

Trabajo final de grado
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias, UDELAR
Montevideo, Uruguay, 2009

**"Aislamiento y caracterización de bacterias
diazotrofas asociadas a maíz (*Zea mays*)
variedad PAU 871"**

Autor: Ana Claudia Menezes Salmini

Tutor: Lic. M. Sc. Andrea Rodríguez

Coordinador: Dra. Magela Laviña

Laboratorio de Microbiología de Facultad de Agronomía. UDELAR.

TABLA DE CONTENIDO

	pág
Resumen.....	3
Introducción.....	4
• El Nitrógeno y las plantas.....	4
• Fijación biológica de N.....	5
• Generalidades de bacterias diazotrofas asociadas a plantas.....	7
• Generalidades del cultivo de maíz.....	9
• Bacterias diazotrofos asociados a maíz (<i>Zea mays</i>).....	10
• Objetivos.....	11
Materiales y métodos.....	12
Resultados.....	16
• Aislamiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno.....	16
• Amplificación del gen <i>nifH</i>	16
• Morfología macro y microscópica.....	17
• Identificación de los aislamientos.....	18
• Secuenciación del 16S rARN.....	19
• DNA fingerprinting (GTG) ₅ - PCR.....	20
• Preferencias metabólicas.....	24
Discusión.....	25
• Aislamiento de diazotrofos.....	25
• Identificación de los aislamientos.....	28
• Diversidad bacteriana asociada a maíz.....	32
• Conclusiones.....	34
• Perspectivas futuras.....	35
Bibliografía.....	36
Apéndice I.....	45
Apéndice II.....	46

RESÚMEN

En Uruguay la superficie sembrada de maíz ocupa el cuarto lugar luego de la soja, trigo y cebada, con un área sembrada de 85 mil há. La evidencia de que en las plantas de maíz se produce Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es de gran interés ya que en los últimos años la producción mundial ha aumentado y es un cultivo que demanda una fertilización importante (entre 80 y 150 Kg. de N/há). En nuestro país el aprovechamiento de la FBN en cultivos comerciales de soja viene realizándose desde hace varios años y hoy cubre el 100% de los cultivos. En las leguminosas la promoción de FBN se realiza a través de la inoculación de bacterias diazotrofas que crecen en simbiosis con la planta. Los beneficios de la sustitución del uso fertilizantes químicos por la utilización de sistemas que promuevan la FBN van desde lo económico al disminuir costos por fertilización a lo ambiental evitando la emisión de gases con efecto invernadero y la lixiviación de nitratos asociados al uso de fertilizantes comunes. Existen diversas consideraciones a tomar antes de elaborar una estrategia de cultivo que promueva la FBN con un rango de productividad confiable. Comenzando por la evaluación de las variedades vegetales de importancia local y la diversidad de bacterias nativas asociadas a ellas.

En este trabajo se caracterizó la población de bacterias diazotrofas asociadas a la variedad PAU871 de maíz crecido bajo tres condiciones de fertilización nitrogenada (sin fertilización, con 40Kg N/há y 80 Kg N/há). El experimento se llevó a cabo en ambiente controlado en macetas con suelo con antecedentes de cultivo de maíz. Para cada planta se discriminó entre poblaciones asociadas a rizósfera, raíz y tallo. Se obtuvieron 167 colonias de características morfológicas diferentes en tres medios semiselectivos sin N. Como forma de confirmar el carácter de diazotrofo para cada aislamiento se buscó la presencia del gen *nifH* que codifica una subunidad del complejo nitrogenasa presente en todos los diazotrofos; para ello se amplificó dicho gen mediante una PCR anidada utilizando primers degenerados. En el 22% de los aislamientos se logró amplificar el gen *nifH*; de ellos la mayor proporción provino de tejido de raíz (56%) y en función de la fertilización nitrogenada la menor proporción de aislamientos provino de las plantas sin fertilización (28%).

Los aislamientos fueron caracterizados macroscópicamente como colonias que van del blanco al blanco-crema, algunas con difusión de pigmento amarillo-verdoso y microscópicamente todas resultaron bacilos Gram negativos de longitud variable. También fue evaluada la formación de velo o película cuando crecen en medio semisólido.

Los aislamientos fueron agrupados según diferencias en el perfil de restricción del gen 16S rADN (ARDRA) lo cual produjo 8 grupos diferentes. De cada grupo se eligieron algunos representantes para la secuenciación con el objetivo de determinar la filiación taxonómica de los aislamientos. Se encontró elevada homología (99%) con especies de los géneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Raoultella*, *Enterobacter* y de un género de la familia *Enterobacteriaceae* posiblemente *Pantoea* o *Enterobacter*. El 50 % de los aislamientos fueron agrupados junto a los identificados dentro del género *Pseudomonas*, le sigue un 35 % de aislamientos agrupados junto a *Enterobacter*.

Para confirmar si los aislamientos asociados a cierto género pertenecen a la misma cepa y explorar la diversidad intraespecífica los aislamientos fueron analizados por perfiles de GTG-PCR. En términos generales cada aislamiento correspondió a un perfil diferente, descartando una marcada selectividad de la planta por alguna de las cepas encontradas.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno y las plantas

La fuente de N para las plantas la constituyen el amonio y el nitrato disueltos en el suelo (N asimilable). El 98% del N presente en el suelo está combinado en moléculas orgánicas y por tanto no disponible para la nutrición vegetal; sólo entre el 1 y 3 % de este es mineralizado en un año por los procesos biológicos denominados amonificación y nitrificación (**Fig. 1**).

Pero no todo el N inorgánico producido puede ser asimilado por los vegetales ya que una parte lo utilizan los microorganismos (inmovilización temporal), otra parte se volatiliza como NH_3 (g) o como NO (g) y N_2O (g) formados en anaerobiosis por desnitrificación y otra parte del NO_3^- se escurre si no es inmediatamente captado por las plantas o los microorganismos ya que los aniones no son adsorbidos a la arcilla. (Frioni 2006) (**Fig. 1**).

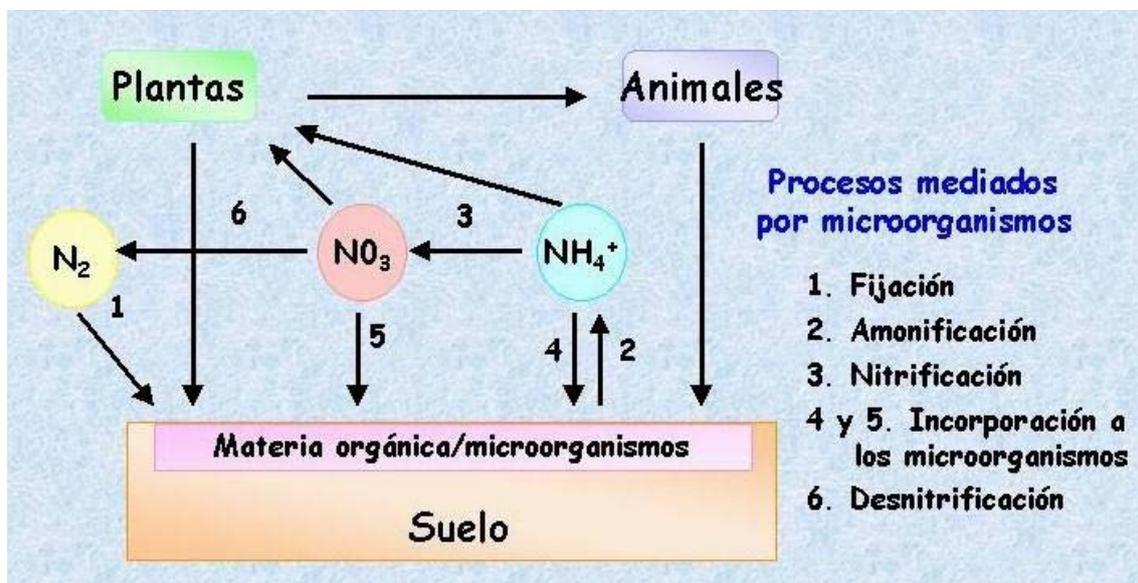


Fig. 1. Ciclo biogeoquímico del Nitrógeno

Por todas estas consideraciones del ciclo del N en el suelo, un cultivo puede mejorar su desarrollo cuando se le agrega 100 Kg de $\text{NO}_3^-/\text{há}$ (lo que equivale a menos del 1% del N de la capa arable del suelo), sin embargo no necesariamente es aprovechado en su totalidad. El mayor o menor aprovechamiento de la fertilización dependerá de varios factores como el tipo de suelo, el estado fenológico del cultivo, la tasa de captación del N del mismo y el tipo de fertilizante utilizado.

Uno de las perturbaciones no deseadas de los sistemas agrícolas intensivos es el escurrimiento de los químicos utilizados hacia las corrientes subterráneas y superficiales. Los nitratos y nitritos son aniones que no son retenidos por el suelo y, cuando se adicionan cantidades superiores a las que pueden ser utilizadas por los organismos biológicos, se escurren. Los efectos de su acumulación en el ambiente y sobre la salud humana son ampliamente documentados (Ryther y Dunstan, 1971; Spalding y Exner, 1993; Howart *et al.*, 1996).

En Uruguay, las recomendaciones de fertilización de cultivos comerciales son efectuadas por numerosos agentes, entre ellos por los propios productores, los agrónomos privados, de cooperativas y de servicios de extensión, que interpretan de forma variada la información producida por los centros de investigación del país y del exterior. Por otra parte, los laboratorios comerciales de países desarrollados también ofrecen, junto con el servicio de análisis de suelo, recomendaciones de fertilización. Estos laboratorios generalmente recomiendan dosis altas para muchos nutrientes, lo que contrasta marcadamente con los resultados de la investigación local e internacional. Algunos productores prefieren seguir estas recomendaciones porque perciben que de este modo “aseguran” un alto rendimiento (Perdomo y Gardellino, 2006).

Otra fuente de N para muchas plantas es la aportada por la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y constituye una importante entrada del elemento N al ecosistema suelo-planta. Este proceso es realizado en forma exclusiva por bacterias que son las únicas capaces de reducir el N₂ atmosférico

Fijación Biológica del Nitrógeno

El proceso denominado Fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la incorporación del nitrógeno atmosférico (N₂) al ecosistema; consiste en la conversión del N₂ a su forma más reducida, iones amonio (NH₄⁺), que serán utilizados por los seres vivos para la formación de sus compuestos nitrogenados.

La FBN es llevada a cabo únicamente por las bacterias fijadoras de N₂ (diazótrofas). Según su relación con las plantas pueden clasificarse en: **fijadores de vida libre**, **rizosféricos** (los que habitan y se desarrollan preferentemente en el suelo adherido a la raíz o en la superficie de ésta) y **endófitos** (los que por algún mecanismo penetran los tejidos y habitan en el interior de la planta). Dentro de este último grupo están los formadores de estructura (nódulos) y los que no la forman. Los sistemas potencialmente más útiles implican, de una forma más o menos íntima, un hospedador con el que la bacteria establece la asociación beneficiosa.

La FBN es un proceso altamente consumidor de energía que es requerida para romper el triple enlace que une los dos átomos de nitrógeno en el N₂. La reacción es llevada a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa con el consumo de entre 12 y 24 moléculas de ATP por N₂ reducido (Frioni, 2006).



Por esta razón la FBN es un proceso estrictamente regulado y se produce dentro de un estricto rango de condiciones para cada organismo. Debe haber disponibilidad de fuente de energía, y no tener acceso a otra fuente de N que resulten metabólicamente más económica, entre otras condiciones. Se observa que la presencia de amonio en el medio es un gran inhibidor de la FBN. Los mecanismos por los cuales la presencia de amonio y otros compuestos nitrogenados inhiben la FBN no son los mismos para todos los diazotrofos (Fu y Burris, 1989) y las diferencias en el grado de inhibición se han revelado amplias. Uno de los mecanismos referido para *Azotobacter chroococcum* fue el balance en la asimilación de C y N dentro de la célula. Cuando la relación C/N aumenta la inhibición por amonio disminuye. Para *Gluconacetobacter diazotrophicus* fue observado que una alta concentración de glucosa protegió la actividad nitrogenasa de la inhibición por amonio y ácido glutámico (Reis y Dobereiner, 1998). En todos los

mecanismos referidos se involucra a la glutamino sintetasa y a la regulación transcripcional de los genes *nif*. La glutamino sintetasa se inhibe cuando se acumula producto, entonces deja de consumir NH_3 . Altas concentraciones de NH_3 , glutamina (producto de la actividad de la enzima glutamino sintetasa) u otros aminoácidos pueden reprimir la transcripción de los genes que codifican la nitrogenasa (genes *nif*). Adicionalmente, en algunas bacterias el exceso de NH_3 también produce una modificación covalente del componente II de la nitrogenasa que la inactiva (Frioni, 2006).

Otros requerimientos para este proceso están determinados por las características de la enzima nitrogenasa. La nitrogenasa es un complejo enzimático que consta de dos componentes: a) Componente I o dinitrogenasa; posee un cofactor de hierro y molibdeno (FeMoCo) que forma parte del centro activo, b) el componente II, o dinitrogenasa reductasa que contiene grupos sulfoferricos. El componente II pasa los electrones al componente I, con consumo de ATP; el componente I cede posteriormente los electrones al sustrato. También se han aislado "nitrogenasas alternativas" que no dependen de Mo sino de Va y otras que solo dependen de Fe (Frioni, 2006).

La vida media de la nitrogenasa en el aire es del orden de décimas de segundo. Se han descrito mecanismos estructurales y fisiológicos para la protección de la enzima dentro de las bacterias aerobias o facultativas (Frioni, 2006).

Por lo tanto para que la FBN ocurra debe haber en el medio suficiente fuente de energía, los metales para la síntesis de la enzima, protección contra el O_2 y baja concentración de N combinado.

La fuente de energía para los heterótrofos con algún grado de asociación con las plantas son los compuestos carbonados suministrados directamente por ésta en cualquier etapa de su vida. De ahí que las variaciones en la actividad fotosintética de la planta se correlacionen con la actividad fijadora de N_2 de los microorganismos. El grado de asociación es determinante por dos factores: la disponibilidad de fuentes de energía y evitar la acumulación de N combinado en el ambiente de la bacteria. A pesar de estas diferencias, la fijación libre por sí sola representa a nivel global algo menos de la mitad del total de N_2 fijado por año ya que la simbiótica, aunque sea más alta, está limitada a unas pocas especies vegetales, entre ellas, las leguminosas de gran importancia económica y social.

El hecho de que quedan fuera cultivos tan importantes como arroz, maíz o trigo motiva la búsqueda para que estas especies vegetales, fundamentales en la alimentación humana, puedan llegar a utilizar el N_2 y hacerse independientes de la aplicación de fertilizante nitrogenado. El interés que esta posibilidad tiene ha determinado la dedicación de numerosos grupos a su estudio.

El avance en los conocimientos sobre la FBN tuvo que ver con el desarrollo de medios de cultivo que contemplan la diversidad metabólica que tienen los diferentes géneros y especies de diazotrofos así como con la utilización de técnicas para la detección de actividad nitrogenasa y finalmente con la aplicación de herramientas propias de la genética molecular como la amplificación por PCR de los genes de la nitrogenasa. (Baldani y Baldani, 2005). Variaciones en la fuente de carbono utilizada, temperatura, pH e incluso tiempos de crecimiento han conducido muchas veces al aislamiento en medios sin N de nuevas bacterias diazotrofas. Pero todo crecimiento en estas condiciones debe ser confirmado como diazotrofo por algún otro método ya que

pequeñas cantidades de N disuelto en los reactivos o en agua utilizada para la preparación de los medios puede permitir el crecimiento de organismos diferentes.

