

Artículo científico

Evaluación del efecto de bacterias lácticas como promotores de la germinación y crecimiento vegetal en cítricos

Evaluation of the effect of lactic acid bacteria as promoters of germination and plant growth in citrus

A. Cruz¹; S.G. Venegas Tarancón^{1,4}; F. Romano¹; L. Sendín²; E. Hebert³; L. Saavedra³; M.P. Filippone^{1,4*}

¹Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Kirchner 1900, (4000), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

²Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres–Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (4101), Las Talitas, Tucumán, Argentina.

³Centro de Referencias para Lactobacilos (CERELA, CONICET), Chacabuco 145, (4000), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

*Correo electrónico: paulafilippone2018@gmail.com.ar

Resumen

Las bacterias lácticas son efectivas en el control de una amplia variedad de fitopatógenos y también como bioestimulantes, al promover directamente el crecimiento de las plantas o la germinación de las semillas, y también para aliviar diversos estreses de origen biótico. Sin embargo, el rol funcional como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, no ha sido profundamente explorado. El objetivo de este trabajo fue evaluar *Enterococcus mundii* (CRL35) y dos cepas de *E. faecium* (CRL1877 y CRL1879) aisladas de productos lácteos, como agentes de inducción de la germinación y crecimiento en genotipos cítricos. *Citrus limon*, *Citrus sinensis* y *Poncirus trifoliata* mostraron incrementos en la germinación, mientras que *Citrus aurantium* mostró sensibilidad a la cepa CRL1877 y su sobrenadante. El tratamiento de semillas de *P. trifoliata* con las células de CRL35 y CRL1879 y sus sobrenadantes, generó plantines con tallos de mayor longitud y diámetro, mayor longitud de raíz principal y de la raíz secundaria más larga y mayor número total de raíces secundarias que los respectivos controles con MgCl₂ y el caldo de cultivo LAPTg. La magnitud de la inducción respondió a la concentración (DO_{600 nm} 1 y 0,1) y tiempo de tratamiento (2 h y 8 h). Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera evaluación de estas cepas de bacterias lácticas como agentes inductores del crecimiento en cítricos, por lo que abre posibilidades potenciales para el desarrollo de estrategias agrícolas sustentables.

Palabras clave: *Enterococcus*; Germinación; PGPR; *Poncirus trifoliata*.

Abstract

Lactic acid bacteria are effective in controlling a wide variety of phytopathogens and also as biostimulants, by directly promoting plant growth or seed germination, and also to relieve various stresses of biotic origin. However, their functional role as plant growth-promoting bacteria, has not been deeply explored. The objective of this work was to evaluate *Enterococcus mundii* (CRL35) and two strains of *E. faecium* (CRL1877 and CRL1879) isolated from dairy products, as germination and growth induction agents in citrus genotypes. *Citrus limon*, *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata* showed increases in germination, while *Citrus aurantium* showed sensitivity to strain CRL1877 and its supernatant. The treatment of *P. trifoliata* seeds with the cells of CRL35 and CRL1879 and their supernatants, generated seedlings with stems of greater length and diameter, greater length of the main root and of the longest secondary root and greater number of secondary roots, than the respective controls with MgCl₂ and the LAPTg culture broth. The magnitude of the induction responded to the concentration (DO_{600 nm} 1 and 0.1) and treatment time (2 h and 8 h). The results obtained in this work are the first evaluation of these strains of lactic acid bacteria as growth-inducing agents in citrus, thus opening up potential possibilities for the development of sustainable agricultural strategies.

Keywords: *Enterococcus*; Germination; PGPR; *Poncirus trifoliata*.

Introducción

La actividad agrícola actual se encuentra frente a múltiples desafíos para alimentar a una población en continuo crecimiento con recursos cada vez más escasos, como consecuencia del cambio climático, la sobreexplotación de los recursos naturales, la merma de la biodiversidad, entre otros factores, lo que demanda el uso imprescindible de estrategias de producción sostenibles (Badgley *et al.*, 2007; Hidalgo López y Sorondo, 2020). Una alternativa para el manejo de los cultivos que cada vez toma mayor participación, es el uso de bioinsumos agrícolas (biofertilizantes, bioinductores y bioplaguicidas), ya que representan opciones económicamente atractivas y ecológicamente más seguras que muchos agroquímicos y fertilizantes de síntesis química. Un bioinsumo es un producto basado en compuestos y/o extractos de micro o macroorganismos o plantas, o de microorganismos vivos, que producen un efecto benéfico sobre la sanidad o el crecimiento (o rendimiento) de los cultivos sin generar impacto negativo en el agroecosistema (Gerwick y Sparks, 2014; Casler *et al.*, 2009). En el desarrollo de un bioinsumo se utilizan estrategias que surgen del estudio y caracterización de lo que sucede en las distintas interacciones de las plantas con su entorno. Así por ejemplo la identificación de nuevos microorganismos benéficos, la conformación sinérgica de consorcios microbianos, la identificación de nuevas moléculas inductoras del crecimiento o de la defensa vegetal, etc., y que pueden utilizarse para el manejo sustentable de los cultivos. Los microorganismos y las plantas constituyen una riquísima fuente de compuestos con propiedades antimicrobianas y con capacidad para inducir los mecanismos de defensa y/o crecimiento vegetal. Dentro de estos microorganismos benéficos se encuentran las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas, que cuando están asociadas a la rizósfera se conocen como PGPR, por sus siglas en inglés “*Plant Growth - Promoting Rhizobacteria*” (Kloepper y Schroth, 1978), las cuales pueden ser bacterias de vida libre que habitan en el suelo o en las raíces de las plantas. Dentro de este grupo de bacterias, los géneros más ampliamente utilizados corresponden a *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otras (Compant *et al.*, 2005, Bashan y Holguin, 1998; Kloepper *et al.*, 1989). Las interacciones que se establecen entre las plantas, el suelo, los

microorganismos y la dinámica de los nutrientes pueden ser complejas y representan una gran oportunidad para mejorar la fertilidad del suelo. En la última década se ha generado una demanda creciente de bioinsumos o inoculantes microbianos (>12 % incremento anual, Red Agrícola, 2021), no obstante, el futuro del uso agrícola de las PGPR depende de su aceptación como una nueva tecnología verde, que puede ser una alternativa más amigable con el ambiente.

