Brown, Alejandro; Martínez Ortiz, Ulises; Acerbi, Marcelo y Corcuera, Javier editores. *La situación ambiental argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, Argentina, pp. 28-31. <http://oab.org.ar/capitulos/cap01.pdf>
- Carley, H. E. y W., R. D. (1966). A new gravimetric method for estimating root-surface areas. *Soil Science* 102:289-291. [https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1966/11000/A\\_New\\_Gravimetric\\_Method\\_for\\_Estimating.1.aspx](https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1966/11000/A_New_Gravimetric_Method_for_Estimating.1.aspx)
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2009). *InfoStat versión 2009*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 268 pp.
- Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A. y Sagardoy, M. A. (2007). Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biology and Fertility of Soils* 43:805-809. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-007-0172-3>
- Frioni, L. (1992). *Ecología microbiana del suelo*. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 519 p.
- Glick, Bernard R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41:109–117. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m95-015#.Wr58Fi7wblU>

Goldstein, A. H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphate: Historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture* 1:51–57. <https://www.cambridge.org/core/journals/american-journal-of-alternative-agriculture/article/bacterial-solubilization-of-mineral-phosphates-historical-perspective-and-future-prospects/D386D12712E75F605768E81C47A6B439>

Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., Del Papa, M. F., Pistorio, M. y Rosas, S. B. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and Fertility of Soils* 46:185-190. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-009-0408-5>

Guiñazú, Lorena B, Andrés, Javier A., Pastor, Nicolás A., Rovera, Marisa y Rosas, Susana B. (2011). Genetic and phenotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their effects on nitrogen fixation and alfalfa (*Medicago sativa* L.) growth promotion. In: Khan, Mohammad S. editor. *Phosphate solubilizing microbes for crop improvement*. NOVA Science Publishers Inc, USA, pp. 309-322. [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=10777](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=10777)

Guiñazú, Lorena B., Andrés, Javier A., Rovera, Marisa y Rosas, Susana B. (2012). Isolation and characterization of rhizobacteria antagonistic to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., causal agent of alfalfa damping-off. En: Malik, Abdul y Grohmann, Elisabeth editores. *Environmental protection strategies for sustainable development*. Springer Netherlands, pp.329-339. <http://www.springer.com/gp/book/9789400715905>

Gyaneshwar, P., Naresh K., Gattupalli. P., y Poole, P. S. (2002). Role of soils microorganisms in improving P nutrition in plants. *Plant Soil* 245:83-93. [http://www.jstor.org/stable/24121058?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/24121058?seq=1#page_scan_tab_contents)

Hajjam, Y. y Cherkaoui, S. (2017). The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. *Journal of Materials and Environmental Sciences* 8:801-808. [https://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol8/vol8\\_N3/83-JMES-ICMES-Hajjam.pdf](https://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol8/vol8_N3/83-JMES-ICMES-Hajjam.pdf)

Hijano, E. H. y Basigalup, D. H. (1995). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. En: Hijano, Edgardo y Navarro, Ariadna editores. *La alfalfa en la Argentina*. Editar, San Juan, Argentina. pp. 12-18. [https://www.biblio.uade.edu.ar/client/es\\_ES/biblioteca/search/detailnonmodal/ent:\\$002f\\$002fSD\\_ILS\\$002f0\\$-002fSD\\_ILS:259183/ada?qu=ARAGON%C2%A0&i-c=true&ps=300](https://www.biblio.uade.edu.ar/client/es_ES/biblioteca/search/detailnonmodal/ent:$002f$002fSD_ILS$002f0$-002fSD_ILS:259183/ada?qu=ARAGON%C2%A0&i-c=true&ps=300)

Jones, D., Smith, B. y Wilson, f., Jeffy Goodman B.A. (1991). Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycological Research* 95:1090-1093. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756209805534>

Khan, M. S.; Zaidi, A. y Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in a sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development* 27:29-43. <https://link.springer.com/article/10.1051/agro:2006011>

Kloepper, J. W. y Schroth, M. N. (1981). Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71:642-644. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n06\\_642.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n06_642.PDF)

Knight, T.J. y Langston-Unkefer Pat J. (1988). Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin releasing plant pathogen. *Science* 241:951-954. <http://science.sciencemag.org/content/241/4868/951.long>

- Kucey, R. M.; Jenzen H. y Leggett M. (1989). Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Advances in Agronomy* 42:199–228. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211308605258>
- Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C. y Défago, G. (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology* 82:190-195. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n02\\_190.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n02_190.PDF)
- Nautiyal, C. Shekhar. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170:265–270. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Olmedo, C. A. (2002). Selección de cepas bacterianas con actividad promotora del crecimiento en soja. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Pastor, N. A.; Carlier, E.; Andrés, J. A.; Rosas, S. B. y Rovera, M. (2012). Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *Journal of Environmental Management* 95: 332-337 <http://files.jagudeloc.webnode.es/200000385-4703f47fd5/Seminario%202.pdf>
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17:362-370.
- Plazinsky, J. y Rolfe, B. G. (1985). Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 49:984-989. <https://pdfs.semanticscholar.org/5981/85bbcbd-9495f7b05ccacb37b29e64ac55a08.pdf?ga=2.68866775.717327169.1541369453-1962388368.1503410341>
- Remans, R., Croonenborghs, A., Torrez Gutierrez, Roldán; Michiels, J. y Vanderleyden, J. (2007). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *European Journal of Plant Pathology* 119:341-351. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-007-9154-4>
- Richardson, A. E. y Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology* 156:989–996. <http://www.plantphysiol.org/content/156/3/989>
- Rodríguez, H. y Fraga, R. (1999). Phosphate-solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319–339. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975099000142>
- Rosas, S. B., Andrés, J. A., Rovera, M. y Correa, N. S. (2006). Phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia–legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry* 38:3502-3505. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071706002525>
- Sindhu, S. S.; Gupta S. K., Suneja, S. y Dadarwal, K. R. (2002). Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. *Biologia Plantarum* 45:117-120. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015117027863>

Urioste, A. M., Bono, A.; Buschiazzi, D. E., Hevia, G. y Hepper, E. N. (1996). Fracciones de fósforo en suelos agrícolas y pastoriles de la región semiárida pampeana central (Argentina). *Ciencia del Suelo* 14:92-95. [https://www.suelos.org.ar/publicaciones/vol\\_14n2/Urioste.pdf](https://www.suelos.org.ar/publicaciones/vol_14n2/Urioste.pdf)

Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biology Programme Handbook Nº 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K, pp. 120-130.

Viglizzo, E. F. (1995). El rol de la alfalfa en los sistemas de producción. En: Hijano, Edgardo H. y Navarro, Ariadna editores. *La alfalfa en la Argentina* pp. 260-272. [https://www.biblio.uade.edu.ar/client/es\\_ES/biblioteca/search/detailnonmodal/ent:\\$-002f\\$002fSD\\_ILS\\$002f0\\$002fSD\\_ILS:259183/ada?qu=ARAGON%C2%A0&ic=true&ps=300](https://www.biblio.uade.edu.ar/client/es_ES/biblioteca/search/detailnonmodal/ent:$-002f$002fSD_ILS$002f0$002fSD_ILS:259183/ada?qu=ARAGON%C2%A0&ic=true&ps=300)

Wani, P. A., Khan, M. S. y Zaidi, A. (2007). Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 283-287. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jpln.200620602>

Whitelaw, M. A. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69: 99-151. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211308609487>