Para la detección de FBN existen dos técnicas fundamentales: ensayo de la reducción del acetileno (ARA) que se basa en la capacidad de la nitrogenasa de reducir otros compuestos con triple enlace además del N₂. Es muy útil para una preselección de sistemas con FBN en condiciones establecidas pero para cuantificar el proceso esta técnica presenta diversas complicaciones. En un sistema ARA positivo seguramente ocurre FBN pero la afirmación contraria no puede hacerse ya que la FBN es un proceso muy sensible a diferentes condiciones abióticas y además la técnica solo mide la actividad de la enzima en un corto período de tiempo (Van Bemmum y Bohlool, 1980; Hardy *et al.*, 1968). La utilización de la técnica de ARA permite hacer medidas de la actividad enzimática con un simple cromatógrafo de gases, pero para relacionar ésta con la cantidad de N₂ atmosférico incorporado a la planta se utilizan las técnicas isotópicas del ¹⁵N se consideran como las únicas que ofrecen cuantificaciones integrales de la FBN, que permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera y entregan valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento dado (Barea, 1991; Danso, 1995).

Los estudios genéticos, por otra parte, demostraron la implicancia directa en la fijación de unos veinte genes (genes *nif*), en el caso de los fijadores libres y de bastantes más en los simbióticos, como *Rhizobium*, ya que el establecimiento de la simbiosis mutualista con la planta conlleva una complicación adicional. El gen *nifH* que codifica para la nitrogenasa reductasa se ha amplificado y secuenciado a partir de ambientes tan diversos como suelos, aguas dulces y saladas, aparato digestivo de insectos entre otros (Zehr y McReynold, 1989; Noda *et al.*, 1999; Widmer *et al.*, 1999; Izquierdo y Nüsslein, 2006) Actualmente se ha secuenciado el genoma completo de algunas bacterias diazotrofas y utilizando ingeniería genética incluso se han creado bacterias genéticamente modificadas con múltiples copias de los genes *nif* (u otras características) y algunas son utilizadas como inoculantes comerciales (Banerjee *et al.*, 2006)

Generalidades de bacterias diazotrofas asociadas a plantas

Las bacterias que estimulan el crecimiento de las plantas son llamadas en su conjunto bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Esta promoción del crecimiento puede darse por diferentes mecanismos: (Banerjee *et al.*, 2006)

- 1- por FBN (Roesch *et al.*, 2007)
- 2- transformación de otros nutrientes a una forma asimilable (Hameeda *et al.*, 2008)
- 3- producción de fitohormonas (Okon y Labandera, 1994)
- 4- protección frente a microorganismos fitopatógenos (Muthukumarasamy *et al.*, 2000)

En el presente trabajo nos dedicaremos únicamente al grupo de bacterias fijadoras de N₂.

Como ya se mencionó la efectividad con la que estas bacterias transfieren el Nitrógeno fijado desde la atmósfera hacia la planta depende, entre otras cosas, de lo estrecha que sea la relación entre ellos. Así las endófitas que desarrollan estructuras (*Rhizobium* forman nódulos) son mas efectivos que los que no lo hacen y estos más que los rizoféricos lo que se explicaría porque el interior de las plantas es un ambiente propicio para que se lleve a cabo la FBN, ya que este ambiente es bajo en oxígeno y relativamente alto en fuentes de carbono (Rozycki *et al.*, 1999; James, 2000), por lo que las bacterias diazótrofas endófitas podrían fijar el nitrógeno y liberarlo directamente en

el interior de las plantas contribuyendo con una parte de los requerimientos nitrogenados de la planta hospedera (Boddey *et al.*, 1995).

Con excepción de las plantas leguminosas y los árboles actinorrízicos, ninguna otra familia de plantas en asociación con bacterias tiene la capacidad de formar estructuras nodulares donde se lleve a cabo la FBN. No obstante, con el empleo de diversas metodologías, como el balance de nitrógeno, la técnica de dilución isotópica del N^{15} , y la abundancia natural de N^{15} , se ha demostrado que existen altos índices de FBN en plantas gramíneas de importancia económica, entre las que se incluyen algunas variedades de caña de azúcar (Boddey *et al.*, 1991; Döbereiner. 1995), de arroz (Sherestha y Ladha, 1996) y maíz (García de Salomone *et al.*, 1996.)

Estos hallazgos han generado un gran interés en la fijación biológica de nitrógeno en plantas de familias diferentes a las leguminosas. Aún cuando no se conoce con exactitud cual o cuales son los microorganismos responsables de la FBN observada en las plantas gramíneas, son diversos los diazotófos endófitos que se han aislado de estas plantas, entre los que se encuentran especies de los géneros *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhizobium* (*sin formación de nódulos*), *Brevundimonas*, *Agrobacterium*, *Pantoea*, *Rhanella* (Boddey *et al.*, 1991; García de Salomone *et al.*, 1996; James y Olivares, 1998; James, 2000; Gutiérrez y Martínez, 2001; Montañez *et al.* 2008). Es de gran importancia conocer la función(es) que desempeñan los endófitos, incluyendo los fijadores de nitrógeno, en el interior de las plantas y determinar si estimulan su crecimiento.

Una relación menos estrecha es la que establecen las bacterias rizosféricas con la planta en la rizosfera y el rizoplano. Este ambiente actúa como un medio selectivo para cierto tipo de bacterias capaces de prosperar a bajas presiones de O_2 , en presencia de exudados radicales (característicos del tipo de vegetal) que son utilizados como fuente de carbono. La FBN se realiza por bacterias de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Desulfovibrio*, *Acetobacter*, *Azoarcus*; *Azorhizobium*; *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*; *Gluconacetobacter*; *Herbaspirillum*; familias *Rhizobiaceae*, *Rhodospirillales*, *Beijerinckia*, *Spirillum* (Baldani, 2005).

Las especies de bacterias fijadoras de N_2 de vida libre utilizan el N_2 fijado para su propio metabolismo (inmovilización temporal), no es exportado y solamente puede ser aprovechado por la planta después de su muerte y lisis y una vez que haya sido mineralizado.

La tabla 1 resume la gran diversidad de bacterias diazotrofas heterótrofas y su relacionamiento con el oxígeno.

Tabla 1- Diversidad de diazotrofos.

Relación con el oxígeno	Géneros	Ambiente
aerobios	Azotobacter Azoarcus Azomonas Beijerinckia Derxia	rizosferico endofito rizoplano rizosferico
anaerobios facultativos (aerobios cuando no fijan N ₂)	Klebsiella Bacillus Enterobacter	Rizosféricos y endofíticos* " "
Microaerófilos (aerobios cuando no fijan N ₂)	Gluconoacetobacter Herbaspirillum Burkholderia Azospirillum Rhizobium Frankia	Endofito " " Rizosféricos y endofíticos* endofitos Rizosféricos y endofíticos*
anaerobios estrictos	Clostridium Desulfovibrio	Rizosferico "

*algunas especies se han aislado preferentemente de suelo rizosférico y otras especies del mismo género han mostrado selectividad por el interior de la planta.

Fuente: Modificado de Frioni, L. (2006).

Generalidades del cultivo de maíz

El maíz es una gramínea del tipo C4, originaria de América. Es cultivado para alimento humano y de animales y más recientemente su interés ha aumentado por su uso para la producción de bioetanol.

La asociación de bacterias diazotrofas a cultivos tiene importancia ecológica ya que la agricultura es una de las fuentes de contaminación de agua por escurrimiento de NO₃⁻ y aumenta la producción de gases con efecto invernadero. También tiene importancia económica directa ya que los fertilizantes nitrogenados sintetizados químicamente son un insumo obligado en todo cultivo comercial.

La suplementación con N recomendada para los cultivos de maíz está entre 80 y 150 Kg/há (Perdomo y Gardellino, 2006) La FBN es favorecida en los cultivos de gramíneas por una fertilización liviana (10-30 Kg de N/há. en la siembra) para el establecimiento del cultivo. El agregado de material orgánico con alta relación C/N o fertilizante nitrogenado de amonificación progresiva o de urea acompañada de algún inhibidor de la nitrificación (Frioni, 2006) son fertilizantes menos contaminantes que los tradicionales por la disminución del riesgo de lixiviación y volatilización (sería interesante determinar en que medida son utilizados en un país en que uno de sus principales recursos naturales son las aguas.)

Desde el año 2000 al año 2007 el cultivo de maíz ha aumentado desde 61.5 mil há a 85 mil há. en Uruguay acompañando la tendencia mundial de consumo del mismo (Figura 2)

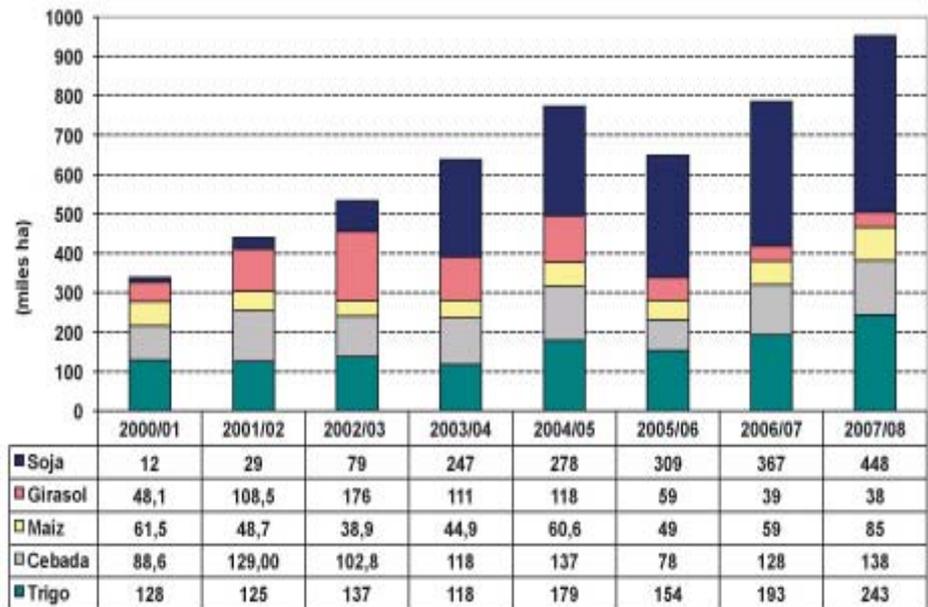


Fig. 2. Área de cultivos de secano seleccionados por año agrícola en miles de há. Fuente: Anuario estadístico agropecuario 2008, DIEA-MGAP.

Bacterias diazotrofos asociados a maíz (*Zea mays*)

Relacionados a maíz se han identificado las siguientes bacterias: *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus circulans*, *Rhanella aquatilis*, *Paenibacillus azotofixans*, *Azospirillum sp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Alcaligenes*, *Methylocystis*, *Beijerinckia*, *Geobacter*, *Rhodovulum*, *Methylobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Methylocella*, *Delftia Azoarcus sp.*, (Roesch *et al.*, 2006, 2007 y 2008), *Brevundimonas*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Pantoea spp.* y *Pseudomonas spp.*(Montañez *et al.*, 2008)

Se ha demostrado que la inoculación de gramíneas, incluido el maíz, con especies de bacterias diazotrofas han producido aumentos en la producción, mas allá de que no se confirme que ese aumento sea debido al aporte de N por fijación biológica o por otro mecanismo de promoción del crecimiento (Kennedy, 2004; Ahmand, 2006; Jha y Kumar, 2009) Analizando más específicamente la cantidad de N fijado por técnica de N-15 se verifico que ésta varía dependiendo de la cepa de *Azospirillum* y del cultivar de maíz utilizados (Garcia de Salomone, 1996)

Comprender las razones de la variación en los resultados de los experimentos es imprescindible para poder recomendar un método de inoculación que sea aceptado como lo es la inoculación de rizobios a las leguminosas (Jagnow, 1979).

Las interacciones entre bacterias (antagonismo, competencia, comensalismo, mutualismo) son manejadas como una posible causa de esas inconsistencias en los resultados. En ese sentido, se han identificado interacciones positivas entre microorganismos y se han denominado como bacterias "helper" (Barenjee *et al.*, 2006)

También la posibilidad de que existan bacterias que aun no han sido identificadas y que estén contribuyendo a la FBN en un sistema dado. Tomando en cuenta que como regla general se asume que la proporción de bacterias cultivables representa el 1% de la

población total, los análisis con métodos moleculares independientes del cultivo toman gran importancia. Estos muestran una diversidad mucho mayor que la que hoy es posible cultivar. En un estudio de diversidad de bacterias heterótrofas asociadas a maíz, Chelius *et al.* (2001) aislaron en medio de cultivo representantes de 4 divisiones de bacterias y por métodos independientes de cultivo obtuvieron ADN de 6 divisiones de bacterias.

Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar la población de bacterias diazotrofas asociadas a una variedad de maíz (PAU 871).

Objetivos específicos

- a) Obtener una colección de cepas de bacterias diazótrofas rizosféricas y endófitas de plantas de maíz de la variedad PAU 871
- b) Determinar la presencia del gen *nifH* en los aislamientos obtenidos
- c) Agrupar los aislamientos por perfiles de *ARDRA* (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)
- d) Identificar un representante de cada grupo mediante secuenciación de un segmento del gen 16S rADN
- e) Analizar la diversidad intraespecífica de los aislamientos mediante la técnica de GTG-PCR.
- f) Caracterizar los aislamientos por: i) morfotipos de sus colonias, ii) utilización de 3 fuentes de C y iii) relación con el O₂

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de las muestras



Fig.3. Plantas de maíz (*Zea mays* L.) variedad PAU 871.

El material vegetal utilizado en este trabajo se obtuvo de un experimento previo realizado con plantas de maíz (*Zea mays* L.) de la variedad PAU871 en el cuarto de luces del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía.

Las plantas de maíz fueron crecidas en macetas con 2 Kg de suelo proveniente del Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía con 0, 40 y 80 Kg de N agregado/há respectivamente, 3 repeticiones por tratamiento (fig.3). Las plantas fueron regadas con agua corriente y mantenidas durante 60 días.

De cada planta se extrajeron muestras de tallo, raíz y suelo rizoférico. Las muestras de suelo rizoféricos se obtuvieron agitando las raíces, recolectando el suelo que se desprende de ellas y realizando una dilución 10^{-1} (1 g en 9 mL de solución salina estéril). Las muestras de tallo se obtuvieron desinfectando superficialmente con etanol 70% e hipoclorito de sodio 4% y moliendo en mortero un trozo de tallo apical y un trozo de tallo basal con 1ml de solución salina estéril (NaCl 0.8%). Las muestras de raíz se obtuvieron desinfectando las mismas y moliendo en mortero con 1ml de solución salina estéril.