La búsqueda y caracterización de nuevos aislamientos de microorganismos que produzcan un beneficio en la producción agrícola y también pecuaria es continua, con el objetivo de mejorar los efectos ya caracterizados o encontrar nuevos beneficios aportados por microorganismos que no generen ningún efecto nocivo para la salud humana (GRAS, de “*Generally Recognized as Safe*”). Entre tales microorganismos se encuentran los lactobacilos, un amplio grupo de bacterias que ocupan diversos nichos ecológicos, principalmente conocidos también como microorganismos beneficiosos para la salud humana. Además de ser utilizados como probióticos para humanos, los lactobacilos ya se han aplicado con éxito en el control de enfermedades de las plantas y en la estimulación del crecimiento vegetal, sin embargo, la información al respecto en la literatura aun es escasa. De acuerdo a esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de bacterias lácticas (BL) locales aisladas de quesos y caracterizadas en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET) ubicado en la provincia de Tucumán, Argentina (Minahk *et al.*, 2000; Saavedra, 2004; Suárez *et al.*, 2013; Suárez, 2015; Bonacina *et al.*, 2014 y 2017; Orihuel *et al.*, 2018a,b) como promotores de la germinación y el crecimiento de plantas cítricas, como una alternativa a las PGPR- convencionales, considerando además que las BL pueden mejorar la calidad nutricional de los frutos, ya sea porque produzcan nuevos metabolitos o incrementen la síntesis de metabolitos benéficos para la salud del ser humano.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas utilizadas

Los genotipos de las cepas de BL utilizados en este trabajo forman parte de la Colección de Cultivos del CERELA y corresponden a la cepa

CRL35 de *Enterococcus mundtii* (Saavedra *et al.*, 2004; Bonacina *et al.*, 2017; Salvucci *et al.*, 2007 y 2012; Orihuel *et al.*, 2018a,b), y las cepas CRL1877 y CRL1879 de *Enterococcus faecium* (Suarez *et al.*, 2013; Suarez, 2015), todas aisladas de quesos artesanales.

Condiciones de crecimiento

Las BL se crecieron en medio LAPTg (Raibaud *et al.*, 1961), a 35 °C con agitación (250 rpm) durante 24 h, realizando tres repiques sucesivos. Para los ensayos, luego del tercer repique, se separó el sobrenadante de las células bacterianas mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. El pellet bacteriano fue resuspendido en una solución de MgCl₂ 10 mM, y la concentración se ajustó por la densidad óptica (DO) medida a 600 nm en un espectrofotómetro (Modelo DU 640; Beckman, USA)

El medio de cultivo LAPTg (peptona, 15 g/L; tripteína, 10 g/L; extracto de levadura, 10 g/L; glucosa, 10 g/L; Tween 80, 1 g/L; pH 6,5) fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min. Para los medios sólidos y semi-sólidos se agregó agar-agar (Britania, Argentina) a una concentración final de 1,5 % o 0,7 % (p/v), respectivamente.

Pruebas de germinación de semillas de cítricos

Los genotipos cítricos utilizados fueron: *Citrus sinensis*, *C. limon*, *C. aurantium* y *Poncirus trifoliata*. Para la extracción de semillas, los frutos fueron cortados por la línea ecuatorial, se extrajo el jugo separando las semillas las cuales se enjuagaron con agua común y luego se dejaron secar al aire. Para los ensayos, las semillas fueron despojadas de la cubierta seminal, desinfectadas con alcohol al 70 % durante 1 min y posteriormente con hipoclorito de sodio 1 % durante 5 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Para la prueba de germinación, las semillas se sumergieron en los diferentes tratamientos: las células de los tres aislados bacterianos (CRL35, CRL1877 y CRL1879) y los respectivos sobrenadantes. Como controles se utilizó una solución de 10 mM de MgCl₂ estéril y medio LAPTg estéril. Las semillas se inocularon con la suspensión de cada bacteria ajustando la concentración a DO_{600 nm} = 1 (equivalente a 2,0 x 10⁷ UFC/mL) y los respectivos sobrenadantes, sumergiéndolas durante 8 h, luego fueron retiradas y se dejaron secar al aire. Se procedió de la misma manera con los tratamientos controles.

Posteriormente, se colocaron 20 semillas de cada tratamiento en cada bandeja de germinación sobre papel filtro humedecido con agua destilada estéril, y se realizaron tres repeticiones (3 bandejas por tratamiento). Las bandejas se colocaron dentro de una bolsa de plástico negro, por 24 h a 30 °C, y luego se colocaron bajo un fotoperiodo de 16 h de luz, manteniendo la humedad del papel de filtro con agua destilada estéril. Se consideró germinada una semilla después de la emergencia de la radícula.

A los 30 días posteriores al tratamiento se determinó el porcentaje de germinación en base al número de semillas germinadas con respecto al total de semillas tratadas, por 100 ((% germinación = (número de semillas germinadas/ número total de semillas) x 100).

Ensayos de promoción del crecimiento

Para las pruebas de promoción del crecimiento, se trabajó con el genotipo cítrico *Poncirus trifoliata* y dos cepas de BL (cepas CRL35 y CRL1879). Se evaluaron dos concentraciones bacterianas correspondientes a una DO_{600 nm} de 1 y 0,1. Los sobrenadantes fueron diluidos en la misma proporción que las células, resultando cuatro tratamientos: T1 y T2, correspondientes a las células de las cepas CRL35 y CRL1879; y T3 y T4, a los respectivos sobrenadantes. Previo al tratamiento, las semillas de *P. trifoliata* fueron desinfectadas y sumergidas durante 2 h y 8 h en las suspensiones de cada bacteria y los respectivos sobrenadantes. Como tratamientos controles se utilizaron MgCl₂ 10 mM y LAPTg estériles, correspondientes a T5 y T6, en adelante. Luego las semillas fueron sembradas en sustrato estéril (humus y perlita, 2:1), y colocadas en condiciones controladas de crecimiento (16 h de luz y 25 °C). A los 60 días de la siembra se volvió a realizar una inoculación bacteriana, el agregado de los respectivos sobrenadantes y los tratamientos controles (MgCl₂ y LAPTg). A los 100 días se realizó la evaluación de los siguientes parámetros: altura de la planta, diámetro de la base del tallo y de la raíz primaria a 1 cm de cuello de la planta, longitud de la raíz primaria y de la secundaria más larga, y número de raíces secundarias. Posteriormente, las plántulas se trasplantaron de forma individual en macetas plásticas de 600 mL en una mezcla de suelo y sustrato (1:1). Para cada tratamiento se utilizaron 10 plantines y tres repeticiones.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico InfoStat utilizando análisis de la varianza y prueba de Tukey de comparación de medias con un nivel de significación de 0,05 (Di Rienzo *et al.*, 2013). Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes y se expresaron como media \pm error estándar. A los datos de germinación obtenidos como porcentajes se les realizó una transformación arcoseno para normalizar los datos (Sokal y Rohlf, 1995) y posteriormente un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey con Infostat para determinar si había diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie cítrica. Para el análisis inferencial de la cantidad de raíces secundarias se utilizó un modelo lineal generalizado con el programa R a través de InfoStat (GLMM), se asignó para el análisis la distribución Poisson. Los factores tratamiento y condiciones del mismo fueron considerados efecto fijo y el número de raíces secundarias variable respuesta. La prueba de comparación de medias se realizó mediante la prueba DGC (5 %). El ajuste del modelo y las pruebas de hipótesis asociadas se realizaron con el programa InfoStat.

