

## **APOORTE DE LOS MICROORGANISMOS EDÁFICOS A LA NUTRICIÓN VEGETAL**

*Fernanda Covacevich y Silvina Vargas Gil*



## APORTE DE LOS MICROORGANISMOS EDÁFICOS A LA NUTRICIÓN VEGETAL

Fernanda Covacevich y Silvina Vargas Gil

### Introducción

Argentina es un país productor de cereales y oleaginosas por excelencia y uno de los principales agroexportadores. Sin embargo, la competitividad en el mercado mundial ejerce presiones para incrementar los rendimientos. De esta manera, ha sido necesario atender a las demandas ofreciendo una agricultura más competitiva, con una mayor eficiencia productiva. Para poder incrementar los niveles de producción de los cultivos y ganar nuevos mercados, en el último siglo se han implementado prácticas de manejo intensivo del suelo, con aplicaciones crecientes de agroquímicos como fertilizantes y fungicidas. Actualmente, la dependencia a la aplicación de estos insumos forma una parte importante de los costos de producción, y no tiene en cuenta la contaminación ambiental, el deterioro de la biodiversidad microbiana y su consecuente efecto sobre el natural ciclado de nutrientes (Marshall y col., 2011). Sin embargo, en las últimas décadas se está tendiendo a combinar prácticas que maximicen la productividad y sanidad de los cultivos con la sostenibilidad de los agroecosistemas, incluyendo alternativas de producción con mínimo impacto ambiental. El desafío es entonces, reducir costos utilizando más eficientemente fertilizantes, fungicidas y herbicidas e incrementar la productividad utilizando las capacidades aun inexploradas de los microorganismos del suelo.

En 1989, el *National Research Council* de la *National Academy of Sciences* de Estados Unidos dio a conocer el comunicado *Alternative Agriculture*, el cual define a la Agricultura Alternativa como un sistema de producción que utiliza prácticas de manejo tendientes a reducir costos, incrementar la eficiencia y mantener los niveles de producción a través de prácticas alternativas a las tradicionales como las rotaciones de cultivos, la integración de los sistemas agrícolas con los ganaderos, la integración de cultivos de leguminosas fijadoras de nitrógeno (N), el control integrado de plagas, el manejo conservacionista y el reciclado de los nutrientes del suelo mediante la utilización de biofertilizantes. Sin embargo, en ocasiones, la implementación de las prácticas alternativas es resistida por los productores. La transición exitosa de la disminución del uso intensivo de agroquímicos en los sistemas de producción dependerá principalmente de que los productores puedan incrementar (o mantener) sus rendimientos, minimizar costos y mantener la calidad de sus suelos destinados a la agricultura.

Este capítulo aborda los principales microorganismos edáficos in-

volucrados en la nutrición mineral de los cultivos, sus características, factores moduladores, estado del conocimiento y herramientas actuales de identificación y utilización.

### Organismos benéficos para el crecimiento vegetal ¿Desde cuándo?

Las plantas establecen a lo largo de su ciclo de vida múltiples relaciones con microorganismos. El reconocimiento de que los microorganismos edáficos cumplen roles de importancia para la movilización de nutrientes, ha permitido que el curso de las investigaciones se haya dirigido a incrementar la nutrición y crecimiento de los cultivos a través de la manipulación microbiana. Desde mediados del siglo XIX varios descubrimientos abrieron luz al entendimiento de la relación entre la ecología microbiana y los ciclos biogeoquímicos. Las primeras evidencias se centraron en el descubrimiento de la fijación biológica de N (FBN) por los microorganismos edáficos, en algunos casos forman-

**Tabla 1.** Principales hitos históricos en el conocimiento de la participación de los microorganismos edáficos en los ciclos biogeoquímicos y como promotores del crecimiento vegetal

| Año          | Investigador                        | Descubrimiento   | Impacto   |
|--------------|-------------------------------------|--|---|
| 1842         | Nägeli                              | Primera descripción de hongos micorrícicos   | Reconocimiento de colonización  |
| 1861<br>1863 | Pasteur<br>Winogradsky y Beijerinck | Fermentación butírica<br>Aislamiento del proceso de fermentación butírica.   | Fijación Biológica del N<br>Inicio de ecología microbiana y su relación con los ciclos biogeoquímicos |
| 1885         | Berthelot                           | Los microorganismos edáficos pueden incorporar N del aire  | Fijación Biológica del N  |
| 1885         | Frank                               | Utilización del término 'mykorrhiza'   | Descripciones morfológicas de la simbiosis hasta mediados S XX.                                       |
| 890          | Winogradsky                         | Aislamiento de <i>Clostridium pasteurianum</i> , capaz de fijar N atmosférico  | Postulación del ciclo del N en la naturaleza  |
| 1888         | Boussingault                        | Planteamiento de la incorporación de N atmosférico por leguminosas   | Fijación Biológica del N en leguminosas   |
|              | Beinjerick                          | Aislamiento de <i>Bacillus radicola</i> (luego rebautizada como <i>Rhizobium</i> ) en un cultivo puro <i>in Vitro</i> . Observación de no reducción de N en vida libre | Fijación Biológica del N  |
| 1890         | Beinjerick                          | Evidencias de la capacidad de <i>Bacillus radicola</i> para nodular específicamente con leguminosas  | Fijación Biológica del N en leguminosas   |
| 1890         | Beinjerick                          | Descripción de <i>Azotobacter</i> como fijadora de N   | Fijación Biológica del N  |
| 1896         | Nobbe y Hiltner                     | Patentamiento de producto inoculante con <i>Rhizobium</i>  |   |
| 1904         | Hiltner                             | Atracción de las poblaciones microbianas del suelo hacia la superficie en vecindad con las raíces  | Identificación del efecto rizosférico   |

|      |                    |  |  |
|------|--------------------|--|--|
| 1948 | Gerretsen          | Solubilización de P inorgánico por cultivos bacterianos  | Utilización de bacterias solubilizadoras de P como biofertilizantes  |
| 1950 | Mosse y Gerdemann  | Primeros reportes de efectos benéficos de la simbiosis raíces-hongos micorrícicos  | Utilización de hongos micorrícicos como inoculantes promotores del crecimiento vegetal   |
| 1958 | Döbereiner         | Evidencias de la capacidad fijadora de N <i>Beijerinckia fluminensis</i> y <i>Azotobacter paspali</i>  | Fijación Biológica del N en gramíneas  |
| 1978 | Kloepper y Schroth | Definición del grupo funcional Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), reconocimiento de efectos  | Inoculación de cultivos con organismos PGPR  |
| 1984 | Molla y col.       | Solubilización de P orgánico por consorcios microbianos ( <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> y <i>Pseudomonas</i> ) más activa que por cultivos puros | Reconocimiento de la existencia de sinergismo microbiano   |
| 1991 | Hinga              | Evidencias de que en la rizósfera ocurren interacciones entre varios grupos de microorganismos   | Extensión del concepto de efecto rizosférico considerando consorcios microbianos. Definición de concepto Microorganismos efectivos |
| 2012 | Malusá             | Ampliación del grupo PGPR por Plant Growth Promoting Microorganism (PGPM)  | Inclusión de hongos micorrícicos y rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal  |

do asociaciones específicas con leguminosas o gramíneas (Tabla 1). A partir de estos descubrimientos, varias líneas de investigación se enfocaron en identificar las aplicaciones de los microorganismos benéficos (particularmente FBN) en agricultura y a determinar tanto los compuestos involucrados en el efecto rizosférico, como sus posibles efectos sobre el crecimiento vegetal. El aislamiento de los bacteroides y su relación con incrementos en la fijación de N por parte de los cultivos abrieron paso a numerosas investigaciones de trascendencia para el área de la microbiología agrícola, que no solo incluyó a los microorganismos involucrados en el ciclo del N, sino que dieron luz hacia otras relaciones microorganismos-plantas y los ciclos biogeoquímicos.

El concepto de `efecto rizosférico` para organismos individuales inicialmente sugerido por Hiltner (1904), haciendo referencia a las relaciones planta-microorganismo que ocurren en las proximidades de la superficie de las raíces, ha sido extendido por la inclusión de varios microorganismos de la comunidad rizosférica. Asimismo, se ha evidenciado que la rizósfera no es un área única sino que es biológica y químicamente diversa, en la que ocurren interacciones complejas y dinámicas no siempre bien establecidas. En consecuencia, actualmente se considera el concepto de Microorganismos Efectivos (ME) los cuales consisten en consorcios microbianos que naturalmente ocurren en los ecosistemas y que pueden ser aplicados como bioinoculantes para incrementar la diversidad microbiana de los suelos así como la productividad de las plantas. En las últimas décadas, numerosas líneas de investigación han demostrado que la inoculación con ME pueden incrementar la calidad y salud de los suelos, así como el crecimiento,

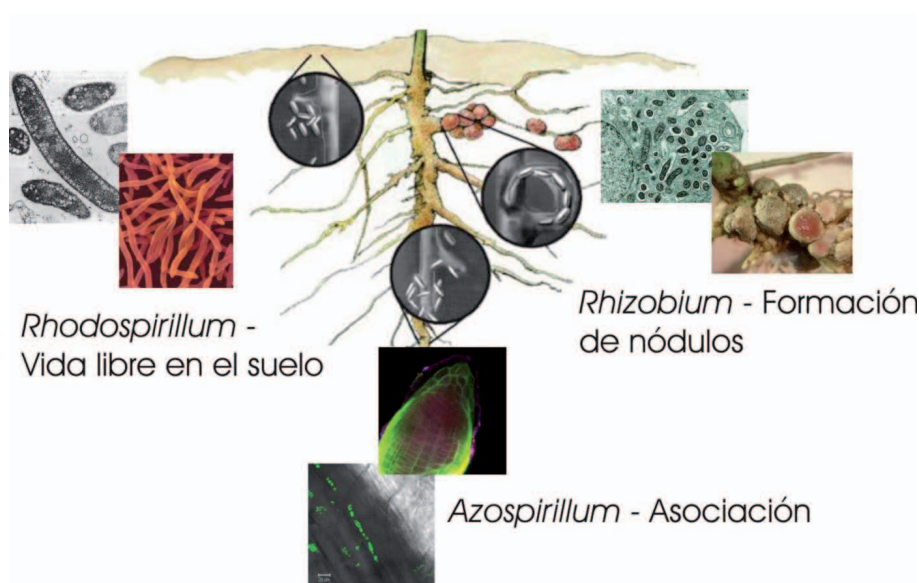
rendimiento y sanidad de los cultivos. Los ME se asocian de diferentes maneras a las plantas y en la mayoría de las ocasiones las asociaciones se mantienen por relaciones tróficas. En tal sentido, las plantas constituyen la parte autotrófica de la relación proporcionando sustratos y energía a la rizósfera a través de sus exudados, que constituyen compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos circundantes. Por otra parte, la microbiota heterotrófica (hongos, bacterias, actinomicetes, protozoos) está generalmente limitada por el suministro de carbono (C) y energía, lo que desencadena complejas interacciones que, como consecuencia de la degradación de los compuestos orgánicos, incidirán en el ciclado de nutrientes y, consecuentemente, en la nutrición vegetal.

Además de las bacterias, otro grupo heterotrófico de importancia en la nutrición vegetal bien reconocido está constituido por los hongos formadores de micorrizas. Debido a la dificultad de aislar estos microorganismos independientemente de las raíces de las plantas por su biotropismo obligado, los primeros reportes de los efectos de la inoculación micorrícica sobre la nutrición y crecimiento vegetal recién aparecen a partir de 1950 a través de experimentos realizados por Mosse y por Gerdemann (Koide y Mosse, 2004). Se ha estimado (Parniske, 2008) que más del 20% de los productos fotosintéticos de las plantas terrestres (aproximadamente 5 billones de toneladas de C año<sup>-1</sup>) son destinados para sostener la simbiosis micorrícica. En tal sentido, se ha establecido que la simbiosis micorrícica contribuye significativamente al ciclado global de fósforo (P) y C (Feddermann y col., 2010) afectando la diversidad y productividad de los ecosistemas terrestres.

El reconocimiento de las bacterias rizosféricas como promotoras del crecimiento vegetal, vía la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento o a través de antagonismos con patógenos de plantas, las ha incluido en el grupo funcional (que inicialmente no incluía a los rizobios FBN simbióticos) denominado '*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*' (PGPR). Las indiscutibles evidencias de que además de las bacterias no FBN, tanto los rizobios como los hongos MA, son efectivos promotores del crecimiento vegetal, ha contribuido a que la denominación actual del grupo se haya ampliado a '*Plant Growth Promoting Microorganism*' (PGPM). La extensión del grupo de microorganismos benéficos para el crecimiento vegetal ha sido motivada por la utilización de estos ME como biofertilizantes. La inoculación con PGPM puede registrarse desde inicios del siglo XX, a partir del patentamiento de un producto conteniendo *Rhizobium* sp. Por otra parte, los hongos micorrícicos han sido utilizados como biofertilizantes desde hace aproximadamente tres décadas. Actualmente, las investigaciones tienden al desarrollo de las tecnologías necesarias para la selección, multiplicación e inoculación de microorganismos individuales o como consorcios para el desarrollo de bioinoculantes.