Aislamientos

De cada uno de los preparados anteriores (tallo, raíz y suelo rizoférico) se sembraron asépticamente 100 μ l en frascos conteniendo 5 ml de 3 medios semisólidos sin nitrógeno (jNFb, JMV, LGi,) (Gillis *et al.* 1989; Döbereiner 1992; Reinhold-Hurek *et al.* 1993; Döbereiner, 1995; Cavalcante and Döbereiner, 1998) (ver apéndice I) (dos réplicas por cada muestra). Los frascos con medios semisólidos fueron incubados a 28°C durante 7 días. Luego de la incubación, de cada frasco que evidenció crecimiento (cambio de color en el medio o presencia de turbidez) (Fig.4), se realizaron dos siembras sucesivas en el mismo medio semisólido selectivo con un intervalo de tiempo entre ellas de 7 días, con el propósito de evitar el crecimiento saprofita y minimizar así la ocurrencia de falsos positivos.



Fig. 4. Medios semisólidos usados. LGI y jNFb muestran el color en ausencia de crecimiento bacteriano (verde y amarillo respectivamente) y en presencia de crecimiento (amarillo y azul respectivamente)

Finalmente de cada frasco de la última ronda de selección se tomó una ansada y se estrió por agotamiento en una caja de petri con medio TY (Somasegaran y Hoben, 1994) (ver apéndice I). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 3 días y luego conservadas a 4°C.

De cada placa se reconoció macroscópicamente (de acuerdo a tamaño, coloración, bordes, brillo y otras características observables) las diferentes colonias presentes y se aisló un representante de cada una en placas con el mismo medio.

Conservación de los cultivos

Los cultivos puros crecidos en placas con medio TY sólido se conservaron refrigerados (4°C) para su posterior análisis. Para conservar por más tiempo los cultivos se mantuvieron en TY líquido-glicerol (50%) a -20°C.

Lisis celular

De los cultivos puros y frescos en medio TY sólido (24 hs. de crecimiento) se obtienen lisados celulares. Una punta de anza de un cultivo axénico se resuspendió en 25 µl de buffer de lisis (ver apéndice II) y se calentó en baño seco a 95°C durante 15 min. Luego se mezcló con 225 µl de agua destilada estéril y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Los lisados fueron conservados a -20°C y el sobrenadante se utilizó para la amplificación del ADN.

Amplificación del gen *nifH*

Para confirmar el carácter de fijadores de N₂ de los aislamientos obtenidos se buscó la presencia del gen *nifH* presentes en la mayoría de los diazotrofos conocidos usando un protocolo de PCR anidada y primers degenerados (Yeager *et al.*, 2003). En la primer reacción de PCR se utilizaron los primers 19F (5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3') (Ueda *et al.*, 1995) y *nifH3* (5'-ATRTTRTTNGCNGCRTA-3') (Zani *et al.*, 2000) y en la segunda reacción se utilizaron los primers *nifH11* (5'-GAYCCNAARGCNGACTC-3') y *nifH22* (5'-ADWGCCATCATYTCRCC-3') (Zani *et al.*, 2000). La primera reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 µl conteniendo buffer 1X (Fermentas), 4 mM MgCl₂ (Fermentas), 2 µM de cada primer 19F y *nifH3* (marca Operon), 0.2 mM dNTPs (Sigma), 1mg/ml de BSA, 0.8 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 3 µl de cada lisado celular. Se realizaron 20 ciclos de amplificación en un termociclador Biometra con las siguientes condiciones: 5 min. a 95°C (desnaturalización inicial), 45 seg. a 94°C, 1 min. a 48°, 1 min. a 72°C. A su termino una extensión de 10 min. a 72°C. Los cebadores 19F y *nifH3* son primers degenerados que amplifican una región del gen *nifH* de aproximadamente 460 pb.

Luego de la amplificación, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5 X (ver Apéndice II) con Bromuro de Etidio como agente intercalante para la detección del ADN. Se cargaron 5 µl de producto de PCR con 2µl de buffer de carga (ver Apéndice II). Se utilizó marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Se aplicó un voltaje de 5V/cm y se reveló por exposición a luz UV.

Con las muestras que amplificaron el fragmento esperado se realizó una segunda PCR con los primers nifH11 y nifH22 que amplifican un fragmento de 360 pb. La segunda reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo buffer 1X (Fermentas), 2 mM MgCl₂ (Fermentas), 1 µM de cada primer nifH11 y nifH22 (Operon), 0.2 mM dNTPs (Sigma), 1mg/ml de BSA, 0.8 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 3 µl de una dilución 1/10 del producto de la PCR anterior. Las diluciones de la PCR fueron hechas en buffer TE (10:1) (ver apéndice II). Las condiciones de ciclado fueron: 95 °C durante 5 minutos seguido por 35 ciclos de: 45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 54 °C y 1 minuto a 72 °C. A su termino una extensión de 10 min. a 72°C. La verificación de la amplificación se realizó de la misma forma que para la primera PCR.

Morfología de las colonias

Se realizó una evaluación visual de las colonias de cada cepa crecidas en las placas de medio TY y se clasificaron según las siguientes características: forma, color, elevación, borde y tamaño.

Morfología al microscopio óptico

Para la observación microscópica se realizó un frotis a partir de un cultivo líquido fresco en medio TY, posteriormente una tinción de Gram y se observó en el microscopio óptico con el objetivo x 100 con aceite de inmersión

Identificación de los aislamientos

Para la identificación de los aislamientos *nifH* positivos se empleó en primer lugar la técnica de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) con el fin de agrupar los aislamientos según su perfil de restricción; luego se utilizó la secuenciación del 16S rDNA como método de identificación.

- ARDRA

La amplificación del ADN que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal se realizó utilizando los primers universales para el dominio eubacteria 41f (5'-GCTCAGATTGAACGCTGGCG-3') y 1488r (5'GGTTACCTTGTTACGACTTACC-3') (Herrera- Cervera, 1999) La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo buffer 1X (Fermentas), 2.5 mM MgCl₂ (Fermentas), 0.2 µM de cada primer (Operon), 0.2 mM dNTPs (Sigma), 2 mg/ml de BSA, 1 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 3 µl de los lisados. Se espera un segmento amplificado de aprox. 1500 pares de bases. Debido a la variación en el contenido de proteínas presentes en el lisado utilizado para las PCR, algunos lisados fueron diluidos al décimo en buffer TE (10:1) (ver apéndice II). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 35 minutos a 94°C , 1 min. a 57°C, 1 min. a 72°C, repetición de 35 ciclos, extensión de 10 min. A 72°C. Para verificar la amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% sembrando 5µl del producto de PCR en solución con 2µl de buffer de carga. Se aplicó un voltaje de 5V/cm y se reveló bajo luz UV.

La digestión fue realizada en un volumen total de 13 μ l conteniendo 10 μ l del producto de la amplificación, 1.5 U de endonucleasa *Msp*I, buffer TANGO 1x (ambos marca Fermentas) y agua hasta completar el volumen. La mezcla se incubó durante 4 hs a 37°C.

El perfil de restricción fue resuelto mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, sembrando en cada pocillo la totalidad de la digestión. Se aplicó un voltaje de 5V/cm. durante 6 hs y se reveló bajo luz UV. Se utilizó el marcador de peso molecular 100pb (Fermentas).

- Secuenciación

El 16S rRNA amplificado se purificó utilizando el kit PCR Cleanup Axyprep™ (Axygen Biosciences) y se cuantificó mediante comparación visual con los fragmentos del marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas) en gel de agarosa 1%.

La secuenciación fue realizada por MacroGen S.A (www.macrogen.com). La secuencia obtenida se comparó con secuencias depositadas en Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) por medio del programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) y en Ribosomal Data Base Project (www.rdp.cme.msu.edu/seqmatch)

DNA fingerprinting (GTG)₅-PCR

Para analizar la diversidad a nivel de cepa se empleó la técnica de rep-PCR utilizando la secuencia repetida en tándem (GTG)₅ (Versalovic *et al.*, 1994)

La reacción se realizó en un volumen total de 25 μ l, con 2 μ l de lisado y 23 μ l de mix preparada con buffer 1X, 2.5mM de MgCl₂, 0.5 μ M de primer, 2.0 mg/ml de BSA, 0.2mM de dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas) y agua suficiente para un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de ciclado fueron: 5 min. a 95°C seguido de 35 ciclos de 1 min. a 95°C, 1 min a 38°C, 2 min. a 72°C, y una extensión final de 15 min. a 72°C.

Los segmentos amplificados fueron separados en un gel de agarosa 3%, se sembraron 15 μ l del producto de PCR y se realizó una electroforesis a 90 V durante 4 hs. Los geles conteniendo Bromuro de Etidio como agente intercalante y se revelaron bajo luz UV. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb-plus (Fermentas).

Preferencias metabólicas

Para la determinación de las preferencias en la fuente de C de las cepas *Nif*H positivas, se utilizó el medio semisólido RMR (Rennie, 1981) (ver apéndice I) variando la fuente carbonada (Manitol, Acido málico o Sucrosa). Cada cepa fue crecida en 5 mL de medio líquido TY durante 24 horas con agitación moderada a 28°C; 1400 μ l de ese cultivo se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min., se descartó el sobrenadante y el *pellet* resultante se resuspendió en 1400 μ l de solución salina estéril (NaCl 0.8%). El proceso de lavado de las células (centrifugación y resuspensión) se repitió dos veces más. Finalmente 100 μ l de la suspensión celular fueron inoculados en los frascos conteniendo 5 mL del medio RMR con las diferentes fuentes de C. Los cultivos se mantuvieron a 28°C durante 7 días.

RESULTADOS

Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno

Las bacterias previamente seleccionadas por crecimiento en medio semisólido sin N fueron repicadas a placas con medio TY y de cada una de estas placas se eligieron para su aislamiento las colonias morfológicamente diferentes. En total se seleccionaron y aislaron 167 colonias. El mayor número de aislamientos se obtuvo de raíz y representó el 58 % de los aislamientos totales y el menor de tallo con un 17% (Gráfico 1A). El medio selectivo LGI fue el que permitió el mayor nº de aislamientos con un 40% del total de los aislamientos y jNFb fue el medio que seleccionó menor número de aislamientos lo que representó un 29% del total de los mismos (Gráfico 1B).

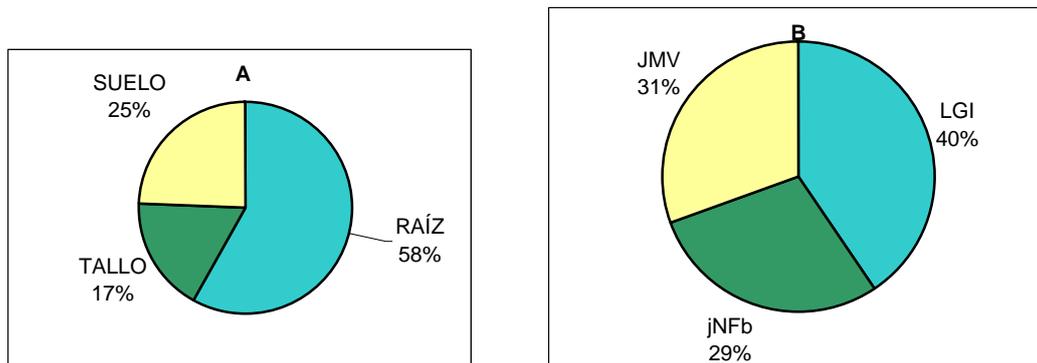


Gráfico. 1-Porcentajes de aislamientos según: **A)** origen de la muestra y **B)** medio de cultivo en el que fueron aislados; sobre un total de 167 colonias

Amplificación del gen *nifH*

La confirmación del carácter diazotrofo fue hecha evidenciando la presencia del gen *nifH* en los aislamientos obtenidos mediante la realización de una reacción de PCR anidada.

La primera reacción de PCR amplificó más de un segmento en la mayoría de los casos hecho que se explica por la utilización de *primers* degenerados. Para las reacciones que amplificaron el segmento esperado (460 pares de bases), se realizó una dilución 1/10 que sirvió como molde para la segunda reacción de PCR. Ésta última, cuando se produjo, amplificó únicamente el segmento esperado de 360 pares de bases, correspondiente a un fragmento del gen *nifH* (Fig. 5).

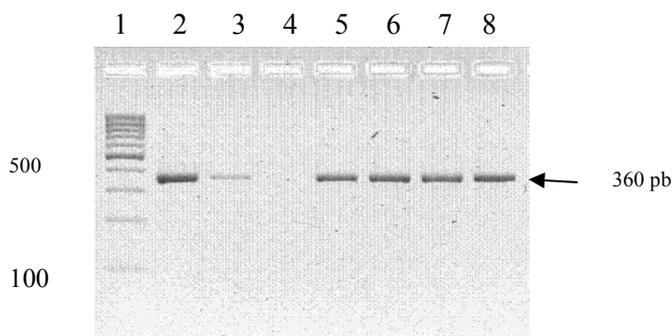


Fig. 5- Producto de PCR correspondiente a un fragmento del gen *nifH*. Pocillo 1 marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), pocillos 2 al 8 amplificación de aislamientos de suelo y raíz. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

De esta manera, se confirmó el carácter de diazotrofo en 37 aislamientos lo que corresponde al 22% del total de los aislamientos analizados.

La colección de aislamientos obtenidos de la variedad PAU 871 se distribuyen según el origen de la muestra en:

- 21 provenientes de raíz (56%), 8 de suelo (22%) y 8 (22%) de tallo (Gráf. 2A)
- 16 aislados en medio LGI (44%), 12 en jNFb (32%) y 9 en JMV (24%) (Gráf. 2B).
- 11 provenientes de plantas sin fertilización (28%), 13 de plantas tratadas con 40Kg/há (36%) y 13 de las tratadas con 80Kg/há (36%) (Gráf. 2C)

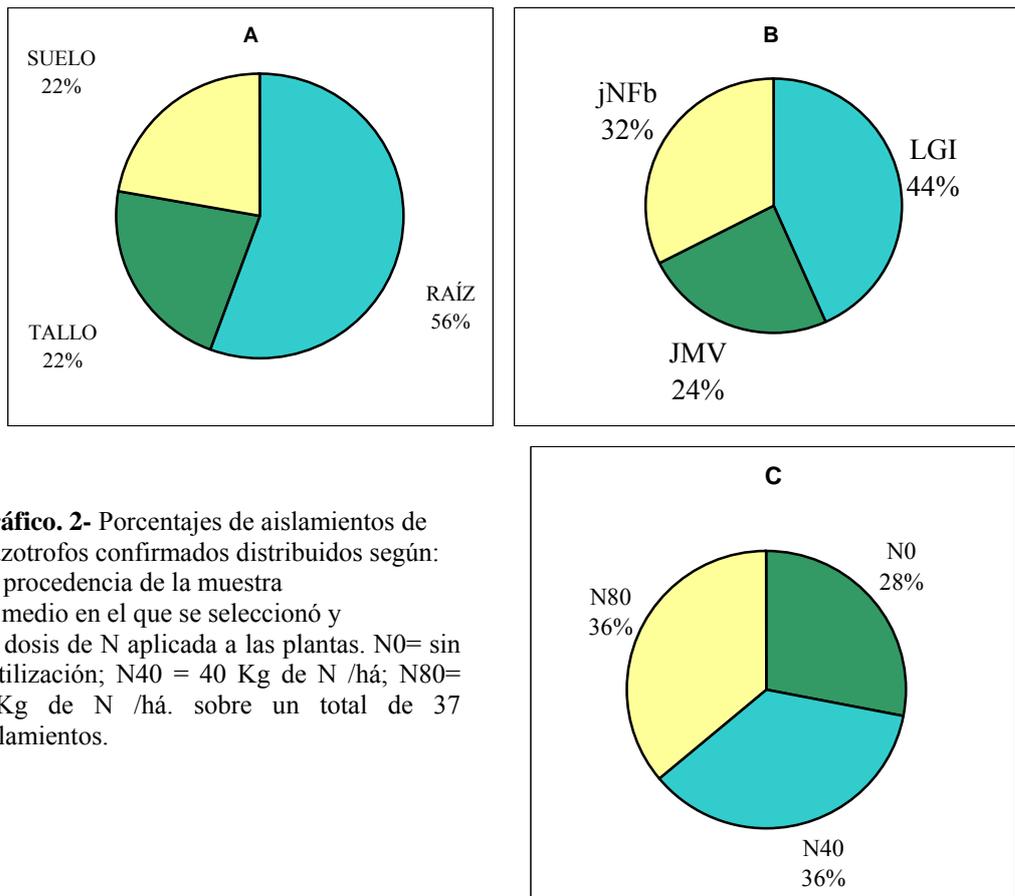


Gráfico. 2- Porcentajes de aislamientos de diazotrofos confirmados distribuidos según: **A)** procedencia de la muestra **B)** medio en el que se seleccionó y **C)** dosis de N aplicada a las plantas. N0= sin fertilización; N40 = 40 Kg de N /há; N80= 80Kg de N /há. sobre un total de 37 aislamientos.