Resultados y discusión

Efecto de las bacterias lácticas en la germinación de semillas de cítricos

Las BL son ubicuas y se encuentran en diversos nichos como las plantas en donde pueden proliferar rápidamente cuando los tejidos se dañan y se liberan contenidos celulares ricos en

carbohidratos. Aunque no forman parte del grupo de géneros bacterianos clásicamente conocidos como PGPR, existen diversos estudios en donde se ha demostrado la capacidad de BL para favorecer la germinación, el desarrollo y crecimiento de tejidos vegetales, debido a mecanismos como la colonización de la superficie de raíces (Hammed *et al.*, 2011) y la producción de compuestos bioactivos que actúan de manera positiva sobre el desarrollo vegetativo como menciona Glick (2015). En este trabajo se seleccionaron los genotipos lácticos del género *Enterococcus*, CRL35, CRL1877 y CRL1879, aislados de alimentos lácteos, para evaluar el efecto en la germinación de semillas de cítricos tratadas con las células bacterianas y sus sobrenadantes. Las cepas utilizadas fueron extensamente caracterizadas en CERELA y se cuenta con el genoma secuenciado de CRL35 y CRL1879 (Suarez *et al.*, 2013; Bonacina *et al.*, 2014). Además, se determinó que la cepa CRL1877 posee los genes para la producción de enterocina A, B y P, tres antibióticos ampliamente caracterizadas en el género *Enterococcus* (Suárez, 2013). Los genotipos cítricos utilizados fueron *C. limon*, *C. sinensis*, *C. aurantium* y *Poncirus trifoliata*. En la Tabla 1, se observa que el efecto sobre la germinación varió en función de la cepa de BL y del genotipo cítrico. La prueba de hipótesis sobre el efecto fijo de los tratamientos dentro de cada especie de cítrico (por columna) demostró que existían diferencias significativas entre algunas de las medias de los tratamientos. Así, por ejemplo, *C. limon* mostró los porcentajes más altos de germinación que el resto de los genotipos cítricos. Las semillas inoculadas con las bacterias no mostraron diferencias con los controles, sin embargo, los sobrenadantes de CRL1877 y

Tabla 1. Germinación (%) de semillas de cuatro genotipos cítricos tratadas con suspensiones de bacterias lácticas y sus sobrenadantes. Las semillas fueron sumergidas durante 8 h en los diferentes tratamientos: células bacterianas (B) de CRL35, CRL1877 y CRL1879 y los respectivos sobrenadantes (S) del cultivo, y luego colocadas en cámaras húmedas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el “test de Tuckey” ($P < 0,05$). La germinación (%) se expresa como la media \pm E.E.

Tratamientos	<i>C. limon</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>C. aurantium</i>	<i>P. trifoliata</i>
CRL35-B	90,13 \pm 4,30 A	60,03 \pm 1,95 BC	82,33 \pm 2,86 D	62 \pm 4,00 A
CRL1877-B	91,2 \pm 4,50 A	70,45 \pm 3,85 D	23,66 \pm 3,94 B	67,33 \pm 2,08 ABC
CRL1879-B	92,33 \pm 2,04 A	72,28 \pm 1,17 D	63,33 \pm 3,18 C	65,77 \pm 4,51 AB
CRL35-S	90 \pm 1,00 A	90,33 \pm 3,28 E	84,33 \pm 3,51 D	100 \pm 0,00 E
CRL1877-S	100 \pm 0,00 B	73,23 \pm 4,28 D	10 \pm 5,00 A	73,33 \pm 2,08 CD
CRL1879-S	100 \pm 0,00 B	69,1 \pm 2,90 CD	65,16 \pm 3,80 C	71 \pm 2,00 BCD
MgCl ₂	90,03 \pm 5,23 A	53,66 \pm 2,50 B	80 \pm 2,08 D	76,88 \pm 2,08 D
LAPTg	90,14 \pm 0,92 A	30,33 \pm 3,18 A	81,86 \pm 3,17 D	75,11 \pm 3,00 D

Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

CRL1879, indujeron la germinación del 100 % de las semillas ($F = 22,90$; $gl = 7$; p -valor $< 0,001$). En cambio, en *C. sinensis* ($F = 90,25$; $gl = 7$; p -valor $< 0,001$) y *P. trifoliata* ($F = 148,85$; $gl = 7$; p -valor $< 0,001$), el mayor porcentaje de germinación se produjo en las semillas tratadas con el sobrenadante de CRL35, alcanzando un promedio de 90,33 % y 100 %, respectivamente. Este último tratamiento también produjo el mayor porcentaje promedio de germinación en *C. aurantium*, pero sin mostrar diferencias significativas con los controles ($MgCl_2$ y LAPTg) ($F = 147,85$; $gl = 7$; p -valor $< 0,001$). Particularmente *C. aurantium* mostró una cierta recalcitrancia al tratamiento con las células y sobrenadantes de CRL1877 y CRL1879, ya que la germinación se vio severamente disminuida con respecto a los controles y CRL35. El tratamiento con el sobrenadante de CRL1877 fue el que más afectó a la germinación de este genotipo cítrico, produciendo una reducción superior al 80 % con respecto a los controles con $MgCl_2$ y LAPTg (Tabla 1). Esto indicaría la sensibilidad de *C. aurantium* a algunos de los metabolitos excretados por el genotipo bacteriano CRL1877.

Existen diferentes estudios que reportan un efecto benéfico de BL sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales, aunque también se registraron situaciones en donde no produjeron efecto alguno e incluso efectos negativos sobre la germinación como los resultados obtenidos en este trabajo (Limanska *et al.*, 2013). Por ejemplo, Siezen y van Hylckama Vileg (2011), determinaron diferencias en función del origen de la cepa de BL evaluada, las inoculaciones de diferentes cepas aisladas del mosto de vid provocaron un aumento en la germinación de semillas de tomate, pero sólo una de las cepas aisladas de productos lácteos tuvo el mismo efecto. Los resultados observados en la germinación de semillas de genotipos cítricos diferentes, asociado a distintos genotipos bacterianos, es llamativa y estaría indicando cierta especificidad entre el genotipo cítrico y genotipo bacteriano, lo que hace interesante la posibilidad de determinar a qué factor/es estaría asociado este comportamiento.

