

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOMAS DE ZAMORA FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS**



**Trabajo de Investigación
Ingeniería agronómica**

**“Bioprospección de bacterias solubilizadoras de zinc y evaluación
de su efecto en estadios temprano del desarrollo vegetal”**

Fabrizio Matías Alfano

Director/a: Julieta Pesqueira
Codirector/a: Santiago Javier Maiale

Lomas de Zamora, mayo del 2026

*“Los estudios de la naturaleza solo dejan en evidencia la ignorancia del
humano frente algo tan vasto como lo es el diálogo biológico”*

Denominación del proyecto

“Bioprospección de bacterias solubilizadoras de zinc y evaluación de su efecto en estadios tempranos del desarrollo vegetal”

Identificación del proyecto

Carrera: Ingeniería agronómica

Unidades ejecutoras:

- **Instituto de Investigación sobre Producción Agropecuaria, Ambiente y Salud (IIPAAS) - Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (FCA-UNLZ).**
- **Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH).**

Director

Apellido y Nombre: Pesqueira, Julieta.

Cargo: Profesora Asociada a cargo de Fisiología Vegetal con dedicación exclusiva en investigación (IIPAAS).

Co-Director

Apellido y Nombre: Maiale, Santiago Javier.

Cargo: Investigador Adjunto CONICET, Laboratorio de Fisiología y Asistencia al Mejoramiento Vegetal (INTECH).

Fecha de iniciación del proyecto: julio del 2024

“Las opiniones expresadas por el autor de este Trabajo no representan necesariamente los criterios de la Carrera de Ingeniería agronómica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Lomas de Zamora”.

RESUMEN

La deficiencia de zinc (Zn) es una de las limitaciones nutricionales más extendidas en la agricultura y la salud humana, siendo el arroz (*Oryza sativa* L.) de los cultivos que se destacan por su alta susceptibilidad a esta carencia. El uso de bacterias solubilizadoras de zinc (BSZ) surge como una alternativa biotecnológica sustentable frente a la fertilización tradicional. El objetivo de este trabajo fue bioprospectar cepas BSZ y evaluar su efecto en el desarrollo temprano de *O. sativa*, tanto en condiciones *in vitro* como *in planta*. Se seleccionaron aislamientos pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Sphingobacterium* y *Klebsiella*, caracterizándose de forma genérica por su capacidad para solubilizar fuentes de zinc y fósforo, fijar nitrógeno atmosférico y producir indoles independientemente del agregado de triptófano. Además, se graficaron las curvas de crecimiento de los tres géneros bacterianos. Para llevar a cabo los ensayos *in planta* se formuló un inoculante encapsulado en perlas coloidales de alginato, que ha resultado óptimo en la conservación y liberación bacteriana para las cepas evaluadas. Estos fueron inoculados en plantas de arroz sin presentar efectos deletéreos sobre los parámetros morfofisiológicos evaluados en las mismas. Los estudios de arquitectura radicular ante deficiencia de zinc se realizaron mediante ensayos gnotobióticos *in vitro*. Se observó que la carencia de este metal altera la relación parte aérea/raíz, aumentando el peso radicular sin modificar su longitud específica. Notablemente, la bacteria *Acinetobacter* actuó como promotora del crecimiento incrementando el peso aéreo bajo condiciones de suficiencia nutricional. Posteriormente, se logró optimizar la metodología de extracción endospermática, exacerbando la deficiencia de zinc en estadios iniciales del desarrollo vegetativo. Estos hallazgos incentivan a nuestro grupo interdisciplinario a profundizar en los

mecanismos de la interacción planta-bacteria mediante la técnica de extracción de endosperma aquí desarrollada. Asimismo, los resultados sientan las bases para proyectar estas aplicaciones biotecnológicas a ensayos de campo.

PALABRAS CLAVE

ZINC - RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) -

INDOLES - ARROZ - ENCAPSULACIÓN BACTERIANA

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros: gracias por enseñarme a mirar el mundo con ojos de ciencia.

A la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNLZ): mi casa de estudios, por la solidez académica y por brindarme el vínculo necesario para desarrollarme en centros de investigación externos.

Al INTECH (UNSAM-CONICET): por ser el espacio donde descubrí mi vocación por la biotecnología vegetal. Mi agradecimiento especial al Laboratorio de Fisiología y Asistencia al Mejoramiento Vegetal y a la UB1, por la formación técnica y humana durante mi tesis. Gracias también al laboratorio de Fitobacteriología, y a cada persona que me brindó su consejo y escucha. Valoro enormemente este vínculo y espero continuar colaborando con la institución.

A la Dra. Julieta Pesqueira: una de las personas más valientes y amorosas que conozco. Gracias por ser mi directora y por ese constante impulso hacia adelante. Fuiste la primera en contagiarme el amor por la ciencia y la fascinación por entender el mundo vegetal. Sin dudas, la mejor docente de la Universidad; un ejemplo de exigencia académica combinada con una calidez humana y una vocación de enseñanza admirables.

Al Dr. Santiago J. Maiale (el famoso *Prolí*): por tu incansable paciencia y dedicación, por largar cada ensayo a la par mía y por brindarme tan cálidamente un pedacito de mesada cada verano e invierno que estuve en Chascomús. Gracias infinitas por

convencerme de que todo lo que me proponga es posible, por tu humildad y tu predisposición hacia la ciencia.

Al Dr. Matías F. Romero: indudablemente de las personas que más he molestado durante mi tesis. Mati, gracias por tu tiempo y amabilidad; por enseñarme todo lo que sé de microbiología y por la paciencia al verme hacer PCR preguntando por décima vez si estaba bien. Siempre recuerdo cuando elogiaste mis primeros estrados de aislamientos; eso te representa: ver siempre lo positivo hasta en lo más sencillo y dar un abrazo al alma cuando más se necesita.

Al futuro Dr. Andy Salazar: ¡mi primer amigo cubano! Gracias por darme una bienvenida tan cálida, por las charlas, los almuerzos compartidos y por hacerme reír tanto.

A la Dra. Silvina Mangano y al Laboratorio de Fisiología de Plantas (INTECH): gracias por el acompañamiento en mis ensayos y, en lo personal, por las largas charlas que me han motivado a continuar con mis estudios de posgrado.

A la Dra. Gabriela Auge y al Laboratorio de Memoria Ambiental de Plantas (IABIMO-INTA: Gabi, no tengo palabras para agradecer tu apoyo científico y personal; por abrirme las puertas de tu laboratorio y permitirme realizar pasantías, "meter mano" en los ensayos y dedicar tiempo a enseñarme. Gracias por ser mi primera experiencia trabajando con plantas modelo y despertar mi pasión actual. Tu inteligencia y calidad humana crean un ambiente laboral que incentiva a crecer. Espero que la ciencia nos mantenga conectados por muchos años más.

A Dami, mi mejor amigo: fuiste la primera persona que conocí al ingresar a la carrera y recorrimos juntos cada materia durante estos cinco años. Gracias por tu compañía

incondicional, por tu afecto y por esos chistes que, aunque muy malos, siempre logran hacerme reír. Voy a extrañar los mates en cada cursada. El destino te puso en mi camino para alivianar las horas de estudio y potenciar las alegrías. Gracias por estar siempre.

A todos los que mencioné, y a quienes la emoción me hace omitir: gracias por el tiempo y los saberes compartidos. Esta tesis fue el puente para recorrer laboratorios, congresos y, sobre todo, para forjar los vínculos más importantes de mi vida.

Durante mucho tiempo en la carrera de Agronomía sentí que me faltaba "algo", a pesar del gusto por aprender. Hoy sé que ese "algo" era la investigación: las horas en el laboratorio, la lectura de papers y la resiliencia ante los resultados inesperados. Era, en definitiva, la ciencia. Me recibo de Ingeniero Agrónomo con la convicción de que aquella incertidumbre que me llevó a hablar con Juli el "día cero" es la que me trajo hasta aquí y la que hoy me impulsa a iniciar el doctorado.

Gracias a cada persona que me mostró que la carrera es el suelo donde echamos raíces, interactuamos con el ambiente y crecemos. Mutamos y cambiamos de etapa con el único propósito de ser fieles a nosotros mismos. Mi gratitud infinita a quienes me contagiaron el amor por la ciencia y me acompañaron a descubrir esta pasión. Deseo que todos tengan la oportunidad de abrirse al pensamiento científico; no solo por el sentido crítico y analítico que nos brinda, sino por la capacidad que tiene de vincularnos, de enseñarnos a colaborar y de recordarnos que, en todo proyecto, cada persona es indispensable.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
TABLA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	13
INTRODUCCIÓN	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
2.1 Hipótesis general y específicas.....	16
2.2 Objetivo general y específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Aislamiento de BSZ a partir de suelo	17
3.1.1 Procesamiento de la muestra de suelo.....	18
3.1.2 Cultivo de la muestra de suelo en medio de enriquecimiento	18
3.1.3 Diluciones seriadas y siembra por extensión	18
3.1.4 Obtención de cultivos axénicos de cepas candidatas a ser BSZ	19
3.1.5 Criopreservación de las cepas candidatas	19
3.2 Medición de la capacidad de solubilizar zinc de las cepas candidatas	20
3.2.1 Inoculación de los medios.....	20
3.2.2 Obtención de muestras	20

3.2.3	Medición de Zn^{+2} por espectrofotometría colorimétrica	20
3.3	Diferenciación de las cepas bacterianas aisladas.....	22
3.3.1	Obtención de ADN genómico (ADNg) por lisis térmica.....	22
3.3.2	Perfiles o huellas genómicas (<i>Fingerprinting</i>) mediante BOX-PCR	22
3.3.3	Electroforesis en gel de agarosa.....	23
3.4	Criterio de selección para cribado (<i>screening</i>).....	23
3.5	Identificación de las bacterias mediante secuenciación del ARNr 16S	24
3.6	Cinética de solubilización de diversas fuentes de zinc y su relación con el pH extracelular	25
3.7	Cuantificación de la evolución de la producción de indoles, con y sin adición de triptófano.....	25
3.7.1	Cultivos bacterianos y preparación de muestra	25
3.7.2	Medición de indoles totales por espectrofotometría colorimétrica.....	26
3.8	Cuantificación de solubilización de fosfato a través del tiempo	26
3.9	Determinación de presencia de actividad ureasa	27
3.10	Cuantificación de fijación biológica de nitrógeno (FBN).....	27
3.11	Determinación de curvas de crecimiento bacteriano	28
3.11.1	Inoculación de medios	28
3.11.2	Medición de DO_{600} y conteo de UFC	28
3.12	Encapsulación bacteriana	29
3.12.1	Preparación de perlas.....	29

3.12.2	Eficiencia de encapsulación.....	30
3.12.3	Viabilidad bacteriana mediante refrigeración en perlas coloidales.....	30
3.13	Tasa de liberación bacteriana en suelo.....	31
3.14	Ensayo de interacción planta-microorganismo <i>in planta</i>	31
3.15	Ensayo de interacción planta-microorganismo <i>in vitro</i>	32
3.16	Deficiencia de zinc inducida mediante extracción de endosperma	34
3.17	Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIONES		36
4.1	Solubilización de zinc de las cepas aisladas.....	36
4.2	Diferenciación de cepas bacterianas aisladas mediante BOX-PCR (<i>Fingerprinting</i>)	38
4.3	Criterio de selección - cribado (<i>screening</i>).....	39
4.4	Identificación de géneros bacterianos mediante secuenciación del ARNr 16S 39	
4.5	Cinética de solubilización de diversas fuentes de zinc y su relación con el pH extracelular	42
4.6	Producción de indoles con y sin adición de triptófano.....	45
4.7	Solubilización de fosfato	48
4.8	Actividad ureasa.....	50
4.9	Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	51
4.10	Curvas de crecimiento bacteriano.....	53