Hubo una segunda confirmación sembrando nuevamente los aislamientos *nifH* + en el mismo medio semisólido selectivo del que procedían. Todos crecieron demostrando que además el gen de la nitrogenasa se expresó en los cultivos puros.

Morfología macro y microscópica

La morfología de todas las colonias aisladas fue aproximadamente circular, de bordes enteros y de superficie lisa. Los colores observados en los cultivos puros van del blanco, blanco crema, crema y destaca un tipo de aislamiento que difunde al medio un color amarillo-verdoso (Fig. 6).

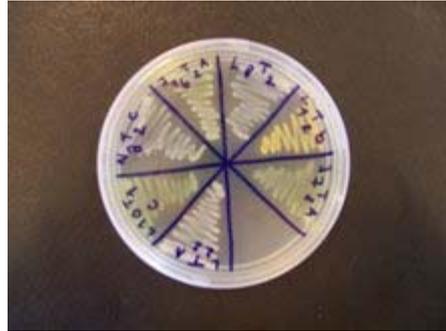


Fig. 6- Crecimiento luego de 24 hs. de incubación en medio TY de cepas provenientes de tallo.

Todos los aislamientos fueron gram negativos. La morfología al microscopio óptico está entre cocoides, cocobacilos y bacilos.

Identificación de los aislamientos

ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

De los 37 aislamientos, en 36 de ellos se amplificó un fragmento de 1500 pares de bases del gen que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal (16S rARN). Este producto de PCR fue digerido con la enzima *MspI*. El producto de esta digestión fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa 3% arrojando perfiles de restricción que permitieron agrupar los aislamientos en 8 grupos diferentes.

Entre los aislamientos provenientes de raíz se diferenciaron 5 perfiles (Fig. 7). En esta figura se pueden apreciar similitudes y diferencias entre los perfiles así como su abundancia en raíz.

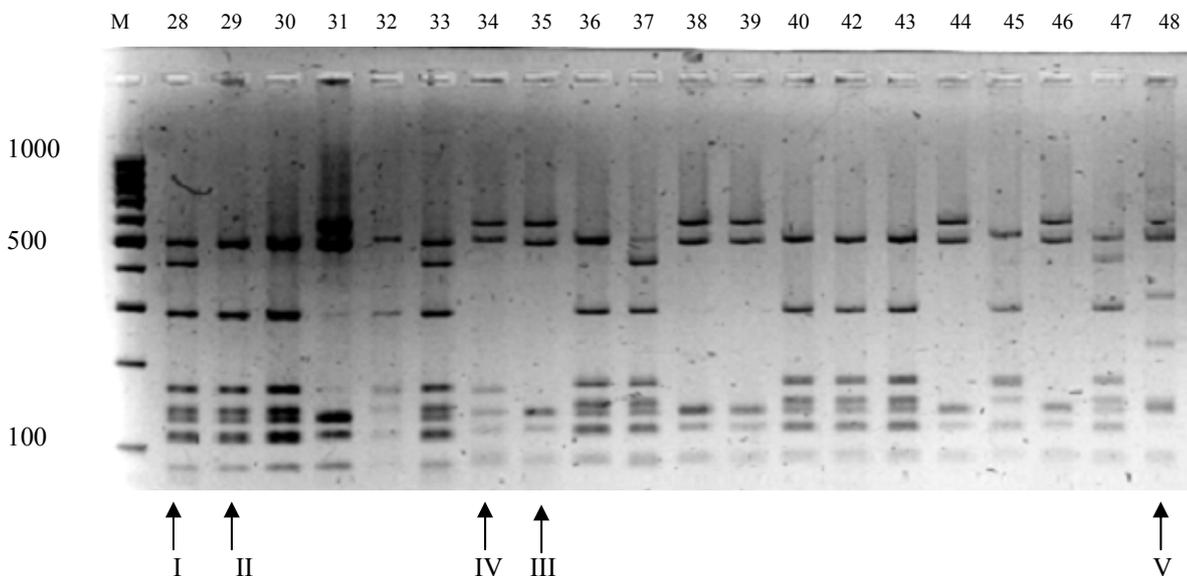


Fig. 7- Perfiles de restricción de 16S rDNA con la enzima *MspI* (ARDRA) resuelto en gel de agarosa al 3%. Pocillo 1 marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), pocillos 2 al 21 aislamientos de raíz de la variedad PAU 871. Las flechas señalan los diferentes perfiles.

Algunos de estos perfiles son claramente diferentes mientras que otros son muy similares; los perfiles III y IV solo difieren en la presencia o ausencia de una banda de

aprox. 180 pb y los perfiles I y II sólo difieren en la presencia o ausencia de una banda de aprox. 400 pb.

El perfil V es diferente al resto y está presente en solo un aislamiento y se encontró exclusivamente en raíz. También el perfil I fue recuperado exclusivamente en tejido de raíz aunque en mayor abundancia (4 aislamientos).

Igual procedimiento para los aislamientos de tallo mostró la presencia de 3 perfiles: un único aislamiento con un perfil al que designamos como VII, un único aislamiento con perfil II y 5 aislamientos con perfil III.

Para suelo también se distinguieron 3 perfiles: 3 aislamientos con un perfil recuperado exclusivamente en suelo al que se designó como perfil VI, un aislamiento con perfil II y 4 con perfil III.

Los resultados generados se exponen en el **Gráfico 3** donde se puede observar que los perfiles II y III fueron los más abundantes dentro de la población de bacterias diazotrofas aisladas, además ambos perfiles estuvieron presentes entre los aislamientos de suelo, tallo y raíz.

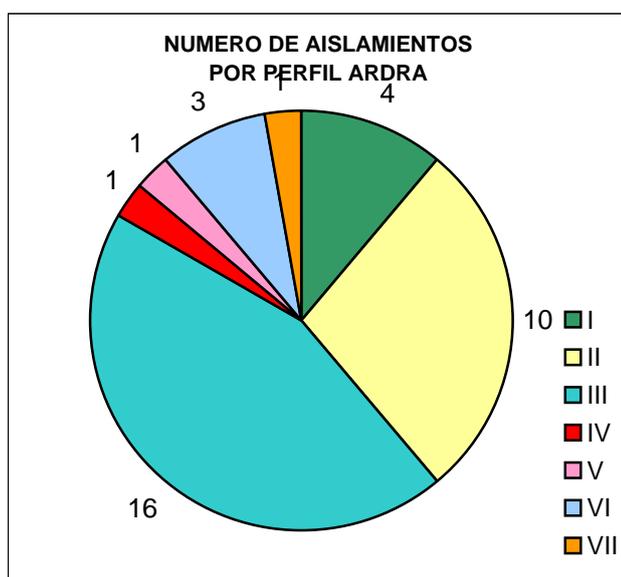


Gráfico 3. Número de aislamientos por perfil ARDRA.

Secuenciación del 16S rARN

Para la secuenciación se eligió por lo menos un aislamiento representante de cada perfil, la elección incluyó aislamientos provenientes de los tres tratamientos. Se realizó la secuenciación de aprox. 800 bases nucleotídicas a partir del fragmento amplificado.

La secuencia de nucleótidos fue contrastada con las secuencias depositadas en dos bancos de datos (*GenBank* y *Ribosomal Database Project*). Mediante el alineamiento de las secuencias se obtuvieron en todos los casos (excepto para el perfil V) una cobertura del 98% de la secuencia y en todos los casos se obtuvieron porcentajes de homología del 99%. En el caso del perfil V no fue posible obtener una secuencia capaz de ser alineada.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis por BLAST de 9 de las 10 secuencias. Se observa que, excepto para el aislamiento 45R, todas las secuencias

fueron claramente incluidas en un género. Para 2 de las secuencias fue posible asociarlas a una única especie.

Tabla 2. Identificación de los aislamientos mediante secuenciación del 16S rRNA.

Perfil ARDRA	Aislamiento	Filiación taxonómica	Especie/s relacionadas y N° de acceso en Genbank	% similitud
I	28 R	Enterobacter spp.	<i>E. ludwigii</i> AJ853891.1	99
II	97S	Raoultella spp.	<i>R. terrigena</i> Y17658.1	99
II	45 R	Enterobacter spp. Pantoea spp.,	<i>E. ludwigii</i> <i>P. agglomerans</i> AJ853891.1 AY335552	99
III	101 S	Pseudomonas spp.	<i>P. syringae</i> <i>P. migulae</i> <i>P. koreensis</i> <i>P. fluorescens</i> CP000075 NR_024927 NR_025228.1 CP000094.2	99
III	46 R	Pseudomona spp.	<i>S. migulae</i> <i>P. syringae</i> <i>P. koreensis</i> <i>P. fluorescens</i> AM293565 CP000058.1 NR_025228.1 CP000094.2	99
III	68T	Pseudomonas spp.	<i>P. fluorescens</i> <i>P. koreensis</i> CP000094.2 NR_025228.1	99
IV	34R	Pseudomonas spp.	<i>P. veronii</i> <i>P. fluorescens</i> EU111725 AM181176	99
V	48R	No fue posible el alineamiento		
VI	99S	Achromobacter spp.	<i>A. xylooxidans</i> <i>A. faecalis</i> AY873802 AJ509002	99
VII	55T	Ochrobactrum spp	<i>O. anthropi</i> <i>O. tritici</i> CP000759 AM114402	98

En la segunda columna la letra que sigue al n° de aislamiento indica la procedencia del mismo (R=raíz; S=suelo; T=tallo)

Todos los perfiles fueron representantes de Protobacteria:

- Perfiles I, II, III, IV gamma proteobacteria
- Perfil VI beta proteobacteria
- Perfil VII alfa proteobacteria

DNA fingerprinting (GTG)₅ - PCR

Con el propósito de estudiar la diversidad intraespecífica, el genoma completo de cada aislamiento *nifH* positivo fue amplificado con el primer repetido (GTG)₅ y resuelto en electroforesis en gel de agarosa 3%.

Para los 20 aislamientos provenientes de raíz, se obtuvieron 15 perfiles diferentes (nombrados con letra desde la A hasta la Ñ), lo que demuestra que algunas cepas fueron aisladas repetidas veces (Fig. 8).



Fig. 8- GTG-PCR. Productos de la amplificación con primer (GTG)₅ resueltos en gel de agarosa al 3%. Pocillos 1 y 22 marcador de peso molecular 100 pb Plus (Fermentas). Pocillos 2 al 21: aislamientos de raíz identificados con sus respectivos números. Arriba con letras de la A a la Ñ se indican los diferentes perfiles.

Entre los 8 aislamientos de tallo se encontraron 7 perfiles de GTG-PCR diferentes (perfiles O al U) y 6 cepas diferentes entre los 8 aislamientos de suelo (perfiles desde la V a la Z²).

Ninguna de las cepas aisladas de raíz fue aislada también en tallo o suelo. Todas las cepas aisladas más de 1 vez provienen siempre de la misma sección de la misma planta (tabla 3).

Tabla 3- Procedencia de los aislamientos correspondientes a la misma cepa.

	T 0	T40	T80
RAÍZ	2 aislamientos (28 y 33) Con perfil A de GTG-PCR y perfil I de ARDRA	5 aislamientos (29,30,36,43 y 45) Con perfil B de GTG-PCR y perfil II de ARDRA	
TALLO	2 aislamientos (53 y 54) Con perfil O de GTG-PCR y perfil III de ARDRA		
SUELO			3 aislamientos (98, 99 y 100) Con perfil X de GTG-PCR y perfil VI de ARDRA

T0= plantas sin fertilización; T40=plantas con 40 Kg de N aplicado/há; T80= plantas con 80 Kg de N aplicado/há.

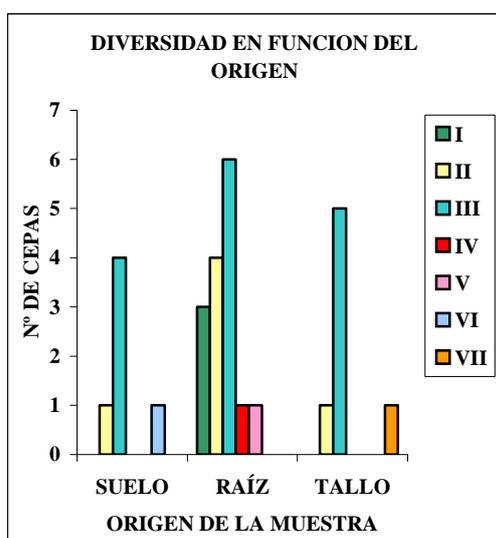
La técnica de GTG-PCR permitió apreciar la diversidad de cepas dentro de los distintos perfiles de ARDRA (tabla 4). De un total de 28 cepas el 57 % tuvieron un perfil III y IV cuyos representantes secuenciados fueron asociadas al género *Pseudomonas*.

Tabla 4. Diversidad observada dentro de cada perfil ARDRA

Perfil ARDRA	Nº Aislamientos	Nº de cepas
I	4	4
II	10	5
III	17	15
IV	1	1
V	1	1
VI	3	1
VII	1	1

En los Gráficos 4A y B las diferentes cepas fueron agrupadas por perfil ARDRA y distribuidas según: (A) el sitio de donde fueron aisladas y (B) la dosis de fertilización de donde procedía la muestra. En el Gráfico 4A se puede ver que la mayor diversidad procede de tejido de raíz con cepas de perfil I, IV y V recuperadas únicamente en este tejido (las dos últimas con un solo aislamiento). El perfil VI solo se encontró en suelo rizosférico y perfil el VII solo en tallo. En el Gráfico 4B, se puede apreciar que existe mayor diversidad en el tratamiento con 80 Kg de N/há. con cepas de los perfiles V, VI y VII solo recuperadas en ese tratamiento y con un único aislamiento.