### Fijadores de nitrógeno: libres, asociativos y simbióticos

El N es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de los cultivos. Las plantas necesitan N en grandes cantidades, dado que es constituyente de los ácidos nucleicos y aminoácidos, entre otros y juega un papel importante en la mayoría de los procesos metabólicos. El N existe en el suelo bajo diferentes formas y puede transformarse fácilmente a través de procesos biológicos. Estos mecanismos de transformación son influenciados por condiciones climáticas y por las propiedades físicas y químicas de cada suelo. A pesar de que el N atmosférico no está disponible para las plantas, ellas pueden utilizarlo a través de la FB (Figura 1).



**Figura 1.** Diferentes sistemas de fijación biológica del Nitrógeno.

La FBN es realizada exclusivamente por organismos procariontes (bacterias), siendo activos agentes de transformación que cumplen funciones esenciales en los ciclos de nutrientes, particularmente importante en el caso del N (Tabla 2). Luego de la cosecha de los cultivos, cualquier porción de la planta que queda en el suelo se descompone retornando N al sistema. Las asociaciones entre los microorganismos fijadores y las plantas admiten varios grados de interdependencia por parte de ambos simbioses. Aunque todos los organismos y sistemas fijadores son susceptibles de ser aprovechados en agricultura (Baldani y Baldani, 2005), algunos son más eficientes en el proceso de FBN y por los niveles de N que incorporan, y otros también son de mayor interés por la importancia económica de los cultivos susceptibles de ser tratados.

Por otra parte, también pueden establecerse asociaciones microbio FBN -planta sin constituir estructuras especializadas en las raíces, las bacterias fijan N a expensas del exudado radical que aprovecha al co-

**Tabla 2.** Tipos de asociaciones microorganismo-planta en la fijación biológica del Nitrógeno.

| Fijación      | Microorganismo   | Hospedante                        | Características de la relación fijador planta                        |
|---------------|--|-----------------------------------|--|
| Simbiótica    | <i>Rhizobium</i><br><i>Allorhizobium</i><br><i>Azorhizobium</i><br><i>Sinorhizobium</i><br><i>Bradyrhizobium</i>                             | Leguminosas o pasturas            | Forman estructuras especializadas (nódulos), condiciones anaeróbicas |
|               | <i>Frankia</i>   | Árboles (Aliso, Casuarina, otros) | Forman nódulos actinorrícos  |
| No simbiótica | <i>Gluconacetobacter</i><br><i>Azoarcus</i> ,<br><i>Herbaspirillum</i><br><i>Azospirillum</i><br><i>Acetobacter</i><br><i>Cianobacterias</i> | Plantas C 4                       | estructuras especializadas   |
|               | <i>Azotobacter</i>   | Arroz                             | Aeróbicas<br>Facultativas<br>Anaeróbicas no fotosintéticas           |
|               | <i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i><br><i>Clostridium</i><br><i>Metanococcus</i><br><i>Rhodospirillum</i><br><i>Chromatium</i>               | Otros cultivos                    | Anaeróbicas fotosintéticas   |

Ionizar los espacios intercelulares del córtex de la raíz (Cassan y col., 2009). Se ha comprobado que estas asociaciones son muy beneficiosas para los cultivos, sin embargo el éxito no solo está dado por la fijación de N sino que, en el caso de *Azospirillum*, está demostrado que el efecto beneficioso es debido mayoritariamente a la capacidad que posee la bacteria de producir fitohormonas así como de estimular actividades enzimáticas en la planta (Pereyra y col., 2010) que determinan un mayor desarrollo del sistema radical y, por tanto, la posibilidad de explorar un volumen más amplio de suelo. A diferencia de *Rhizobium*, el N que fijan estas bacterias asociativas no es exportado a la planta, sino que solamente puede ser aprovechado después de la muerte microbiana y la posterior lisis celular. Es decir que estas bacterias serían de utilidad en la práctica como fijadoras adicionadas individualmente, como también en inoculaciones conjuntas con *Rhizobium*, o bien si se inoculan como rizobacterias PGPM como antagonistas contra fitopatógenos, otra característica que también poseen estas bacterias.

También hay otros sistemas conformados por las cianobacterias y algunas plantas, que pueden jugar un papel importante en la fertilización, como en el caso cianobacterias-arroz. Otras asociaciones capaces de utilizar el N atmosférico y establecer simbiosis con las plantas se dan con las bacterias del género *Frankia*, que pueden asociarse con más de 250 especies de plantas no leguminosas generalmente leñosas (Bautista Guerrero y Valdés, 2008) (Foto 1). Estas plantas, al ser perennes, pueden presentar un valioso potencial ecológico, ya que constantemente están aportando N al suelo y a las plantas vecinas, tanto sea a través de la red micorrícica (las plantas actinorrícas forman ectomicorrizas y/o micorrizas arbusculares) o por la liberación de N de la materia orgánica, producto de la descomposición de sus hojas (Wall, 2000).





**Foto 1.** Simbiosis de diferentes plantas y microorganismos: soja con *Rhizobium*, *Alnus* con *Frankia*, *Azolla* con *Anabaena*, Caña de azúcar con *Azospirillum* (de izquierda a derecha).

La FBN es valorable en el contexto de la agricultura sustentable, ya que puede disminuir el uso de fertilizantes, favorecer el ahorro en el consumo de energía y reducir la degradación del ambiente (Tabla 3). La fijación simbiótica del N representa el 8,5% del consumo total de N de la planta, debido a la eficacia de la transferencia de este N fijado a la misma. Con la finalidad de complementar el uso de fertilizantes inorgánicos, es generalizado el uso de bioinoculantes con el objetivo de proveer un número suficiente de microorganismos viables para inducir la rápida colonización de la rizósfera. Según Boiero y col. (2007), la biofertilización incrementa el crecimiento de los cultivos debido a la presencia de cinco tipos diferentes de fitohormonas (ácido indol acético –AIA-, zeatina, etileno, ácido abscísico y ácido giberélico –AG-) que son producidas por cepas de *B. japonicum*.

**Tabla 3.** N fijado anualmente por microorganismos en simbiosis en sistemas agrícolas con diferentes especies vegetales a nivel global.

| Agente                                       | Sistema agrícola                              | Tasa de fijación de N <sub>2</sub> (kg N/ha/año) | Total de N fijado por el sistema (Tg/año) |
|--|---|--|---|
| Rhizobios                                    | Leguminosas                                   | 115  | 21  |
| Rhizobios                                    | Forrajeras y Pasturas, Leguminosas            | 110-227  | 12-25                                     |
| Azolla-<br>Cianobacterias,<br>Cianobacterias | Arroz   | 33   | 5   |
| Bacterias endofíticas, asociativas y libres  | Caña de azúcar                                | 25   | 0.5                                       |
| Bacterias endofíticas, asociativas y libres  | Otros cultivos                                | <5   | <4  |
| Bacterias endofíticas, asociativas y libres  | Cultivos extensivos, tropicales para pastoreo | <10  | <14                                       |

Fuente: FAOSTAT  
Tg (teragramo) = 10<sup>12</sup> g

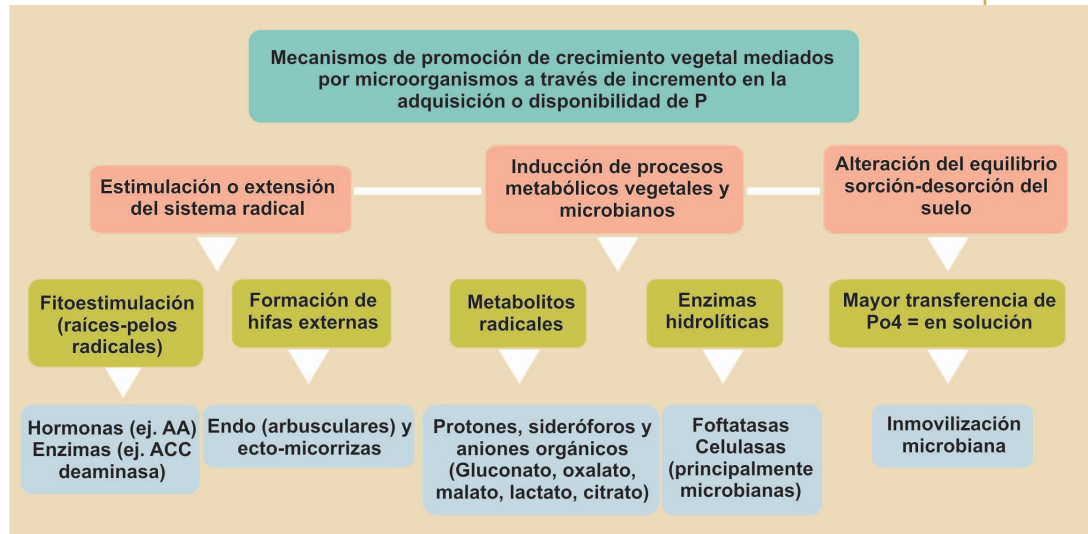
## Microorganismos que participan en la absorción de fósforo

El P, es un nutriente esencial para el crecimiento de los cultivos y forma parte de compuestos estructurales en los organismos (fosfolípidos; ácido desoxirribonucleico –ADN-, ácido ribonucleico –ARN-), y su participación en el almacenamiento-liberación de energía en todas las reacciones bioquímicas (adenosín tri-fosfato –ATP-) hace que sea clave para el desarrollo de la vida. Debido a su baja movilidad y disponibilidad edáfica en muchas regiones agrícolas, el P es uno de los nutrientes que actualmente limitan la producción de los cultivos. En tal sentido, el desarrollo de las raíces, tallos, hojas, flores y semillas, la madurez, producción y calidad de las plantas, la FBN en leguminosas, así como la resistencia-tolerancia a patógenos, están asociados a una adecuada nutrición fosfatada de los cultivos (Khan y col., 2010).

La dinámica del P en el suelo se caracteriza por procesos fisicoquímicos (sorción-desorción) y biológicos (inmovilización-mineralización), en los cuales los microorganismos juegan un rol clave en la dinámica del P y su subsecuente disponibilidad para las plantas (Richardson y Simpson, 2011). El concepto de la participación de los microorganismos edáficos en el incremento de la disponibilidad de P para las plantas no es nuevo. A mediados del siglo pasado, Gerretsen (1948) demostró que cultivos bacterianos puros incrementaron la nutrición fosfatada y el crecimiento de plantas a través de la solubilización de formas precipitadas de fosfatos de Ca. A partir de este estudio, numerosas evidencias de la participación de los microorganismos en la movilización del P del suelo y la nutrición vegetal han sido reportados (En revisiones de: Khan y col., 2010; Richardson y Simpson, 2011), lo que ha motivado la utilización de las bacterias solubilizadoras de P como biofertilizantes a partir de los años 1950.

Los microorganismos rizosféricos pueden incrementar la absorción vegetal de P a través de tres mecanismos principales (Richardson y Simpson, 2011) (Figura 2): i) aumento de la superficie de absorción dada por fito-estimulación del crecimiento radical vía estimulación hormonal de la ramificación o proliferación de pelos radicales, por producción de ácido indol acético o enzimas que alteran los precursores del etileno tales como las carboxil deaminasas, entre otros (Hayat y col., 2010); o a través del aumento de la exploración del suelo por extensión del sistema radical vía asociación con hongos micorrícicos; ii) a través de la inducción de procesos metabólicos que son efectivos en la solubilización directa de P inorgánico y mineralización de P orgánico; y iii) alteración del equilibrio de sorción que resulta en incrementos netos de la transferencia de  $PO_4^{=}$  hacia la solución del suelo o por facilitación de la movilidad del P orgánico mediada por la inmovilización microbiana.

El rol de los microorganismos edáficos en la mineralización-inmovilización del P del suelo hace que este elemento participe de un pool



**Figura 2.** Mecanismos de los microorganismos rizosféricos que contribuyen a incrementar la absorción de P por las plantas (Adaptado de Richardson y Simpson, 2011)

muy dinámico en la biomasa microbiana. La incorporación del P en la biomasa microbiana (inmovilización) por la descomposición de los residuos del suelo (mineralización) ocurre en períodos de tiempo relativamente cortos. Al respecto, McLaughlin y col. (1988) cuantificaron, en residuos de leguminosas, una incorporación del 28% como P microbiano luego de 7 días. Estudios más recientes han determinado incrementos en la tasa de incorporación de P en respuesta a la adición de C y N, con la consecuente disminución del ortofosfato en la solución del suelo. En el largo plazo, todo el P inmovilizado puede estar disponible para las plantas, por lo que se considera al P en la biomasa microbiana como un mecanismo importante para la regulación del suministro del P en la solución del suelo (Richardson y Simpson, 2011). La utilización de P orgánico (predominantemente fosfatos de inositol y sus derivados) por plantas y microorganismos requiere la mineralización (hidrólisis) de los sustratos por enzimas fosfatasas (principalmente ácidas, aunque también alcalinas) extracelulares de origen principalmente microbiano aunque también puede ser vegetal. Si bien la detección de estirpes solubilizadoras de P orgánico y los mecanismos involucrados no resultan siempre claros, Kim y col. (1998) identificaron capacidades solubilizadoras de P orgánico (ácido fítico) por *Enterobacter agglomerans*, aún con baja actividad fosfatasa.