4.11	Eficiencia de encapsulación bacteriana	54
4.12	Viabilidad bacteriana mediante refrigeración en perlas coloidales.....	55
4.13	Tasa de liberación bacteriana en suelo.....	56
4.14	Efecto de la interacción <i>in planta</i> con <i>Oryza sativa</i>	57
4.15	Efecto de la interacción <i>in vitro</i> con <i>Oryza sativa</i>	61
4.16	Deficiencia de zinc inducida mediante extracción de endosperma en <i>Oryza sativa</i>	67
CONCLUSIONES.....		69
INVESTIGACIONES FUTURAS Y ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS		73
BIBLIOGRAFÍA		75
ANEXO.....		82
1.	Medios de cultivo microbianos.....	82
2.	Medios de cultivo vegetal	85
3.	Protocolo de termociclador y componentes de la mezcla de reacción (<i>Master Mix</i>) para BOX-PCR.	87
4.	Componentes de la <i>Master Mix</i> para PCR del ARNr 16S.....	88
5.	Reactivo Salkowski.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Solubilización de ZnO tras 72 h de incubación.	36
Figura 2.	Solubilización de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ tras 72 h de incubación.....	37

Figura 3. Dendrograma obtenido a partir de la matriz binaria de presencia/ausencia de bandas (BOX-PCR).....	38
Figura 4. Filogenia del gen del ARN ribosómico 16S de las cepas bacterianas seleccionadas.....	41
Figura 5. Solubilización de ZnO por las distintas cepas en función del tiempo de incubación.	42
Figura 6. Relación entre el pH y la concentración de Zn^{2+} (ppm) de las cepas cultivadas en ZnO.	43
Figura 7. Solubilización de $Zn_3(PO_4)_2$ por las distintas cepas en función del tiempo de incubación.	44
Figura 8. Relación entre el pH y la concentración de Zn^{2+} (ppm) de las cepas cultivadas en $Zn_3(PO_4)_2$	45
Figura 9. Producción de indoles por las diferentes cepas a lo largo del tiempo, sin suplementación de triptófano.	46
Figura 10. Producción de indoles por las diferentes cepas a lo largo del tiempo, con suplementación de triptófano.	47
Figura 11. Cinética de solubilización de fosfato por las diferentes cepas en medio NBRIP.	48
Figura 12. Relación entre el pH y la concentración de ortofosfato (ppm) en medio NBRIP.	50
Figura 13. Perfil de actividad ureasa en cepas seleccionadas.	51

Figura 14. Capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FBN) de las diferentes cepas.	52
Figura 15. Curvas de crecimiento bacteriano.	54
Figura 16. Eficiencia de encapsulación bacteriana en perlas coloidales.	55
Figura 17. Viabilidad de las cepas bacterianas encapsuladas tras un período de 28 días de refrigeración.....	56
Figura 18. Liberación y persistencia bacteriana en suelo.....	57
Figura 19. Variables de crecimiento y biomasa de <i>Oryza sativa</i> L. luego de la inoculación con las cepas bacterianas <i>in planta</i>	58
Figura 20. Contenido de clorofila total en hojas de <i>Oryza sativa</i> L. inoculadas con las cepas bacterianas <i>in planta</i>	59
Figura 21. Perfil multivariado de parámetros de fluorescencia de clorofila a (JIP-test) de <i>Oryza sativa</i> L. inoculadas con las cepas bacterianas <i>in planta</i>	60
Figura 22. Largo radicular de plántulas de <i>Oryza sativa</i> cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.	62
Figura 23. Peso fresco radicular de <i>Oryza sativa</i> cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.	63
Figura 24. Longitud radicular específica (LRE) de <i>Oryza sativa</i> cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.....	64

Figura 25. Biomasa aérea de <i>Oryza sativa</i> cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.....	65
Figura 26. Relación peso fresco aéreo (PFA) y peso fresco radicular (PFR) de <i>Oryza sativa</i> cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.	67
Figura 27. Variables de crecimiento y biomasa de <i>Oryza sativa</i> L., sometidas a extracción del endosperma, bajo distintas disponibilidades de zinc durante 32 días de tratamiento.	68

TABLA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C Grados Celsius	DO Densidad óptica
μL Microlitro	g Gramos
AA Agar Agua	h Horas
ABS Absorbancia	L Litro
ADN Ácido Desoxirribonucleico	LRE Longitud Radicular Específica
AIA Ácido indol-3-acético	M Molar
ANOVA Análisis de varianza	min Minutos
ARN Ácido Ribonucleico	mL Mililitro
ARNr ARN ribosomal	mM Milimolar
BSZ Bacterias solubilizadoras de zinc	MM-Zn Medios con fuente de zinc de baja solubilidad
dNTPs Desoxirribonucleótido(s) trifosfato	pb Pares de bases
NBRIP Medio de fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (del inglés <i>National Botanical Research Institute's phosphate</i>)	PCA Agar para Recuento en Placa (del inglés <i>Plate Count Agar</i>)
nm Nanómetro	PCR Reacción en cadena de la polimerasa
ON Durante la noche (del inglés <i>Overnight</i>)	PGPR Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal
ppm Partes por millón	UFC Unidades Formadoras de Colonias
rpm Revoluciones por minuto	Vol Volumen

INTRODUCCIÓN

La agricultura global enfrenta el reto de aumentar la producción de alimentos bajo un paradigma de sostenibilidad que reduzca la dependencia de agroquímicos. En este escenario, el uso de bioestimulantes e inoculantes bacterianos se presenta como una estrategia clave para mejorar la resiliencia de los agroecosistemas y minimizar el impacto ambiental de las prácticas tradicionales (Carillo *et al.*, 2025; Corrêa *et al.*, 2025; Ruzzi & Aroca, 2015). Estos bioinsumos no solo pretenden promover el crecimiento vegetal, sino que optimizan la eficiencia en el uso de nutrientes, siendo pilares fundamentales para la transición hacia una agricultura más sustentable.

Entre los micronutrientes, el zinc ha cobrado una relevancia crítica en la investigación agrícola reciente (Cakmak & Kutman, 2017). Su deficiencia constituye una de las limitaciones nutricionales más extendidas a nivel mundial, impactando significativamente tanto el rendimiento de los cultivos como la calidad de los granos destinados al consumo humano (Alloway, 2009). En este contexto, el arroz (*Oryza sativa* L.) destaca por su alta susceptibilidad a esta carencia, la cual ha sido reportada incluso como una enfermedad fisiogénica (Forno *et al.*, 1975; Khan *et al.*, 2021). Esta vulnerabilidad ha impulsado la caracterización de mecanismos genéticos orientados al desarrollo de variedades resilientes y programas de biofortificación (Wissuwa *et al.*, 2006).

Estudios de fertilización actuales demuestran que, si bien la aplicación foliar o edáfica de zinc puede corregir deficiencias, su eficiencia suele ser baja debido a la rápida fijación en la matriz del suelo (Doolette *et al.*, 2018). Esto resalta la necesidad de emplear Bacterias Solubilizadoras de Zinc (BSZ) como una alternativa

biotecnológica para movilizar las reservas de zinc prístino o aplicado, y así incrementar la biodisponibilidad del mismo para los cultivos (Fahri *et al.*, 2026; Gandhi & Muralidharan, 2016; Gontia-Mishra *et al.*, 2017; Manasa *et al.*, 2019; Saravanan *et al.*, 2007).

Para comprender cómo estos microorganismos influyen en parámetros morfofisiológicos, el uso de sistemas de cultivo *in vitro* bajo condiciones gnotobióticas resulta interesante. Estos entornos controlados y libres de microorganismos no deseados permiten aislar el efecto de una cepa específica sobre la planta. Particularmente, facilitan el estudio detallado de la arquitectura radicular, permitiendo observar modificaciones en la longitud de la raíz principal, la densidad de raíces laterales y la formación de pelos radiculares que, en condiciones de campo, serían imposibles de monitorear con tal precisión (Vacheron *et al.*, 2013).

No obstante, existe una brecha significativa entre estos estudios básicos y la aplicación a campo. La complejidad de la interacción en la matriz suelo, donde intervienen factores fisicoquímicos y la competencia con la microbiota nativa, plantea el desafío de la extrapolación de resultados. El uso de arroz (*Oryza sativa* L.) como especie modelo de gramíneas, y que también es un cultivo de importancia económica, bajo ambos sistemas de estudio (axénico y suelo) permite una aproximación integral para entender los mecanismos moleculares y morfofisiológicos que rigen la interacción planta-microorganismo. La simbiosis funcional entre arroz y bacterias solubilizadoras de zinc representa un modelo ideal para estudiar cómo los microorganismos modulan la nutrición mineral de este elemento. Bacterias que no solo aumentan la fracción de Zn disponible en la rizosfera, sino que también pueden inducir cambios en la expresión de proteínas

transportadoras reguladas por zinc e imitadoras de transportadores regulados por hierro (ZIP, del inglés *Zinc-regulated transporter and Iron-regulated transporter-like protein*), mejorando la eficiencia de absorción del micronutriente (Bashir *et al.*, 2012; Krithika & Balachandar, 2016).

Este tipo de interacción adquiere relevancia en contextos donde la deficiencia de Zn coexiste con otros estreses abióticos, ya que las BSZ pueden contribuir a la resiliencia del cultivo mediante la producción de fitohormonas, compuestos antioxidantes y moléculas señalizadoras (Prathap *et al.*, 2021).

Por lo tanto, es imperativo no solo bioprospectar nuevas cepas con potencial PGPR (solubilización de minerales, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, etc.), sino también evaluar su comportamiento con plantas en diferentes sistemas de cultivo. Esta tesina propone abordar dicha brecha, analizando la interacción de aislamientos solubilizadores de Zn en *O. sativa*, bajo condiciones controladas y en suelo, utilizando tecnologías de encapsulamiento en perlas coloidales de alginato para favorecer la persistencia bacteriana en la matriz edáfica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis general y específicas

La hipótesis general del trabajo estipula que la bioprospección de bacterias solubilizadoras de zinc permite inferir acerca de la potencial interacción benéfica entre plantas y microorganismos en distintas condiciones de disponibilidad de zinc. Es por ello que se plantean las siguientes hipótesis específicas:

- “Existen cepas bacterianas edáficas con capacidad de solubilizar zinc y desencadenar otras actividades metabólicas que permiten inferir sobre su posterior comportamiento como promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)”
- “Existe interacción positiva entre las cepas seleccionadas y *Oryza sativa* L., independientemente de las condiciones de cultivo, *in vitro* o *in planta*”

2.2 Objetivo general y específicos

El objetivo general de esta tesis es evaluar el efecto de bacterias solubilizadoras de zinc (BSZ) en interacción con *Oryza sativa* L. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- A. Aislar bacterias edáficas con capacidad de solubilizar fuentes de zinc de baja solubilidad.
- B. Caracterizar, seleccionar e identificar las cepas bacterianas aisladas.
- C. Estudiar el efecto de las cepas bacterianas en interacción con *Oryza sativa* L., en condiciones *in vitro* e *in planta*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento de BSZ a partir de suelo

Para el aislamiento de las bacterias con potencial actividad solubilizadora de zinc (BSZ) se partió de muestras de suelo, las cuales fueron sometidas a un enriquecimiento previo para favorecer el crecimiento bacteriano, seguido por el aislamiento y obtención de cultivos axénicos, que fueron criopreservados para su posterior uso.

