



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

BACTERIAS ENDÓFITAS DE MAÍZ: ANÁLISIS *IN VITRO* DE PROPIEDADES PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL PARA EL DISEÑO DE BIOFERTILIZANTES FOLIARES

Berca Espinosa J^{1,2}; Maroniche G^{3,2}; Martino MV³; Vallejo D¹; Garcia JE¹; Puente M¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, Argentina

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

³Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina

bercaespinosa.julian@inta.gob.ar - gmaroniche@mdp.edu.ar - martino.maria@inta.gob.ar - vallejo.daniela@inta.gob.ar - puente.mariana@inta.gob.ar

ENDOPHYTIC BACTERIA FROM MAIZE: *IN VITRO* ANALYSIS OF PLANT GROWTH PROMOTING PROPERTIES FOR THE DESIGN OF FOLIAR BIOFERTILIZERS

In recent years, endophytic bacteria have gained significant attention due to their crucial role in enhancing plant nutrition. Operating within host plant tissues, these microorganisms establish beneficial symbiotic relationships that can be leveraged for agricultural purposes. When isolated, characterized, and reapplied, selected strains can significantly improve crop yield and nutrient uptake. Due to its land extension in our country, maize consumes a huge amount of chemical fertilizers, contributing to negative environmental effects on the whole ecosystem. This study aimed to evaluate the plant growth-promoting (PGP) potential of bacterial isolates from various tissues of maize (*Zea mays* L.) to determine their potential as novel biofertilizers. The isolates were characterized *in vitro* through a screening panel, which assessed their ability to: fix atmospheric nitrogen when growing in a nitrogen-free semi-solid medium, solubilize tricalcium phosphate, potassium from feldspar, and zinc oxide, produce a wide variety of phytohormones, and the ability to tolerate UV-C radiation.

Palabras Clave - Keywords

Endófitos, PGPB, Biofertilizantes, *Zea mays* L, *In vitro*.

Endophytes, PGPB, Biofertilizers, *Zea mays* L, *In vitro*.

Introducción

El maíz se ha consolidado como uno de los cultivos más relevantes en Argentina, destinando la mayor parte de su producción a la exportación y en menor medida al forraje o a las industrias de molienda y bioetanol. Al ser un cultivo altamente exigente en cuanto a los factores que determinan la producción de grano, su marcada sensibilidad a la disponibilidad de recursos genera una considerable brecha entre el rendimiento teórico y el obtenido efectivamente por los productores. Frente a este escenario, la producción de maíz podría ser intensificada de manera sostenible mediante el abordaje de limitantes clave como la nutrición del cultivo. En la actualidad, existe una marcada demanda de una agricultura de bajo impacto ambiental, lo que impulsa la búsqueda de estrategias de manejo integrado más eficientes y menos





50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

dependientes de productos de origen químico, logrando así aumentar los rendimientos de forma sustentable en el tiempo con menor impacto negativo sobre el ecosistema (Presello et al., 2022).

La coevolución entre las plantas y sus microorganismos endófitos, en específico, bacterias, es un objeto de estudio consolidado en la biología vegetal. Se ha demostrado que aquellas bacterias capaces de colonizar de forma endofítica los tejidos internos (raíces, tallos y hojas) son reclutadas activamente por el hospedador en respuesta a estímulos tanto ambientales como endógenos. Esta microbiota endófitica puede establecerse mediante dos vías principales: de forma vertical, a través de la herencia de una carga bacteriana nativa presente en las semillas, o de forma horizontal, mediante el reclutamiento activo del suelo. En este último caso, las plantas, a través de las raíces, secretan fitohormonas y exudados específicos que actúan como señales quimiotácticas, seleccionando y atrayendo géneros bacterianos específicos con funciones metabólicas adaptativas que benefician la aptitud de la planta (Zhai et al., 2024).