Efecto de la inoculación de bacterias lácticas en la promoción del crecimiento del portainjerto cítrico Poncirus trifoliata

En base a los resultados de germinación, se seleccionaron los genotipos bacterianos CRL35 y CRL1879, para evaluar si estas bacterias y/o sus

sobrenadantes, podrían promover el crecimiento en el portainjerto cítrico *P. trifoliata*. Para este ensayo las semillas fueron tratadas con dos concentraciones de las suspensiones de bacterias ($DO_{600\text{ nm}} = 1$ y $0,1$) y los correspondientes sobrenadantes, durante dos tiempos de tratamiento: 2 h y 8 h. En general, se puede observar en las Figuras 1 y 2, que los diferentes tratamientos indujeron el crecimiento de *P. trifoliata*, efecto observado tanto en la parte aérea como radicular. La prueba de hipótesis sobre la variable respuesta “longitud de tallo” evidenció que el tratamiento con la mayor concentración ($DO_{600\text{ nm}} = 1$) y 2 h de inoculación, no arrojó diferencias significativas entre tratamientos y controles ($F = 2,39$; $gl = 5$; p -valor = $0,0611$), contrario a lo ocurrido cuando los tratamientos se aplicaron durante 8 h donde la prueba de hipótesis demostró que existían diferencias significativas entre algunas de las medias de los tratamientos ($F = 9,03$; $gl = 5$; p -valor $< 0,0001$), en este último caso, los tratamientos con las células bacterianas (T1 y T2), produjeron las plantas de mayor altura, mientras que los controles con $MgCl_2$ y LAPTg (T5 y T6), las de menor altura (Figura 1A). Los resultados en cuanto al “diámetro de tallo y raíz”, mostraron que las plantas tratadas presentaron valores promedios mayores que los controles. En todos los tratamientos, para los parámetros “diámetro de tallo y raíz”, la prueba de hipótesis demostró que existían diferencias significativas entre algunas de las medias de los tratamientos para los dos tiempos evaluados, 2 y 8 h ($F = 6,24$; $gl = 5$; p -valor = $0,0004$ y $F = 5,20$; $gl = 5$; p -valor = $0,0015$, respectivamente) (Figura 1A). El tratamiento de solo 2 h, tanto con las bacterias como con los sobrenadantes, produjo plantas de menor diámetro promedio de tallo y raíz que las tratadas durante 8 h, y solo mostraron diferencias significativas con el control de $MgCl_2$ ($F = 4,42$; $gl = 5$; p -valor = $0,0039$; $F = 7,91$; $gl = 5$; p -valor = $0,0001$, respectivamente).

La Figura 1B muestra los resultados obtenidos con el inóculo de una concentración 10 veces menor ($DO_{600\text{ nm}} = 0,1$) en donde se observó un comportamiento similar a lo descrito anteriormente para una $DO_{600\text{ nm}} = 1$, es decir que los tratamientos con las células bacterianas y sobrenadantes mostraron los mayores valores promedio de longitud de tallo y diámetro de tallo/raíz que los controles, y para ambos tiempos de tratamiento. En la Figura 1B se observa que el tiempo de 2 h no arrojó diferencias significativas