3.1.1 Procesamiento de la muestra de suelo

Las muestras de suelo han sido recolectadas y enviadas gentilmente por el Ing. Agr. Mariano Durand desde el Campo Experimental Fundación ProArroz, ubicado en San Salvador, Entre Ríos, Argentina (-31.6562473; -58.4994852) y se conservaron a 4 °C hasta su uso. El procesamiento consistió en moler hasta una granulometría uniforme para realizar los cultivos en medio de enriquecimiento.

3.1.2 Cultivo de la muestra de suelo en medio de enriquecimiento

El objetivo de realizar un enriquecimiento previo a la siembra en medio agarizado ha sido el de favorecer el crecimiento de bacterias presentes en el consorcio microbiano.

Las muestras de suelo (1 g) se sembraron en 20 mL de medio líquido de enriquecimiento, que consistió en el medio mínimo con fuente de zinc de baja solubilidad (MM-Zn), ya sea como óxido o fosfato de zinc (ver ANEXO). Por cada medio selectivo se realizaron tres repeticiones, se incubaron a 28 °C y en agitación constante (160 rpm) por 24 h. Luego se dejó decantar el medio inoculado y se transfirió 1 mL del sobrenadante a 20 mL del mismo medio. Se incubó a 28 °C y en agitación constante (160 rpm) por 24 h.

3.1.3 Diluciones seriadas y siembra por extensión

Diluciones seriadas

Se realizaron diluciones seriadas (1:10), transfiriendo 100 µL del cultivo a 900 µL de agua estéril, de esta dilución (10^{-1}), se tomó 100 µL y se transfirió a un microtubo con 900 µL de agua estéril, se ha repetido el proceso hasta la dilución 10^{-5} .

Siembra

Se sembraron 50 μL del medio incubado y de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} en placas de Petri con MM-Zn, correspondiente al medio de enriquecimiento previamente utilizado. Se dejó incubar a 28 °C hasta visualizar crecimiento de colonias.

3.1.4 Obtención de cultivos axénicos de cepas candidatas a ser BSZ

Se realizaron siembras en estría por agotamiento de colonias candidatas a ser BSZ en medio Agar para Recuento en Placa (PCA, del inglés *Plate Count Agar*), con el objetivo de contar con cultivos axénicos de las cepas. Se repitió el proceso hasta lograr obtener colonias aisladas.

3.1.5 Criopreservación de las cepas candidatas

Se prepararon soluciones de glicerol al 25 % con el fin de criopreservar en freezer a -80 °C los aislamientos bacterianos con potencial capacidad de solubilizar zinc. De esta forma se tuvieron los aislamientos para los estudios pertinentes y siempre que fue necesario se estriaron alícuotas de ellos.

Para ello se extrajeron con un palillo colonias aisladas en PCA y se sembraron en 3 mL de medio líquido PCA, se dejó en incubación durante la noche (ON, por sus siglas en inglés *overnight*) a 28 °C y agitación constante (160 rpm). Pasado este período se colocó 500 μL de glicerol al 50 % y 500 μL del medio de cultivo bacteriano en tubos criogénicos, se dio un pulso en vórtex y se conservó en freezer -80 °C.

3.2 Medición de la capacidad de solubilizar zinc de las cepas candidatas

Para cuantificar la capacidad de solubilizar zinc se inoculó medios MM-Zn, con su respectiva fuente de zinc de baja solubilidad y luego se midió el zinc como catión divalente (Zn^{2+}) mediante técnica colorimétrica.

3.2.1 Inoculación de los medios

Se inoculó con una alícuota de 50 μL de cultivo bacteriano crecido en PCA líquido a 28 °C y agitación constante (160 rpm) durante 24 h, con las cepas correspondientes, en tubos con 3 mL del medio selectivo de acuerdo con los aislamientos de las muestras de suelo. Además, se dejaron controles negativos (Blancos), es decir, inoculados con 50 μL de medio PCA estéril. Los tubos inoculados se incubaron a 28 °C y agitación constante (160 rpm) durante 72 h.

3.2.2 Obtención de muestras

Luego de 72 h de incubación, se dejaron decantar los tubos y se transfirió el medio a microtubos, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se conservó para cuantificar el Zn^{2+} como se detalla a continuación.

3.2.3 Medición de Zn^{+2} por espectrofotometría colorimétrica

Para la medición de zinc, como catión divalente, se utilizó el reactivo zincon (2-[5-(2-Hydroxy-5-sulphophenyl)-3-phenyl-1-formazyl]benzoic acid monosodium salt) con el protocolo adaptado de Choi *et al.* (2007).

El fundamento del método se basa en la quelación del Zn^{+2} por el zincon a pH 9, rindiendo un producto coloreado medible a 620 nm. El zincon también quela Cu^{2+} a pH 5 y 9 y puede ser interferido por otros cationes como Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} ,

Cd^{2+} , por lo que se utiliza ascorbato de sodio para enmascarar el Mn^{2+} , el cual, entre los interferentes mencionados, es el que se encontraría en mayor proporción.

El zincon (2,17 mM) se preparó en el momento de uso, debido a su alta fotosensibilidad, a razón de 1 mg/mL en NaOH 0,02N.

Se utilizó una solución de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [65 ppm] como stock para preparar los estándares de la curva patrón de Zn^{2+} .

La secuencia de agregado de los reactivos en el tubo de reacción fue la siguiente:

1. 50 μL muestra
2. 20 μL NaOH [1N]
3. 30 μL $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$ [1,2 M]
4. 50 μL Buffer borato (pH 9)
5. 150 μL zincon [2,17 mM]

Se dejó reaccionar 5 minutos, luego de darle un pulso en vórtex, y se midió la absorbancia de 200 μL con el uso de un lector de microplacas de 96 pocillos, a una longitud de onda de 620 nm.

Curva patrón.

Se realizaron curvas patrones, por duplicado, en cada medición con el objetivo de realizar un análisis de regresión lineal simple, y poder calcular la masa de Zn^{+2} existente en el tubo de reacción.

3.3 Diferenciación de las cepas bacterianas aisladas

3.3.1 Obtención de ADN genómico (ADNg) por lisis térmica

Se tomó con un palillo masa bacteriana de una placa “fresca”, es decir, con incubación ON. Se suspendió en 20 µL de agua miliQ y se dio un pulso en vórtex. Luego se calentó la suspensión a 100 °C durante 10 min, se agregó 200 µL de agua miliQ estéril y se dio un pulso en vórtex. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Finalmente se transfirió el sobrenadante a microtubos y se conservó a 4 °C hasta su uso. El protocolo ha sido adaptado de Dashti *et al.* (2009).

3.3.2 Perfiles o huellas genómicas (*Fingerprinting*) mediante BOX-PCR

El análisis de *fingerprinting* o huella genómica se realizaron mediante la técnica BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1994), usando el oligonucleótido BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic *et al.*, 1991, 1994). El uso de estas huellas genómicas corresponde a una técnica ampliamente usada para el análisis de diversidad genética de poblaciones bacterianas (Covelli, 2013), basado en la amplificación de las regiones repetitivas dispersas a lo largo del genoma en diferentes posiciones intergénicas, lo que produce amplicones de distintos tamaños que tras su separación electroforética resultan en un perfil único que permite discriminar hasta nivel de cepa.

La composición de la mezcla de reacción (*Master Mix*), así como el programa utilizado del termociclador (Castagno *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2016) están especificados en el ANEXO.

3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa

A las muestras amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se les agregaron 3 μ L de buffer de carga y se corrieron en gel de agarosa al 1,5 %, preparado con buffer TAE (1X) y 0,03 μ L de bromuro de etidio (25 mM) por mililitro de gel.

Además, se sembró en el gel un marcador de peso molecular (*DNA ladder*) de 100 pb, con el que luego se realizó la estimación del tamaño de los amplicones utilizando el software GelAnalyzer v. 23.1.1 (Lazar, 2023).

El programa de corrida en la cuba electroforética fue a 80 V y 40 mAh, con el tiempo necesario para que las muestras corran hasta el final del gel de agarosa, con el objetivo de tener un patrón de bandas correctamente resueltas en el frente de corrida.

3.3.4 Análisis de amplicones y árbol filogenético

Como se detalló previamente, se utilizó el software GelAnalyzer v. 23.1.1 (Lazar, 2023) para estimar los tamaños de los amplicones. Luego se procedió a armar una matriz binaria para calcular la correlación cofenética y armar un árbol de distancia génica que permitió seleccionar cepas distintas. Esto evitó la redundancia de cepas previo a iniciar las caracterizaciones de actividades *in vitro* e identificación molecular por secuenciación del ARNr 16S.

3.4 Criterio de selección para cribado (*screening*)

De la colección de cepas bacterianas que se obtuvieron se seleccionaron aquellas que presentaron óptima solubilización de fuentes de zinc de baja solubilidad y que, tras el análisis del patrón de bandas obtenido en los geles de la BOX-PCR,

indicaron ser diferentes cepas. Se seleccionaron aislamientos provenientes de medios con fuentes de zinc como óxido y fosfato, con el fin de tener una mayor diversidad de microorganismos a investigar. Seguido de ello, se realizó la identificación de los géneros bacterianos mediante secuenciación del ARNr 16S.

3.5 Identificación de las bacterias mediante secuenciación del ARNr 16S

Para la extracción de ADNg se utilizó la misma metodología que para realizar la BOX-PCR. Seguido de la amplificación y verificación del ARNr 16S (aproximadamente 1.500 pb) utilizando primers universales 41f y 1488r (Estrella *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2016) detallados en el ANEXO, para su posterior purificación y secuenciación, realizada como servicio que provee el Centro científico, tecnológico y educativo del acuario del río Paraná (Rosario).

Las lecturas de secuenciación (*reads*) fueron editadas y ensambladas en contigos (*contigs*) utilizando el software DNA Baser Assembler v5 (Heracle BioSoft, 2022). La identificación taxonómica de las secuencias se realizó mediante comparaciones de homología empleando la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Para el análisis evolutivo, se llevó a cabo un alineamiento múltiple en el software MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021), donde se integraron las secuencias obtenidas con secuencias ortólogas de referencia. Las secuencias seleccionadas fueron analizadas empleando el método UPGMA con distancias evolutivas calculadas mediante el modelo p-distance. La robustez de las agrupaciones se evaluó mediante un análisis de bootstrap con 1.000 réplicas.

Para caracterizar las cepas bacterianas ya identificadas se realizaron diversas pruebas bioquímicas que se detallan a continuación.

3.6 Cinética de solubilización de diversas fuentes de zinc y su relación con el pH extracelular

Se evaluó la capacidad de las cepas seleccionadas para solubilizar fuentes de zinc mediante muestreos periódicos cada 24 h, durante un periodo total de 96 h de incubación. Se utilizaron medios de cultivo correspondientes a los aislamientos iniciales, así como a la otra fuente de zinc. Para ello se siguió el protocolo inicial de cuantificación de Zn^{2+} , obteniéndose el sobrenadante por centrifugación. A este se le midió el pH y, posteriormente, se determinó la concentración de zinc soluble mediante espectrofotometría colorimétrica, de acuerdo con la metodología descrita por Choi *et al.* (2007) .

3.7 Cuantificación de la evolución de la producción de indoles, con y sin adición de triptófano

3.7.1 Cultivos bacterianos y preparación de muestra

Para determinar la capacidad de las cepas de producir indoles se usaron cultivos bacterianos en medio PCA. Para la evaluación en presencia de triptófano se suplementó a razón de 10 μ M de L-triptófano.