Las formas inorgánicas de P pueden ser solubilizadas por un amplio rango de microorganismos heterotróficos, tanto bacterias (*Actinomyces*, *Pseudomonas* y *Bacillus*) como hongos (*Aspergillus* y *Penicillium*). Estos microorganismos solubilizadores de P pueden excretar ácidos orgánicos (citrate, gluconate, oxalate y succinate, entre otros) con acidificación del medio, lo que favorece la disolución de los fosfatos minerales o cationes quelantes de  $PO_4^{-3}$ , liberando P directamente

en la solución del suelo (Khan y col., 2010). Entre las bacterias del suelo, *Pseudomonas strata S.*, *Bacillus sircalmous* y *B. intrubacters* son consideradas las estirpes mas reconocidas, siendo *P. fluorescens* el miembro más importante en la rizósfera con capacidad solubilizadora de P. Otras bacterias menos reconocidas tales como *Z-ketuaxelalic sp.*, *Malic sp.* y *Socsinic sp.* también han demostrado capacidad solubilizadora de P inorgánico (Mehrvarz y Chaichi, 2008).

La eficiencia en la solubilización de P dependerá tanto del microorganismo como de la fuente de fosfato a solubilizar (Tabla 4). Al respecto Fankem y col. (2008) demostraron que en medio líquido tres estirpes rizosféricas de *P. fluorescens* solubilizaron todas las fuentes de P proporcionadas. Sin embargo, en condiciones de cultivo en

**Tabla 4.** Solubilización de sustratos fosfatados por medio de sustancias secretadas por microorganismos rizosféricos. (Adaptado de Rodríguez y Fra-ga 1999)

| Microorganismo                 | Sustrato                             | Sustancia solubilizadora   |
|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | No-espe cífico                       | Fosfatasa ácida            |
| <i>Pseudomonas sp.</i>         | No-específico                        | Fosfatasa ácida            |
| <i>Burkholderia cepacia</i>    | No-específico                        | Fosfatasa ácida            |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>  | No-específico                        | Fosfatasa ácida            |
| <i>Enterobacter cloacae</i>    | No-específico                        | Fosfatasa ácida            |
| <i>Citrobacter freundii</i>    | No-espe cífico                       | Fosfatasa ácida            |
| <i>Proteus mirabilis</i>       | No-específico                        | Fosfatasa ácida            |
| <i>Serratia marsescens</i>     | No-específico                        | Fosfatasa ácida            |
| <i>Bacillus subtilis</i>       | Fosfato de inositol                  | Fitasa                     |
| <i>Pseudomonas putida</i>      | Fosfato de inositol                  | Fitasa                     |
| <i>Pseudomonas mendocina</i>   | Fosfato de inositol                  | Fitasa                     |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Fosfomonoacetato                     | Fosfomonoacetato hidrolasa |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Fosfato de Ca, Fe o Al; Roca fosfato | Ácidos orgánicos           |
| <i>Bacillus licheniformis</i>  | D-α-glicerofosfato                   | D-α-glicerofosfatasa       |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>    | Fosfonatos                           | C-P-liasa                  |
| <i>Aspergillus niger</i>       | Roca fosfato                         | Acidos orgánicos           |

placa, dos de las tres estirpes presentaron habilidad para solubilizar  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $AlPO_4 \cdot H_2O$  o  $FePO_4 \cdot 2H_2O$ , mientras que otra solo fue capaz de solubilizar Fe-P. El principal mecanismo detectado fue incremento en la secreción de ácidos orgánicos (citrato, malato, tartrato, y en menor medida gluconato y trans-aconitato). La capacidad solubilizadora de P se tradujo luego en incrementos de crecimiento de plantas de maíz fertilizadas con roca fosfórica (RF, origen Senegal 33 %  $P_2O_5$ ) que variaron entre 37 y 17% dependiendo de la estirpe.

La aplicación directa de RF puede resultar poco eficiente en el corto plazo para la mayoría de los cultivos anuales debido a su lenta solubilización. En tal sentido, los microorganismos productores de ácidos pueden aumentar la velocidad de solubilización del P de la RF. Tao y col. (2008) detectaron estirpes (*Bacillus megaterium*, *Burkholderia*

*caryophylli*, *Pseudomonas cichorii* y *P. syringae*) con capacidad solubilizadora del P de la RF en el rango entre 25–42  $\mu\text{gPmL}^{-1}$ . Asimismo, detectaron 10 estirpes de *Bacillus cereus* y *B. megaterium* que evidenciaron capacidad solubilizadora y mineralizadora de P orgánico en el rango 4,4-26,5  $\mu\text{gPmL}^{-1}$  y de 13,8-62,8  $\mu\text{gPmL}^{-1}$ , respectivamente. En todos los casos se evidenció incorporación del P mineralizado en las células bacterianas. Sin embargo, los incrementos en la solubilización de P de RF no están limitados a las bacterias. Al respecto, Goenadi y Siswanto (2000) detectaron capacidad solubilizadora de RF (origen: Marruecos) de hasta un 100 % en *Aspergillus niger* (estirpe BCC 194) aislado de suelos tropicales ácidos, asociada a la producción fúngica de ácidos orgánicos.

Si bien se han reconocido siete tipos diferentes de simbiosis micorrízica sobre la base de su morfología, hongos y especies vegetales involucradas, la más antigua y cosmopolita es la formada por hongos MA (*Glomeromycota*), quienes han tenido un rol clave para la colonización de las plantas al medio terrestre. Los hongos MA, son simbiontes obligados de las raíces de aproximadamente el 90% de las plantas terrestres (Feddermann y col., 2010) así como también de algunas acuáticas, siendo *Arabidopsis* (Brassicaceae) alguna de las más notables excepciones. Los hongos MA invaden intra e intercelularmente las células corticales de la raíz formando arbuscúlos que constituyen las estructuras claves en el intercambio de nutrientes entre los simbiontes. El micelio externo a la raíz aumenta la superficie de absorción en las plantas micorrizadas y actúa como nexo entre los componentes bióticos y geoquímicos del suelo incrementando la absorción y transferencia a las plantas de nutrientes con baja movilidad como el P (Parniske, 2008; Siddiqui y col., 2008). Covacevich y Echeverría (2009) demostraron que hongos nativos de suelos Hapludoles de pasturas del sudeste Bonaerense, no serían eficientes para incrementar el crecimiento de agropiro y festuca, mientras que la inoculación con hongos no nativos incrementó el crecimiento en aproximadamente un 60%, particularmente en ausencia de las poblaciones nativas y bajo condiciones sin fertilización o cuando la fuente fue RF. Considerando los efectos deletéreos sobre el ambiente y las comunidades microbianas de la aplicación de altas dosis de fertilizantes sintéticos (aspecto que será detallado más adelante), una alternativa para minimizar el riesgo ambiental, podría ser el uso de dosis moderadas de fertilizantes o de fuentes no sintéticas (tales como RF para cultivos perennes) en combinación con la inoculación con hongos MA.

Experimentos en condiciones controladas han evidenciado efectos positivos de la formación de micorrizas también sobre la absorción de Zn en maíz (Ortas y Akpınar, 2011; Sajedi y Rejali, 2011). Resultados preliminares indican incrementos entre 20-40% y del 10-25% para el crecimiento y absorción de Zn en plantas de maíz, respectivamente, atribuido a consorcios de hongos MA nativos del sudeste bonaerense (Argentina), particularmente ante deficiencia de Zn (Astiz Imaz y col.,

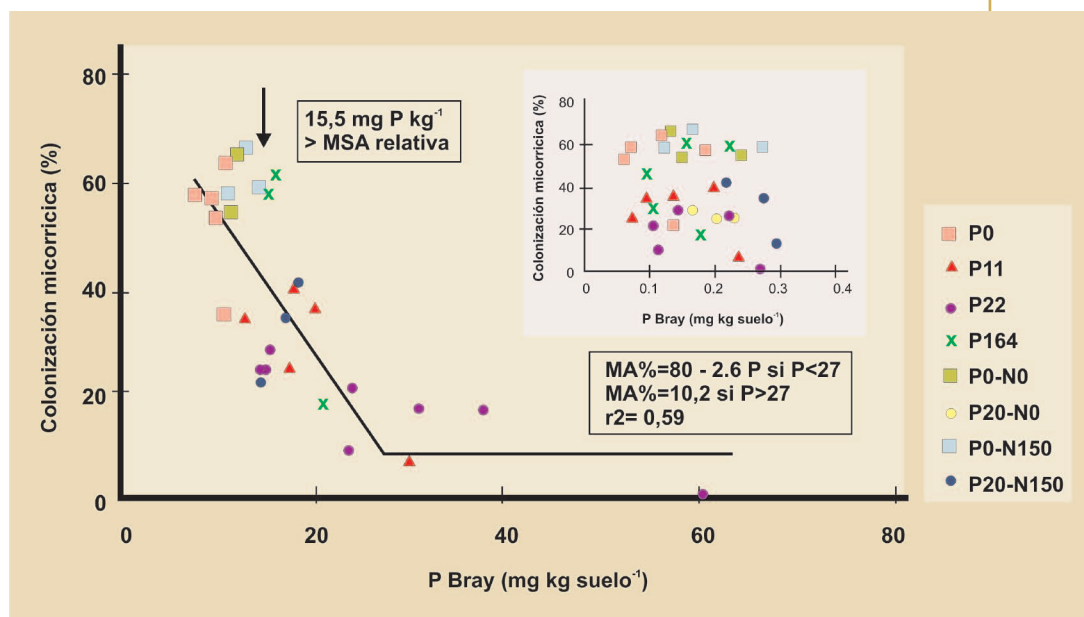
2012). Además de incrementos en la nutrición mineral y de agua, la alta producción de hifas de hongos MA ha sido correlacionada con incrementos significativos en la estabilidad de los agregados del suelo (Rillig y Mummey, 2006; Siddiqui y col. 2008), así como mayor la tolerancia a estrés abiótico (hídrico, salino, metales pesados, xenobióticos) y bióticos (patógenos de raíces) que pueden deprimir el crecimiento vegetal (Augé, 2001; Hildebrandt y col., 2007; Shreenivasa y col., 2007).

### **Efecto de la fertilización y disponibilidad de nutrientes sobre los microorganismos PGPM**

Como se mencionó, algunos nutrientes limitan el crecimiento y la producción de los cultivos por lo que la práctica de la fertilización se ha generalizado. Paradójicamente, se ha evidenciado que algunos fertilizantes deprimen el crecimiento y actividad de algunos de los microorganismos que podrían cumplir roles estratégicos en la captación de nutrientes.

La fertilización con alta dosis de fertilizantes sintéticos ricos en N, P y K deprimen la formación de micorrizas (Siddiqui y col., 2008). Covacevich y col. (2007) evidenciaron que la fertilización con superfosfato (SF), deprimió la colonización del cultivo de trigo por hongos MA nativos del sudeste bonaerense sugiriendo que el efecto principal parecería ser reducción de la micorrización causada por elevados contenidos de P en el suelo mas que en la planta. Además, se estableció que a 15,5 mg P kg suelo<sup>-1</sup> se obtuvo el mayor crecimiento y la micorrización alcanzó valores aceptables, mientras que al valor umbral de 27 mg P kg suelo<sup>-1</sup> (Figura 3), la micorrización se estableció en un mínimo del 10%. Estos valores deberían ser considerados al planificar estrategias de fertilización para el cultivo de trigo a efectos de obtener adecuados rendimientos sin deprimir la micorrización y consecuentemente la sostenibilidad del sistema. Además de la dosis, Covacevich y col. (2005, 2008) han determinado que la fertilización con SF en la línea de siembra deprime en mayor medida la micorrización nativa de cultivos de trigo en comparación con la fertilización al voleo. Esto permitiría especular que los hongos MA podrían actuar como `facilitadores` del P en las aplicaciones al voleo, compensando las diferencias de rendimiento que se esperarían por la aplicación en la línea. Estudios recientes indican que no solo la disponibilidad de P en el suelo actuaría como modulador de la capacidad micotrófica. La disponibilidad de Fe, y en menor medida de Mn parecen deprimir la capacidad micotrófica de hongos MA, particularmente a moderados-bajos contenidos de carbono orgánico (Covacevich y col., 2012a).