Recientemente se ha empezado a estudiar el potencial que posee esta microbiota bacteriana endófitica como posibles biofertilizantes que puedan ayudar a la salud y a la nutrición de las plantas en un contexto donde se busca disminuir la carga de fertilizantes químicos que se aplican y donde las condiciones ambientales son cada vez más desfavorables y difíciles de predecir. Esas bacterias no solo pueden colonizar y vivir dentro de los tejidos internos de las plantas, sino que también poseen la capacidad de intercambiar con la planta nutrientes y metabolitos que estimulan el crecimiento del hospedador. Estas características impulsan numerosas investigaciones orientadas a comprender su interacción con las plantas y evaluar su potencial como biofertilizantes.

Materiales y métodos

Las cepas evaluadas fueron aisladas a partir de diversos tejidos de *Zea mays* L. provenientes de distintas localidades de la provincia de Buenos Aires, con el objetivo de recuperar una amplia diversidad de géneros bacterianos. Una parte de los aislamientos bacterianos se obtuvo a partir de semillas desinfectadas superficialmente y de sus respectivas plántulas pre-germinadas en agar agua, sembradas en diversos medios de cultivo. Estos aislamientos se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal y Microbiana de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Mar del Plata). Por otra parte, se procesó tejido foliar desinfectado procedente del partido de Luján con el propósito específico de aislar bacterias filosféricas metanotróficas. Asimismo, se procesaron muestras de mucílago de raíces aéreas recolectadas de una finca familiar del partido de Moreno con el objetivo de aislar bacterias del género *Herbaspirillum* y bacterias solubilizadoras de fosfato; es por este motivo que se utilizaron medios de cultivo específicos (jNFB y NBRIP-BPB, respectivamente). Los aislamientos de hoja y mucílago se realizaron en el Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal del IMYZA (INTA Castelar). Todas las cepas aisladas y purificadas fueron depositadas en el cepario BPCV-IMYZA-INTA (WDCM31).



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

Con el fin de evaluar el potencial biofertilizante de las cepas, se realizaron cuatro ensayos in vitro para determinar su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfato, potasio y zinc a partir de fuentes insolubles, tolerar radiación UV-C y producir fitohormonas.

Fijación de nitrógeno atmosférico

Se determinó la capacidad de las cepas endófitas para fijar nitrógeno mediante un ensayo cualitativo en medio semisólido Nfb (Dobereiner et al., 1995). Previamente, las células bacterianas se lavaron con solución fisiológica estéril para eliminar cualquier traza de nitrógeno residual del cultivo previo. Para ello, se centrifugaron 10 mL de cultivo joven (24–48 h) a $905 \times g$ durante 15 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 mL de solución fisiológica estéril y se repitió el proceso una vez más. Una vez lavadas, se inocularon 100 μ L de la suspensión celular en tres viales con medio Nfb, los cuales se incubaron en estufa durante aproximadamente 5 días. La fijación de nitrógeno se evidenció por la aparición de una película o "nube" de crecimiento en la interfaz aire-medio, acompañada de un cambio de coloración del verde al azul del indicador del medio. Aquellos cultivos que mostraron un resultado preliminar positivo se repicaron con un anza estéril hacia un segundo vial con medio Nfb fresco. El resultado se confirmó como positivo sólo cuando la cepa manifestaba un crecimiento y viraje del indicador tras este segundo pasaje consecutivo.

Solubilización de minerales

Se evaluó semicuantitativamente la capacidad de solubilización de macro y micronutrientes como el fósforo, el potasio y el zinc. Para esto las cepas fueron cultivadas entre 24 y 72 horas. Posteriormente, se determinó el título bacteriano mediante la técnica de microgota (Salvo et al., 2022) y los inóculos bacterianos se estandarizaron a una concentración de 10^6 UFC/mL. Se inocularon, por triplicado, microgotas de las suspensiones estandarizadas en distintos medios de cultivo sólidos: medio NBRIP-BPB (Mehta & Nautiyal et al., 2001) suplementado con fosfato tricálcico para la solubilización de fósforo, medio NBRIP modificado con óxido de zinc (ZnO) y medio Aleksandrov (Hu et al., 2006) con feldespato previamente lavado con agua destilada, para evaluar la solubilización de potasio. Las placas inoculadas fueron incubadas a 30°C durante 5 días. Transcurrido ese período, se evaluó la capacidad solubilizadora de las cepas mediante la medición del diámetro de la colonia bacteriana (Dc) y el diámetro del halo de solubilización (Dh) generado alrededor del crecimiento, utilizando un transiluminador. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Mediante el software ImageJ se logró obtener los diámetros de las colonias y de los halos de solubilización expresados en cm. A partir de estas mediciones, se calculó el Índice de Solubilización (IS) aplicando la ecuación $IS = (Dc + Dh) / Dc$ (Premono et al., 1996). Los índices de solubilización obtenidos para cada cepa, se analizaron estadísticamente como se planteó anteriormente mediante los tests no paramétricos de Levene, Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn.