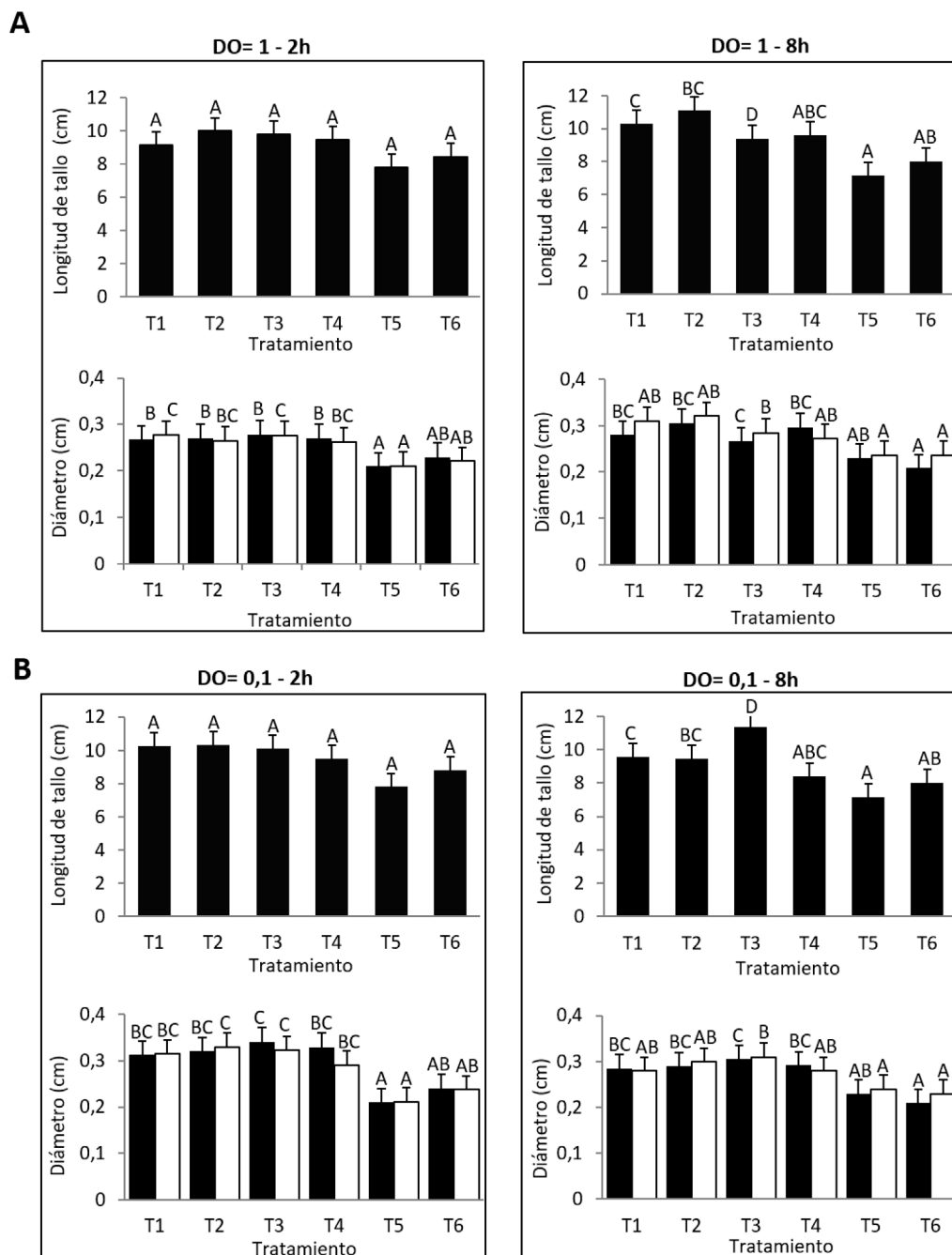


Figura 1. Efecto bacterias ácido lácticas en el crecimiento de plantines de *Poncirus trifoliata*. Longitud del tallo y diámetro de la base del tallo (barras negras) y la raíz principal (barras blancas). Las semillas fueron inoculadas con dos concentraciones bacterianas o el sobrenadante del cultivo: A. equivalente a una densidad óptica de 1 ($DO_{600nm} = 1$); y B. a una densidad óptica de 0,1 ($DO_{600nm} = 0,1$). En ambos casos las semillas fueron sumergidas en los tratamientos durante 2 y 8 h. Tratamientos: T1 y T2: células bacterianas de CRL35 y CRL1879; T3 y T4: sobrenadantes del cultivo de CRL35 y CRL1879; T5: 10 mM de $MgCl_2$; T6: LAPTg. Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

entre tratamientos en el parámetro “longitud de tallo” ($F = 2,39$; $gl = 5$; p -valor = 0,0611), mientras que con 8 h todos los tratamientos mostraron diferencias significativas entre sí y con los controles ($F = 15,20$; $gl = 5$; $p < 0,001$). Particularmente en este ensayo se observó un efecto muy marcado en el tratamiento con el

sobrenadante de CRL35 (T3), el cual produjo el mayor valor de longitud de tallo diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos. Este tratamiento también arrojó los mayores valores de diámetro de tallo y raíz primaria. El sistema radicular fue notablemente beneficiado, observándose un mayor desarrollo radicular que en

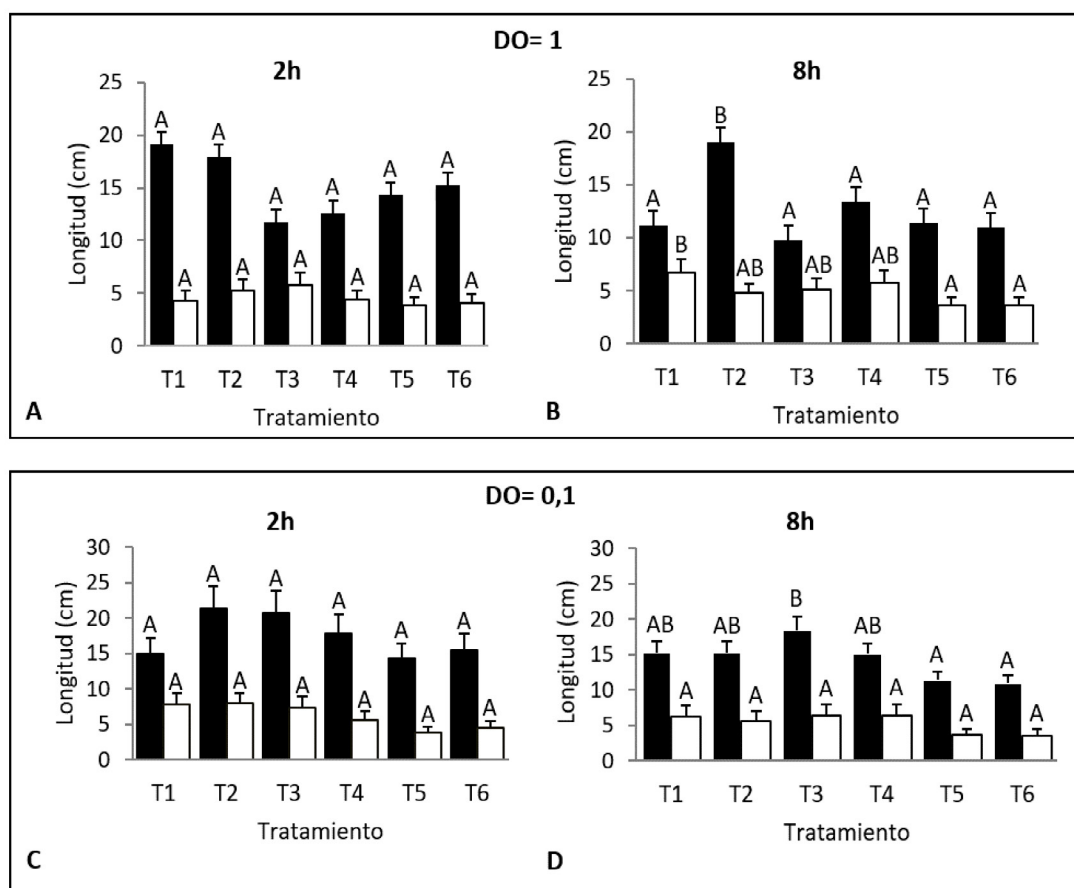


Figura 2. Efecto de bacterias ácido lácticas en la raíz de plantines de *Poncirus trifoliata*. Longitud de la raíz principal (barras negras) y de la raíz secundaria más larga (barras blancas). Las semillas fueron sumergidas durante 2 h y 8 h en suspensiones de células bacterianas y el sobrenadante correspondiente a dos concentraciones: A y B, equivalente a una densidad óptica de 1 ($DO_{600\text{nm}} = 1$); C y D, a una densidad óptica de 0,1 ($DO_{600\text{nm}} = 0,1$). Tratamientos: T1 y T2: células bacterianas de CRL35 y CRL1879; T3 y T4: sobrenadantes del cultivo de CRL35 y CRL1879; T5: 10 mM de $MgCl_2$; T6: LAPTg. Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

los plantines correspondientes a los tratamientos controles con $MgCl_2$ (T5) y el caldo LAPTg (T6). Ambas bacterias y los sobrenadantes, tuvieron efecto promotor tanto sobre la longitud de la raíz principal y secundaria más larga, como en el número de raíces secundarias (Figuras 2 y 3). La longitud de la raíz primaria fue más afectada por el tiempo de inoculación que por la concentración de los tratamientos. Aunque en todos los casos, los tratamientos con las bacterias y sobrenadantes produjeron raíces primarias más largas que los controles, las diferencias no fueron significativas en todos ellos. Al analizar la variable longitud de la raíz primaria se determinó que en los tratamientos de 2 h y a ambas concentraciones no presentaron diferencias significativas entre las medias ($F = 2,01$; $gl = 5$; $p\text{-valor} = 0,1053$), Figuras 2A y C. Por el contrario, con 8 h de inoculación, los tratamientos con la bacteria CRL1879 ($DO_{600\text{nm}} = 1$) y con el sobrenadante de CRL35 ($DO_{600\text{nm}}$