4A



4B

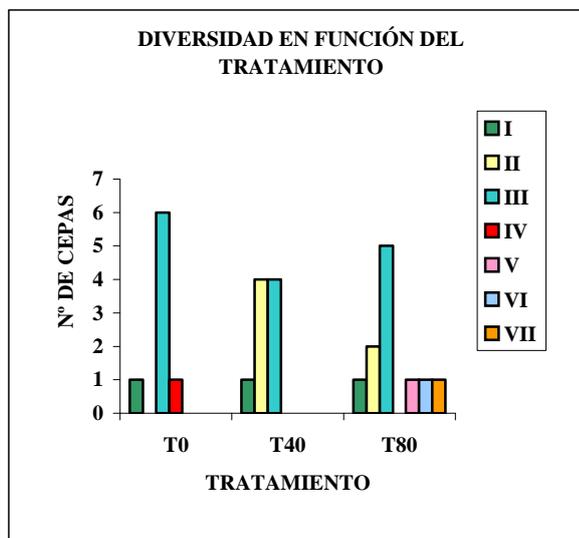
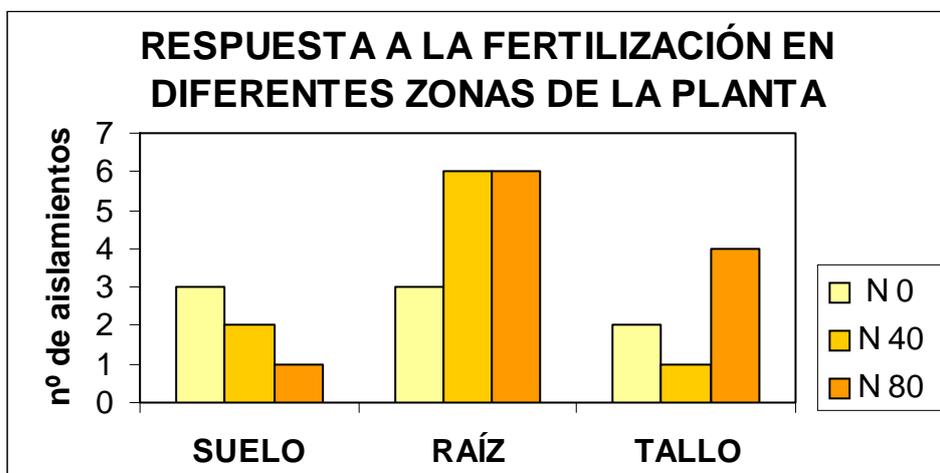


Gráfico 4.-Nº de cepas dentro de cada perfil de ARDRA según A) origen de la muestra y B) según la dosis de N aplicada a las plantas. T0= sin fertilización; T40 = 40 Kg de N aplicado/há; T80= 80Kg de N aplicado/há.

Si discriminamos doblemente, por zona de la planta y por fertilización aplicada (**Graf. 5**) observamos que la tendencia es diferente si se trata de bacterias endófitas o rizosféricas, en el primer caso el nº de aislamientos aumenta con la fertilización y en el segundo disminuye. En la **tabla 5** vemos un detalle completo de los aislamientos por perfil ARDRA y GTG-PCR obtenidos por zona de la planta y por tratamiento. Acá vemos por ejemplo que la disminución en el nº de aislamientos con perfil II que se evidencia en los datos globales del gráfico 4B no ocurre en tejido de raíz y que el

aumento de la diversidad total en términos de nº de aislamientos, perfiles ARDRA y GTG no ocurre en suelo.



Gráf. 5. Nº de cepas aisladas de suelo, raíz y tallo según tratamiento recibido (tratamientos con 0, 40 y 80Kg de N/há respectivamente).

Tabla 5. Aislamientos de **TALLO, RAÍZ Y SUELO** obtenidos de plantas con diferentes dosis de N indicando su perfil ARDRA y GTG.

TALLO								
0Kg N/há			40Kg N/há			80Kg N/há		
Aislamientos	ARDRA	GTG-PCR	aislamientos	ARDRA	GTG-PCR	aislamientos	ARDRA	GTG-PCR
53 y 54	III	O	65	II	Q	55	VII	P
68	III	S				66	III	R
						69	III	T
						71	III	U
RAÍZ								
28 y 33	I	A	29, 30, 36, 43 y 45	II	B	32	II	D
34	IV	E	31	III	C	39	III	I
35	III	F	37	I	G	40	II	J
			38	III	H	46	III	M
			42	II	K	47	I	N
			44	III	L	48	V	Ñ
SUELO								
96	III	V	97	II	W	98, 99 y 100	VI	X
102	III	Y	103	III	Z			
104	III	Z ²						

Preferencias metabólicas

Los aislamientos inoculados en medio semisólido fueron capaces de crecer bien y sin preferencia observable en sucrosa, ácido málico y manitol. Excepto el aislamiento 35R (correspondiente al perfil III) y el 36R (correspondiente al perfil II) que crecieron escasamente con las 3 fuentes de C.

Para determinar características en cuanto a su relación con el O₂ se evaluó en el medio RMR la formación o no de una película o velo. Se espera que aquellas bacterias móviles crezcan mas allá del recorrido que traza el tip al inocular el medio semisólido. Además, las móviles que presenten preferencias hacia un rango estrecho de concentración de O₂ desarrollarán una película o velo. Esta evaluación se realizó únicamente para aquellos inóculos con buen crecimiento hasta el 7° día y por triplicado. Para casi todos los aislamientos se evidenció movilidad y para algunos se observó formación de velo o película. **En la tabla 6** se resumen las características de los aislamientos que fueron seleccionados de cada perfil ARDRA.

Tabla 6- Resumen de las características de los aislamientos identificados.

Aislamientos	Perfil ARDRA y Filiación taxonómica	Morfología de la colonia	Morfología al microscopio	Formación de velo (tres repeticiones)
28R	I - Enterobacter	Blanca brillante	Cocobacilos	1
97S	II - Roulletella	Blanca grande y densa	Cocobacilos	No
101S	III- Pseudomonas	Blanco-crema. Difunde amarillo	Bacilos cortos	No
45R	II- Enterobacteriaceae	Blanca, borde irregular	Cocobacilos	1
46R	III -Pseudomonas	Crema, brillante, gde. Difunde amarillo	Cocobacilo	2
68T	III-Pseudomonas	Gomosa. Difunde amarillo.	Bacilos cortos	N/D
34R	IV - Pseudomonas	Blanca circular diminuta, difunde amarillo	Bacilos largos	2
48R	V -Sin determinar	Blanco-crema rugosa	Cocobacilos	2
99S	VI -Achromobacter	Blanco-seco, cremosa	Bacilos cortos	No
55T	VII -Ochrobactrum	Blanca amarillosa	N/D	N/D

DISCUSIÓN

La selección de plantas capaces de establecer asociaciones con organismos diazotrofos que realicen FBN, en las condiciones que el cultivo puede desarrollarse, es una vía indiscutible para paliar el problema de la lixiviación de nitratos provenientes de la agricultura. Además del ahorro que significa considerando que, por ejemplo para el cultivo de maíz, los fertilizantes nitrogenados representan el 75% de los costos de fertilización y el 40% de los costos totales de producción del cultivo (Machado *et al.*, 1998), aunque muchas veces no se pueda cubrir la totalidad de la demanda de N por medio de la FBN (Riggs *et al.*, 2001). Con este objetivo se han realizado desde la década del 70 esfuerzos para comprender y utilizar la FBN en otros cultivos diferentes a las leguminosas. Similar a lo que ocurre en la asociación leguminosa-*Rhizobium*, se ha observado que la variedad del cultivo, especie e incluso subespecie de bacteria que se ha

asociado a ese cultivo, capacidad del microorganismo para sobrevivir a las condiciones impuestas para el cultivo (como infectividad, competencia con otras bacterias, baja sensibilidad a la fertilización nitrogenada, etc) son algunos de los variables mencionadas al evaluar la FBN.

El presente estudio se enfocó en caracterizar una población de diazotrofos asociada a una variedad de maíz que mostró disminución de la captación de N atmosférico cuando fue fertilizada con nitrógeno (Montañez *et al.*, 2008).

Aislamiento de diazotrofos

En este trabajo se utilizaron para el aislamiento de diazotrofos, 3 medios semisólidos sin nitrógeno que varían en su composición. Los medios de cultivo utilizados son semiselectivos ya que la presencia de trazas de N proveniente de los reactivos (incluida el agua destilada) hace posible el crecimiento de organismos que utilizan N combinado (Hill y Postgate, 1969). Por esta razón siempre que se investigan poblaciones de diazotrofos es necesario confirmar éste carácter por algún otro método. En el presente trabajo la confirmación del carácter diazotrofo fue hecha evidenciando la presencia del gen *nifH* en los aislamientos obtenidos. Los primers utilizados son primer degenerados y diseñados para amplificar el gen que codifica para las nitrogenasa y nitrogenasas alternativas (las dependientes de Va y Fe o solo dependiente de Fe) (Yeager *et al.*, 2003) cubriendo así la totalidad de organismos diazotrofos conocidos. Con el protocolo de PCR utilizado, el 22% de los aislamientos recuperados a partir de los medios sin N resultaron portadores del gen *nifH*. Cabría esperar un mayor porcentaje de aislamientos confirmados teniendo en cuenta los sucesivos repiques realizados en medios selectivos sin nitrógeno previos al aislamiento final del que se obtiene el ADN para la PCR. La explicación del alto porcentaje de aislamientos que no amplificaron el gen *nifH* podría estar en la base de la técnica de PCR. A pesar de que se utilizaron primers degenerados intentando abarcar la mayor diversidad de secuencias posibles, existen evidencias que señalan que variaciones en un solo par de bases del molde producen cambios decisivos en la hibridación del oligonucleótido con el ADN molde y por lo tanto en los parámetros óptimos para la PCR (Reisembach *et al.*, 1992; Suzuki y Giovannoni, 1996). Diferentes sesgos son inevitables en los estudios de diversidad de una comunidad microbiana cuando se utiliza la técnica de PCR. Más específicamente, Bürgmann *et al.* (2004) compararon los productos de amplificación con un primer universal para diazotrofos y con diferentes *sets de primers* diseñados para diferentes grupos de diazotrofos. El primer universal no amplificó tres especies de referencia (de tres géneros diferentes) de las seis utilizadas estando todas contempladas en el diseño del primer universal. Esto demuestra que es casi imposible abarcar la totalidad de los diazotrofos utilizando primers degenerados.

De los tres medios utilizados, el medio LGI fue el que permitió recuperar un mayor número de aislamientos. Si bien este medio fue asociado originalmente con la selección de *Azospirillum amazonensis*, en él se pueden seleccionar una amplia variedad de otras especies y géneros (Baldani y Baldani, 2005), como ocurrió en este estudio. Además de la composición, otras variables del medio de cultivo como el pH y la temperatura juegan un papel determinante al intentar recuperar un organismo dentro de una comunidad, especialmente aquellos con requerimientos especiales. Al comparar con ensayos anteriores como el de Montañez *et al.*, (2008), se observa que fue mayor el número de aislamientos obtenidos a partir del medio jNFb (una variación del medio

NFb que permitió el aislamiento del género *Spirillum* y la descripción y creación del género *Azospirillum* (Baldani y Baldani, 2005).

El nº de diazotrofos obtenidos en el muestreo de raíz fue ampliamente superior al de los muestreos de suelo y tallo. Resultados similares fueron observados en un estudio de poblaciones de diazotrofos asociados a dos cultivares de maíz (Roesch *et al.*, 2006) donde los autores concluyen que la raíz es, independientemente del tipo de cultivar y el estado fenológico del cultivo, el sitio preferencial de colonización explicando que posiblemente esto ocurra por la mayor disponibilidad de fuente de carbono junto a una menor competencia dentro de los tejidos.

En este estudio el nº de aislamientos obtenidos nos da una primera idea de la diversidad de la población estudiada ya que la morfología de las colonias fue el primer "filtro" utilizado para la selección de los aislamientos y su posterior análisis de diversidad a nivel molecular. Un segundo parámetro de diversidad utilizado en este trabajo fue genético a través del análisis de perfiles de ARDRA y GTG-PCR. Utilizando éstos métodos fue el tejido de raíz el que produjo mayor diversidad, independientemente de la dosis de N aplicado. Estos resultados difieren con los encontrados por Roesch *et al.*, (2008) donde se analizó la diversidad de poblaciones de diazotrofos asociados a rizósfera y tejidos de raíz y tallo de maíz por métodos independientes de cultivo, en base a fragmentos del gen *nifH* y posterior secuenciación de los mismos; los resultados indicaron que la mayor diversidad se encontró en rizósfera. La sensibilidad de la amplificación por PCR para detectar cantidades muy pequeñas de ADN además de evitar el filtro que implican las condiciones de cultivo hace a las técnicas independientes de cultivo las preferidas a la hora de estudiar diversidad.

En nuestro estudio muchos de los aislamientos endófitos no fueron detectados en rizósfera. El origen de estas poblaciones podría estar en el interior de las semillas, inoculados por insectos fitófagos (lo cual es improbable en las condiciones en las que fueron cultivadas las plantas) o en la rizósfera en un número tan bajo que no fue posible cultivarlos; esta última hipótesis sería consistente con los resultados de Roesch *et al.*, (2008).

El nº de aislamientos obtenidos de las plantas sin fertilización fue menor al de las plantas fertilizadas. De los 7 perfiles ARDRA diferenciados entre el total de los aislamientos 6 fueron encontrados en las plantas fertilizadas con 80 Kg de N/há; en cambio, de las plantas sin fertilización y con 40 Kg N/há se obtuvieron 3 perfiles diferentes en cada una.

En suelo se han informado anteriormente tanto aumento como decremento en la diversidad de bacterias totales en función de la aplicación de N, y estas variaciones pueden ser explicadas por el estado previo del suelo, sobre todo la relación C/N (Demoling *et al.*, 2008). La diversidad de diazotrofos en suelo sin carencia de C, se ha observado que puede aumentar cuando se fertiliza hasta con 150 Kg de N/há (Teng *et al.*, 2009), lo que puede explicarse por una mejora en las condiciones nutricionales que permiten un buen desarrollo de cualquier especie incluidos los diazotrofos.

Varios autores han estudiado el efecto de la fertilización sobre las poblaciones de diazotrofos asociados a maíz (rizosféricos y endófitos). Piceno y Lovell (2000) han estudiado el efecto a corto plazo (2 y 8 semanas) que tiene la aplicación de N en dosis hasta el doble de la que utilizamos en nuestro estudio (16,3 g/m²) sobre suelo rizosférico y han observado estabilidad de la comunidad de diazotrofos. Cohelo *et al.*, (2009) estudiaron el efecto de la fertilización con 120 Kg.N/há. respecto a la fertilización con

12 Kg.N/há sobre la diversidad de diazotrofos rizosféricos, para dos cultivares de sorgo bicolor. Para ambos cultivares se observó reducción en la diversidad y abundancia de las poblaciones presentes en las plantas con fuerte fertilización respecto a las ligeramente fertilizadas, pero la magnitud de los cambios fue muy superior en uno de los cultivares. En forma similar, Tan *et al.* (2003) en un estudio en plantas de arroz, observaron que la fertilización produjo disminución de la diversidad de la población de diazotrofos endófitos de raíz y disminución de la abundancia.