Tolerancia a la radiación UV-C





50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

Se evaluó la tolerancia de las cepas endófitas a UV-C mediante una adaptación del protocolo de García et al. (2020). Previamente, las cepas fueron cultivadas en medio líquido en condiciones de agitación a 180 rpm a 30 °C durante un tiempo de 24 a 72 horas, dependiendo de la cinética de crecimiento de cada cepa. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados y estandarizados a una densidad óptica de 1 (OD₆₀₀) utilizando solución fisiológica estéril. A partir de estas suspensiones, se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de Petri y expuestas, sin tapa, a una fuente de luz UV-C proveniente de una lámpara Philips 15W G15 T8 contenida en el propio banco de flujo horizontal. Se aplicó un tratamiento con un tiempo de exposición de un minuto y medio, equivalente a una dosis de radiación de 100 J/m². Las placas del control negativo se mantuvieron envueltas en papel aluminio desde el inicio. Inmediatamente después de la irradiación, las placas fueron cubiertas con papel aluminio para evitar su exposición a la luz natural y se incubaron en la oscuridad a 30°C por 48 h. Tanto el control negativo como el tratamiento irradiado se realizaron por triplicado, utilizando 3 tubos independientes de inóculo para cada condición. Luego, se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) para determinar el grado de sensibilidad de cada cepa. Para detectar diferencias significativas en la tolerancia al UV-C, los datos se transformaron a logaritmo en base 10 y se calculó el porcentaje de supervivencia comparando el recuento obtenido en las placas tratadas con el control negativo. A partir de estos valores se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad y se procedió a realizar un ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para la detección de diferencias significativas. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Rstudio.

Determinación de Producción de Fitohormonas

En función de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* previamente descritos, se seleccionaron 7 de las cepas con mayor potencial para evaluar su capacidad de producir fitohormonas. Las cepas seleccionadas, corresponden a aquellas que fueron aisladas en medios selectivos para bacterias metanotróficas (medio AMS), *Herbaspirillum* (JNFB) y *Bacillus* (cepa pasteurizada). Para la determinación de fitohormonas, se prepararon precultivos en medio NB con incubación nocturna. Luego, se inocularon alícuotas de 10 µL en tubos de ensayo que contenían 3 mL de medio de sales mínimo y se incubaron por 48 h a 28 °C en agitación (150 rpm). Los sobrenadantes recuperados se filtraron (PTFE, 0,22 µm) y se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS; ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-XS IVD, Waters). La cuantificación de ácido indol-3-acético (IAA), trans-zeatina (tZ) y ácido salicílico (SA) en las muestras se realizó mediante curvas de calibración elaboradas con los respectivos estándares puros.

Resultados

El ensayo cualitativo de fijación de nitrógeno permitió clasificar las cepas evaluadas en 2 grupos, aquellas capaces de fijar nitrógeno y aquellas que no. La figura





50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

1 muestra esta clasificación en función de la formación de la nube en la interfase aire-medio, junto con el viraje del indicador de pH de verde al azul.