Si bien para cultivos anuales, la estrategia es la utilización de fertilizantes de rápida disolución como el SF, fuentes alternativas tales como la RF de menor costo e impacto ambiental podrían ser utilizadas

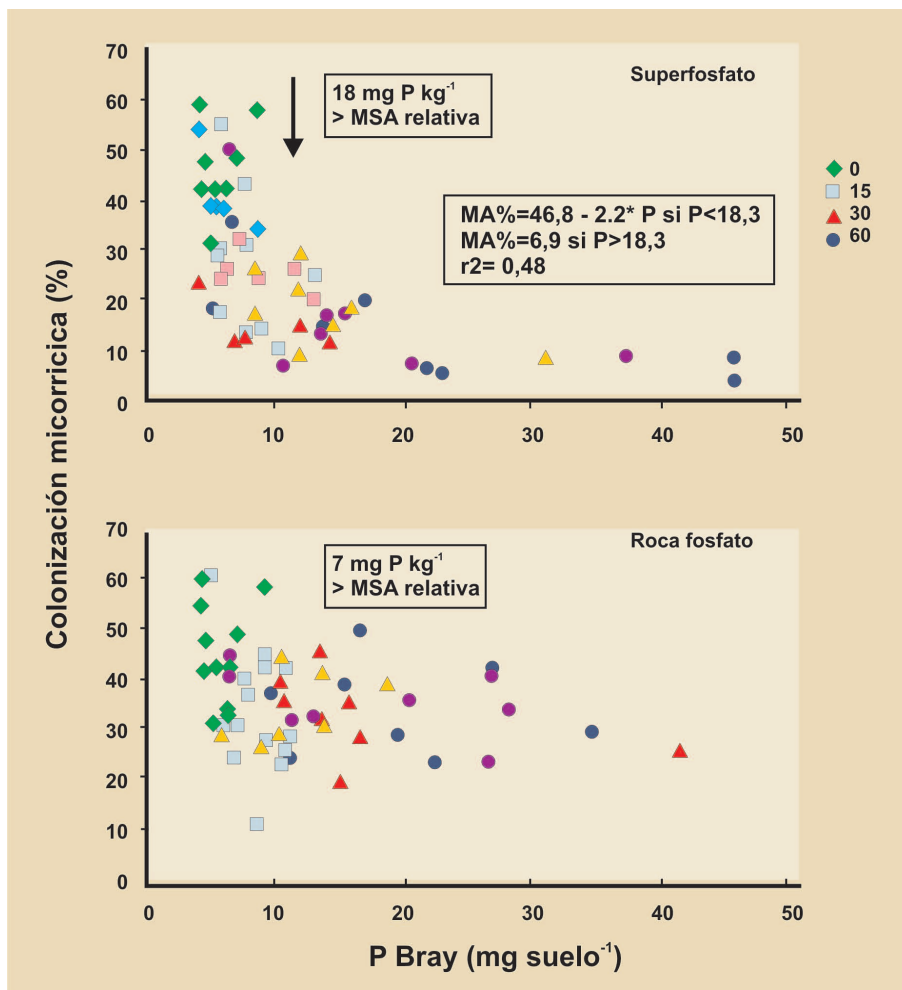


**Figura 3.** Relación entre la intensidad de colonización micorrizica (MA%) y el contenido de P en suelo y planta para distintos estados fenológicos de trigo y en función de distintas dosis de fertilización fosfatada. Adaptado de Covacevich y col., (2007)

para cultivos perennes. Al respecto, Covacevich y col. (2006) determinaron que la fertilización con SF y RF, ocasionaron similar producción en pasturas aunque la fertilización con SF deprimió la micorrización nativa en relación a la aplicación de RF (Figura 4).

En relación a los PGPM que incrementan la FBN, se ha evidenciado que elevados niveles de fertilización nitrogenada deprimen el desarrollo de nódulos de *Rhizobium* (Goicoechea y col., 2004) así como la fijación no simbiótica tanto libre como asociativa (en revisión de Pedraza, 2008). La fertilización nitrogenada inhibe el proceso de infección por *Rhizobium* spp. y también puede inhibir la fijación per se. En cuanto al primer evento, probablemente se dé por la modificación de los mecanismos de reconocimiento bacteria-planta debido a la presencia de nitrato. Mientras que la inhibición de la FBN probablemente se deba a la derivación de fotosintatos hacia la asimilación de nitrato. Sin embargo, se conocen algunos casos en los que algunas bacterias (*Azrhizobium caulinodans*), son capaces de fijar N activamente, aún en presencia de altos niveles de N en suelo ( $200 \text{ kg N ha}^{-1}$ ). Por el contrario, bajas dosis de fertilizante ( $<30 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) pueden estimular el crecimiento temprano de las leguminosas e incrementar la FBN. Díaz-Zorita y col. (1999) determinaron que la diferente localización de fosfato diamónico no afectó la nodulación aunque si el rendimiento de un cultivo de soja bajo siembra directa.

Como se mencionó, si bien la aplicación de algunos fertilizantes



**Figura 4.** Relación entre la intensidad de colonización micorrizica (MA%) y el contenido de P en suelo en festuca (símbolos llenos) and agoproiro (símbolos vacíos) fertilizadas (0, 15, 30 y 60 kg ha P-1) con fuentes de P de variada solubilidad. Adaptado de Covacevich y col., (2006)

deprimen las actividades de ciertos grupos de microorganismos, hay reportes que las actividades microbianas generales del suelo se ven incrementadas a través de una fertilización apropiada (Conforto y col., 2012). Estudios recientes evidenciaron este efecto, al estudiarse la aplicación de diferentes combinaciones de nutrientes sobre variables microbianas (Grümberg y col., 2012). Los resultados mostraron que los fertilizantes interactúan con las comunidades microbianas de varias maneras, promoviendo su crecimiento a través de la oferta de nutrientes, o indirectamente, estimulando el crecimiento de las plantas e incrementando el flujo de C a las raíces, lo que aumenta la rizodeposición. Los microorganismos en suelos fertilizados inorgánicamente aumentan la eficiencia en la utilización del C, ocurriendo lo contrario en suelos deficientes en nutrientes, debido principalmente a la poca disponibilidad de P, y en segundo lugar de N. En situaciones de escasez de nutrientes, los microorganismos se encuentran bajo estrés para



sobrellevar la deficiencia nutricional y para una apropiada actividad metabólica. Sin embargo, algunos autores (Islam y col., 2011) encontraron que las actividades funcionales de las comunidades microbianas del suelo no fueron afectadas por la fertilización. Esto indica la complejidad no solamente de las actividades de los microorganismos en el suelo, sino también de los métodos empleados para cuantificar esas funciones.

Los efectos de la fertilización sobre los microorganismos PGPM deberían ser tomados en cuenta a la hora de definir estrategias de fertilización, a efectos de optimizar los recursos naturales que podrían favorecer la nutrición y el crecimiento vegetal, atendiendo a la sostenibilidad del ecosistema edáfico.

### **Desarrollo y utilización de biofertilizantes para la producción agrícola**

Las tendencias actuales para reducir la contaminación, ahorrar energía y minimizar la erosión del suelo están forzando a los productores a introducir prácticas de manejo con menor impacto sobre los agroecosistemas. En tal sentido, los beneficios de los PGPM sobre la nutrición, crecimiento y sanidad de los cultivos ha incrementado su uso como biofertilizantes (Caja 1). El inóculo puede consistir en mi-

**Biofertilizantes.** Sustancias que contienen microorganismos vivos (individuales o consorcios) que, cuando son aplicados a las semillas, superficies vegetales o suelo, colonizan la rizósfera o el interior de las plantas y promueven el crecimiento vegetal por incremento en el suministro o disponibilidad de nutrientes primarios a la planta hospedadora.

croorganismos nativos o no, aunque lo importante es que la carga del inóculo permita tanto la instalación de los microorganismos a introducir como la co-existencia con los nativos (Malusá y col., 2012). En la mayoría de los casos, no está claro si los microorganismos introducidos se establecen exitosamente y cómo impactan sobre la diversidad de las poblaciones microbianas nativas. El uso de técnicas moleculares pueden asistir al monitoreo de la persistencia de los inóculos así como en la detección de los cambios producidos en la poblaciones nativas luego de su instalación a campo.

Además del microorganismo a inocular, el soporte del inoculante es un factor clave en la decisión del productor para su utilización (Caja 2). La formulación del soporte debe permitir la dispersión o disolución del inoculante en el volumen de suelo próximo a la raíz con la menor

**Inoculantes secos** (Foto 2). Bacterianos, fúngicos o en combinación, producidos con:

- materiales orgánicos: turba, compost, harina de soja, salvado de trigo salvado, aserrín, etc.)
- materiales inorgánicos: carbón, arcilla, perlita, vermiculita, silicatos, bentonita, polímeros, etc..

**Inoculantes líquidos:** Generalmente bacterianos, basados en:

- aceites minerales u orgánicos, o - suspensiones solubles en agua.

complicación operativa posible. Además, el soporte debe proporcionar un microambiente adecuado para los PGPM que aseguren su vida en el producto (por lo menos de 2-3 meses, preferentemente a temperatura ambiente). Estos se aplican generalmente a la siembra del cultivo y contienen además de las bacterias, compuestos de protección de las células y aceleradores de la germinación y emergencia radical, entre otros.

Para la inoculación con FBN, los métodos más comunes consisten en cubrir la semilla con polvo o con líquido que contienen los organismos fijadores (Bogino y col., 2008). En general, el incremento de los rendimientos de los cultivos asociados a la inoculación son variables y dependientes del suelo (por su capacidad de suministro de N por mineralización) y de la presencia de bacterias FBN provenientes de cultivos anteriores. En el caso hipotético de un suelo en el que la infección a la planta no sea factible, el rendimiento del cultivo no sería superior al 40% del potencial. Con la inoculación se puede llegar hasta 80%, el 20% restante se lograría con el manejo adecuado de la simbiosis y la manipulación genética.

En Argentina, la inoculación con cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se ha adoptado de manera masiva como una práctica de rutina en el cultivo de soja (Melchiorre y col., 2011), y con menor frecuencia en maní (Nievas y col., 2012). Según Melchiorre y col. (2011), la inoculación de soja se realiza en el 90% de los campos agrícolas lo que favorece la FBN y mejora los rendimientos. El éxito del proceso de nodulación luego de la inoculación está determinado por varios factores, siendo la selección de cepas eficientes una característica de suma importancia. La respuesta a la inoculación es mayor en lotes sin antecedentes de soja en la rotación, siendo cercano al 50% en suelos sin historia de inoculación de Entre Ríos, sur de Córdoba y Chaco (Peticari, 2007), sin embargo actualmente la mayoría de los suelos presentan poblaciones naturalizadas de rizobios.

La inoculación con *Azospirillum* sp. ha sido evaluada en más de 100 especies cultivables en el mundo, detectándose amplitud en la colonización. Si bien en la actualidad hay 13 especies descritas de *Azospirillum*, en Argentina, la cepa usada en inoculantes es la Az 39

de *A. brasilense* aislada por el IMYZA INTA hace 25 años. En Argentina, el cultivo de arroz se inocula con *Azospirillum*, debido a que el N es el principal nutriente limitante para su producción, particularmente en estadios críticos de desarrollo como son la reproducción y la generación del vástago (García de Salamone y col., 2012). Similares resultados fueron encontrados para los cultivos de maíz y trigo inoculados con *Azospirillum* (García de Salamone y col., 1996). A diferencia de los antecedentes mencionados para *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azospirillum*, en Argentina aún no se realizan aplicaciones masivas con cianobacterias o con bacterias del género *Frankia*, aunque los resultados de ensayos a campo son promisorios. Por otra parte, se ha descrito que especies de *Methylobacterium*, *Burkholderia* y *Ralstonia* (*Wautersia*) entre otras proteobacterias, pueden nodular leguminosas tropicales y establecer simbiosis efectivas. Estos antecedentes implicarían una posibilidad de ampliación natural de las simbiosis fijadoras a otros microorganismos distintos de *Rhizobium*, posiblemente facilitando la extensión de esta característica a otras especies vegetales fuera de las leguminosas (Leigh, 2002).

El uso de inoculantes con hongos MA está siendo implementado, en particular para la producción de cultivos hortícolas y recuperación de suelos contaminados y degradados, principalmente en Europa y Estados Unidos aunque también su utilización está aumentando en Latinoamérica. La tendencia actual es la utilización de consorcios de hongos MA con la flora acompañante. Al respecto, Jin y col. (2012) reportan que los inoculantes formados por consorcios de hongos MA incrementan en mayor medida el crecimiento de las plantas y producen menores cambios en las comunidades microbianas nativas que las cepas individuales.