Se incubó a 28 °C en agitación constante (160 rpm) por 96 h. Alícuotas de 100 μ L se colectaron cada 24 h para obtener el sobrenadante mediante centrifugación a 12.000 rpm por 5 min.

3.7.2 Medición de indoles totales por espectrofotometría colorimétrica

La estimación se realizó según el protocolo de Gordon & Weber (1951), de modo que los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con el reactivo Salkowski (ver ANEXO), en proporción 1:2, respectivamente. Es decir, se adicionaron 75 μ L del sobrenadante y 150 μ L del reactivo. A los 30 min de reacción en oscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm en lector de microplacas.

La concentración de indoles se calculó utilizando como curva de calibración cantidades crecientes de ácido indol-3-butírico (IBA, Sigma-Aldrich).

3.8 Cuantificación de solubilización de fosfato a través del tiempo

Para la determinación de la solubilidad de fosfatos provenientes de fuente de baja solubilidad ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) se utilizó el medio Fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP, por sus siglas en inglés *National Botanical Research Institute's phosphate*), detallado en anexo.

3.8.1 Cultivos bacterianos y preparación de muestra

Se inocularon 3 mL de medio NBRIP en estado líquido con 50 μ L de cultivo ON, crecido en PCA de las cepas bacterianas. Se dejó incubando a 28 °C y agitación constante (160 rpm). Se extrajeron alícuotas cada 24 h, durante un periodo total de 96 h de incubación, seguidas de centrifugación a 12.000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se le midió el pH y luego se utilizó para cuantificar la presencia de iones ortofosfato (PO_4^{3-}).

3.8.2 Cuantificación de iones ortofosfato (PO_4^{3-}) por espectrofotometría colorimétrica

La concentración de iones ortofosfato (PO_4^{3-}) de los sobrenadantes se cuantificó mediante el método colorimétrico del azul de molibdeno, adaptando el protocolo de Murphy & Riley (1962). Se midió la absorbancia a 882 nm tras la incubación del complejo fosfomolibdato reducido, cuantificando los resultados mediante una curva de calibración de fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4).

3.9 Determinación de presencia de actividad ureasa

Para verificar si las cepas bacterianas presentan actividad ureasa se utilizó el medio de Medio Christensen (MC), descrito en anexo. Tras un crecimiento ON en PCA incubados con agitación constante (160 rpm) a 28 °C, las células se cosecharon por centrifugación. El pellet resultante se lavó en dos oportunidades con agua, luego se inocularon 5 µl de la suspensión en el medio MC. La actividad ureasa se verificó a las 12 h de incubación a 28 °C como cambio de coloración en el medio de cultivo de amarillo a rosado intenso, indicando actividad ureasa positiva.

3.10 Cuantificación de fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Para cuantificar la FBN por parte de las cepas bacterianas se prosiguió con el protocolo de Cordova-Rodriguez *et al.* (2022) adaptando el medio de cultivo como se detalla en el ANEXO.

Para ello se inocularon 5 mL de medio de cultivo líquido Döbereiner con 50 µL de cultivo ON crecido en PCA. Se dejó incubando durante 48 h a 28 °C sin agitación. Luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos y se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm a 200 µl del sobrenadante.

Se utilizó como curva patrón dosis crecientes de trietanolamina ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$) luego de ser mezcladas con medio de cultivo estéril.

3.11 Determinación de curvas de crecimiento bacteriano

Para simplificar el ajuste de las unidades formadoras de colonias (UFC) al momento de realizar las inoculaciones de los ensayos pertinentes, se caracterizó el crecimiento microbiano en el tiempo. Los valores de densidad óptica (DO_{600}), entendido como la absorbancia medida a una longitud de onda de 600 nm, se asociaron a los conteos de UFC a través del tiempo. Con el fin de graficar dicha relación, se ajustó un modelo lineal utilizando el logaritmo natural de las UFC/mL como variable dependiente.

3.11.1 Inoculación de medios

Se partió de alícuotas de las cepas criopreservadas a -80°C , que se inocularon en 5 mL de MM-Zn, con la fuente de zinc correspondiente al aislamiento original de la cepa. Se incubaron a 28°C en agitación constante (160 rpm), durante 48 h. Luego se inoculó con 83 μL del cultivo bacteriano 5 mL de PCA, se dejó incubando ON a 28°C y en agitación constante (160 rpm).

3.11.2 Medición de DO_{600} y conteo de UFC

Al día siguiente se inoculó con 333 μL del cultivo bacteriano a 20 mL de PCA e inmediatamente se tomó una alícuota para realizar diluciones seriadas (1:10) y se midió la absorbancia a 600 nm. Se prosiguió con esta metodología cada 2 h de incubación, en un período total de 6 h. La incubación se realizó a 28°C y agitación constante (160 rpm). Luego de las diluciones seriadas se sembró, con la técnica de microgota en placa (*drop plate*), 5 μL para conteo de UFC, se incubaron a 28°C hasta observación de colonias. El ensayo se realizó por cuadruplicado.

3.11.3 Curvas de crecimiento bacteriano

Las cinéticas de crecimiento bacteriano se modelaron mediante una regresión no lineal ajustada a una función exponencial del tipo $y = a.e^{bx}$ utilizando el software estadístico R versión 4.5.1 (R Core Team, 2025). Este modelo permitió determinar la tasa relativa de crecimiento (b) a partir del exponente de la función. La validez y precisión del ajuste biológico de los datos observados (UFC/mL y DO₆₀₀) se confirmaron a través del coeficiente de determinación (R²).

3.12 Encapsulación bacteriana

Con el objetivo de llevar a cabo el ensayo *in planta* se encapsularon las cepas bacterianas en perlas coloidales que luego se utilizaron como inoculantes. Además, se evaluó la tasa de liberación bacteriana desde las perlas a la matriz edáfica y se determinó la viabilidad de las bacterias encapsuladas mediante refrigeración a 4 °C. Para la preparación de las perlas de alginato se siguió el protocolo de Gavilanes & Cálix (2017) con pequeñas modificaciones.

3.12.1 Preparación de perlas

Se utilizaron cultivos bacterianos frescos, que se prepararon inoculando 50 µL de cultivo ON crecidos en PCA a tubos que contenían 3 mL del mismo medio, se dejaron incubando durante 2 horas en agitación constante (160 rpm) y 28 °C. Luego se ajustó la DO₆₀₀, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en placas de 96 pocillos, para obtener una concentración bacteriana de 10⁸ UFC/mL adicionando cantidad suficiente de agua.

Una vez ajustada la DO₆₀₀ de los cultivos bacterianos en microtubos de 1,5 mL se prosiguió a centrifugar a 12.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1,5 mL de agua. Se repitió este procedimiento dos veces con el fin de descartar restos de medio de cultivo.

Luego se colocó 1 mL de la suspensión bacteriana a 9 mL de alginato de sodio al 2 % y se pipeteó sobre solución de CaCl_2 [100mM]. Las perlas coloidales formadas se filtraron del exceso de solución, se enjuagaron 3 veces con agua estéril y se conservaron a 4 °C en tubos cónicos de 50 mL hasta su uso. En el caso del control negativo se preparó reemplazando la suspensión bacteriana por medio de cultivo estéril.

3.12.2 Eficiencia de encapsulación

Para verificar si la concentración bacteriana se mantuvo tras la encapsulación se prosiguió a deshacer el coloide formado y realizar conteo de UFC en medio PCA.

Para la ruptura del estado coloidal se pesaron 4 perlas de encapsulados bacterianos en un microtubo y se le adicionó 1 mL de citrato de sodio [55 mM]. Se dejó incubando a 130 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se prosiguió a realizar diluciones seriadas y siembra por el método *drop plate*. Las placas se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias.

La eficiencia de encapsulación se calculó como:

$$\text{Eficiencia de encapsulación bacteriana} = (N/N_0) * 100$$

Donde, N = Logaritmo en base 10 de las UFC encapsuladas; N_0 = Logaritmo en base 10 de las UFC inoculadas (Gavilanes & Cálix, 2017).

3.12.3 Viabilidad bacteriana mediante refrigeración en perlas coloidales

Para este ensayo, se realizó el mismo procedimiento previamente descrito a diferencia que se utilizaron perlas con 28 días de conservación a 4 °C.

3.13 Tasa de liberación bacteriana en suelo

Con el objetivo de evaluar la tasa con la que las bacterias se liberan del encapsulado se inocularon tubos con 10 gramos de suelo estéril con la misma dosis que se utilizó en los ensayos *in planta* (1 gramo de perlas/kg de suelo), que equivale a inocular 10^4 UFC/gramo de suelo.

Tras pasar 5, 10 y 30 días de incubación a 25 °C, se extrajeron alícuotas de 100 mg del suelo circundante a la perla para realizar conteo de UFC. Para ello se realizaron diluciones seriadas seguidas de siembra en placas de Petri con medio PCA mediante la técnica de *drop plate*. Se dejaron incubando a 28 °C hasta la visualización de colonias.

3.14 Ensayo de interacción planta-microorganismo *in planta*

Para evaluar el efecto de la inoculación con las cepas bacterianas en condiciones de suelo, se plantearon ensayos en maceta con suelo extraído del Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH), Buenos Aires, Argentina (situación más cercana a la realidad de la interacción planta-bacteria a campo). El suelo se esterilizó mediante tindalizado y se verificó su esterilidad mediante siembra en placas con PCA.

3.14.1 Desinfección de cariopses

Los cariopses se desinfectaron con etanol al 70 % en agitación constante durante 1 minuto, seguido por el enjuague y agregado de NaClO al 30 % con 50 µl de Tween 20; en agitación constante durante 20 minutos. Finalmente se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril y se sembraron en papel de filtro previamente humedecido.

3.14.2 Siembra e inoculación

A las 48 h de sembrados en papel de filtro se transfirieron a macetas de 10 cm de diámetro con 100 gramos de suelo estéril, colocando 2 cariopses por maceta. Al día siguiente se inoculó con las perlas coloidales de las respectivas cepas bacterianas a razón de 1 gramo de perlas/kg de suelo, equivalente a inocular 10^4 UFC/gramo de suelo. A los 3 días de la emergencia se ralearon las plántulas con el fin de dejar únicamente un ejemplar por maceta. El ensayo se llevó a cabo en cámara de cultivo a 25 °C, con intensidad lumínica de $200 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo 16:8 horas de luz y oscuridad, respectivamente.

3.14.3 Variables respuesta analizadas

La cosecha se llevó a cabo a los 30 días de iniciado el tratamiento y se cuantificó el largo total del vástago, número de macollos, peso fresco y seco aéreo, así como el porcentaje de materia seca. En cuanto a variables fisiológicas se estimó el contenido de clorofila (MC-100 Apogee, USA) y la fluorescencia emitida (Fluorómetro Pocket-PEA Hansatech, UK).

3.15 Ensayo de interacción planta-microorganismo *in vitro*

Los ensayos de interacción en condiciones de *in vitro* se realizaron para generar deficiencia de zinc que en suelo es difícil de lograr y evaluar, en un corto periodo de tiempo (14 días), el efecto de las bacterias sobre la planta en dos condiciones de disponibilidad de zinc (con y sin). Además, este sistema de cultivo permitió evaluar de mejor manera parámetros radiculares.

Los cariopses de *Oryza sativa* var. *Cambá* se establecieron en medio de cultivo Murashige Skoog (MS) 0.5X (pH 5,8), libre de zinc y suplementado con ZnSO₄ (ver ANEXO), siendo inoculados con las bacterias, en ambas condiciones.