Estos resultados se contradicen con la tendencia encontrada en este trabajo para endófitos, donde la fertilización provocó un aumento en el número y diversidad de diazotrofos en raíz y tallo. Se detectaron tres perfiles ARDRA (V, VII de raíz y tallo y VI de suelo) únicamente en el tratamiento con 80 KgN/há. Si bien cabe resaltar que se trató de un solo aislamiento de cada perfil, podemos suponer que en estos casos la fertilización aumentó la abundancia de estos organismos permitiendo que fueran detectados lo que aumentó la diversidad total observada. Esto también podría ser explicado por la menor competencia que significó la ausencia de algunas cepas pertenecientes a los perfiles ARDRA II y III; los aislamientos con perfiles II y III mostraron una tendencia a disminuir su diversidad con la fertilización máxima.

Sin embargo, para las muestras de suelo al observar los perfiles ARDRA vemos aumento de la diversidad con dosis media pero una disminución a dosis máxima, y según perfiles GTG-PCR se observa una disminución progresiva de la diversidad a medida que aumenta la dosis de N. Debemos considerar que en el caso de las muestras de suelo se cuenta con un bajo número de aislamientos lo que podría estar llevando a cometer errores en las consideraciones.

Una especie endófito muy estudiada es *Acetobacter diazotrophicus*; en caña de azúcar Fuentes-Ramírez *et al.*, (1999) y en plantas de piña Tapia-Hernández *et al.*, (2000) han observado disminución e incluso desaparición de este microorganismo cuando las plantas crecen con fertilización. En cambio para Muthukumarasamy *et al.*, (1999), la población de *A. diazotrophicus* y *Herbaspirillum* en caña de azúcar no se ven afectadas de la misma forma por la fertilización y considera la posibilidad de que no sea la acción directa del fertilizante sobre las bacterias sino los cambios fisiológicos que éste produce en la planta lo que afecta la colonización de las bacterias. Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado (2003) estudiaron la población de tres cepas diferentes de *A. diazotrophicus* en diferentes cultivares de caña de azúcar y con diferentes niveles de fertilización y concluyeron que la población disminuyó drásticamente en relación a la edad de la planta, la dosis de N utilizada, la cepa y cultivar estudiados.

En síntesis, entre la bibliografía consultada la tendencia general es hacia la disminución de la diversidad en las poblaciones de diazotrofos cuando están sometidos a altas dosis de N asimilable; pero las condiciones iniciales del suelo en cuanto al contenido de carbono, la edad y genotipo de la planta son variables que pueden afectar estas mediciones, sobre todo para los endófitos en los que los mecanismos de colonización de los tejidos pueden estar muy determinados por la planta (Iniguez *et al.*, 2004). En el presente trabajo si bien se observó un aumento en la diversidad total cuando se aplica fertilización, se ve que para algunos géneros la diversidad disminuye. En los estudios de Cohelo *et al.*, (2009) y Tan *et al.* (2003) donde la diversidad total disminuyó también pudieron observarse genotipos que prosperaron en condiciones de alta fertilización nitrogenada.

Identificación de los aislamientos

Los aislamientos fueron agrupados según perfiles generados mediante la restricción de un fragmento de 1500 pb del 16S rADN con la enzima *MspI*, obteniéndose 7 grupos nombrados del I a VII. Uno o más representante de cada grupo fue seleccionado para la secuenciación de una hebra de aprox. 800 bases nucleotídicas de este gen. Esa secuencia fue contrastada con secuencias registradas en dos bases de datos (Genbank y Ribosomal Data Base Project). A continuación se resumen algunas características de cada una de las especies o géneros identificados.

El aislamiento 28R, (perfil I) fue asociado a la especie *Enterobacter ludwigii*. Aislamientos con este perfil fueron recuperados únicamente de raíz de las plantas fertilizadas y sin fertilizar. La especie *Enterobacter ludwigii* fue descrita en el 2005 como una nueva especie dentro del complejo *Enterobacter cloacae* (Paauw *et al.*, 2008). Es un bacilo Gram negativo, móvil, fermentativo. Puede ser diferenciada entre otras especies del género por su crecimiento en mio-inositol y 3-o-metil-d-glucopiranososa. Fue aislado por primera vez de muestras clínicas (Hoffmann *et al.*, 2005). Bacterias fijadoras de N relacionadas a *Enterobacter cloacae* fueron aisladas de la superficie e interior de plantas de banana, aunque sin poder ser claramente afiliadas a una especie (Martínez *et al.*, 2003). *E. ludwigii* ha sido aislada de tejido de raíz de plantas de arroz (Mano y Morisaki, 2008) y de *Lolium perenne* con capacidad de fijar N y promover el crecimiento vegetal mediante varios mecanismos (Shoebitz *et al.*, 2009).

Los dos aislamientos secuenciados con perfil de restricción II fueron asociados a géneros distintos dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (*Raoultella* y *Enterobacter/Pantoea*). Esto demuestra que el análisis de ARDRA con *MspI* para estos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* no permite su diferenciación. Es necesario un análisis más minucioso de los aislamientos con perfil II para determinar a que género pertenecen.

Aislamientos con perfil II fueron recuperados en suelo, tallo y en mayor cantidad de raíz de plantas fertilizadas con 40 KgN/há más que con 80 KgN/há y no fueron aisladas de plantas sin fertilización.

El aislamiento 97S, (perfil II) fue asociado a la especie *Raoultella terrigena*. *Klebsiella terrigena* originalmente fue descrita como una especie nueva por Izard *et al.*, (1981) y reubicada posteriormente por Drancourt *et al.*, (2001) como *Raoultella terrigena*. Son células Gram-negativas, no móviles, encapsuladas, no forman esporas, con forma de bacilos rectos, colonias más o menos cóncava y con grado variable de viscosidad. Son anaeróbicas facultativas y, a diferencia de *Klebsiella*, son capaces de crecer a 10°C. Estas bacterias aisladas de suelo y agua son encontradas también como patógenos oportunistas en animales y humanos inmunocomprometidos (Brisse y van Duijkeren, 2005). Se ha informado la capacidad de fijar N en bacterias de ésta especie en cultivo puro (Zlotnikova *et al.*, 2007). Según la revisión bibliográfica realizada esta especie bacteriana no se ha detectado como endófitas de plantas.

Al aislamiento 45R, (también con perfil II) no fue posible asignarle un género ya que con igual porcentaje de homología se asociaron secuencias correspondientes a *Enterobacter ludwigii* y *Pantoea agglomerans*. La similitud del segmento secuenciado para estos dos géneros impide identificarlo claramente; la misma dificultad fue referida por Shoebitz *et al.*, (2009) quien caracterizó una cepa de *E. ludwigii* como promotora

del crecimiento vegetal. Analizando estos resultados, vemos que los dos aislamientos cuya secuencia del 16S los relaciona a *E. ludwigii* presentan perfiles ARDRA diferentes (I y II), por lo que sería inesperado que dos organismos con perfiles de ARDRA distintos representaran a la misma especie. Frente a esta situación, podríamos secuenciar un segmento mayor del gen 16S rADN para abarcar más regiones hipervariables que permitieran una mejor definición o identificarlos con pruebas bioquímicas. *P. agglomerans* es común encontrarla como una especie aislada de la rizosfera o el interior de plantas, se obtuvieron aislados relacionados a *Pantoea* de muestras provenientes de tejido de raíz de plantas de maíz (Montañez *et al.*, 2008).

Varios aislamientos secuenciados con perfiles de restricción III y un aislamiento con perfil IV fueron identificados como *Pseudomonas spp.* no pudiéndose identificar la especie ya que fueron asociados a especie diferentes. Para estos casos también se aplica la posibilidad de aumentar el tamaño del segmento secuenciado para mejorar la definición. El género *Pseudomonas*, compuesto por bacilos Gram-negativos aerobios estrictos no formadores de esporas, con flagelo polar está asociado en numerosos estudios a la promoción del crecimiento vegetal pero son pocas las especies descritas como fijadoras de N. En general el género *Pseudomonas* es frecuentemente revisado y se incluyen y excluyen especies de las listas de especies aprobadas en diferentes años (Anzai *et al.*, 2000). Es un género de gran diversidad funcional y genética y al parecer de gran variabilidad. Las siguientes especies fueron señaladas como fijadoras de N: *P. stutzeri*, *P. diazotrophicus*, *P. saccharophila*, *P. paucimobilis* y *P. azotocolligan* (Eady *et al.*, 1992). También se han encontrado bacterias de este género fijadoras de N asociadas a líquenes privados de cianobacterias, aunque no ha sido identificada la especie (Liba *et al.*, 2006).

En este trabajo los aislamientos 46R, 68T y 101S (perfil III) (los tres difunden pigmentos amarillo-verdoso al medio) fueron asociados a las especies *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. koreensis* y *P. migulae*. Este perfil no solo fue recuperado en todas las plantas y zonas sino que también fue el más abundante.

El aislamiento 34R, (perfil IV, muy similar al perfil III) (también difunde pigmento amarillo-verdoso) fue asociado a *Pseudomonas veronii* y *P. fluorescens*. Un único aislamiento con este perfil fue recuperado de tejido de raíz de la planta sin fertilización. Todas las especies con las que se encontró homología excepto *P. koorensis* pertenecen al grupo de las pseudomonas fluorescentes

(www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root). El grupo de pseudomonas fluorescentes es llamado así por su característica producción de sideróforos de color amarillo-verdoso que fluorescen bajo luz UV. Esta característica permite descartar a la especie *P. koorensis* en la identificación. La variedad de sideróforo pueden también permitir discriminar entre algunas especies (siderotipificación) aunque en este caso no permitiría la diferenciación entre *P. migulae* y *P. syringae* ya que el sideróforo producido por ambas es el mismo (Meyer *et al.*, 2002).

Pseudomonas fluorescens es una especie oportunista reconocida desde hace mucho tiempo por su diversidad genética, fisiológica y funcional. En un análisis taxonómico realizado dentro de esta especie, se describieron 7 biotipos. La identificación clásica (bioquímica) de esta especie dentro del grupo más general de pseudomonas fluorescentes es bastante compleja debido a la diversidad antes mencionada (Stainer *et al.*, 1966). La secuenciación del genoma completo de 3 cepas de *P. fluorescens* ha

proporcionado la oportunidad para la realización de estudios comparativos que muestran un alto e inesperado grado de diversidad. Normalmente, diferentes cepas de una misma especie se esperaría que mostrarán una superposición sustancial de los genes centrales del genoma. Por ejemplo, cinco genomas secuenciados de *P. aeruginosa* comparten entre el 80%-90% de sus genes, mientras que tres genomas de *P. fluorescens* comparten sólo el 61% de sus genes y tienen un bajo promedio de identidad de nucleótidos. Por estos motivos se revisa nuevamente la clasificación de estos organismos (Silby *et al.*, 2009).

La especie *Pseudomonas syringae* ha sido aislada de los tejidos enfermos de un gran número de especies de plantas (Iacobellis, *et al.* 2003); originalmente clasificadas como especies diferentes, hoy están agrupadas como diferentes patovares de *P. syringae*. Estos microorganismos tienen flagelos polares, con pocas excepciones produce pigmentos fluorescentes, es oxidasa y arginina dihidrolasa negativo (fenotipos que lo distinguen de la mayoría de las demás pseudomonas fluorescentes) (Young, 1991).

Las bacterias pertenecientes a la especie *Pseudomonas migulae* son positivas para las pruebas de oxidasa, catalasa, arginina y dihidrolasa y móviles por medio de un solo flagelo polar, producen un pigmento fluorescente sobre medio King B. Crecen entre 4 y 36 °C, pero no a 41 °C. No se acumula Poli-B-hidroxibutirato. Las colonias en agar nutriente son circulares y no pigmentadas. Todas las cepas se han aislado de aguas minerales naturales (Elomari *et al.*, 1996)

Pseudomonas veronii es una especie de bacilos Gram -, produce pigmento fluorescente, móviles, con un solo flagelo, aislado por primera vez de agua mineral natural en Francia por Elomari, *et al.* (1996). Basado en el análisis del 16S rARN, *P. veronii* ha sido ubicado en el grupo de *Pseudomonas* fluorescentes (Anzai *et al.*, 2000).

El aislamiento 99S (perfil VI) fue asociado a *Achromobacter* (o *Alcaligenes*) *xylosoxidans* y *A. faecalis*. Fue el único aislamiento con este perfil y fue recuperado de suelo. *Alcaligenes xylosoxidans* tiene forma de bacilo recto Gram-negativo, no formador de esporas, móviles con flagelos peritricos, estrictamente aeróbicos (Yabuuchi y Yano, 1981). *A. xylosoxidans* es la especie tipo del género *Achromobacter* que se ha aislado de muestras clínicas (Ramos *et al.*, 1996) y recientemente se aisló como endófito de plantas de trigo con actividad nitrogenasa, producción de AIA y solubilización de P (Jha y Kumar, 2009). Por otro lado, las bacterias de la especie *Alcaligenes faecalis* son cocobacilares, Gram-negativas, no oxidan glucosa y se han obtenido aislamientos fijadores de N₂ desde arroz que en principio fueron identificados como *A. faecalis* y que luego de un análisis más detallado resultaron pertenecer a *A. stutzeri* (Desnoues *et al.*, 2003).

El aislamiento 55T (perfil VII), fue asociado a *Ochrobactrum tritici* y *O. antropi*, fue el único aislamiento con este perfil y fue recuperado de tallo. La especie *O. tritici* fue aislada y descrita por primera vez de suelo y rizosfera de trigo (Lebuhn *et al.*, 2000). Son bacilos cortos Gram-negativos, muy móviles por flagelos peritricos o subpolares, aeróbicos, oxidasa y catalasa positivos. Crece entre 4° y 40 ° C (óptimo 30 °C) y entre los valores de pH de 3 y 9 (el pH óptimo 6 ± pH 7). Las colonias son opacas y mucoide y sin desarrollo de pigmento observado. A nivel del genoma, *O. tritici* es claramente diferente de otras especies del género *Ochrobactrum* en la composición del ADN total, pero por heterogeneidad de secuencia del 16S rADN es posible diferenciarlo de otras

especies del género pero no de *O. anthropi*. La mayoría de las cepas que se disponen de *O. anthropi* están aislados de muestras clínicas humanas, en particular de las personas inmunocomprometidas, existen algunos informes sobre la presencia de *O. anthropi* en el suelo, en el trigo y en los tejidos internos de las raíces, pero la identificación fue basada únicamente en caracteres fenotípicos (Aguillera *et al.*, 1993; McInroy y Kloepper, 1994; Sato y Jiang, 1996).

La secuenciación del 16S rADN permitió para la mayoría de los aislamientos secuenciados la identificación a nivel de género, con excepción de 2 aislamientos que fueron identificados a nivel de especie y de un aislamiento que sólo fue posible asignarle familia. La fidelidad o peso que puede tener cierto porcentaje de homología en general es mayor cuanto mas largas sean las secuencias comparadas. En este sentido sería posible mejorar la identificación secuenciando un fragmento mayor del gen e incluso sus dos hebras. Aún así, no siempre se logra diferenciar una especie de otra muy cercana y el % de homología para el gen 16S rADN puede incluso disminuir cuando aumentan los tamaños de las secuencia comparadas. Al mismo tiempo algunos grupos de organismos comparten casi idénticas secuencias de 16S rADN pero han mostrado un % de hibridación de su ADN total mucho menor que 70% lo que indica que pertenecen a especies diferentes. Un numero demasiado elevado de variaciones acumuladas en la secuencia (lo cual es altamente probable en las regiones hipervariables del gen) también podría simular falsas identidades (Stackebrandt y Goebel, 1994). En nuestro caso para el aislamiento 45R (perfil II) parece que estas falsas identidades llegan a nivel de género aunque es probable que esto sea debido a una baja calidad de la secuencia. Sin embargo al aislamiento 97S, (también perfil II) fue posible asociarlo a un género preciso: *Raoultella*. El análisis de ARDRA con la enzima *MspI* para la familia Enterobacteriae no permite la diferenciación entre géneros por lo que sería necesario digerir con más de una enzima.