Mientras que la producción de cultivos bacterianos se realiza generalmente en biorreactores (Foto 3), la producción de inóculos de hongos MA presenta mayores dificultades debido a que por la naturaleza biotrófica obligada del hongo, este necesita de la planta hospedadora para su multiplicación (Foto 4). Algunos inóculos consisten en suelo-inóculo conteniendo esporas, hifas y raíces micorrizadas multiplicados en sustrato originalmente estéril. Sin embargo, estos tipos de inóculos presentan la dificultad de su dispersión a gran escala por lo que son utilizados principalmente en viveros y cultivos hortícolas. Las raíces micorrizadas son consideradas los propágulos mas infectivos y las esporas como los de mayor capacidad de supervivencia y tole-



**Foto 3.** Producción de inoculantes líquidos en biorreactores (izquierda). Presentación final de inoculante líquido en envase para comercialización (derecha)



**Foto 4.** Producción en masa de inoculantes de hongos micorrícicos arbusculares como suelo-inóculo (izq). Inoculación de plántulas por agregado de suelo-inóculo en proximidades de la raíz (der).

rancia a condiciones adversas. Para la multiplicación del inóculo hay que considerar que las plantas hospedadoras sean diferentes a las del hospedero final, a efectos de minimizar la transferencia de patógenos de raíces. En algunos casos la formulación de los inoculantes de micorrizas contiene esporas aisladas en algún soporte inerte (generalmente sólido soluble en agua, aunque también puede ser líquido), siendo *Rhizophagus intraradices* (= *Glomus intraradices*) la especie más utilizada en los inoculantes. En los últimos años se ha desarrollado un método de producción de esporas de hongos MA multiplicadas en raíces transformadas (Ri T-DNA) generalmente de zanahoria y crecidas en placas de Petri (St-Arnaud y col., 1996). Aunque este método puede permitir la producción de hasta 15000 esporas por caja de Petri en un período de 4-5 meses, complicaciones operativas en el mantenimiento de los cultivos, así como la no multiplicación de todas las especies, hacen que esta metodología sea utilizada principalmente para fines científicos.

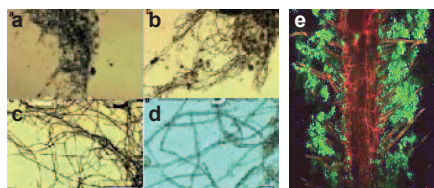
Varias evidencias han demostrado sinergismo entre organismos PGPM (En revisiones de: Hayat y col., 2010; Malusá y col., 2012), incluyendo representantes de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, hongos MA, entre otros. Mehrvarz y Chai-chi (2008) reportaron que los mayores incrementos de absorción de N y P y crecimiento en cebada en condiciones de campo (Teherán) ocurrieron por la co-inoculación con *Pseudomonas putida* y un consorcio de hongos MA, más que la inoculación individual o la fertilización fosfatada. Por su parte, Abasi y col. (2011) reportaron que mientras el hongo MA *Funneliformis mosseae* (= *Glomus mosseae*) evidenció algún efecto inhibitorio sobre la bacteria solubilizadora de P *Bacillus coagulans*, esta última presentó efecto positivo sobre la capacidad micorrizal y la inoculación dual incrementó la absorción de P en maíz. Roesti y col. (2006) reportaron que la co-inoculación con *Pseudomonas* y hongos MA (consorcio nativo de campos de India) inoculados a campo incrementaron la absorción de P y el contenido de proteína en granos de trigo. También se han registrado incrementos en la nodulación y FBN luego de la co-inoculación con un consorcio conformado por *Septoglomus deserticola* (= *Glomus deserticola*) y *Rhizobium trifoli*, en comparación con la inoculación simple con *R. trifoli* (Vassilev y col., 2001). Por su parte, Cassán y col. (2009) demostraron que la inoculación individual y coasociada de *Azospirillum brasilense* Az39 y *Brayrhizobium japonicum* E109 fueron responsables de la promoción de crecimiento temprano en plántulas de maíz y soja. Dicha promoción fue evidenciada in vitro por incrementos en la excreción de los regula-

dores de crecimiento radical AIA y zeatina, así como del promotor de crecimiento aéreo ácido glucorónico a las concentraciones necesarias para producir cambios morfológicos y fisiológicos en tejidos seminales jóvenes. Las abundantes evidencias del sinergismo de los efectos benéficos por la aplicación de consorcios de microorganismos PGPM hacen que su utilización en los inoculantes biológicos esté siendo actualmente implementada.

Además de las formulaciones de inoculantes tradicionales, en los últimos años, el desarrollo tecnológico de los biofilms (Caja 3) está siendo implementado como un medio alternativo para la producción

**Biofilm.** Crecimiento microbiano desarrollado en una matriz polimérica de producción microbiana adherida a una sustancia inerte (conocida como sustancia polimérica extracelular, que proporciona estructura y protección al biofilm).

de bioinoculantes (Seneviratne y col., 2008). Los biofilms formados por microorganismos edáficos pueden consistir en bacterias (incluyendo Actinomycetes), hongos, y consorcios fúngico-bacterianos que se desarrollan en la superficie de las raíces (Foto 5). La tecnología del uso de biofilms para la producción de inóculos con PGPM podría facilitar las dificultades asociadas al soporte. En este sentido, Jaya-



**Foto 5.** a-d) Biofilms fúngicos creciendo en raíces de mangle en descomposición, asociados con materiales orgánicos y otras células protistas incluyendo diatomeas (c-d imágenes ampliadas de a y b; [http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1007\\_978-90-481-3799-2\\_7-3](http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1007_978-90-481-3799-2_7-3))

e) Biofilm bacteriano: *Bacillus subtilis* en raíces de *Arabidopsis* (Foto: Dr. Rudrappa 2008; <http://www.udel.edu/udaily/2009/oct/bais101708.html>)

singhearachchi y Seneviratne (2004) reportaron que la aplicación de un inoculante formulado como biofilm conteniendo un consorcio de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019)-*Penicillium* sp. incrementó en un 42% el peso de nódulos lo que se tradujo en una mayor fijación de N<sub>2</sub> en soja con incremento del peso seco aéreo del 27%, en comparación con la inoculación con *Bradyrhizobium* solo. Por su parte, Ashraf y col. (2004) demostraron incrementos entre 85–281% de crecimiento de plantas de trigo creciendo en suelos con salinidad moderada luego de la inoculación con bacterias (una cepa de *Aeromonas hydrophila* y cuatro de *Bacillus*) multiplicadas como biofilms. Si bien son altamente promisorios los resultados, en Argentina la utilización de biofilms para el desarrollo de biofertilizantes aún se restringe al ámbito de la investigación.

En Argentina, algunas empresas comercializan inoculantes biológicos. Si bien la mayoría de los productos cuentan con ensayos de evaluación a campo como respaldo de eficiencia, actualmente no se realiza monitoreo de la instalación y persistencia del inóculo adicionado como tampoco los efectos sobre las poblaciones microbianas nativas. Además, en ocasiones, el soporte (sólido o líquido) suele contener concentraciones, a veces elevadas, de nutrientes o de sustancias que por sí solas funcionan como estimuladores del crecimiento. Esto debería ser tomado en cuenta a efectos de identificar separadamente los efectos producidos por los PGPM o por el bioinoculante en su conjunto.

### Biodegradación de xenobióticos

La biodegradación de xenobióticos es un proceso por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas contaminantes del suelo o del agua transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. Sin embargo, este proceso es naturalmente lento y puede acelerarse introduciendo bacterias o plantas con capacidades específicas en los ambientes contaminados, denominado biorremediación. En este proceso generalmente se emplean consorcios de microorganismos, aunque algunos se basan en la introducción de cepas individuales de bacterias u hongos (Halan y col., 2012).

Básicamente, los procesos de biorremediación pueden ser de tres tipos (Caja 4): la degradación enzimática, la remediación microbiana y la fitorremediación (Tabla 5). La degradación enzimática es en general incluida en el tipo remediación microbiana, lleva décadas en el mercado y hoy las compañías biotecnológicas ofrecen enzimas y microorganismos genéticamente modificados para tal fin (<http://www.argenbio.org>). Si para la remediación microbiana la estrategia consiste en favorecer la multiplicación y actividad de microorganismos nativos (sin inoculación), entonces puede suplementarse el sitio con nutrientes (particularmente P y N) con el fin de acelerar el proceso.

#### **Biorremediación, tipos**

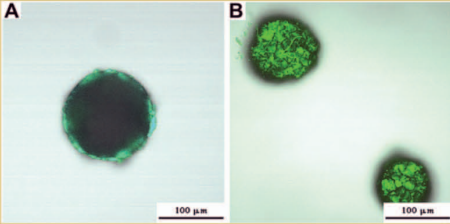
**Degradación enzimática:** Utilización de enzimas bacterianas degradadoras (propias o por inducción por transformación genética) de las sustancias nocivas en el sitio contaminado.

**Remediación microbiana:** Utilización de microorganismos degradadores (nativos o exógenos que son inoculados) directamente en el foco de la contaminación.

**Fitoremediación:** Aprovechamiento de la capacidad de ciertas plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, aire, agua o sedimentos como: metales pesados, metales radioactivos, compuestos orgánicos y compuestos derivados del petróleo.

Si bien hay algunos compuestos y sus derivados que pueden ser fácilmente degradados, los metales pesados no son biodegradables, aunque algunos microorganismos pueden secuestrarlos y concentrarlos de tal manera de evitar su disponibilidad y facilitar su eliminación. Aguilera y col. (2011) identificaron la localización por fluorescencia de Al contaminante en esporas de hongos MA (Foto 6, en Tabla 5). Los

**Tabla 5.** Diferentes estrategias de remediación de xenobióticos.

| Remediación mediada por                                | Nombre  | Características de la remediación  |
|--|---|--|
| Microorganismos (remediación o degradación enzimática) | <i>Pseudomonas</i> (general), <i>Alcaligenes</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> . | Actividad detoxificadora, gran capacidad de adaptación, utilización de variedad de compuestos químicos (fuente de C).  |
|  | <i>Pseudomonas putida</i>   | Metabolismo complejo, convierten desechos de poliestireno en plásticos biodegradables, producen moléculas que secuestran metales pesados.  |
|  | <i>Rhodococcus wratislaviensis</i>  | Degradación de p -Nitrophenol (PNP) (Gemini y col., 2007), utilizado en Argentina.   |
|  | Actinobacterias   | Degradación de pesticidas organoclorados como aldrin, DDT, metolachlor, atrazina, 2,4-D (Cuozzo y col., 2012; González y col., 2012). Utilizado en Argentina.  |
|  | Hongos MA   | Disminución de efectos adversos del Al por incremento en la absorción de P, Ca y Mg (antagonistas a Al), o inmovilización del Al en estructuras fúngicas.<br><br><b>Foto 6.</b><br>Fluorescencia de esporas de hongos MA aisladas de suelos chilenos contaminados con Al (Aguilera y col. 2011).<br>A) Esporas colectadas de suelos con saturación al 7% de Al.<br>B) Esporas colectadas de suelos con saturación al 70% de Al. La mayor fluorescencia (Foto B) indica mayor secuestro de Al.<br><br>Acumulación de Cd en <i>Medicago truncatula</i> a través de cambios metabólicos de la glicólisis Aloui y col., 2011). |
| Plantas (fitoremediación)                              | Plantas acuática macrófitas   | Extracción de metales pesados (Miretzky y col., 2004) en Argentina.  |
|  | Pasto cubano <i>Tithonia tubaeformis</i> (Asteraceae)   | Extracción de hidrocarburos de petróleo (Larenas Parada y de Viana, 2005), en Argentina .  |
|  | <i>Vicia sativa</i> o <i>Brassica napus</i>   | Extracción de fenoles (González y col., 2012; Ibáñez y col., 2012) en Argentina.   |

autores sugieren la formación de complejos estables entre metales y componentes fúngicos a través de sitios de inmovilización, especialmente en paredes celulares. Este aspecto podría ser relevante en suelos multi-contaminados donde los hongos MA podrían jugar un rol clave en la mitigación de contaminación por inmovilización en sus estructuras.

Existen contaminantes difíciles de degradar (hidrocarburos ramificados y cíclicos) y para los cuales aún no se han encontrado microorganismos capaces de transformarlos. La biotecnología puede solucionar en parte este problema, generando organismos genéticamente modificados con nuevas capacidades para eliminar tales contaminantes. La base de esta estrategia consiste en la búsqueda de las enzimas adecuadas y la posterior transferencia de los genes correspondientes a los microorganismos que se inocularán en el lugar contaminado. En Argentina se emplean diversos tipos de microorganismos nativos, para degradar productos xenobióticos. En suelos deficientes en N de nuestro país, es posible realizar bioremediación de hidrocarburos, mediante microorganismos que son capaces de mineralizar, eliminar y utilizar derivados del petróleo como fuente de C y energía (Acuña y col., 2008).