3.15.1 Desinfección y siembra de cariopses

La desinfección se realizó del mismo modo que se detalló en el ensayo *in planta* (3.14.1), seguido por la siembra en medio Agar Agua (AA), que se detalla en anexo, para dejarlas germinando en cámara de cultivo a 25 °C, con intensidad lumínica de 160 $\mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y fotoperíodo 16:8, luz y oscuridad, respectivamente.

3.15.2 Inoculación bacteriana

Las plántulas con 2 días de germinadas en AA se transfirieron a los respectivos tratamientos en placa, seguidas por la inoculación bacteriana, es decir, ajustando con MgSO₄ [10mM] la DO₆₀₀ de cultivos bacterianos frescos con el fin de inocular microgotas de 5 μl con una concentración bacteriana de 10⁸ UFC/mL. De esta forma, se inocularon 500.000 bacterias viables/plántula.

3.15.3 Variables respuesta analizadas

Para estudiar el efecto de la interacción en las plántulas de arroz, se cuantificaron, a los 14 días de iniciado el tratamiento, el peso fresco aéreo y el peso fresco radicular, se calculó la relación entre ambos (A/R) y la longitud de la raíz utilizando el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Asimismo, se calculó la longitud radicular específica (LRE) mediante la siguiente relación:

$$LRE = \text{Peso fresco radicular(g)} / \text{Longitud total de las raíces (cm)}$$

De esta forma se pudo inferir en la relación entre extensión y peso, inversión en biomasa radicular por unidad de extensión (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013).

3.16 Deficiencia de zinc inducida mediante extracción de endosperma

Adicionalmente, se ajustó un protocolo de evaluación en medios de cultivo con y sin Zn que incluye el establecimiento *in vitro* de embriones de arroz (libres de endosperma), ajustando aún más la deficiencia de zinc en los primeros estadios vegetativos.

El objetivo de este apartado consistió en ajustar una técnica que permita la detección temprana de deficiencias de Zn en plántulas de arroz y que sirva en futuros ensayos como herramienta preliminar para evaluar la respuesta de las bacterias solubilizadoras. Para ello, la metodología consistió en aislar embriones de *Oryza sativa* var. *Cambá* y sembrarlos *in vitro*; este procedimiento permite inducir síntomas de carencia en estadios vegetativos tempranos al prescindir del zinc almacenado en el endosperma, el cual es habitualmente suficiente para cubrir los requerimientos iniciales de las plántulas.

3.16.1 Aislamiento de embriones de arroz

Previa desinfección (3.14.1) e imbibición de los cariopses, se realizó la escisión de los embriones y la siembra *in vitro* en medio MS (1952) con y sin sulfato de zinc. El cultivo se extendió durante 32 días en tubos dispuestos en cámara de cultivo a 25 °C, con fotoperíodo de 12 h e intensidad lumínica de 107 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.16.2 Diseño y variables respuesta analizadas

El experimento consistió en un DCA con 10 repeticiones y se utilizó ANOVA y el test DGC al 5 % para evaluar las variables respuesta. Al cabo del período de

evaluación se registraron los pesos frescos de raíz y vástago, y se tomaron fotografías que luego se procesaron con el ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) para analizar parámetros de crecimiento y desarrollo.

3.17 Análisis estadístico

Los datos obtenidos, tanto de las caracterizaciones bioquímicas como de los parámetros de crecimiento vegetal (*in vitro* e *in planta*) fueron analizados utilizando el software estadístico R versión 4.5.1 (R Core Team, 2025).

Para cada variable respuesta, se verificaron inicialmente los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de la varianza mediante la prueba de Levene.

En los casos donde se cumplieron ambos supuestos, se procedió a realizar un Análisis de Varianza (ANOVA), empleando modelos de un factor o de dos factores con interacción según la estructura del diseño experimental, seguido de una prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha=0,05$).

En aquellas variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad o igualdad de varianzas, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba post-hoc de Dunn para la separación de rangos.

Todos los gráficos y análisis de correlación fueron generados utilizando el paquete ggplot2 y las librerías base de R.

El procesamiento y análisis de datos inherentes a la secuenciación y curvas de crecimiento bacteriano fueron detallados en sus respectivos apartados.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Solubilización de zinc de las cepas aisladas

A partir del cultivo en el medio MM-ZnO se aislaron seis cepas, que se han denominado de forma genérica como “SSO”. La curva de calibración para la medición de Zn^{2+} mostró un ajuste lineal con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9993, lo que permitió continuar con la cuantificación de las muestras.

Las cepas SSO1' y SSO5 presentaron concentraciones de Zn^{2+} de $80,58 \pm 4,31$ ppm y $133,39 \pm 7,41$ ppm, respectivamente, diferenciándose significativamente del resto de las cepas y del Blanco (Figura 1). Por este motivo, fueron seleccionadas para realizar la identificación genética y posteriores caracterizaciones.

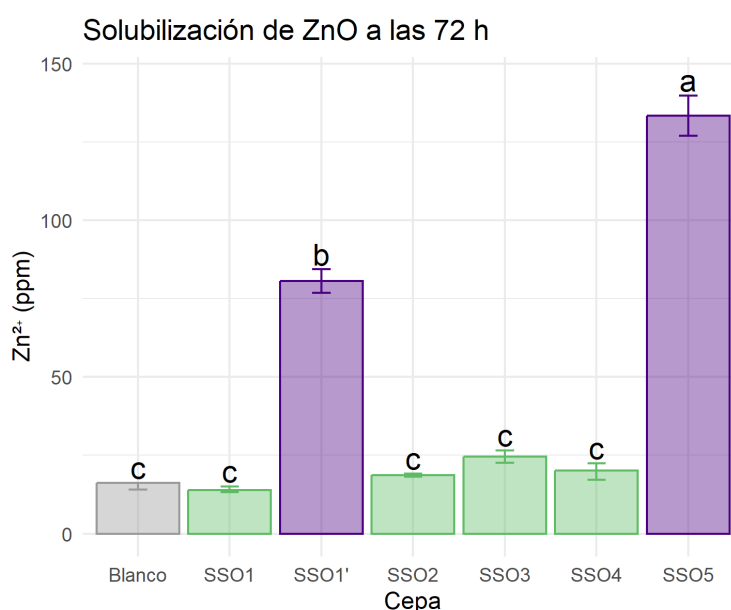


Figura 1. Solubilización de ZnO tras 72 h de incubación.

En gris se indica el Blanco (control negativo), en verde y púrpura las cepas evaluadas; las referenciadas en púrpura fueron seleccionadas para posteriores determinaciones. Los resultados se presentan como medianas $\pm$ IQR. Las letras sobre las barras señalan diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Kruskal–Wallis, $p < 0,05$).

En cuanto a los aislamientos provenientes del medio $\text{MM-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, se han obtenido 38 cultivos axénicos, denominados de forma genérica como “SSP”. Entre

ellos se han destacado por su mayor actividad de solubilizar fosfato de zinc las cepas SSP22, SSP23 y SSP24, con valores de $725,74 \pm 11,30$; $707,10 \pm 9,95$ y $719,10 \pm 29,77$ ppm Zn^{2+} , respectivamente; seguidas por las cepas SSP25 y la SSP29, con valores de $598,29 \pm 11,49$ y $384,20 \pm 20,68$, correspondientemente (Figura 2). La curva de calibración para la medición de Zn^{2+} mostró un ajuste lineal con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9988, lo que ha permitido continuar con la interpolación de las muestras por esta metodología.

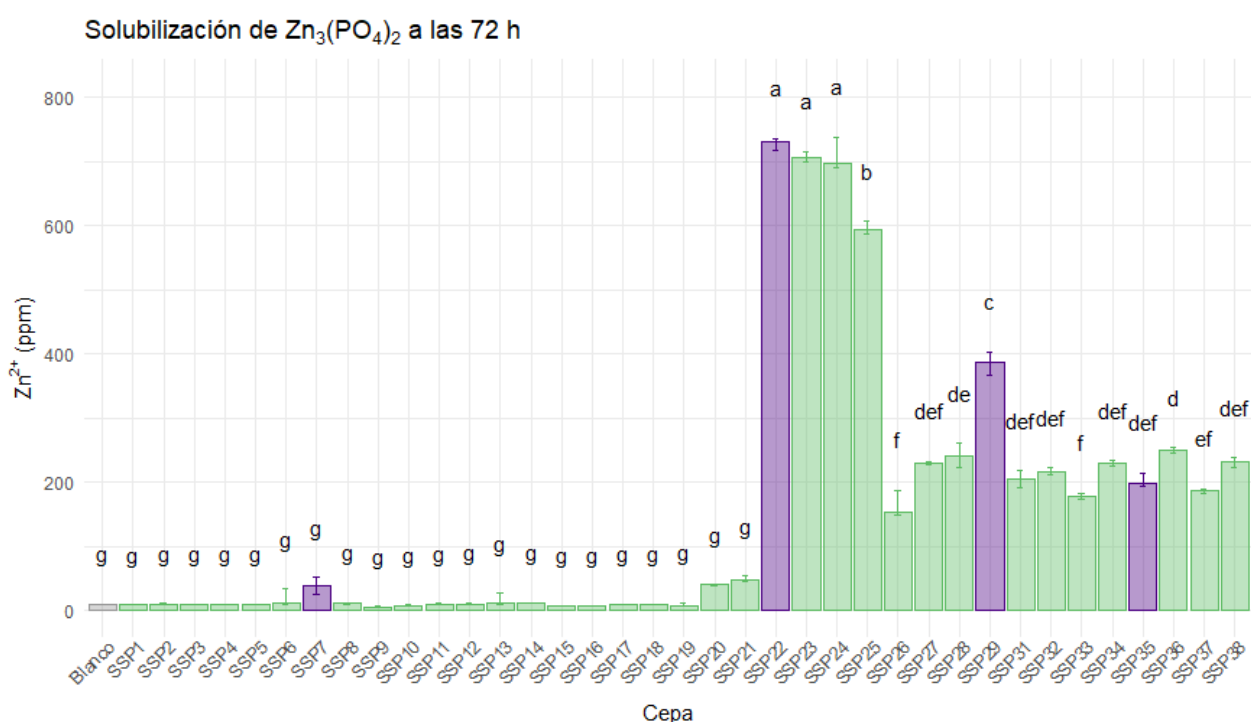


Figura 2. Solubilización de $Zn_3(PO_4)_2$ tras 72 h de incubación.

En gris se indica el Blanco (control negativo), en verde y púrpura las cepas evaluadas, siendo las referenciadas con púrpura las que han sido seleccionadas para siguientes determinaciones. Los resultados se presentan como medianas $\pm$ IQR. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal–Wallis, $p < 0,05$).

4.2 Diferenciación de cepas bacterianas aisladas mediante BOX-PCR (Fingerprinting)

Tras la corrida electroforética se han establecido patrones de bandas que fueron analizados y se estimaron los pesos moleculares de cada banda, utilizando el programa GelAnalyzer v. 23.1.1 (Lazar, 2023), y como referencia, se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (*DNA ladder*). Este patrón permitió realizar un dendrograma de las distintas cepas aisladas (Figura 3), previo a continuar con las evaluaciones, para evitar redundancia de cepas. A partir de esta diferenciación se seleccionaron para los siguientes estudios las cepas SSO1', SSO5, SSP7, SSP22, SSP29 y SSP35.