Por otra parte para los aislamientos identificados como *Pseudomonas*, la similitud de la secuencia de ADN para diferentes especies impidió su identificación a este nivel. Además, no sabemos si la digestión con *MspI* es o no capaz de diferenciar especies, ya que los tres aislamientos presentan altos % de homología con los mismas 4 especies.

La diferencia en el poder de discriminación taxonómica del ARDRA con *MspI* puede ser entendida por factores como: i) que los procariotas no evolucionan isocrónicamente y hay géneros más homogéneos que otros (en nuestro caso concuerda con las evidencias de que el género *Pseudomonas* es mas heterogéneo que los otros analizados) ii) los taxones género y especie se han definido tradicional y principalmente por características fenotípicas (ejemplo patogenicidad en humanos, animales o plantas) que no siempre se correlacionan con grandes diferencias a nivel del 16S rADN en términos de mutaciones puntuales como las que se analizan con las enzimas de restricción. Para aumentar el poder de resolución deberíamos realizar la restricción del ADN con más de una enzima evaluando así un número mayor de polimorfismos.

Diversidad bacteriana asociada a maíz

En el presente trabajo los representantes de gamma Proteobacteria fueron ampliamente predominantes; descripciones previas de la diversidad de bacterias asociadas a maíz (Chelius y Triplet 2001) y diazotrofas asociadas a maíz (Roesch *et al.*, 2008) mostraron predominancia de alfa y beta proteobacteria y, tanto en este último como en la mayoría de los trabajos de diazotrofos asociados a maíz, se ha señalado la presencia de los generos *Azotobacter* y *Azospirillum* (García de Salomone y Dobereiner 1996; Baldani *et al.*, 1997), ambos ausentes en este trabajo. Resultados similares fueron observados en

un estudio de bacterias en raíces de arroz donde Ueda *et al.*(1995) utilizando el primer 19F (el mismo que se utilizó en la primer PCR para amplificar el gen *nifH* en el presente trabajo) no obtuvieron evidencia de estos géneros ampliamente señalados como asociados a arroz. En su caso, fue analizado como consecuencia de la selección al azar de un n° limitado de clones pero, dado que en nuestro estudio la selección de clones fue diferente y más exhaustiva podríamos pensar, consistentemente con lo analizado mas arriba, que hubo un efecto de sesgo en contra de estos géneros debido a la utilización de este primer.

Dentro del grupo gamma-Proteobacteria, del total de aislamientos el 50% correspondió a perfiles asociados al género *Pseudomonas*; le siguen los asociados a los géneros *Raoultella* y *Enterobacter* con el 35%. El género *Pseudomonas* fue el más abundante tanto en el total como en cada zona en particular: entre los aislamientos de suelo el 50% correspondió a *Pseudomonas*, dentro del tejido de raíz el 25% y en tejido de tallo el 50%. En estudios anteriores en suelos rizosféricos de diversas plantas la proporción de *Pseudomonas* se ha mostrado abundante y dentro de ella muchas han mostrado FBN (Chan y *et al.*, 1994). El género *Pseudomonas* también se ha señalado como uno de los más importantes como endófitos de diversas plantas (Hallmann *et al.*, 1997), asociado a maíz se ha encontrado como el más abundante (entre 40% y 50%) en un estudio realizado con cultivos crecidos en tres tipos de suelo (Hernández *et al.*, 2003). Es probable que el experimento analizado en este trabajo hubiera en la rizósfera un número elevado de estas bacterias lo que explicaría también la gran diversidad de cepas recuperadas, muy superior a la observada para las otras especies.

Por otro lado, no se ha señalado este género como predominante dentro del grupo de los diazotorfos rizosféricos o endofíticos de plantas por lo que parecería que alguna de las condiciones impuestas en este estudio ha generado un importante sesgo a favor del género. Podríamos pensar en un sesgo impuesto por el método de confirmación del carácter de diazotrofo, es decir que el primer utilizado en la reacción de PCR que amplificó el gen *nifH* se hibridó con mayor eficiencia en la secuencia de los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas*. Una forma de evitar este sesgo sería realizar la confirmación con mas de un sets de primer (Burgman *et al.*, 2004). Lo que ocurre con los métodos que utilizan PCR para reconocer estos organismos es similar a lo que ocurrió por la década del 70 con los medios de cultivo: fue posible seleccionar nuevas especies en la medida que se ensayaron nuevas variantes del medio NFb. Existen otros medios de confirmación, el más común es el ensayo de reducción de acetileno (ARA), en este caso la elección de las condiciones del experimento también dejaría afuera muchas bacterias ya que la FBN es un proceso se cumple en un rango estricto de condiciones. De todos modos, sería interesante analizar la actividad nitrogenasa en los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas* como forma de confirmar su capacidad de fijar N₂ ya que no presentaron homología con especies con esta capacidad reportada anteriormente.

No hay un único método para seleccionar diazotrofos que pueda recuperarlos a todos, de modo que cada variante en la metodología puede enriquecer nuestro conocimiento de las poblaciones como es el caso de las técnicas independientes de cultivo.

CONCLUSIONES

Fue cumplido nuestro objetivo de caracterizar la fracción cultivable de la población de diazotrofos asociada a la variedad PAU 871 de maíz.

- Se aislaron un total de 37 bacterias asociadas a maíz con capacidad de crecer en medios semisólidos sin N y con presencia del gen *nifH*.
- Todos los aislamientos resultaron bacilos o cocobacilos gram negativos, formadores de colonias aproximadamente circulares de colores que van del blanco al amarillo pálido.
- Todos fueron capaces de crecer aislados en medio semisólido sin N y con sucrosa, manitol o ácido málico como única fuente de carbono.
- En relación con el oxígeno fueron observados aerobios, microaerófilos y aerotolerantes.
- El mayor % de aislamientos fue obtenido de tejido de raíz.
- El mayor % de aislamientos fue obtenido de las plantas fertilizadas con N independientemente de la dosis.
- La técnica de ARDRA permitió agrupar los aislamientos en 7 grupos.
- La secuenciación del 16S rADN permitió la identificación a nivel de género de 6 aislamientos, a nivel de familia de un aislamiento y a nivel de especie de 2 aislamientos. Los géneros identificados fueron *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*; las especies fueron *Raoultella terrigena* y *Enterobacter ludwigii* y la familia *Enterobacteriaceae*.
- La digestión del 16S rDNA solamente con *MspI* para la familia *Enterobacteriaceae* no permitió discriminar entre los géneros *Enterobacter*, *Pantoea* y *Raoultella* y para el género *Pseudomonas* no permitió discriminar entre especies.
- El género *Pseudomonas* fue el más abundante, tanto en raíz, tallo o suelo.
- Algunos perfiles ARDRA fueron encontrados exclusivamente en una zona de la planta: en tejido de raíz perfiles I, IV y V; en tallo perfil VII; en suelo perfil VI.
- Se realizó la diferenciación genotípica de cepas por perfiles de GTG-PCR y se encontró gran diversidad dentro de cada perfil ARDRA .
- A nivel de cepas ninguna fue recuperada en más de una zona de la planta.
- Cuando la planta crece con fertilización se observó aumento de la diversidad de bacterias endófitas evidenciada por mayor número de perfiles ARDRA, perfiles GTG-PCR y nº de aislamientos y una disminución de la diversidad de bacterias rizosféricas.

Todos los aislamientos de diazotrofos obtenidos son conservados congelados en glicerol en el Laboratorio de Microbiología de Facultad de Agronomía donde se realizó este trabajo.

Perspectivas futuras

La necesidad de aumentar nuestro conocimiento sobre la relación planta-microorganismo tuvo y tiene como objetivo inmediato la adopción de sistemas de cultivo en los que esa relación sea óptima para beneficio del hombre y su ambiente. El punto de partida para llegar a este objetivo son los programas de mejoramiento genético en plantas que contemplen la característica "potencial FBN". Pensando luego en la utilización de inoculantes en el cultivo es que se busca identificar las principales cepas de bacterias que aportan N.

El cultivar estudiado nos permitió observar las características de la fracción cultivable de una población de diazotrofos. Para continuar deberíamos saber si las bacterias que están realizando el principal aporte de N por FBN pertenecen a alguno de los aislamientos obtenidos en este trabajo o si por el contrario no han podido ser cultivadas. Una primera aproximación puede ser evaluar el efecto que tiene sobre la FBN la inoculación de una planta de maíz con cultivos puros de los diferentes aislamientos obtenidos.

Tomando en cuenta los antecedentes que muestran que, en esta variedad de maíz utilizada, las plantas sin fertilización evidenciaron altos niveles de FBN, mientras que las fertilizadas con N mostraron una disminución de los niveles de FBN (Montañez *et al.*, 2008); vemos que la diversidad de la población de diazotrofos en si no estaría garantizando buenos niveles de FBN. ¿Podrían ser los aislamientos recuperados en las plantas sin fertilización y ausentes en las plantas fertilizadas los principales responsables de la FBN observada? ¿El N aplicado afecta directa o indirectamente a estos aislamientos "intolerantes" a la fertilización? Determinar si son una o más de una las cepas que aportan el N mediante la fijación, si son cultivables o no, si son capaces o no de acompañar el crecimiento de la planta son preguntas de importancia práctica a la hora de pensar en la posibilidad de manejo de cultivos con inoculación.

Por otro lado, es necesario confirmar mediante técnicas independientes de cultivo la observación del aumento de la diversidad de diazotrofos endofitos cuando la planta crece con fertilización nitrogenada así como su relación con la abundancia.

Teniendo en cuenta que el género *Pseudomonas* tuvo la mayor representación entre los aislamientos y fueron relacionados a especies que no han sido reportadas anteriormente como capaces de realizar FBN (*Pseudomonas syringae*, *P. migulae*. y *P. fluorescens*), sería interesante medir la actividad nitrogenasa de estos aislamientos y realizar una caracterización genética y bioquímica más profunda.

Otro aspecto importante sería estudiar la colonización y desarrollo de los aislamientos correspondientes a los perfiles I, IV, V, VI y VII que solo fueron encontrados en una zona de la planta (raíz para los tres primeros, suelo y tallo respectivamente).

BIBLIOGRAFÍA

- Aguillera, M.; Hodge, N.; Stall, R. and Smart, G. C., Jr (1993).** Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. *Journal of Invertebrate Pathology*; 68, 68-72.
- Ahmad, F.; Ahmad, I.; Aqil, F.; Wani, A.A. and Sousche, Y. (2006).** Plant growth promoting potential of free-living diazotrophs and other rhizobacteria isolated from Northern Indian soil. *Biotechnology Journal*.10:1112-1123.
- Anzai, Y.; Kim, H.; Park, J.Y.; Wakabayashi, H.; Oyaizu, H. (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16SrRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:1563-1589.
- Baldani, J.I. and Baldani V. (2005).** History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais de Academia Brasileira Ciências*. 77:549-579.
- Baldani, J.; Caruso, L.; Baldani, V.; Goi, S. and Döbereiner, J. (1997)** Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 911-922.
- Banerjee, M.; Yesmin, L. and Vessey, J. (2006).** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides, pp:137-181. In: *M.K Rai (Ed.). Handbook of Microbial Biofertilizers*. New York, Haworth Press, Inc.
- Barea, J. (1991).** Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de ¹⁵N. Vol. II. Fijación de N y micorrizas. pp 105-124. In : *J. Olivares y J. Barea (Ed.). Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, RAYCAR, S. A., Madrid, España.
- Boddey, R. M.; de Oliveira, O.; Urquiaga, S.; Reis, V.; De Olivares, F; Baldani, V. and Döbereiner, J. (1995).** Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174:195-209.
- Boddey, R.; Urquiaga, S.; Reis, V. and Döbereiner, J. (1991).** Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* 137:111-117.
- Brisse, S. and van Duijkeren, E. (2005)** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Veterinary Microbiology*, 105: 307-312.
- Bürgmann, H.; Widmer, F.; Von Sigler, W.; and Josef Zeyer, J. (2004).** New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 240-247.
- Cavalcante, V.A.; Döbereiner, J. (1988)** A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant Soil* 108:23-31.
- Chan, Y.; Barraquio, W. and Roger, K. (1994).** N₂-fixing pseudomonads and related soil bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 13:95-117.
- Chelius, M.K. y Triplett, E.W. (2001).** The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mais* L. *Microbial Ecology*. 41:252-263.
- Coelho, M.; Marriel, I.; Jenkins, S.; Lanyon, C.; Seldin, L. and O'Donnell, A. (2009)** Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 42:48-53.
- Danso, S.K.A. (1995).** Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer Research* 42:33-41.

- Demoling, F.; Ola Nilsson L. and Baath E. (2008).** Bacterial and fungal response to nitrogen fertilization in three coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:370-379.
- Desnoues, N.; Lin, M.; Guo, X.; Ma, L.; Carreño-Lopez, R. and Elmerich, C. (2003)** Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* 149: 2251-2262.
- Döbereiner, J. (1995).** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research* 42:241-250.
- Döbereiner, J. (1992).** History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, 13:1-13.
- Döbereiner, J. (1990).** Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. *Estudos avançados*,4:144-152.
- Drancourt, M.; Bollet, C.; Carta, A. and Rousselier, P.(2001)** Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 925-932.
- Eady, R.R. (1992)** The dinitrogen-fixing bacteria. In: *Balows A, Troper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K (eds) The prokaryotes, vol 1, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg NewYork, pp 534–553.*
- Elomari, M., Coroler, L., Hoste, B., Gillis, M., Izard, D., and Leclerc, H.(1996).** DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:1138-1144.
- Frioni, L. (2006).** Microbiología básica, ambiental y agrícola. *Publicaciones Facultad de Agronomía. Universidad de la República Oriental del Uruguay. pp 169-210.*
- Fu H. and Burris, R. H. (1989).** Ammonium Inhibition of Nitrogenase Activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Bacteriology*, 171: 3168-3175.
- Fuentes-Ramirez, L.E.; Caballero-Mellado, J.; Sepulveda, J. and Martinez-Romero, E. (1999)** Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high Nfertilization. *FEMS Microbiology and Ecology* 29: 117–128.
- Garcia de Salomone, I.; Döbereiner, J.; Urquiaga, S. y Boddey, . R. (1996).** FBN in *Azospirillum* strain-maize genotype asociation as evaluate by N- 15 isotope dilution technique. *Biology and Fertility of Soil* 23:249-256.
- Gillis, M.; Kersters, K.; Hoste, B.; Kroppenstedt, B.; Stephan, M.; Teixeira, K.; Döbereiner, J. and De Ley, J. (1989).** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39:361–364.
- Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero (2001).** Natural endophytic asociation entre *Rhizobium etli* and maíz (*Zea mais* L.) *Journal of Biotecnology* 91:117-126.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F, and Kloepper, J.W. (1997)** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:1997.
- Hameeda, B.;Harini, G.; Rupela, O.P.; Wani, S.P. and Reddy, G..(2008)** Growth promotion of maize by phosphate-solybilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, 163: 234-242.