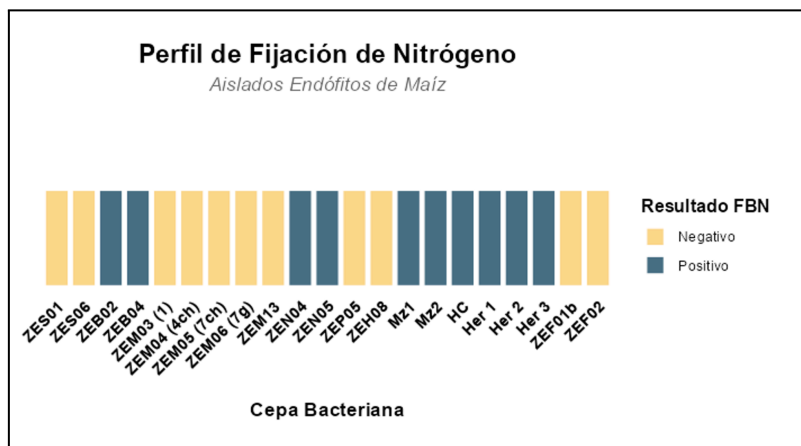


Figura 1. Cuadro de resultados del ensayo cualitativo de fijación biológica de nitrógeno en medio Nfb. El color rojo indica que el ensayo fue positivo, el color azul indica que el resultado fue negativo.

Las Figuras 2, 3 y 4 muestran los gráficos de barras de aquellas cepas que resultaron positivas en los ensayos de solubilización de fósforo, potasio y zinc, respectivamente. Las cepas que no crecieron en los medios evaluados o que no presentaron halos de solubilización no se encuentran representadas en los gráficos. Todos los gráficos expresan el índice de solubilización junto con sus respectivas barras de error y las letras que denotan diferencias estadísticas significativas.

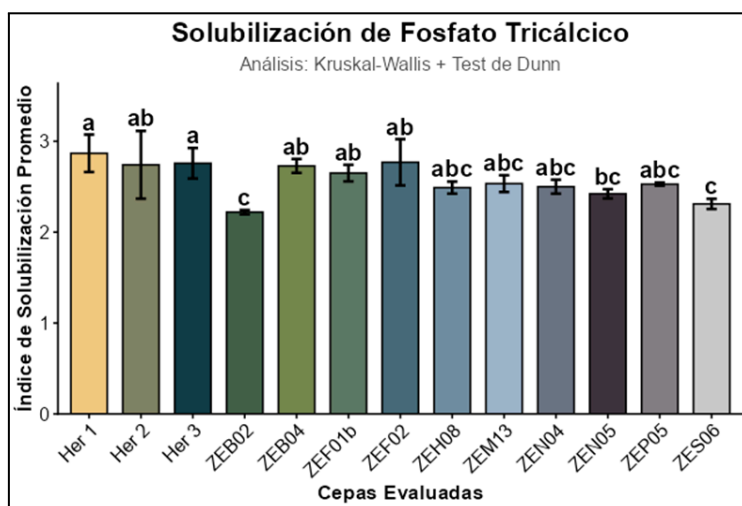


Figura 2. Índices de solubilización de las cepas endófitas de maíz en medio NBRI-PBP.



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

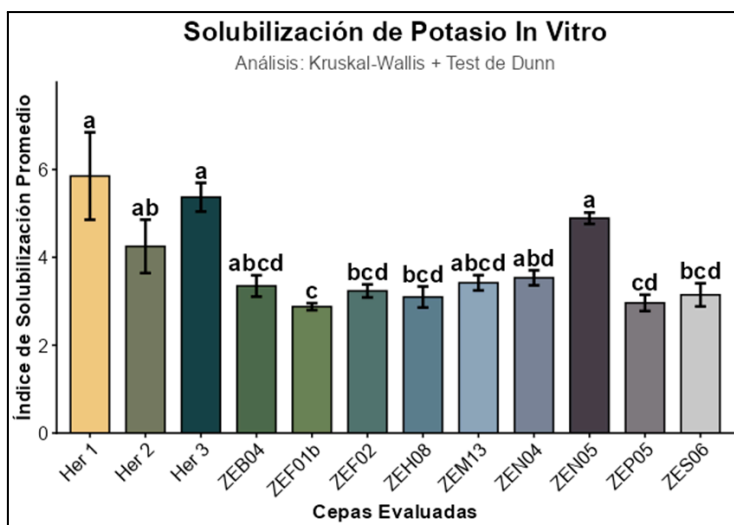


Figura 3. Índices de solubilización de las cepas endófitas de maíz en medio Aleksandrov.