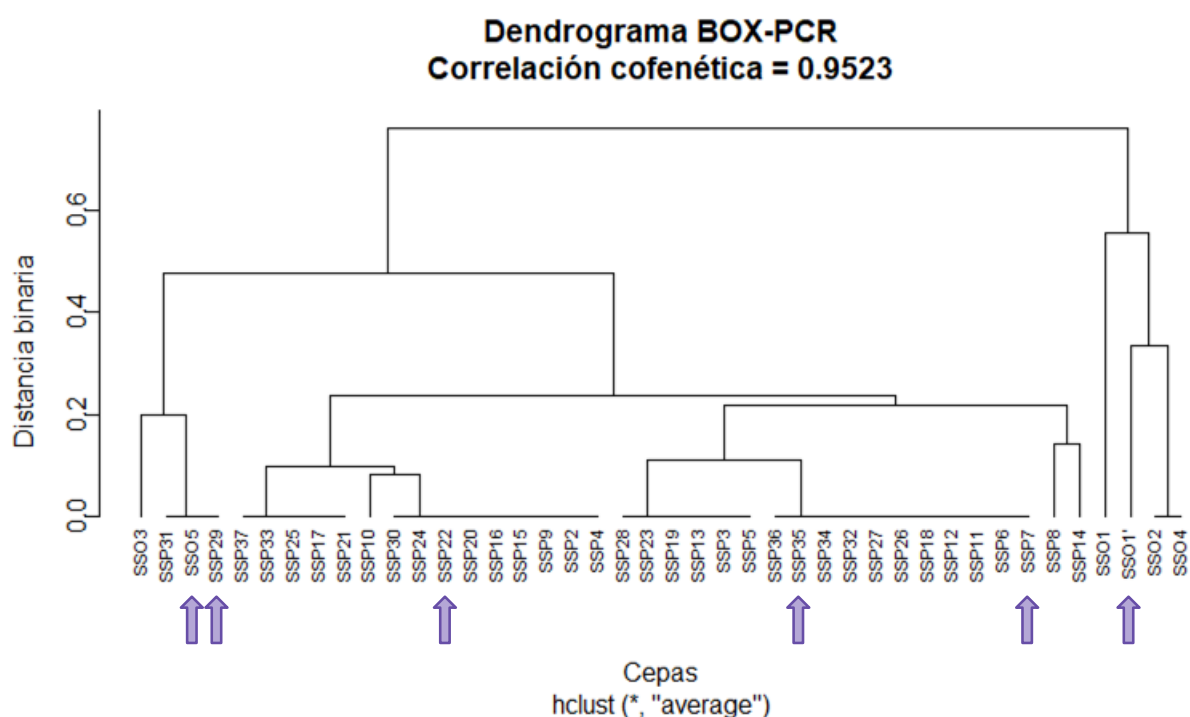


Figura 3. Dendrograma obtenido a partir de la matriz binaria de presencia/ausencia de bandas (BOX-PCR).

Se señala con flechas púrpuras las cepas bacterianas seleccionadas. El agrupamiento se realizó con el método UPGMA (método de enlace promedio). La calidad del ajuste se evaluó mediante correlación cofenética ($r = 0,9523$).

4.3 Criterio de selección - cribado (*screening*)

Como se mencionó en el apartado anterior, se seleccionaron las cepas en función de su comportamiento diferencial en la solubilización de zinc y por presentar patrones de bandas distintos entre sí, lo que aseguró que se trataran de cepas diferentes. Además, se contempló incluir aislamientos provenientes tanto de fuentes de zinc en forma de óxido como de fosfato, con el fin de conservar una adecuada diversidad genotípica.

4.4 Identificación de géneros bacterianos mediante secuenciación del ARNr 16S

El análisis de las secuencias del gen ARNr 16S, validado mediante comparaciones en la base de datos del NCBI y la construcción de un árbol filogenético, permitió la identificación taxonómica de los aislados. Las cepas SSO1' y SSO5 fueron asignadas a los géneros *Acinetobacter* y *Sphingobacterium*, respectivamente. Por su parte, las cepas SSP7, SSP22, SSP29 y SSP35 se identificaron como integrantes del género *Klebsiella*, destacando que todos los aislados provenientes de medios con fosfato de zinc como fuente de baja solubilidad (SSP) pertenecen a este mismo género (Figura 4).

Los géneros identificados en este estudio han sido ampliamente documentados por su carácter ubicuo y su comportamiento oportunista, con presencia en ambientes como el suelo, aire y agua (Duran-Bedolla *et al.*, 2021). En particular, diversas cepas de *Acinetobacter* spp. han sido reportadas como bacterias solubilizadoras de zinc (BSZ) con efectos promotores del crecimiento vegetal, destacándose aislamientos obtenidos de la rizosfera de *O. sativa* (Gandhi & Muralidharan, 2016).

Con respecto a *Klebsiella*, se trata de un género perteneciente a las *Enterobacteriaceae* que se destacan por su notable capacidad de fijación biológica de nitrógeno (Duran-Bedolla *et al.*, 2021) y su eficiencia en la movilización de nutrientes. Además, investigaciones como la de Duca *et al.* (2014) resaltan el rol de estas bacterias en la producción de fitohormonas, específicamente el ácido indolacético (AIA), lo cual favorece el desarrollo radicular y, consecuentemente, la absorción de nutrientes.

Por último, *Sphingobacterium* se distingue por el elevado contenido de esfingolípidos en su membrana celular (Shivaji *et al.*, 1992), propiedad que le confiere una notable resiliencia ante condiciones ambientales adversas. Diversas investigaciones han documentado su impacto positivo como PGPR en cultivos como *Solanum lycopersicum* y *Vigna mungo*, incluso bajo condiciones de estrés salino (Ahmed *et al.*, 2014; Vaishnav *et al.*, 2020).

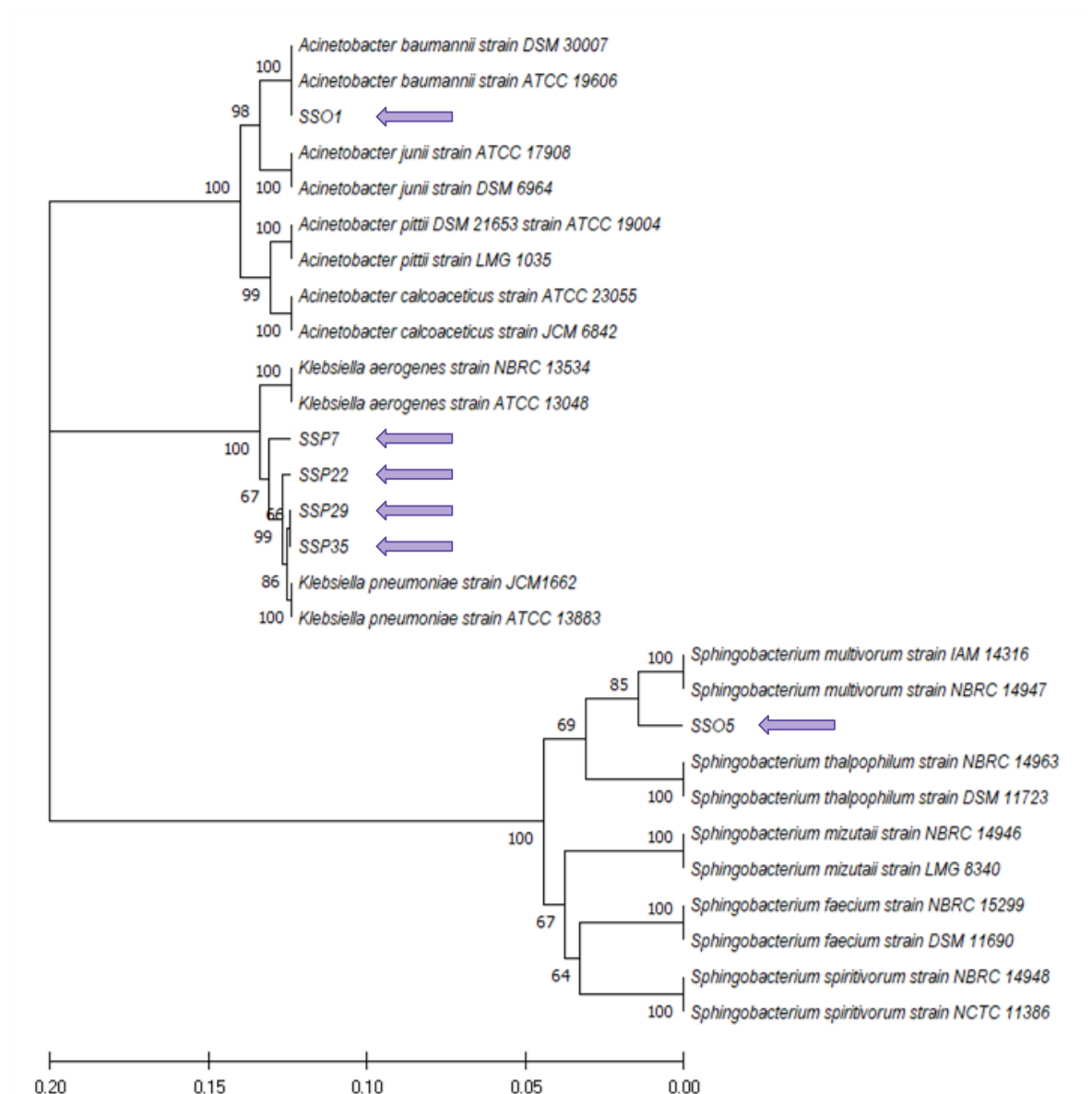


Figura 4. Filogenia del gen del ARN ribosómico 16S de las cepas bacterianas seleccionadas.

Árbol filogenético construido a partir de secuencias ensambladas en contigs y comparadas mediante BLASTn contra la base de datos NCBI. Se incluyeron únicamente secuencias correspondientes a cepas tipo (*type material*). Se aclaran los códigos de colección o identificadores de secuencia en NCBI junto a cada nombre. Se señala con flechas púrpuras las cepas bacterianas seleccionadas. El árbol se generó en MEGA11 utilizando el método UPGMA y el modelo p-distance. Los valores de bootstrap (1.000 réplicas) se muestran junto a las ramas como medida de soporte estadístico.

4.5 Cinética de solubilización de diversas fuentes de zinc y su relación con el pH extracelular

Las cepas seleccionadas fueron evaluadas en medio MM-ZnO obteniendo valores de solubilización acumulada hasta 96 h y muestreando cada 24 h para ver la dinámica de la misma. A modo general se pudo apreciar que aquellas bacterias aisladas de fosfato de zinc (denominadas de modo genérico como “SSP”) presentan menor actividad solubilizadora que las aisladas de medio con óxido de zinc (SSO), siendo congruente con el origen de los mismos (Figura 5).

A su vez, al ver la dinámica de acumulación de Zn^{2+} en el tiempo se aprecia como en las cepas SSO1' y SSO5, los valores incrementan cada 24 h.