La fitorremediación ofrece numerosas ventajas en relación a los métodos fisicoquímicos actuales, como amplia aplicabilidad, bajo costo y rapidez con que pueden llevarse a cabo ciertos procesos degradativos. Según la planta y el agente contaminante, la fitorremediación puede producirse por acumulación del contaminante en las partes aéreas de la planta (por ej. metales pesados), absorción, precipitación y concentración de contaminantes en raíces (por ej. metales pesados, isótopos radioactivos), reducción de la movilidad del contaminante para impedir la contaminación de aguas subterráneas o del aire (por ej. lagunas de deshecho de yacimientos mineros). Otros mecanismos incluyen la captación y modificación del contaminante para luego liberarlo a la atmósfera con la transpiración (por ej. mercurio, selenio y metales clorados), o la captación y degradación del contaminante para originar compuestos menos tóxicos (por ej. pesticidas, herbicidas, TNT, etc.). Si para la extracción del xenobiótico la estrategia utilizada es la bioacumulación por algún organismo (planta o microorganismo), el paso siguiente es definir la estrategia a seguir para extraer dicho material del ambiente y eliminar o neutralizar el contaminante.

### **Rol microorganismos edáficos en la nutrición mineral de especies forestales**

Se ha mencionado que, en sistemas agrícolas, los nutrientes son removidos del suelo en cada estación con la cosecha de cultivo, y que dicha extracción es reemplazada por fertilización orgánica o inorgánica. En sistemas forestales, la cosecha del material vegetal ocurre



a intervalos mayores de tiempo que en los sistemas agrícolas y la fertilización no es una práctica generalizada, por lo que los nutrientes que se pierden del sitio deben ser reemplazados principalmente por el proceso de ciclado de nutrientes. Este proceso puede ser favorecido por la asociación de microorganismos rizosféricos, cuya diversidad y actividad puede ser modulada por las especies forestales (Calvaruso y col., 2010). La naturaleza del sistema radical es un factor clave de dicho proceso, por lo que las raíces deben establecer estrategias o mecanismos para realizar una exploración/explotación de los nutrientes a efectos de suplir la demanda del crecimiento aéreo.

Una estrategia de las especies forestales para acceder eficientemente a los nutrientes del suelo es a través de la formación de micorrizas. Si bien, en comparación con las especies no forestales, el número de hospedadores representa solo una pequeña fracción del número total de plantas terrestres, estos constituyen los componentes dominantes de los ecosistemas forestales y ocupan un área de gran importancia global. Entre ellas, las micorrizas *ericoides* son las que se forman con forestales pertenecientes al orden Ericales (familias Ericaceae, Empetraceae, y Epacridaceae, aproximadamente 3400 especies de plantas). Estos sub-arbustos o pequeños árboles forman micorrizas tanto en tierras altas como bajas, pobres en nutrientes como el sotobosque de los bosques boreales. Las micorrizas *ericoides* también se desarrollan en vegetación achaparrada de zonas cálidas mediterráneas, lo que sugiere que el aspecto nutricional más que los factores climáticos son los que determinan este tipo de asociación micorrízica. Por otra parte, entre los forestales perennes el tipo de asociación micorrízica que se destaca es la *ectomicorriza*, formada entre aproximadamente 10000 especies de hongos pertenecientes a los Basidiomicetes y Ascomicetes con aproximadamente 8000 especies de árboles o arbustos (incluidas especies de Dipterocarpaceae y las leguminosas Caesalpinoideae) distribuidas globalmente todos los ecosistemas (Taylor y Alexander, 2005). En este caso, el hongo no penetra en las células del hospedador sino que recorre la raíz intercelularmente en epidermis y córtex (denominado red de Hartig la que, al igual que los arbusculos, constituye la interfase entre los simbioses) y la simbiosis se caracteriza por la formación de un manto alrededor de las raíces. Por otra parte, los forestales representados por el género *Arbutus* (arbusto o árbol siempreverde) y por la familia Pyrolaceae, forman micorrizas del tipo *arbutoide* con hongos ectomicorrízicos en la cual ocurre penetración celular. Representantes de *Pinus* y *Larix* forman asociaciones del tipo *ectendomicorrizas* con los mismos hongos que con otros hospedadores forman ectomicorrizas. La asociación ectendomicorrízica presenta características de la asociación ecto y endomicorrízica (red de Harting bien desarrollada, con penetración celular).

Como se mencionó, no menos importante para la mayoría de los ecosistemas que la formación de micorrizas es la fijación de gases,

especialmente la FBN. Si bien, desde un punto de vista global, las leguminosas probablemente proporcionan no más del 20% del N fijado cada año, esto podría ser una subestimación si se considera la gran superficie del planeta que está cubierta con leguminosas leñosas perennes. Otra forma, y tal vez la más importante de la FBN en los bosques, la constituye la simbiosis actinorrízica formada por angiospermas no leguminosas con ciertas bacterias de vida libre con capacidad fijadora de N entre las cuales las más importantes son las cianobacterias autótrofas, antiguamente conocidas como algas verde-azules. Algunas cianobacterias viven en simbiosis con los hongos como los líquenes, y algunos de ellos son también FBN. En la FBN de vida libre, las bacterias heterótrofas son estimuladas en las inmediaciones de las raíces de las plantas, y es probable que dicha fijación de N del tipo asociativa, constituya un aporte sustancial al ciclo geoquímico de algunos ecosistemas forestales. Otros microorganismos también importantes en la nutrición de los cultivos forestales son las bacterias del género *Frankia* spp. En Argentina se han empleado exitosamente *Myrica pubescens* y *Alnus acuminata* asociadas con *Frankia* spp., en zonas fuertemente erosionadas (Easdale, 2000).

Para la producción de forestales, así como para cultivos agrícolas, los mayores beneficios de la inoculación se esperan para situaciones de estrés para la planta. Para el caso de producción de forestales, el trasplante es un momento crítico con alta probabilidad de pérdida de material radical, mayor exposición a estrés biótico (parásitos radicales) y abiótico (deseccación, daños por luz, estrés por cambios nutricionales). Es por esta razón que la práctica de la inoculación en especies forestales se realiza particularmente para minimizar los efectos adversos del trasplante, en la mayoría de las ocasiones mediante la inoculación con micorrizas (Appleton y col., 2003). Villegas-Espinoza y col. (2010) evidenciaron que la inoculación con *Bacillus amyloliquefaciens* y la FBN *Azospirillum halopraeferens* de semillas de *Prosopis chilensis*, especie utilizada para reforestación, incrementó el porcentaje y tasa de emergencia de las semillas así como la altura de planta, longitud radical, peso fresco y seco.

La experimentación con forestales presenta dificultades operativas tales como la gran producción de material vegetal y los largos períodos de crecimiento. Por esta razón, la práctica de la inoculación en forestales se realiza en mayor medida a nivel productivo y la estandarización y unificación de protocolos no es una generalidad. Asimismo, tampoco se dispone de la abundancia de resultados experimentales de cuantificación del beneficio de la inoculación, en comparación con la información disponible para especies agrícolas y hortícolas.

### **Herramientas biotecnológicas para el uso de microorganismos para la nutrición vegetal**

Los microorganismos constituyen aproximadamente el 60% de

la biomasa del planeta, con aproximadamente  $4-5 \times 10^{30}$  células microbianas en los ecosistemas terrestres de los cuales solo el 1% han sido cultivadas por las técnicas microbiológicas clásicas (Rastogi y Sani, 2011). Desde hace aproximadamente 3 décadas, estrategias basadas en el estudio y manipulación del genoma están auxiliando a las clásicas en la exploración del abundante reservorio genético microbiano. Las herramientas biotecnológicas pueden ser utilizadas tanto para la detección/selección de organismos de interés, así como para la manipulación de los microorganismos transformándolos con características deseadas.

Actualmente se cuenta con técnicas para identificar y caracterizar filogenética y funcionalmente a los microorganismos edáficos, así como para modificarlos genéticamente (Figura 5). El entendimiento de la diversidad y funcionalidad microbiana puede realizarse mediante el análisis parcial o íntegro de las comunidades. Las estrategias para el análisis parcial de las comunidades generalmente se inician con la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de parte del material genético (ADN o ARN). Si la muestra consiste en suelo, el producto amplificado por la reacción de PCR será una mezcla del sector de interés del genoma de todos los microorganismos presentes. Luego de la secuenciación de los fragmentos amplificados, se constituyen y actualizan librerías genéticas disponibles en bases públicas (GenBank, Ribosomal Database Project y Greengenes), lo que permite la asignación de niveles taxonómicos a las secuencias analizadas. Aunque la mayoría de los trabajos en EE.UU. y Europa realizan relevamientos de aproximadamente 200 clones con un máximo de análisis de 1000 secuencias, por área estudiada, se requiere aproximadamente el secuenciamiento de 40000 clones para revelar el 50% de la riqueza genética en una muestra ambiental (Dunbar y col., 2002).

Otras técnicas (de menor costo operativo y económico que el secuenciamiento) se basan en el análisis directo de los perfiles (*fingerprinting* genéticos) de los productos de amplificación por PCR del ADN de la muestra ambiental basados en diferencias en sus secuencias genéticas. Las técnicas más utilizadas son DGGE/TTGE, SSCP, RAPD, ARDRA, T-RFLP, LH-PCR, RISA y RAPD y si bien no proporcionan identidades taxonómicas directas, permiten el análisis simultáneo de múltiples muestras proporcionando un primer panorama sobre la posible diversidad genética microbiana de la situación en estudio. En este sentido, Covacevich y col. (2012b) detectaron por SSCP la variabilidad genética de hongos MA del género *Funneliformis* (= *Glomus*) nativos de la provincia de Buenos Aires asociados a condiciones edáficas y manejo agrícola contrastante. Asimismo, se pudo cuantificar cómo la diversidad microbiana edáfica puede ser modificada en respuesta a la implementación de sistemas de manejo intensivo en comparación con sistemas conservacionistas (Pérez Brandán y col., 2012; Vargas Gil y col., 2011).

Tanto las librerías genéticas como el *fingerprinting* son técnicas cualitativas mientras que también se dispone de otras (por ejemplo Q-PCR o PCR en tiempo real) que brindan información de la abundancia de los microorganismos en el sistema. Otras técnicas cuantitativas se basan en la hibridación *in situ* o bien del ADN de la muestra ambiental o de sus productos de PCR (FISH o microarreglos) con marcadores anclados en microarreglos, con posterior detección/ cuantificación de los microorganismos con la secuencia de interés por microscopia de fluorescencia.

El descubrimiento de que grupos bacterianos filogenéticamente relacionados difieren solo entre un 3-5% en los contenidos de guanina(G)+citosina(C) en su material genético (Nüsslein y Tiedje, 1999), ha abierto camino a técnicas (DGGE/ARDRA) que generan perfiles de la comunidad íntegra a partir de los gradientes de centrifugación del ADN basados en el contenido diferencial de G+C. Sin embargo, estos estudios solo se focalizan en comunidades bacterianas y su resolución es menor que otras técnicas.

A diferencia de las técnicas mencionadas en las que el estudio se restringe a una parte del genoma del microorganismo o de la comunidad microbiana en estudio, técnicas recientes permiten el análisis integral del genoma microbiano (Figura 5). La cantidad de secuencias generadas exceden en varios miles a las obtenidas por las técnicas clásicas de clonado-secuenciamiento, y a partir de ellas pueden predecirse las proteínas codificantes. Esto proporciona, además de información filogenética, detalles de la funcionalidad del organismo blanco de estudio. Actualmente, varias instituciones y laboratorios están completando el secuenciamiento de genomas completos. La secuencia genómica de *Desulfovibrio desulfuricans* G20, una proteobacteria modelo reductora de sulfato, demostró la existencia de una vía metabólica por la cual esta bacteria es capaz de reducir metales pesados como uranio (VI) y cromo (VI) hacia formas menos solubles en agua (Li y col., 2009). Duan y colaboradores (2013) reportaron que el secuenciamiento completo de *Pseudomonas sp.* (UW4) aislada de la rizósfera (USA) permitió la identificación de genes involucrados en la solubilización de P, producción de ACC deaminasa, AIA, trealosa y sideroforos, entre otros, que le confieren la capacidad PGPM. La información generada por el secuenciamiento de los genomas es depositada en bases de datos públicas (tales como el *Microbial Genomes Resources del National Center for Biotechnology Information*), que actualmente disponen de mas de 1000 genomas completos de procariotas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>).

En los últimos años, los estudios de Metagenómica están permitiendo el estudio del genoma de comunidades microbianas como un todo (Rastogi y Sani, 2011). Esta se basa en el concepto de que la composición genética de la comunidad microbiana íntegra puede ser secuenciada y analizada de la misma manera que puede

ser secuenciado el genoma completo de un solo individuo. Por pirosecuenciamiento se obtienen cientos de miles de secuencias cortas de toda la comunidad microbiana proporcionando información no solo de la estructura de la comunidad (riqueza y distribución de especies), sino que también sobre su funcionalidad potencial. Si bien los primeros estudios de Metagenómica se centraron en estudios de las comunidades bacterianas (Edwards y col., 2006; Fulthorpe y col., 2008, entre otros), esta tecnología está contribuyendo al conocimiento de las comunidades completas de hongos del suelo. Lumini y col. (2010) reportaron los primeros resultados de pirosecuenciamiento metagenómico de la diversidad de hongos MA en ecosistemas mediterráneos a través de un gradiente de uso de suelo.

