

PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE MANÍ MEDIANTE LA INCORPORACION DE RIZOBACTERIAS INMOBILIZADAS EN UNA MATRIZ DE ALGINATO

Adriana B. Cesari^{1,3}, Natalia S. Paulucci^{1,3}, Edith I. Yslas^{2,3}, Marta S. Dardanelli^{1,3}

1- INBIAS, Instituto de Biotecnología Ambiental y Salud, CONICET.

2- IITEMA, Instituto de Investigaciones en Tecnologías Energéticas y Materiales Avanzados, CONICET.

3- Departamento de Biología Molecular, Universidad Nacional de Río Cuarto

acesari@exa.unrc.edu.ar

Introducción

Los microorganismos con función de promoción del crecimiento de plantas (PGPM) juegan un papel preponderante para el desarrollo y la salud de los vegetales y del suelo (Frioni 2011). La encapsulación de microorganismos PGPM concentra actualmente gran interés para el desarrollo de nuevos bioformulados e implica el recubrimiento o atrapamiento de células microbianas dentro de un material polimérico para producir microesferas permeables a nutrientes, gases y metabolitos a fin de mantener la viabilidad celular dentro de las mismas (John y col, 2011). La inmovilización de rizobacterias presenta ventajas sobre la formulación de inoculantes líquidos, debido a que ofrece un ambiente de protección para microorganismos con menor exposición al estrés abiótico y biótico, mejorando la supervivencia celular durante el almacenamiento. El objetivo de nuestra investigación fue inmovilizar un elevado número de células de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 o *Azospirillum brasilense* Az39 en matriz de alginato generando microesferas que permitan la liberación y aseguren la viabilidad de las células manteniendo propiedades PGPM durante 12 meses de almacenamiento a 4 °C. De este modo buscamos desarrollar un inoculante que promueva el crecimiento de maní incluso en condiciones de estrés abiótico, tal como lo es el déficit de agua.

Materiales y Métodos

Las microesferas fueron obtenidas empleando el polímero alginato de sodio al 2% y una suspensión bacteriana de SEMIA6144 o Az39, por un proceso de gelificación iónica (Joe y col, 2012). Luego de la caracterización fisicoquímica de las microesferas mediante SEM y FTIR, se estudió el número de células inmovilizadas, la actividad metabólica (MTT) y la cinética de liberación in vitro de las células, frente a solución fisiológica (SF) y exudados de raíces (ER) de maní. Además se evaluó la producción de ácido indol acético (AIA), la quimiotaxis a ER y la adhesión a raíces de maní de bacterias extraídas de las microesferas nuevas y almacenadas durante 1, 3, 6 y 12 meses a 4 °C. Finalmente se analizaron los parámetros de crecimiento y el contenido de Nitrógeno (N) en plantas de maní de 30 días de crecimiento bajo condiciones no restrictivas y restrictiva de agua e inoculadas con microesferas de alginato conteniendo SEMIA6144 nuevas y de 12 meses de almacenamiento.

Resultados

El proceso de síntesis de microesferas alcanzó un rendimiento de 72-77%, con una inmovilización de 10^7 células.microesfera⁻¹. La viabilidad de las bacterias disminuyó después de 4 meses de almacenamiento a 4 °C, sin embargo, para SEMIA6144 la viabilidad se mantuvo en valores óptimos hasta 12 meses de almacenamiento, presentando baja actividad metabólica. La composición de las microesferas de alginato permitió la liberación constante de células, los resultados muestran que cuando las microesferas de SEMIA6144 y de Az39 se colocaron en ER, el valor de las células liberadas fue de un orden mayor que el observado en SF. La determinación de la producción de AIA de Az39 extraído de las microesferas almacenadas (nuevo, 1,3, 6 y 12 meses) a 4 °C se realizó en comparación con la producción de IAA de un cultivo líquido de Az39. Los resultados mostraron cambios en los niveles de IAA producidos por bacterias libres y aquellas que previamente habían quedado inmovilizadas en alginato. Después de los periodos de almacenamiento, se observó una disminución gradual en los niveles de IAA producidos por Az39 extraído de las microesferas de alginato. Las bacterias extraídas de microesferas almacenadas durante 6 y 12 meses produjeron AIA, aunque fueron las que mostraron valores más bajos (11.5 a 9.21 $\mu\text{g AIA}\cdot\text{mg}^{-1}$ biomasa seca). Las células de SEMIA6144 y Az39 extraídas de las microesferas, mantuvieron la quimiotaxis hacia los ER y la adhesión, propiedades necesarias para interactuar con *Arachis hypogaea*. Los resultados de la inoculación de maní con microesferas mostraron un aumento en la longitud de la raíz y la biomasa seca de la parte aérea de la planta de maní inoculada con las microesferas de SEMIA6144 almacenadas durante 12 meses. Interesante, los resultados mostraron que, en condiciones de cámara de crecimiento, se estableció una simbiosis óptima entre la bacteria *Bradyrhizobium* sp SEMIA6144 y *A. hypogaea*, incluso después de 12 meses de almacenamiento de microesferas a 4 °C, lo que favorece la aparición de nódulos de tamaño variable en las raíces laterales en comparación al inoculante líquido tradicional. Esto sugiere que la liberación gradual y constante de células SEMIA6144 de las perlas de alginato asegura la presencia constante de células en la rizosfera, logrando la invasión de la raíz, incluso bajo condiciones restrictivas de agua.

Conclusión

Estos resultados indican que la matriz de alginato proporciona protección a las células y no induce cambios en la capacidad de formar nódulos y fijar N, lo que se reflejó en un contenido 34% mayor de N, en comparación con la inoculación líquida tradicional.

Nuestro estudio demostró que la inmovilización de SEMIA6144 y Az39 en una matriz de alginato al 2% es una alternativa potencial para una agricultura sostenible y se espera que este enfoque mejore el crecimiento de *A. hypogaea*, incluso bajo condiciones restrictivas de agua.