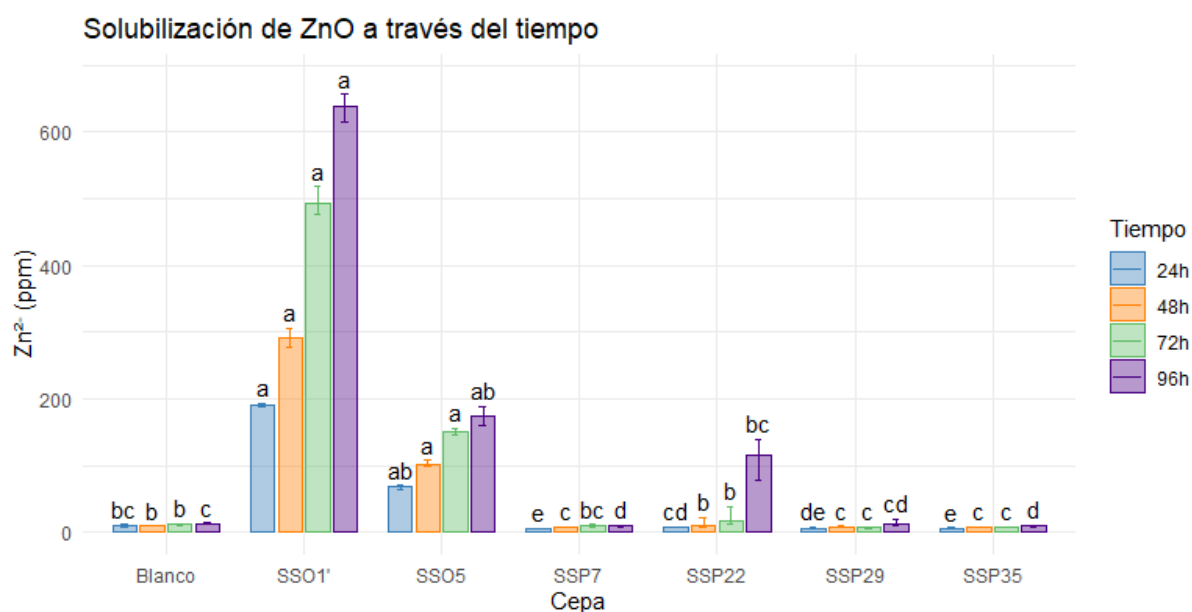


Figura 5. Solubilización de ZnO por las distintas cepas en función del tiempo de incubación.

Cada barra representa la mediana de Zn^{2+} (ppm), mientras que las líneas de error corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3). Los colores diferencian los tiempos de incubación. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre cepas dentro de cada tiempo, determinadas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

Como es ampliamente mencionado y fundamentado por varios autores, la solubilización de minerales por parte de microorganismos es precedida de la

disminución en el pH del medio extracelular, adjudicándose a esta reducción la capacidad de diversas cepas de solubilizar fuentes insolubles de zinc y de fósforo (Maliha *et al.*, 2004). En concordancia, los estudios mostraron que la solubilización de ZnO está relacionada de forma directa con la baja de pH en los cultivos bacterianos, presentando un coeficiente de determinación (R^2) de 0,78 (Figura 6). Por lo que se podría pensar que la solubilización del óxido de zinc es consecuencia de mecanismos implicados en el metabolismo microbiano, ya sea por secreción de ácidos inorgánicos u orgánicos, producción de sideróforos y ligando quelantes (Timofeeva *et al.*, 2022), así como mecanismos aún inciertos.

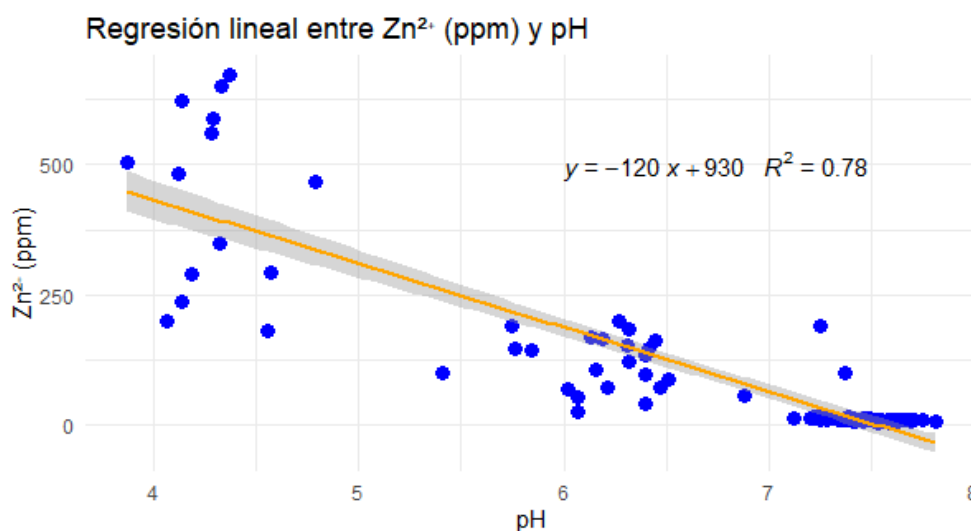


Figura 6. Relación entre el pH y la concentración de Zn^{2+} (ppm) de las cepas cultivadas en ZnO.

Los puntos representan los valores observados, mientras que la línea indica el ajuste lineal con su intervalo de confianza. Se incluye la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) como medida de ajuste.

Cuando se evaluaron las cepas en medio con otra fuente de zinc de baja solubilidad, como fosfato de zinc, se ha observado que, inicialmente (24 y 48 h), en las cepas aisladas del mismo medio se registraron cantidades de zinc significativamente superiores que las aisladas de ZnO. Sin embargo, alcanzadas

las 72 h, las diferencias dejaron de ser significativas, alcanzando niveles similares de solubilización entre ambos grupos (Figura 7).

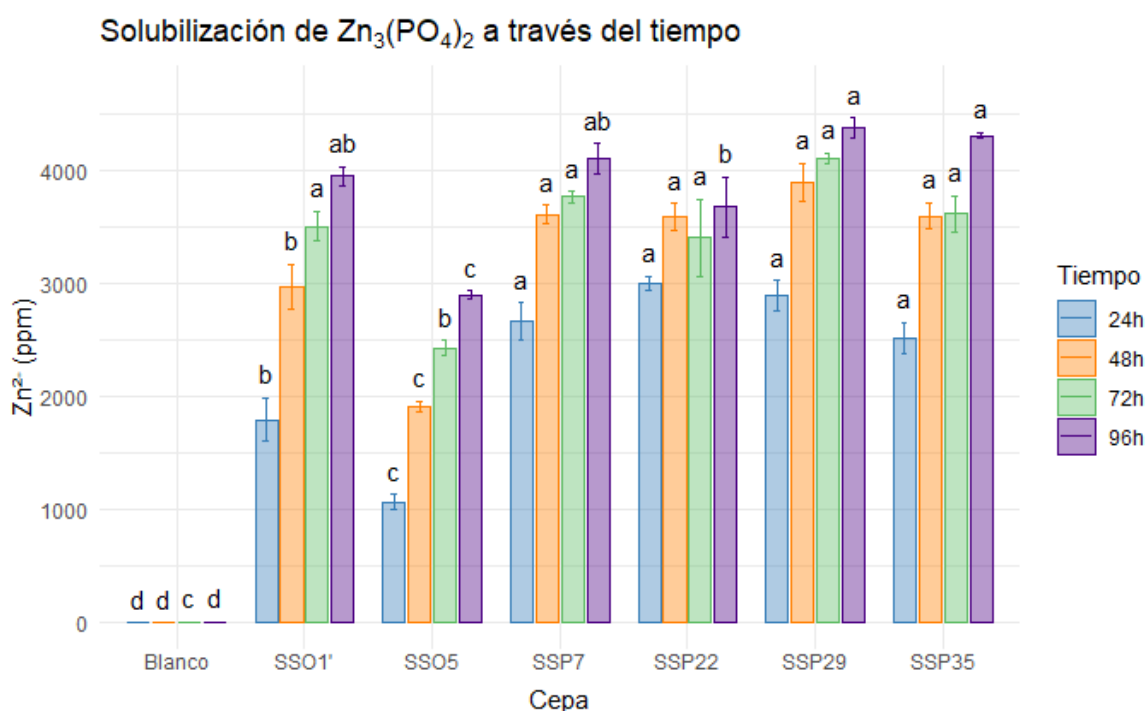


Figura 7. Solubilización de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ por las distintas cepas en función del tiempo de incubación.

Las barras representan la media de Zn^{2+} (ppm) $\pm$ error estándar (SE). Los colores indican cada tiempo de incubación. Las letras sobre las barras señalan diferencias significativas entre las cepas para un mismo tiempo de acuerdo con ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$).

Al igual que el ensayo de cinética de solubilización de ZnO , se midió el pH del medio extracelular y se correlacionó con el zinc solubilizado, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,81 (Figura 8). Esta correlación positiva entre las concentraciones de Zn^{2+} y el descenso del pH permite suponer que la solubilización fue posible por la secreción bacteriana de ácidos al medio extracelular, ya sea de naturaleza orgánica o inorgánica.

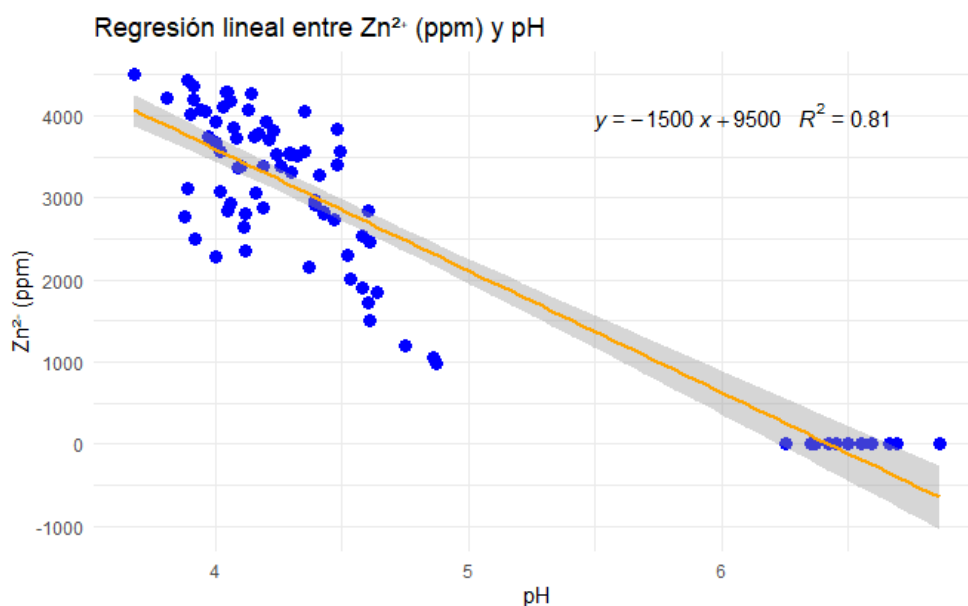


Figura 8. Relación entre el pH y la concentración de Zn^{2+} (ppm) de las cepas cultivadas en $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$.

Los puntos representan los valores observados, mientras que la línea indica el ajuste lineal con su intervalo de confianza. Se incluye la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) como medida de ajuste.

4.6 Producción de indoles con y sin adición de triptófano

La acumulación de compuestos indólicos mostró un incremento progresivo a lo largo del tiempo, siendo este comportamiento más marcado en las cepas aisladas de fosfato de zinc en comparación con aquellas provenientes de óxido de zinc. La suplementación con triptófano potenció significativamente la síntesis, alcanzando concentraciones superiores a 1.500 ppm (Figura 10), mientras que en ausencia del precursor no se superaron las 80 ppm tras 96 h de incubación (Figura 9).

Este máximo de acumulación observado en los cultivos con suplementación de triptófano, hacia las 96 h, coincide con la entrada de los cultivos bacterianos en fase estacionaria, etapa en la que está ampliamente reportado un incremento notable en la producción de compuestos del metabolismo secundario en general, y de indol

en particular, de señales de densidad poblacional (*Quorum Sensing*) y de la limitación de nutrientes (Lee & Lee, 2010).