$= 0,1$), indujeron una mayor longitud de la raíz primaria significativamente superior al resto de los tratamientos y controles (Figura 2B y D), ($F = 6,78$; $gl = 5$; $p\text{-valor} = 0,0002$ y $F = 3,89$; $gl = 5$; $p\text{-valor} = 0,0008$, respectivamente).

Al igual que en la raíz primaria, la media de la longitud de raíz secundaria más larga, en todos los tratamientos resultó mayor que en los controles. Sin embargo, a excepción de la inoculación con la bacteria CRL35 ($DO_{600\text{nm}} = 1$ y 8 h), el cual fue el único tratamiento que se diferenció significativamente de ambos controles ($F = 3,25$; $gl = 5$; $p\text{-valor} = 0,0183$), el resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí ni con los controles (Figura 2B).

El número de raíces secundarias también fue afectado por los tratamientos. En este parámetro se observó un efecto del tiempo de aplicación. La prueba de hipótesis sobre el efecto fijo de los tratamientos demostró que existían diferencias

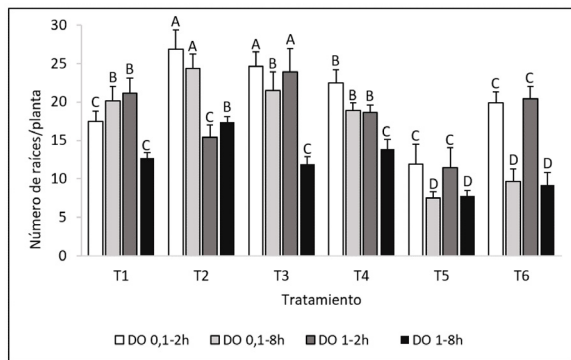


Figura 3. Número de raíces secundarias en plantines de *Poncirus trifoliata* tratadas con bacterias lácticas. Tratamientos: T1 y T2: células bacterianas de CRL35 y CRL1879; T3 y T4: sobrenadantes del cultivo de CRL35 y CRL1879; T5: 10 mM de $MgCl_2$; T6: LAPTg. El número de raíces es expresado como la media \pm EE. Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

significativas entre algunas de las medias de los tratamientos ($F = 4,86$; numDF = 15; denDF = 168; p -valor $< 0,0001$). Los resultados de la comparación de medias de los tratamientos según la prueba DGC (o prueba de comparaciones múltiples, software Infostat) se muestran en la Figura 3. A diferencia de los tratamientos aplicados durante 2 h, los de 8 h mostraron diferencias significativas con ambos controles, sin embargo, en los que se utilizó la mayor concentración ($DO_{600\text{nm}} = 1$), desarrollaron menor número de raíces secundarias que a la $DO_{600\text{nm}} = 0,1$. En el menor tiempo de inoculación (2 h), se observaron menores diferencias entre tratamientos y controles, en especial con el

control del medio de cultivo (T6), a ambas concentraciones. Los tratamientos con la bacteria CRL1879 (T2) y el sobrenadante de CRL35 (T3) a la menor concentración, presentaron el mayor número de raíces secundarias, significativamente superior a la de ambos controles. En la Figura 4 se muestran detalles de los plantines producidos con los distintos tratamientos con una $DO_{600\text{nm}} = 1$ aplicados durante 8 h.

Los resultados obtenidos determinaron que los tratamientos, tanto con las células bacterianas como con sus sobrenadantes, tienen efectos promotores del crecimiento de plantines de *P. trifoliata*. La actividad promotora del crecimiento de genotipos de BL ha sido poco estudiada. Sin embargo, algunos trabajos demostraron la capacidad de estas bacterias para promover el crecimiento tanto de la parte aérea como radicular. Diferentes autores han demostrado que algunas especies de BL incrementan el crecimiento y rendimiento en diferentes cultivos, mejorando la germinación, el contenido de clorofila y de aminoácidos en las plantas (Strafella *et al.*, 2021). Díaz y Montero (2011) y Abdel-Aziz *et al.* (2014), indicaron que en los semilleros de tomate aumentó el vigor y el crecimiento del tallo y raíces, desde la germinación hasta la emergencia de las plántulas. Resultados similares a lo obtenido en este trabajo, lo describe Padilla *et al.* (2012), quienes utilizaron el remojo de semillas de *Moringa oleifera* con una suspensión de bacterias lácticas para acelerar



Figura 4. Aspecto de los plantines de *Poncirus trifoliata* desarrollados a partir de semillas tratadas con las bacterias CRL35 (T1) y CRL1879 (T2) y sus sobrenadantes (T3 y T4, respectivamente), correspondientes al tratamiento $DO_{600\text{nm}} = 1$ y 8 h. Controles: $MgCl_2$ (T5) y LAPTg (T6).

la germinación y con ello, su crecimiento aéreo como radicular, destacando en particular un mayor efecto en el desarrollo radicular.

El efecto positivo de las BL sobre el crecimiento vegetal, puede responder a múltiples factores, así por ejemplo en forma directa sobre la planta mediante la producción de compuestos inductores del crecimiento y/o activación de rutas metabólicas vegetales específicas (como síntesis de fitohormonas), y en forma indirecta mejorando la disponibilidad de nutrientes en el sustrato. Las BL participan activamente en la descomposición de materia orgánica y son utilizadas en los compost (Partanen *et al.*, 2010) y en silaje (Tobías-Rivero y Vargas-González, 2000). En diferentes cultivos se ha determinado que el uso de compost inoculados con BL produjo mayores rendimientos e incrementos de la toma de nutrientes, tales como en trigo (Hu y Qi, 2010), soja (Tran *et al.*, 2019), poroto mung (Javaid y Bajwa, 2011), arroz (Javaid, 2010) y algodón (Khaliq *et al.*, 2006). Se ha determinado que las BL incrementan la solubilización de fosfatos y sales insolubles de K, debido principalmente a la capacidad para producir ácidos orgánicos, como el ácido láctico que favorece específicamente la disponibilidad de K.