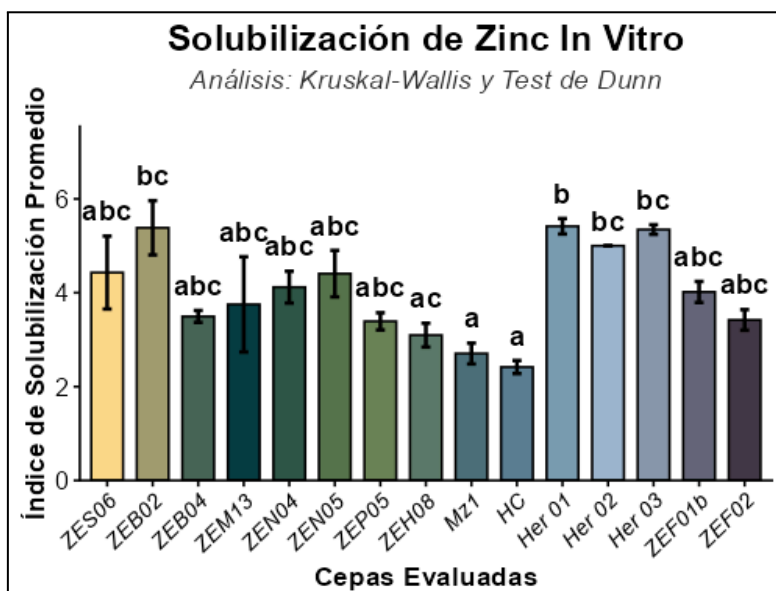


Figura 4. Índices de solubilización de las cepas endófitas de maíz en medio NBRIP modificado con 0,5% de ZnO.

La figura 5 muestra los resultados del análisis estadístico del ensayo de resistencia a la radiación UV-C. El gráfico de barra muestra los porcentajes de supervivencia de cada cepa. Se observa que las cepas aisladas de la filósfera (cepas HC, Mz1, Mz2) presentaron los mayores porcentajes de supervivencia. Las cepas ZEF01b, ZEM05 y ZEM06 también registraron porcentajes elevados, estadísticamente similares a los de las cepas filósfericas. Sin embargo, se puede observar que la mayoría de las cepas ensayadas mostró una tolerancia media a baja (entre un 40 y 60% de supervivencia) respecto a la dosis de 100 J/m² de radiación de tipo UV-C.



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

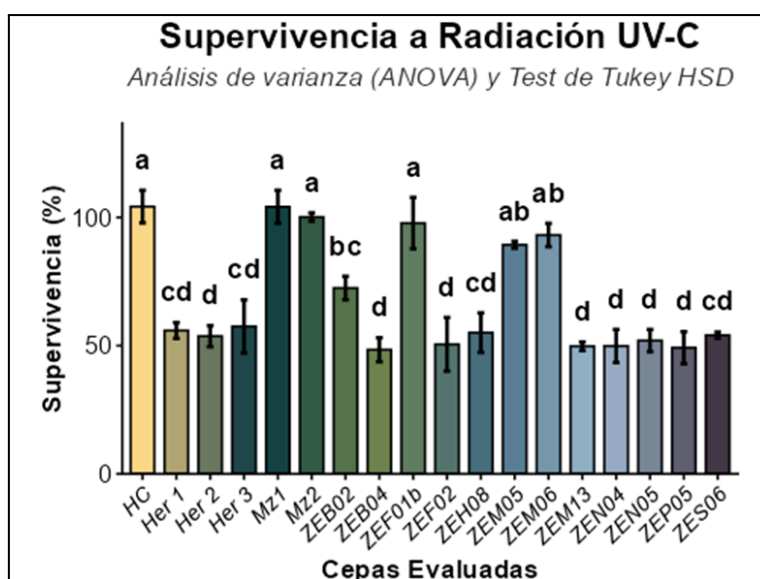


Figura 5. Tolerancia de las cepas endófitas de maíz a la radiación de tipo UV-C.