Si bien los estudios de Metagenómica dan luz sobre la diversidad microbiana integral de los ecosistemas, se plantean dudas si los taxones más representativos son también los más activos funcionalmente. Esto es porque los estudios basados en el ADN no discriminan si el ADN extraído se corresponde con un organismo funcionalmente activo o con un resto en proceso de degradación. En la búsqueda de la determinación de la actividad microbiana, el desarrollo de tecnologías de postgenómica tales como la Metatranscriptómica y Metaproteómica, proporcionan información sobre la actividad enzimáticas de los microorganismos del suelo (Nannipieri y col., 2010). El monitoreo de la expresión de los genes, tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional, utiliza el ARN mensajero (mARN) como indicador de la actividad microbiana en el suelo. La Metaproteómica (también conocida como proteómica ambiental), involucra la separación por electroforesis uni y bi-direccionales de las proteínas totales de una muestra ambiental generando un *fingerprinting* funcional de la comunidad. Sin embargo, para el caso del N, la proteómica debe considerar que el N microbiano representa aproximadamente el 4% del N orgánico del suelo, mientras que la mayoría del N total está presente como proteínas extracelulares o péptidos de N estabilizados por los coloides del suelo. Además, la información sobre la expresión de genes relacionada a la actividad microbiana debería estar basada en la caracterización de las proteínas microbianas intracelulares, a menos que se requiera información sobre los procesos microbianos que involucran enzimas extracelulares. La caracterización de proteínas extracelulares, protegidas contra proteólisis por su asociación con coloides del suelo, podría brindar conocimiento sobre los mecanismos responsables de dicha asociación. Estos dos enfoques se han denominado proteómica funcional y estructural del suelo, respectivamente. Los estudios de proteómica funcional podrían incrementar el conocimiento sobre la degradación y bloqueo de xenobióticos, sobre el ciclado de nutrientes, sobre comunicación molecular entre microorganismos, y de estos con las raíces de las plantas, entre otros (Nannipieri y col., 2010).

Los estudios filogenéticos y funcionales permiten detectar, identificar y seleccionar microorganismos potencialmente benéficos. Además

mediante la biotecnología es posible modificar los organismos (Figura 5) con la finalidad de optimizar y eficientizar diferentes procesos de bioproducción, haciéndolos de mas calidad, seguros y consistentes, aumentar su valor así como la seguridad alimentaria y sustentabilidad. En la agricultura, la biotecnología ha permitido la alteración genética de los cultivos haciéndolos mas nutritivos, mejorando la productividad del suelo y el control de malezas y plagas. La biotecnología incluye métodos como la manipulación genética, el uso de marcadores moleculares, desarrollo de técnicas basadas en la manipulación del ADN, propagación *in vitro* de plantas, entre otras.

Muchas de las transformaciones genéticas en las plantas son tendientes a incrementar la captación de nutrientes. Se han detectado genes del hospedador directamente implicados en el establecimiento de una simbiosis efectiva con *Rhizobium*, así como algunas de las proteínas codificadas por estas bacterias, lo que podría ser utilizado para conseguir la extensión de la capacidad fijadora a otras plantas de interés no leguminosas (D'Antuono y col., 2008). Actualmente, una demanda pendiente es lograr que el maíz, el trigo o el arroz sean infectados de forma eficiente por *Rhizobium* con transferencia de la capacidad fijadora. Sin embargo, es probable que las plantas transformadas para la FBN no alcancen los niveles de producción óptimos, a pesar de que no necesiten ser fertilizadas. Esto se debería a que el costo energético que supone la FBN llega a ser hasta tres veces más alto que la utilización del nitrato por lo que los rendimientos serían menores (Pastor y Brinkley, 1998).

Además de los cultivos, muchos microorganismos útiles para la agricultura han sido transformados genéticamente con la finalidad de lograr mayores beneficios en la productividad de los cultivos. La manipulación genética de los microorganismos del suelo para favorecer la nutrición mineral (particularmente N) es una de las líneas con más desarrollo, tendientes a lograr nuevas especies fijadoras de N, a efectos de disminuir la dependencia de los fertilizantes químicos. La transformación genética de *Rhizobium* ha permitido entender cómo se determinan sus propiedades genéticas, establecer las relaciones entre las diferentes propiedades de las cepas y los mecanismos de la simbiosis (Mazur y Koper, 2012). En el caso de *Rhizobium*, ciertas propiedades específicas (infectividad, competitividad para nodular frente a las cepas nativas, y capacidad para fijar N en simbiosis) son el blanco de las modificaciones genéticas a efectos de lograr cepas más eficientes. Algunas transformaciones de cepas de *Rhizobium* mediante la introducción de genes bacterianos exógenos con elevada actividad de la enzima catalasa, han incrementado la eficiencia de la nodulación y capacidad FBN (Orikasa y col., 2010). Con la finalidad de conocer los mecanismos de la simbiosis, en Argentina se realizan transformaciones de cepas de *Rhizobium*, creado bacterias mutantes con su capacidad inhibida para la síntesis de polisacáridos relacionados con la formación de los nódulos (Lepek y D'Antuono, 2005), así

como mutantes para la producción de proteínas relacionadas con la transformación de las raíces para formar los nódulos (D'Antuono y col., 2008). En el caso de *Azospirillum*, se han realizado transformaciones en genes que codifican para una proteína que normalmente se inactivaría en presencia de  $\text{NH}_4^+$  (Holguin y col., 1999). Además se han realizados transformaciones en la bacteria eficientizando su capacidad FBN y promotora del crecimiento, mediante la activación de genes relacionados con la elongación de las raíces, incrementando su capacidad exploradora (Holguin y Glick., 2003).

La biotecnología se aplica además en la modificación de microorganismos con fines ambientales, por ejemplo en el uso de las poblaciones microbianas (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter* y *Acinetobacter*) como vectores para la introducción (por replicones, fagos, transposones o vectores de clonado) de actividades detoxificadoras. En la práctica de la inoculación, la biotecnología también ha contribuido y en este sentido es deseable que se evalúen y consideren los efectos `secundarios` de productos preparados con organismos modificados genéticamente. Estos aspectos están relacionados con las estrategias de las cepas a inocular, que se les pueda transferir la capacidad para que desaparecieran del ambiente una vez cumplida su función, o bien que se impidiera la transferencia genética horizontal para conservar la biodiversidad de la microbiota del medio. La biotecnología también puede asistir en el monitoreo de la persistencia de los inóculos en el suelo, así como en detectar cambios producidos en las poblaciones microbianas nativas por la introducción del inoculante.

### Perspectivas y consideraciones generales

En las últimas décadas numerosas líneas de investigación están aportando evidencias de la contribución de los microorganismos edáficos a la nutrición mineral vegetal. Si bien paulatinamente la utilización de los microorganismos PGPM está siendo incorporada a las prácticas de manejo, aun la fertilización mineral sigue siendo la práctica generalizada. Esto se basa fundamentalmente en la mayor seguridad y rapidez en la respuesta de los cultivos, dado que los procesos biológicos son más lentos que los químicos. Aun así, en las últimas décadas el conocimiento de los efectos deletéreos de la fertilización química sobre el ambiente, y en particular sobre algunas poblaciones PGPM, está contribuyendo al cambio paulatino hacia un manejo más sustentable. En este sentido, la biotecnología está asistiendo tanto en la detección de organismos potencialmente benéficos, en los cambios producidos en las comunidades por las prácticas agrícolas, así como en la manipulación genética tanto de los microorganismos como de los cultivos con la finalidad de una nutrición mineral más eficiente.

Si bien los caminos de la biotecnología son varios, esta es una

de las áreas que se está desarrollando a mayor velocidad y está asistiendo en el conocimiento de las bases moleculares de los beneficios que aportan los microorganismos PGPM, así como los mecanismos mediante los cuales lo llevan a cabo. El conocimiento de las vías metabólicas de interés, permitirán mejorarlas a efectos de eficientizar los ciclos biogeoquímicos y la nutrición mineral de las plantas, atendiendo a la sostenibilidad de los agroecosistemas. Esto podría disminuir la dependencia de los cultivos a la fertilización tendiendo a prácticas sustentables, logrando cultivos más rentables, particularmente en zonas edafoclimáticas particularmente frágiles.



## Bibliografía

- Abasi, A., M. J. Zarea, F. Rejali, y M. Barari. 2011. Effects of P solubilizer bacteria and AM fungi on forage maize growth in a semi-arid region in Iran. *J. Agricul. Tech.* 7:589-597.
- Acuña, A. J., O. H. Pucci, y G. N. Pucci. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de Nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. *Ecosistemas* 17:85-93.
- Aguilera, P., F. Borie, A. Seguel, y P. Cornejo. 2011. Fluorescence detection of aluminum in arbuscular mycorrhizal fungal structures and glomalin using confocal laser scanning microscopy. *Soil Biol. Biochem.* 43: 2427-2431.
- Aloui, A., G. Recorbet, F. Robert, B. Schoefs, M. Bertrand, C. Henry, V. Gianinazzi-Pearson, E. Dumas-Gaudot, y S. Aschi-Smiti. 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits shoot proteome changes that are modified during cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology* 11:75
- Appleton, B., J. Koci, S. French, M. Lestyan, y R. Harris. 2003. Mycorrhizal fungal inoculation of established street trees. *J. Arboricul.* 29:107-110.
- Ashraf, M., S. Hasnain, y O. Berge. 2004. Tariq Mahmood Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress *Biol. Fertil. Soils* 40: 157–162.
- Astiz Imaz, P, H. R. Sainz Rozas, y F. Covacevich. 2012. Respuesta Micorrícica en un Híbrido de Maíz Asociada a la Fertilización con Cinc. VII Encuentro Biólogos en Red, Mar del Plata, Noviembre 2012.
- Augé, R. 2001. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42.
- Baldani, J. I., y V. L. D. Baldani. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in gramineous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 77:549-579.
- Bautista Guerrero, H. H., y M. Valdés. 2008. Frankia y la simbiosis actinorrícica. *Rev. Lat. Microbiol.* 50 (3):90-102.
- Bogino P., E. Banchio, C. Bonfiglio, y W. Giordano. 2008. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia. *Curr. Microbiol.* 56:66-72.
- Boiero, L., D. Perrig, O. Masciarelli, C. Penna, F. Cassán, y V. Luna. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:874-880.
- Calvaruso, C., M. P. Turpault, E. Leclerc, J. Ranger, J. Garbaye, S. Uroz, y P. Frey-Klett. 2010. Influence of forest trees on the distribution of mineral weathering-associated bacterial communities of the *Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere. *Appl. Environm. Microbiol.* 76(14): 4780–4787
- Conforto C., O. S. Correa, A. Rovea, M. Boxler, S. Rodríguez Grastorf,

- J. Minteguiaga, J. Meriles, y S. Vargas Gil. 2012. La actividad microbiana del suelo en respuesta a la fertilización inorgánica en maíz. *Revista de Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica (IPNI)*. 8:18-21.
- Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna, y V. Luna. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45:28-35.
- Covacevich, F., H. R. Sainz Rozas, P. A. Barbieri, y H. E. Echeverría. 2005. Formas de colocación de fósforo sobre el crecimiento y la micorrización espontánea del cultivo de trigo. *Ciencia del Suelo* 23 (1): 39-45.
- Covacevich, F., M. A. Marino, y H. E. Echeverría. 2006. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass in a moderately acidic Argentinean soil. *Eur. J. Soil Biol.*, 42: 127-138.
- Covacevich, F., H. E. Echeverría, y L. A. N. Aguirrezabal. 2007. Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization into field and glasshouse-grown spring wheat in Argentina. *Appl. Soil Ecol.*, 35: 1-9.
- Covacevich, F., H. R. Sainz Rozas, P. A. Barbieri, y H. E. Echeverría. 2008. Crecimiento y micorrización arbuscular nativa de trigo en siembra directa bajo distintas formas de colocación de fósforo. *Ciencia del Suelo* 26 (2): 169-175
- Covacevich, F., y H. E. Echeverría. 2009. Mycorrhizal occurrence and responsiveness in tall fescue and wheatgrass are affected by the source of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *J. Plant Interact.*, 4: 101-112.
- Covacevich, F., M. Eyherabide, H. R. Sainz Rozas, y H. E. Echeverría. 2012a. Características químicas determinan la capacidad micorrizal arbuscular de suelos agrícolas y prístinos de Buenos Aires (Argentina). *Ciencia del suelo* 30(2): 119-128
- Covacevich, F., K. Hernandez Guijarro, H. R. Sainz Rozas, y H. E. Echeverría. 2012b. Variabilidad de hongos micorrízicos (*Glomus* spp.) Mediante PCR-SSCP en suelos de Buenos Aires con diferentes manejos. XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Argentino de la Ciencia del Suelo, Mar del Plata.
- Cuozzo, S. A., M. S. Fuentes, N. A Bourguignon, C. S. Benimeli, y M. J. Amoroso. 2012. Chlordane biodegradation under aerobic conditions by indigenous *Streptomyces* strains. *Int. Biodet. Biodegr.* 66:19-24.
- D'Antuono, A. L., O. T., L. Krusell, V. Voroshilova, R. A. Ugalde, M. Udvardi, y V. C. Lepek. 2008. Defects in rhizobial cyclic glucan and lipopolysaccharide synthesis alter legume gene expression during nodule development. *Mol. Plant Microb. Int.* 21 (1):50-60.
- Díaz-Zorita, M., G. Grosso, M. V. Fernández-Canigia, y G. Duarte. 1999. Efectos de la ubicación de un fertilizante nitrógenofosfatado sobre la nodulación y la producción de soja en siembra directa en la región de la pampa arenosa, Argentina. *Ciencia del Suelo* 17: 62-65-