Además, las BL tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos bacterianos y fúngicos debido a la producción de diferentes componentes tales como peróxido de hidrógeno, péptidos antimicrobianos o ácidos orgánicos que modifican el pH y con esto el ambiente para el crecimiento de fitopatógenos (Ghosh *et al.*, 2015), lo que indirectamente también contribuye a mejorar el crecimiento vegetal.

Uno de los requisitos de las PGPR es su habilidad para colonizar los tejidos vegetales. Se ha demostrado que diferentes genotipos de BL tienen la habilidad de colonizar la rizósfera, la superficie radicular y también los espacios intercelulares de las plantas (Glick, 2015). Jaini *et al.* (2022) aislaron dos genotipos endofíticos de BL de semillas de papaya, *Weissella cibaria* PPKSD19 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PPSSD39. Estos autores determinaron que ambos aislados eran capaces de producir ácido indol acético (AIA), sideróforos, amonio y de solubilizar fosfatos. También, Lee *et al.* (2015) determinaron que la capacidad de un aislamiento de *Enterococcus faecium* para inducir el crecimiento en arroz, estaba asociada a la producción de ácido indol

acético (AIA) y también giberelina.

En la gran mayoría de las investigaciones sobre promoción del crecimiento vegetal con BL publicadas hasta el momento, involucran el uso directo de la célula bacteriana, y para nuestro conocimiento, no existen investigaciones realizadas con los sobrenadantes. Fue de nuestro interés evaluar los sobrenadantes, para conocer si era necesaria la presencia de la bacteria o estas secretaban metabolitos bioactivos diferentes o de igual eficiencia que las células, abriendo con esto la posibilidad de aprovechar los sobrenadantes, en forma independientes de las células. Las BL secretan al medio de cultivo una gran variedad de compuestos, como las bacteriocinas y diferentes ácidos orgánicos entre los que predomina el ácido láctico y propiónico. Aunque determinar la molécula bioactiva presente en el extracto no era objetivo de este trabajo, existen reportes en otros genotipos PGPR como *Pseudomonas* y *Bacillus*, que algunos ácidos orgánicos producidos por estas bacterias, actuaron como promotores del crecimiento (Archana *et al.*, 2012; Pellegrini *et al.*, 2020). De acuerdo a esto resulta interesante determinar a cuál o cuáles moléculas de los sobrenadantes de CRL35 o CRL1879 se debe la actividad inductora de la germinación y/o crecimiento vegetal.

Si bien el uso de las BL como PGPR no es común, cada vez más son las investigaciones que refuerzan la hipótesis que las mismas pueden considerarse como PGPR, lo que sumado a que muchos genotipos son además probióticos de humanos y animales, abre muchas posibilidades para el uso de las BL en una agricultura de doble beneficio: para las plantas y también para los consumidores.

Conclusiones

En este trabajo se evaluaron tres cepas de bacterias lácticas (BL) aisladas de quesos artesanales de la provincia de Tucumán correspondientes a los géneros *E. mundtii* y *E. faecium*, las cuales mostraron actividad promotora de la germinación y crecimiento en cítricos. La inoculación de las cepas lácticas CRL35, CRL1877 y CRL1879 y sus sobrenadantes, tuvo un efecto diferencial en la germinación de semillas de cítricos, dependiendo del genotipo cítrico y de la cepa bacteriana. *Citrus limon* mostró el mejor comportamiento con las tres cepas, mientras que *C. aurantium*

mostró alta sensibilidad a CRL1877. Esto podría indicar la existencia de alguna interacción específica entre cepa y genotipo cítrico. El tratamiento de semillas del portainjerto *Poncirus trifoliata* con células de CRL35 y CRL1879 y sus respectivos sobrenadantes, indujo el desarrollo de plantines de mayor altura y desarrollo radicular, efectos relacionados con una capacidad para promover el crecimiento vegetal. Según nuestros conocimientos, los resultados presentados en este trabajo constituyen la primera vez en que los genotipos lácticos evaluados fueron utilizados para inducir la germinación y el crecimiento vegetal, lo que sumado además al hecho de que los genomas de CRL35 y CRL1879 se encuentran secuenciados, resulta interesante profundizar su estudio para evaluar potenciales aplicaciones en producción vegetal.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el subsidio otorgado por la Secretaría de Políticas Universitarias, SPU 2018- VT42-UNT12076, aprobado por Resolución RESOL-2018-109-APN-SECPU#MECCYT.

Referencias bibliográficas

- Archana G., Buch A., Kumar G.N. (2012). Pivotal role of organic acid secretion by rhizobacteria in plant growth promotion. In: *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Satyanarayana, T., Johri, B. (eds) Springer, Dordrecht. ISBN : 978-94-007-2213-2.
- Abdel-Aziz S.M., Moustafa Y.A., Hamed H.A. (2014). Lactic acid bacteria in the green biocontrol against some phytopathogenic fungi: treatment of tomato seeds. *Journal of Basic and Applied Scientific Research* 4 (12): 1-9.
- Badgley C., Moghtader J., Quintero E., Zakem E., Chappell M.J., Avilés-Vázquez K., Samulon A., Perfecto I. (2007). Organic agriculture and the global food supply. *Renewable Agriculture and Food Systems* 22: 86-108.
- Bashan Y., Holguin G. (1998). Proposal for the division of "plant growth-promoting rhizobacteria" into two classifications: biocontrol-plant growth-promoting bacteria and plant growth-promoting bacteria. *Soil Biology Biochemistry* 30: 1225-1228.
- Bonacina J, Saavedra L., Suárez N., Sesma F. (2014). Draft genome sequence of the nonstarter bacteriocin-producing strain *Enterococcus mundtii* CRL35. *Genome Announcement* 2 (3): e00444-14. . <https://doi.org/10.1128/genomeA.00444-14>.
- Bonacina J., Suárez N., Hormigo D., Fadda S., Lechner M., Saavedra L. (2017). A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. *DNA Research* 24 (1): 11-24.
- Casler M.D., Mitchell R., Richardson J., Zalesny R.S. (2009). Biofuels, bioenergy, and bioproducts from sustainable agricultural and forest crops. *Bioenergy Research* 2: 77-78.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2013). InfoStat version 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz O.A., Montero D.M. (2011). Determinación de la acción de EM (Microorganismos Eficientes) bajo condiciones de invernadero, sobre la actividad de intercambio catiónico, en la recuperación de un suelo de Mondoñedo. Tesis de grado, Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia, https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/574, consulta: mayo 2022.
- Gerwick B.C., Sparks T.C. (2014). Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest Management Science* 70 (8): 1169-1185.
- Glick B. (2015). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer Nature Switzerland AG. Part of Springer Nature. Suiza. ISBN: 978-3-030-44368-9.
- Ghosh R., Barman S., Mukhopadhyay A., Mandal N. (2015). Biological control of fruit-rot of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria. *Biological Control* 83: 23-36.
- Hammed T.B., Soyingbe A.A., Adewole D.O. (2011). An abattoir waste water management through composting: a case study of alesinloye waste recycling complex. *International Journal of Interdisciplinary Social Sciences* 6 (2): 67-78.
- Hidalgo López C., Sorondo L. (2020). Agroecología y soberanía alimentaria: ideas para el debate en camino a la agricultura sostenible. *Revista Ciencia y Tecnología Agrollanía* 19: 80-87.
- Hu C., Qi Y. (2010). Effect of compost and chemical fertilizer on soil nematode community in a Chinese maize field. *European Journal of Soil Biology* 46 (3): 230-236.
- Jaini M., Roslan N., Yusof M., Saidi N., Ramli N., Zainudin N., Hashim A. (2022). Investigating the potential of endophytic lactic acid bacteria isolated from papaya seeds as plant growth promoter and antifungal agent. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 45: 207-233.
- Javaid A. (2010). Effects of biofertilizers combined