- Hardy, R.W.; Holsten, R. D.; Jackson, E. K. and Burns, R. C. (1968).** The C₂H₂-C₂H₄ assay for N₂ fixation : Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43: 1185-1207.
- Hernández, A.; Caballero, A.; Pazos, M.; Ramírez, R.; Heydrich, M. (2003).** Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5:45-55.
- Herrera-Cervera, J.; Caballero-Mellado, J.; Laguerre, G.; Hans-Volker Tichy; Requena, N.; Amarger, N.; Martínez-Romero, E.; Olivares, J. and Sanjuan, J.(1999).** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 87 - 97.
- Hill, S. and Postgate, J.R. (1969).** Failure of Putative Nitrogen-fixing Bacteria to Fix Nitrogen. *Journal of General Microbiology* 58:277-285.
- Hoffmann, H.; Stindl, S.; Stumpf, A.; Mehlen, A.; Monget, D.; Heesemann, J.; Schleifer, K.H.; and Roggenkamp, A. (2005)** Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Systematic and applied microbiology*, 28 (3), 206-212.
- Howart, R. W.; Billen, G.; Swaney, D.; Townsend, A.; Jaworski, N.; Lajtha, K. et al. (1996).** Regional nitrogen budgets and riverine N and P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: Natural and human influences. *Biogeochemistry*, 35:75-139.
- Iacobellis, N. S.; Collmer, A.; Hutcheson, S.; Mansfield, J.; Morris, C.; Murillo, J.; Schaad, N.; Stead, D.; Surico, G. and Ullrich, M. (eds) (2003)** *Pseudomonas syringae* and Related Patogens. *Kluwer Academic Publishers*.
- Izard, D.; Ferragut, C.; Gavini, F.; Kersters, K.; De Ley, J. and Leclerc, H. (1981).** *Klebsiella terrigena*, a New Species from Soil and Water. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31:116-127.
- Izquierdo, J and Nüsslein, K. (2006)** Distribution of Extensive *nifH* Gene Diversity Across Physical Soil Microenvironments. *Microbial Ecology*, 51: 441-452.
- Iniguez, A.; Dong, Y.; Carter, H.; Ahmer, B.; Stone, J. and Triplett, E. (2005)** Regulation of Enteric Endophytic Bacterial Colonization by Plant Defenses. *Molecular Plant- Microbe Interaction*; 18:169-178.
- Jagnow, G.(1979)** Nitrogen-fixing Bacteria Associated with Gramineous Roots with Special Reference to *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 142: 399-410.
- James, E. K. (2000).** Nitrogen fixation in endophytic and associative Symbiosis. *Field Crops Research* 65:197-209.
- James, E. K. and Olivares, F. L. (1998).** Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Critical reviews in plant sciences*, 17:77-119.
- Jha, B.; Thakur, M.; Gontia, I.; Albrecht, V.; Stoffels, M.; Schmid, M. and Hartmann, A. (2009)** Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45:62-72.
- Jha, P. and Kumar, A.(2009).** Characterization of Novel Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from Wheat Plant. *Microbial Ecology*, 58:179-188.
- Kennedy, I.R.; Choudhury, A.T. y Kecskes, M.L.(2004).** Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1229-1244.

- Lebuhn, M.; Achouak, W.; Schloter, M.; Berge, O. Meier, H.;** Barakat, M.; Hartmann, A. and Heulin, T. (2000). Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2207–2223.
- Liba, C. M.; Ferrara F.; Manfio, G.; Fantinatti-Garboggini, F.; Albuquerque, R.; Pavan, C.; Ramos, P.; Moreira-Filho, C. and Barbosa, H. (2006).** Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101:1076-1086.
- Machado, A.T; Sodek, L.; Dobereiner, J. y Reis, V.M.(1998).** Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33:961-970.
- Mano, H. and Morisaki, H. (2008).** Endophytic bacteria in rice plant. *Microbes Environment*, 23:109-117.
- Martínez, L.; Caballero-Mellado, J.; Orozco, J. and Martínez-Romero, E.(2003)** Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.) *Plant and Soil*, 257: 35–47.
- Meyer J.M.; Geoffroy V.A.; Baida, N.; Gardan,L.; Izard, D.; Lemanceau,P.; Achouak, W. and Palleroni, N. (2002).** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*; 68: 2745-53
- McInroy, J. A. & Kloepper, J. W. (1994).** Novel bacterial taxa inhabiting internal tissues of sweet corn and cotton. In *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*, p. 190. Edited by M. H. Ryder, P. M. Stephens & G. D. Bowen. Adelaide: CSIRO.
- Montañez, A.; Abreu, C.; Gill, P.; Hardarson, G. y Sicardi, M. (2008).** Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils* 45:253-263.
- Muñoz-Rojas, J. y Caballero-Mellado, J. (2003).** Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microbial Ecology*, 46: 454-464.
- Muthukumarasamy, R.; Rebathi,G. and Vadivelu, M. (2000).** Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of sugarcane. *Current Science*, 78:1063-1065.
- Muthukumarasamy, R.; Revathi, G. & Lakshminarasimhan, C. (1999).** Influence of N-fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biology and Fertility of Soils* 29, 157–167.
- Noda, S.; Ohkuma, M.;Usami, R.; Horikoshi, K and Kudo, T(1999).** Culture-Independent Characterization of a Gene Responsible for Nitrogen Fixation in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of the Termite *Neotermes koshunensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4935-4942.
- Okon, Y., and C. A. Labandera-González. (1994).** Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1591-1601.
- Paauw, A.; Caspers, M.; Schuren, F.; Leverstein-van Hall, M.; Delétoile, A. et al. (2008)** Genomic Diversity within the *Enterobacter cloacae* Complex. *PLoS*

ONE 3(8): e3018. doi:10.1371/journal.pone.0003018.

- Perdomo, C.; Gardellino, G. (2006).** Respuesta de maíz a fertilizaciones definidas con diferentes criterios de recomendación *Agrociencia* 10:63-79.
- Piceno, Y.M.; and Lovell, C.R. (2000).** Stability in natural bacterial communities. I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*; 39: 32–40.
- Ramos, J.M.; Domine, M.; Ponte, M.C. and Soriano, F. (1996)** Bacteremia caused by *Alcaligenes* (*Achromobacter*) *xylosoxidans*. Description of 3 cases and review of the literature. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*,14:436-40.
- Reis, V.M. and Döbereiner J. (1998).** Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology*, 171:13-18.
- Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T.; Gillis, M.; Hoste, B.; Vancanneyt, M.; Kersters, K.; and De-Ley, J. (1993).** *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal Systematic Bacteriology*, 43:574-584.
- Ryther, J. H.; Dunstan, W.M. (1971).** Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171:1008-1013.
- Rennie, R. J. (1981).** A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27:8-14.
- Reysenbach, A. L., L. J. Giver, G. S. Wickham, and N. R. Pace. (1992)** Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3417-3418.
- Riggs, P.J.;Chelius, Marisa K.; Iniguez A. Leonardo; Kaeppler, Shawn M.; Triplett, Eric W. (2001)** Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28:829–836.
- Roesch, L.F.W.; Camargo, F.A.O.; Bento, F.M. and Triplett, E.W. (2008)** Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil*, 302:91–104.
- Roesch, L.; Dörr de Quadros, P.; Camargo, F. and Triplett, E. (2007).** Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1377-1383.
- Roesch, L., Olivares F., Pereira L., Selbach P., Saccol de Sa E. and Oliveira F. (2006).** Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen supply. *World Journal of Microbiology an Biotchnology*, 22:967-974.
- Rozycki, H. Dahm H. Strzelczy K. Li, C. (1999).** Diazotrophic bacteria en root free soil and in the root zone of pine (*Pinus silvestris*) and oak (*Quercus robur*). *Applied Soil Ecology*, 12:239-250.
- Sato, K. & Jiang, J.-Y. (1996).** Gram-negative bacterial flora on the root surface of wheat (*Triticum aestivum*) grown under different soil conditions. *Biology and Fertility of Soils*; 23:273-281.
- Sherestha, R. K. and Ladha, J.K. (1996).** Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen 15N dilution. *Soil Science Society of America Journal*, 60:1815-1821.

- Shoebitz, M.; Ribaudó, C.; Pardo, M.; Cantore, M.; Ciampi, L. and Curá, J. (2009).** Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1768-1774.
- Silby, M.W.; Cerdeño-Tárraga, A.M.; Vernikos, G.S.; Giddens, S.R.; Jackson, R.W.; Preston, G.M.; Zhang, X.X.; Moon, C.D.; Gehrig, S.M.; Godfrey, S.A.; Knight, C.G.; Malone, J.G.; Robinson, Z.; Spiers, A.J.; Harris, S.; Challis, G.L.; Yaxley, A.M.; Harris D.; Seeger, K.; Murphy, L.; Rutter, S.; Squares, R.; Quail, M.A.; Saunders, E.; Mavromatis, K.; Brettin, T.S.; Bentley, S.D.; Hothersall, J.; Stephens, E.; Thomas, C.M.; Parkhill, J.; Levy, S.B.; Rainey, P.B. and Thomson, N.R. (2009).** Genomic and geneic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology*. 2009, 10:R51. PublisherBioMed Central Ltd.
- Somasegaran, P. and Hoben, H.J. (1994).** Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. *Springer, Heidelberg, Germany*.
- Stackebrandt, E.; Goebel, B.M. (1994)** Taxonomic Note:"A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Oct. 1994 p. 846-849.
- Stanier, R.Y.; Palleroni, N.J. and Doudoroff M. (1966).** The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43:159-271.
- Suzuki, M. T., and S. J. Giovannoni. (1996)** Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:625-630.
- Spalding, R.F.; Exner, M (1993).** Occurrence of nitrate in groundwater - a review. *Journal Environment Quality*, 22: 392-402.
- Tapia-Hernández, A.; Bustillos-Cristales, M.; Jiménez-Salgado, T.; Caballero-Mellado, J. and Fuentes-Ramírez, L. (2000)** Natural Endophytic Occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in Pineapple Plants. *Microbial Ecology*, 39:49-55.
- Tan, Z.; Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. (2003)** Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology*, 5: 1009–1015.
- Teng, Q.; Sun, B.; Fu, X.; Li, S.; Cui, Z and Cao, H. (2009).** Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China. *Journal of Microbiology*, 47:135-141.
- Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro and T. Matsuguachi.(1995).** Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal Bacteriology*, 177:1414-1417.
- Van Berkum, P. y B. B.Bohlóol. (1980).** Evaluation of Nitrogen Fixation by Bacteria in Association with Roots of Tropical Grasses. *Microbiological Review*, 44:491-517.
- Versalovic, J., Schneider, M.; de Bruijn, F.J. and Lupski, J. (1994)** "Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based on PCR. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5:25-40.
- Welsh, D.; Bourgues, S.; de Wit, R. and Auby, I. (1997)** Effect of plant photosynthesis, carbon sources and ammonium availability on nitrogen fixation rates in the rhizosphere of *Zostera noltii*. *Aquatic Microbial Ecology* 285-290, 1997

- Widmer, F.; Shaffer, B. T.; Porteous, L. A. and Seidler, R. J. (1999).** Analysis of *nifH* Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:374-380.
- Yabuuchi, E. and Yano, I.(1981)** *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev.*International Journal of Systematic Bacteriology*. 31:477-478.
- Yeager,C.; Kornosky, J.; Housman, D.; Grote, E.; Belnap, J. and Kuske, C.(2003)** Diazotrophic community structure en function in two successional stages of biological soils crusts from the Colorado plateau and Chihuahuan desert. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:973-983.
- Young, J. M. (1991).** Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of applied biology*, 118:283-298.
- Zani, S., M.T. Mellon, J.L. Collier and J.P. Zher.(2000).** Expresion *de nifH* genes in natural assemblages in Lake George, New York, detected bu reverse transcriptase PCR. *Applied Environment Microbiology*, 66: 3119-3124.
- Zehr, J. P. and McReynolds, L. A. (1989).** Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2522-2526.
- Zlotnikova, A.K.; Kazakova, M.L.; Zlotnikov, K.M.; Kazakov, A.V. and Umarov, M.M. (2007).** Physiological and Biochemical Properties of the Bacterial Association of *Klebsiella terrigena*E6 and *Bacillus firmus* E3. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43:304–312.

APENDICE I

MEDIOS DE CULTIVO

LGI

Componentes	cantidad
Sucrosa	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.02 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.002 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.002 g
Azul de bromotimol al 0.5% en 0.2 N KOH	5 ml
FeCl ₃	0.010 g
pH	6
Solución de vitaminas*	1 ml
Agar	4.0 g
Agua	1 litro

JMV

Componentes	cantidad
manitol	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.6 g
KH ₂ PO ₄	1.8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.002 g
Solución de micronutrients**	2.0 ml
Azul de bromotimol al 0.5% en 0.2 N KOH	2.0 ml
CaCl ₂	0.02 g
EDTA	0.06 g
FeCl ₃	0.01 g
pH	4.5
Solución de vitaminas*	1 ml
Agar	4.0 g
Agua	1 litro

* Sol. Vitamina: 10mg Biotina, 20mg

Pyridoxal-HCL, 100ml agua destilada.

** Sol. micronutrientes: 0.40g

CuO₄S.5H₂O, 0.12g ZnSO₄.7H₂O, 1.40g

H₃BO₃, 1.00g Na₂MoO₄.2H₂O, 1.50g

MnSO₄.H₂O.

jNFb

Componentes	cantidad
DL- malic acid	5.0 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20 g
NaCl.2H ₂ O	0.02 g
Solución de micronutrients**	2.0 ml
Azul de bromotimol al 0.5% en 0.2 N KOH	2.0 ml
FeEDTA 1.64% sol.	4.0 ml
pH	6
Solución de vitaminas *	1 ml
Agar	4.0 g
Agua	1 litro

RMR

Componentes	cantidad
K ₂ HPO ₄	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	0.1 g
EDTA Fe Na	28 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	24 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.06 g
Biotina	0.004 g
Agar	4 g
pH	6
Agua	1 litro
Fuente de C variable:	
Manitol	3 g
Sucrosa	5 g
A. Malico	3 g

TY

Componentes	cantidad
Triptona	59 g
extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ .2HO	0.87 g
Agar	18 g
pH	7
Agua	1 litro

APENDICE II

SOLUCIONES

Buffer de lisis:

NaOH..... 0.05%

SDS..... 0.25%

Buffer TE 10:1 (1X)

Tris-HCl 1M pH 8,0.*..... 10ml

EDTA 500mM pH 8,0.**.....2ml

Agua destilada.....csp 1L

*Preparar 1 litro de solución 1M Tris HCl disolviendo 121 grs de Tris Base en 800 mL de dH₂O, ajustando la solución a un pH de 8.0 con 1M HCl y aforando a 1 litro.

** Preparar 1 litro de solución 0.5M EDTA pH 8.0 disolviendo 186.1 grs de Na₂EDTA ·2H₂O en 700 ml de dH₂O en un vaso de precipitados. Ajustar el pH a 8.0 con 10M NaOH (~50 ml) y aforar con dH₂O a un litro.

Buffer de carga 6X:

Glicerol.....30 %

azul de bromofenol..... 0,25 %

xilenocianol..... 0,25 %

Buffer de corrida Tris-Boratos-EDTA (TBE) 5X:

Tris Base.....54 g

ácido bórico.....27.5 g

EDTA sódico.....4.7 g

Agua destilada..... 1L