- Duan, J., W. Jiang, Z. Cheng, J. J. Heikkilä, y B. R. Glick. 2013. The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. PLoS ONE 8: e58640. doi:10.1371/journal.pone.0058640
- Dunbar, J., S. M. Barns, L. O. Ticknor y C.R. Kuske. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. Appl. Environ. Microbiol. 68:3035–3045.
- Easdale, T. 2000. Crecimiento de 12 especies de árboles pioneros de bosque montano en suelos de cultivos, pastisales, “peladares” y suelos fertilizados. Actas de la XXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Río Cuarto, Provincia de Córdoba.
- Edwards, R. A., B. Rodríguez-Brito, L. Wegley, M. Haynes, M. Breitbart, D. M. Peterson, M. O. Saar, S. Alexander, E. C. Alexander, Jr., y F. Rohwer. 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* 7:57.
- Fankem, H., L. Ngo Nkot, A. Deubel, J. Quinn, W. Merbach, F.X. Etoa, y D. Nwaga. 2008. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. Afr. J. Microbiol. Res. (2):171-178.
- FAOSTAT. At <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>.
- Feddermann, N., R. Roger Finlay, T. Boller, y M. Elfstrand. 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza—the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecol.* 3:1–8.
- Fulthorpe, R. R., L. F. W. Roesch, A. Riva, y E. W. Triplett. 2008. Distantly sampled soils carry few species in common. *ISME J* 2: 901–910.
- García de Salamone, I. E., y J. Dobereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils* 21:193-196.
- García de Salamone, I. E., J. M. Funes, L. P. Di Salvo, J. S. Escobar-Ortega, F. D'Auria, L. Ferrando, y A. Fernandez-Scavino. 2012. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *App. Soil Ecol.* En Prensa.
- Gemini, V. L., A. Gallego, V. Tripodi, D. Corach, E. I. Planes, y S. E. Korol. 2007. Microbial degradation and detoxification of 2,4-dinitrophenol in aerobic and anoxic processes. *Int. Biodeterioration Biodegr.* 60: 226-230.
- Gerretsen, F. C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil* 1:51-81.
- Goenadi, D. H., y S. Y. Siswanto. 2000. Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64:927–932
- Goicoechea, N., S. Merino, y M. Sánchez-Díaz. 2004. Management of phosphorus and nitrogen fertilization to optimize *Anthyllis-Glomus-Rhizobium* symbiosis for revegetation of desertified semiarid areas.

- J. Plant Nutr. 27: 1395–1413,
- González, P. S., G. A. Maglione, M. Giordana, C. E. Paisio, M. A. Talano, y E. Agostini. 2012. Evaluation of phenol detoxification by *Brassica napus* hairy roots, using *Allium cepa* test. Environ. Sci. Pollut. Res. 19 (2):482-491.
- Grümbert B., C. Conforto, C. Pérez Brandán, A. Rovea, M. Boxler, S. Rodríguez Grastorf, J. Minteguiaga, C. Luna, J. Meriles, y S. Vargas Gil. 2012. La fertilización inorgánica y su efecto sobre los hongos micorrícicos en el cultivo de maíz. Revista de Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica (IPNI). 8:22-26.
- Halan, B., K. Buehler, y A. Schmid, 2012. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. Trends Biotech. 30 (9):453-465.
- Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid, y I. Ahmed. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Ann Microbiol 60:579-598.
- Hildebrandt, U., M. Regvar, y H. Bothe. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. Phytochem. 68:139-146.
- Hiltner, L. 1904. Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. Arb. Deut. Landw. Gesell, 98:59-78.
- Holguin, G., y G. R. Glick. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the tetr gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. Microb. Ecol. 46:122-133.
- Holguin, G., C. L. Patten, y B. P. Glick. 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. Biol. Fertil. Soils 29:10-23.
- Islam M. R., P. S. Chauhan, Y. Kim, M. Kim, y T. Sa. 2011. Community level functional diversity and enzyme activities in paddy soils under different long-term fertilizer management practices. Biol. Fertil. Soils 47:599-604.
- Ibáñez, S. G., L.G. Sosa Alderete, M. I. Medina, y E. Agostini. 2012. Phytoremediation of phenol using *Vicia sativa* L. plants and its antioxidative response. Environm. Sc. Pollution Res. 19 (5): 1555-1562.
- Jayasinghearachchi, H. S., y G. Seneviratne. 2004. A *Bradyrhizobial-Penicillium* spp. biofilm with nitrogenase activity improves N<sub>2</sub> fixing symbiosis of soybean. Biol. Fertil. Soils 40(6):432-434.
- Jin, H, J. J. Germida, y F. L. Walley. 2012. Impact of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants on subsequent arbuscular mycorrhizal fungi colonization in pot-cultured field pea (*Pisum sativum* L.). Mycorrhiza on line: <http://www.springerlink.com/content/91121q3r87n7601w/fulltext.pdf>
- Khan, M. S., A. Zaidi, M. Ahemad, M. Oves, y P. A. Wani. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. Arch. Agron. Soil Sci. 56:73-98.
- Kim, K. Y., D. Jordan, y G. A. McDonald. 1998. Enterobacter agglomerans, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources Soil Biol. Biochem. 30 (8/9):995-1003.
- Koide, R. T., y B. Mosse. 2004. A history of research on arbuscular

- mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145-163.
- Leigh, G. J. (Ed.) 2002. Nitrogen fixation at the millennium. Elsevier Science. London, RU.
- Lepek, V. C., y A. L. D'Antuono. 2005. Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. *Lotus News*. 35:93-105.
- Li X., Q. Luo, N. Q. Wofford, K. L. Keller, M. J. McInerney, J. D. Wall, y L. R. Krumholz. 2009. A molybdopterin oxidoreductase is involved in H<sub>2</sub> oxidation in *Desulfovibrio desulfuricans* G20. *J. Bacteriol.* 191:2675–2682.
- Lumini, E., A. Orgiazzi, R. Borriello, P. Bonfante, y V. Bianciotto. 2010. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environ. Microbiol.* 12(8):2165-2179.
- Malusá, E., L. Sas-Paszt, y J. Ciesielska. 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The ScientificWorld Journal* on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3324119/pdf/TSWJ2012-491206.pdf>
- Marshall, C. B., J. R. McLaren, y R. Turkington. 2011. Soil microbial communities resistant to changes in plant functional group composition. *Soil Biol. Biochem.* 43:78-85.
- Mazur, A., y Koper P. 2012. Rhizobial plasmids - replication, structure and biological role. *Cent. Eur. J. Biol.* 7 (4):571-586.
- McLaughlin, M. J., A. M. Alston, y J. K. Martin. 1988. Phosphorus cycling in wheat-pasture rotations. II. The role of the microbial biomass in phosphorus cycling. *Aust. J. Soil Res.* 26: 333–342.
- Mehrvarz, S., y M. R. Chaichi. 2008. Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on forage and grain quality of barely (*Hordeum vulgare* L.) Am-Euras. *J. Agric. Environ. Sci.* 3 (6):855-860.
- Melchiorre, M., M. J. de Luca, G. Gonzalez Anta, P. Suarez, C. Lopez, R. Lascano, y R. Racca. 2011. Evaluation of *Bradyrhizobia* strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biol. Fertil. Soils* 47 (1):81-89.
- Miretzky, P., A. Saralegui, y A. Fernández Cirelli. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 57:997-1005.
- Molla, M. A. Z., A. A. Chowdhury, A. Islam, y S. Hoque. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. *Plant Soil* 78 (3):393-399
- Nannipieri, P., L. Landi, L. Giagnoni, y G. Renella. 2010. Gene expression and proteomics in soil. 19<sup>th</sup> World Congress of Soil Science. Soil Solutions for a Changing World. Australia. <http://www.iuss.org/19th%20WCSS/Symposium/pdf/2492.pdf>
- Nievas, F., P. Bogino, F. Sorroche, y W. Giordano. 2012. Detection, characterization, and biological effect of quorum-sensing signaling molecules in peanut-nodulating *Bradyrhizobia*. *Sensors* 12:2851-2873.
- Nüsslein, K., y J. M. Tiedje. 1999. Soil bacterial community shift

- correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3622–3626.
- Orikasa, Y., Y. Nodasaka, T. Ohyama, H. Okuyama, N. Ichise, I. Yumoto, N. Morita, M. Wei, y T. Ohwada. 2010. Enhancement of the nitrogen fixation efficiency of genetically-engineered *Rhizobium* with high catalase activity. *J. Biosci. Bioeng.* 110:397-402.
- Ortas, I., y C. Akpınar. 2011. Response of maize genotypes to several mycorrhizal inoculums in terms of plant growth, nutrient uptake and spore production. *J. Plant Nutr.* 34 (7):970-987.
- Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Rev.* 6:763.
- Pastor, J., y D. Binkley. 1998. Nitrogen fixation and the mass balances of carbon and nitrogen in ecosystems. *Biogeochemistry* 43:63-78.
- Pedraza, R. O. 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125: 25–35
- Pereyra, C. M., N. A. Ramella, M. A. Pereyra, C. A. Barassi, y C. M. Creus. 2010. Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. *Plant Physiol Biochem.* 48:62-9
- Perez-Brandán, C., J. L. Arzeno, J. Huidobro, B. Grümberg, C. Conforto, S. Hilton, G. Bending, J. Meriles, y S. Vargas Gil. 2012. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in soybean. *Crop Prot.* 40:73-82.
- Peticari, A. 2007. Fijación biológica de nitrógeno=beneficios para la producción. Jornada Bonaerense de Microbiología, Universidad Nacional de Luján (UNLU).
- Rastogi, G., y R. K. Sani. 2011. En: I. Ahmad, F. Ahmad y J. Pichtel (Eds.). *Microbes and Microbial Technology: 29 Agricultural and Environmental Applications*, Chapter 2: Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. Springer Science+Business Media LLC.
- Richardson, A.,E., y R. J. Simpson. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol.* 156:989-996.
- Rillig, M. C., y D. L. Mummey. 2006. Mycorrhizas and soil structure *New Phytol.* 171:41-53.
- Roesti, D., R. Gaur, B.N. Johri, G. Imfeld, Sharma, K. Kawaljeet, y M. Aragno. 2006. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol. Biochem.* 38:1111-1120.
- Sajedi, N. A., y F. Rejali. 2011. Effects of Drought Stress, Zinc application and mycorrhiza inoculation on uptake of micro nutrients in maize Iranian J. Soil Research (Soil and Water Sci.) 25(2):83-92.
- Seneviratne, G., J. S. Zavahir, W. M. M. S. Bandara, y M. L. M. A. W. Weerasekara. 2008. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotech.* 24 (6):739-743.
- Shreenivasa, K. R., K. Krishnappa, y N. G. Ravichandra. 2007.

- Interaction effects of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on growth and phosphorous uptake of tomato. *Karnataka J. Agric. Sci.* 20 (1):57-61.
- Siddiqui, Z. A., M. S. Akhtar, y K. Futai. 2008. *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*. Springer, New Delhi. 359 pp.
- St-Arnaud, M., C. Hamel, B. Vimard, M. Caron, y J. A. Fortin. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* 100 (3):328-332.
- Tao, G., S. Tian, M. Cai, y G. Xie. 2008. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere.* 18:515-523.
- Taylor, A. F. S., y I. Alexander. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19: 102–112.
- Vargas Gil, S., J. Meriles, C. Conforto, M. Basanta, V. Radl, A. Hagn, M. Schloter, y G.J. March. 2011. Soil microbial communities' response to tillage and crop rotation in a soybean agroecosystem in Argentina. *Eur. J. Soil Biol.* 47:55-60.
- Vassilev, N., M. Vassileva, R. Azcon, y A. Medina. 2001. Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarrowia lipolytica* inoculated into a soil-plant system. *Biotech. Lett.* 23 (2):149-151.
- Villegas-Espinoza, J. A., E. O. Rueda-Puente, B. Murillo-Amador, M. E. Puente, M., O. Grimaldo-Juárez, S. M. Avilés-Marín, y J. F. Ponce Medina. 2010. Efecto de la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *Prosopis chilensis*. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12:19-32.
- Wall, L. G. 2000. The actinorhizal symbiosis. *J. Plant Growth Regul.* 19:167-182.