- with different soil amendments on potted rice plants. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(1): 157-163.
- Javaid A., Bajwa R. (2011). Field evaluation of effective microorganisms (EM) application for growth, nodulation, and nutrition of mung bean. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35 (4): 443-452.
- Khaliq A., Abbasia M.K., Hussain T. (2006). Effects of integrated use of organic and inorganic nutrient sources with effective microorganisms (EM) on seed cotton yield in Pakistan. *Bioresource Technology* 97 (8): 967-972.
- Kloepper J., Schroth M.N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the IV international Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. France pp.879-882.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablutowicz R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology* 7: 39-43.
- Lee K., Radhakrishnan R., Kang S., You Y., Joo G., Lee I., Ko J., Kim J. (2015). *Enterococcus faecium* LKE12 cell-free extract accelerates host plant growth via gibberellin and indole-3-acetic acid secretion. *Journal Microbiology and Biotechnology* 25: 1467-1475.
- Limanska N., Ivanytsia T., Basiul O., Krylova K., Biscola V., Chobert J., Ivanytsia V., Haertle T. (2013). Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 35 (5): 1587 - 1595.
- Minahk C.J., Farias M.E., Sesma F., Morero R.D. (2000). Effect of enterocin CRL 35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane. *FEMS Microbiology Letters* 192: 79-83.
- Orihuel A., Bonacina J., Vildoza M.J., Bru E., Vignolo G., Saavedra L., Fadda S. (2018a). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a meat model using a combination of a bacteriocinogenic strain with curing additives. *Food Research International* 107: 289-296.
- Orihuel A., Terán L., Renaut J., Vignolo G., de Almeida A., Saavedra L., Fadda S. (2018b). Differential proteomic analysis of lactic acid bacteria-*Escherichia coli* O157:H7 interaction and its contribution to bioprotection strategies in meat. *Frontiers in Microbiology* 9: 1083.
- Padilla C., Fraga N., Suárez M. (2012). Effect of the soaking time of moringa (*Moringa oleifera*) seeds on the germination and growth indicators of the plant. *Cuban Journal of Agricultural Science* 46 (4): 419-421.
- Partanen P., Hultman J., Paulin L., Auvinen P., Romantschuk M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology* 10 (1): 94.
- Pellegrini M., Pagnani G., Bernardi M., Mattedi A., Spera D.M., Gallo M.D. (2020). Cell-free supernatants of Plant Growth-Promoting Bacteria: a Review of their use as biostimulant and microbial biocontrol agents in sustainable agriculture. *Sustainability* 12 (23): 9917.
- Raibaud P., Caulet M, Galpin J.V., Mocquot G. (1961). Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *Journal Applied Bacteriology* 24: 285-291.
- Red Agrícola (2021). Estiman que el mercado de bioestimulantes tendrá un crecimiento sustancial. <https://www.agribio.com.ar/noticias/estiman-que-el-mercado-de-bioestimulantes-tendra-un-crecimiento-sustancial>, consulta: septiembre 2022.
- Saavedra L., Minahk C.J., Ruiz Holgado A., Sesma F. (2004). Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2: 2778-2781.
- Salvucci E., Saavedra L., Sesma F.J. (2007). Short peptides derived from the NH2-terminus of subclass IIa bacteriocin enterocin CRL35 show antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (6): 1102-1108.
- Salvucci E., Saavedra L., Hebert E.M., Haro C., Sesma F. (2012). Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne Pathogens and Disease* 9 (1): 68-74.
- Siezen R.J., van Hylckama Vlieg J.E. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories* 10, (Suppl 1), S3. DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S3.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. (1995). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. New York: W. H. Freeman and Company, cop. (Eds.), Nueva York. ISBN: 0-7167-2411-1.
- Strafella S., Simpson D., Yaghoubi Khanghahi M., De Angelis M., Gänzle M., Minervini F., Crecchio C. (2021). Comparative genomics and in vitro plant growth promotion and biocontrol traits of lactic acid bacteria from the wheat rhizosphere. *Microorganisms* 9 (1): 78. (published online 2020 Dec 30. doi: 10.3390/microorganisms9010078).
- Suárez N. (2015). Título: Aplicación de herramientas moleculares de vanguardia para la prospección de genes de interés tecnológico en bacterias lácticas aisladas de quesos regionales. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina, consulta: agosto 2020.
- Suárez N., Saavedra L., Složilová I., Bonacina J., Demnerová K. Sesma F. (2013). Draft Genome Sequence of *Enterococcus faecium* Strain CRL 1879, Isolated from a Northwestern Argentinian Artisanal Cheese. *Genome Announcement* 1(4):e00514-13.
- Tobias-Rivero C., Vargas-González E. (2000). Inóculos

- bacterianos una alternativa para mejorar el proceso fermentativo en los ensilajes tropicales. *Nutrición Animal Tropical* 6 (1): 129-144.
- Tran Q. N., Mimoto H., Koyama M., Nakasaki K. (2019). Lactic acid bacteria modulate organic acid production during early stages of food waste composting. *Science of The Total Environment* 687: 341-347.