Finalmente, la tabla 1 presenta las 7 cepas seleccionadas para realizar el ensayo de determinación de fitohormonas. En la misma se detallan los valores expresados en ng/mL de ácido indol acético (AIA), la citoquinina trans-zeatina y el ácido salicílico.

Tabla 1. Valores de producción de las tres fitohormonas analizadas (ácido indol acético, trans-zeatina y ácido salicílico) para las 7 cepas ensayadas expresados en nanogramos por mililitro. Los guiones en algunas celdas indican producción nula de la fitohormona.

Cepa	AIA (ng/mL)	Trans-Zeatina (ng/mL)	Ácido Salicílico (ng/mL)
HER 01	3736,5067	-	4,2380
HER 02	4421,5295	0,2570	5,6620
HER 03	3419,2832	-	4,8380
ZEB 02	4439,1135	0,2050	6,9980
MZ1	146,2713	47,8340	0,9360
MZ2	165,6767	38,3060	1,3390
HC	176,4909	83,6120	1,2250

Conclusiones

La caracterización *in vitro* de la colección bacteriana evidenció una notable diversidad funcional, permitiendo identificar distintos perfiles de cepas promisorias y complementarias para el desarrollo de futuros biofertilizantes foliares. Por un lado,



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

aislamientos como HER 01 y HER 03 se destacaron por presentar características asociadas a la nutrición vegetal, incluyendo solubilización de P, K y Zn, y fijación biológica de nitrógeno) acoplado a una elevada síntesis de auxinas (ácido indol-3-acético). En contraposición, aislamientos como MZ1 y HC mostraron una mayor tolerancia al estrés por radiación UV-C, junto con una marcada producción de citoquininas (trans-zeatina) pero mostrando una baja capacidad de solubilización de nutrientes. Además, se identificó un grupo de cepas con potencial para contribuir a la nutrición vegetal pero que no han sido evaluados por su producción de fitohormonas, representando candidatos de interés para futuros estudios. Finalmente, los ensayos in vitro permitieron identificar un grupo de cepas (ZEM03, ZEM04, ZEM05 y ZEM06) que carecen de la capacidad para fijar nitrógeno o solubilizar los minerales evaluados. A pesar de haber exhibido una considerable tolerancia a la radiación UV-C, la ausencia de estos mecanismos directos justifica su descarte como candidatas para futuros ensayos de promoción del crecimiento vegetal.

Es posible que la combinación de cepas con alta movilización de nutrientes y síntesis de AIA, junto con aislamientos de alta supervivencia ambiental y productores de citoquininas, represente una estrategia prometedora para el desarrollo de biofertilizantes foliares altamente eficientes.

Bibliografía

Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI.

Edi-Premono, M., Moawad, A. M., & Vlek, P. L. G. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11(1), 13–23.

Presello, D. A., Giménez, F. J., & Ferraguti, F. J. (2022). La producción de maíz en Argentina. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 14(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v14i1.2573>

Zhai, K., Zhang, Y., Zhao, C., Wang, Q., & Gao, X. (2024). Conservation and Dynamics of Maize Seed Endophytic Bacteria Across Progeny Transmission. *Microorganisms*, 12(12), 2399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122399>

Salvo, L. P. D., García, J. E., Puente, M. L., Amigo, J., Anríquez, A., Barlocco, C., ... & Vallejo, D. (2022). The drop plate method as an alternative for *Azospirillum* spp viable cell enumeration within the consensus protocol of the REDCAI network. *Revista argentina de microbiología*, 54(2), 61-70.

Julia E. García, Maria M. Labarthe, Luciana A. Pagnussat, Melina Amenta, Cecilia M. Creus, Guillermo A. Maroniche(2020). Signs of a phyllospheric lifestyle in the genome of the stress-tolerant strain *Azospirillum brasilense* Az19, *Systematic and Applied Microbiology*.

Hu, X., Chen, J. & Guo, J. Two Phosphate- and Potassium-solubilizing Bacteria Isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 983–990 (2006). <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9144-2>

Mehta, S., Nautiyal, C. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Curr Microbiol* 43, 51–56 (2001). <https://doi.org/10.1007/s002840010259>