Asimismo, la producción detectada en el medio no suplementado (Figura 9) sugiere la existencia de vías de biosíntesis independientes de la adición de triptófano externo. Esto indica que las cepas poseen la capacidad metabólica de sintetizar precursores indólicos *de novo* a partir de rutas endógenas (como la ruta del antranilato), lo cual les otorga una ventaja adaptativa en entornos con baja disponibilidad de aminoácidos (Spaepen *et al.*, 2008). Estos autores resaltan que esta capacidad metabólica permite a la bacteria mantener una producción basal de fitohormonas, facilitando la interacción inicial bacteria-planta en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes.

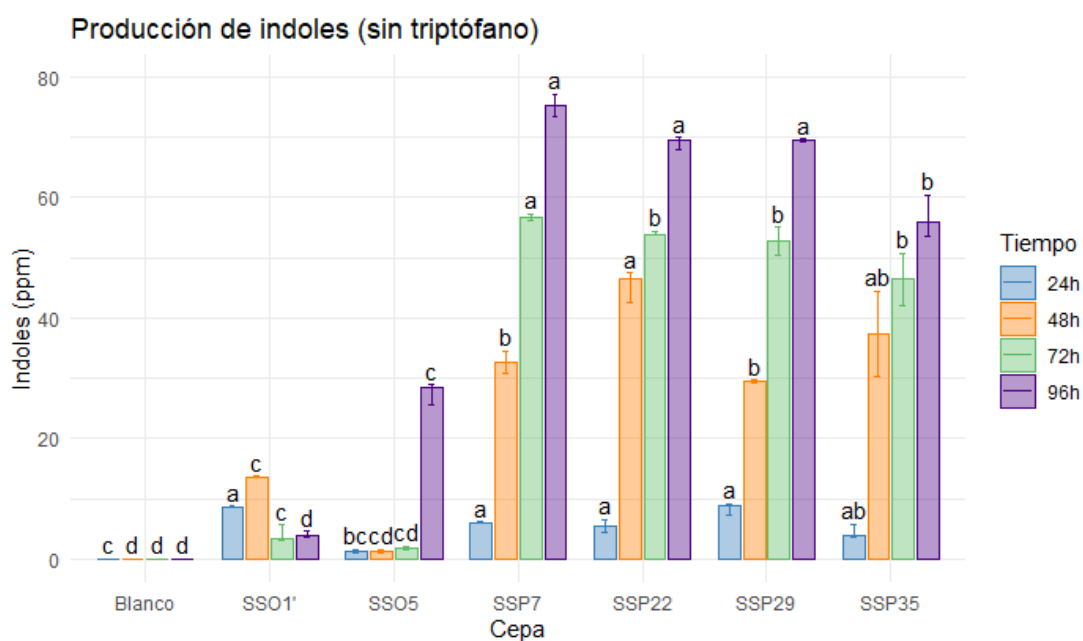


Figura 9. Producción de indoles por las diferentes cepas a lo largo del tiempo, sin suplementación de triptófano.

Las barras representan la mediana de los valores, con líneas de error que indican el rango intercuartílico (Q1–Q3). Los colores corresponden a cada tiempo de incubación. Las letras sobre las barras señalan diferencias significativas entre cepas para el mismo tiempo de evaluación: para 24h y 96h se aplicó ANOVA seguido de Tukey, mientras que para 48h y 72h se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

Los niveles de compuestos indólicos observados en las cepas suplementadas con triptófano (Figura 10), que superaron los 1.500 ppm, categorizan a los aislamientos SSP como “super-productores” de auxinas. Estos valores, aunque significativamente superiores a los promedios reportados para PGPR convencionales, guardan consistencia con lo hallado por Mohite (2013), quien describe el comportamiento de cepas de la rizosfera con una capacidad de síntesis exacerbada ante altas concentraciones del precursor. Esta respuesta metabólica sugiere que en estas cepas la ruta del indol-3-piruvato opera con una alta eficiencia enzimática y una baja inhibición por producto final, permitiendo una acumulación masiva de AIA durante la fase estacionaria (Apine & Jadhav, 2011).

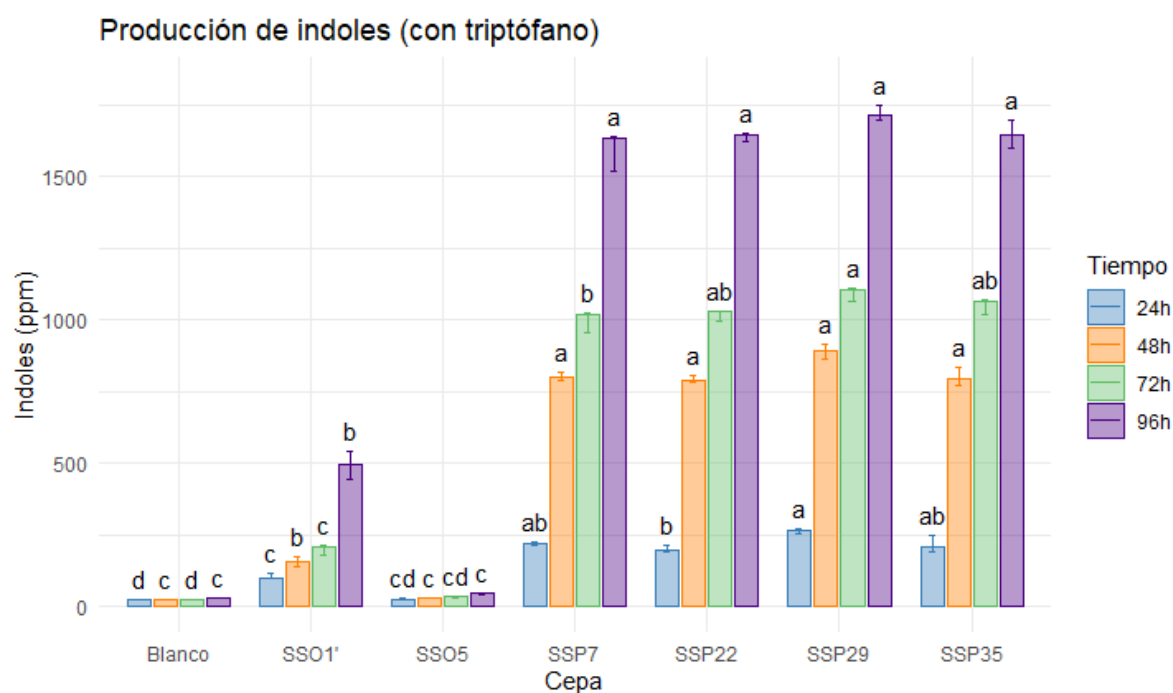


Figura 10. Producción de indoles por las diferentes cepas a lo largo del tiempo, con suplementación de triptófano.

Las barras muestran la mediana de los valores, con líneas de error que representan el rango intercuartílico (Q1–Q3). Los colores corresponden a cada tiempo de incubación. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre cepas para el mismo tiempo de incubación: en los tiempos con distribución normal (48h y 96h) se aplicó ANOVA seguido de la prueba de Tukey, mientras que en los tiempos sin normalidad (24h y 72h) se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

4.7 Solubilización de fosfato

El análisis de solubilización de fósforo, como ion ortofosfato, ha permitido diferenciar a la cepa SSO5 del resto, dado que siempre se encuentra con valores de $(\text{PO}_4)^{3-}$ inferiores que las demás cepas evaluadas (Figura 11); y, a pesar de su leve tendencia a solubilizar, no llega a diferenciarse de forma significativa con el control negativo. La otra cepa proveniente del aislamiento de ZnO, SSO1', también, a las 24 y 48 h de incubación se encuentra por debajo de los valores de solubilización de las demás cepas. A las 72 h y 96 h, salvo para SSO5, las cepas dejan de tener diferencias significativas entre ellas, con una leve disminución de la concentración de ortofosfato extracelular transcurridas las 96 h.

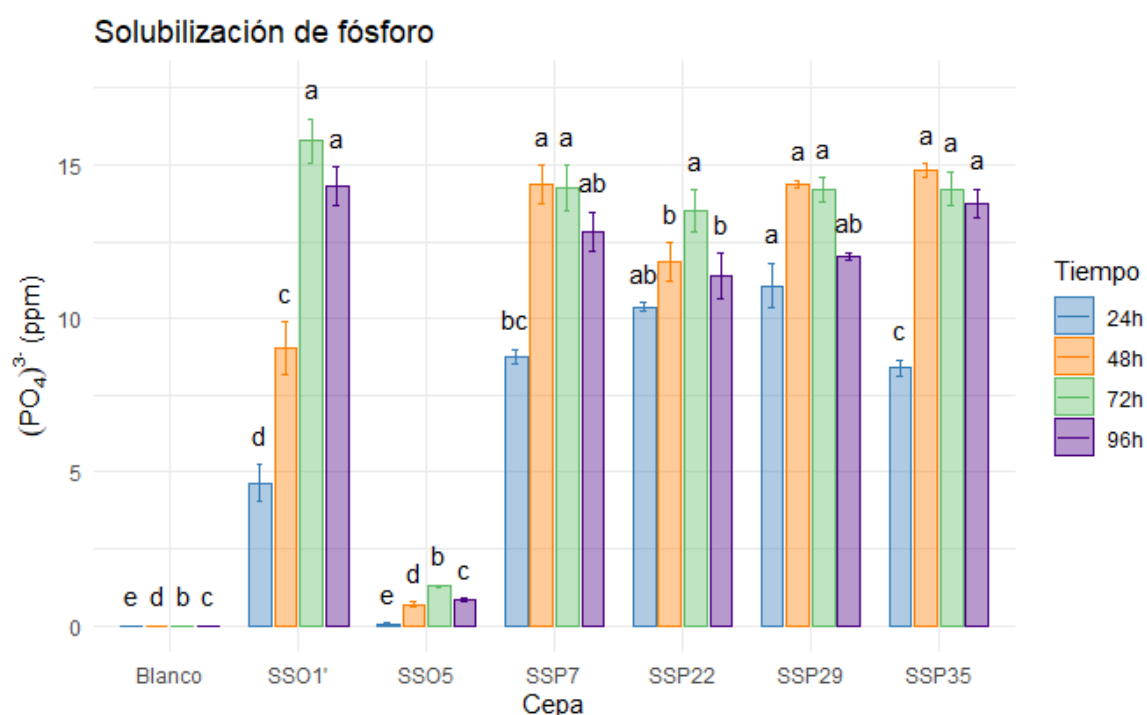


Figura 11. Cinética de solubilización de fosfato por las diferentes cepas en medio NBRIP.

Las barras muestran la media de la concentración (ppm) del ion ortofosfato $(\text{PO}_4)^{3-}$ en el sobrenadante del medio de cultivo bacteriano $\pm$ error estándar (SE). Los colores corresponden a cada tiempo de incubación. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre cepas para el mismo tiempo de incubación de acuerdo con ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Del mismo modo que se ha relacionado la solubilización de zinc con la disminución del pH extracelular, se procedió con la solubilización de fósforo. En este caso, la correlación lineal resultó presentar un coeficiente de determinación (R^2) de 0,57 (Figura 12), lo que sugiere una correlación moderada o débil entre ambas variables. Este hallazgo resulta de particular interés ya que disiente de los resultados que se obtuvieron para fuentes de zinc (Figura 6 y 8), además de lo reportado en trabajos similares para fuentes de fósforo (Panhwar *et al.*, 2009). Tanto Bakki *et al.* (2024) como Bargaz *et al.* (2021) sostienen que el principal mecanismo por el cual las bacterias solubilizan el fosfato mineral es la secreción de ácidos orgánicos. En este sentido, estudios enfocados en la identificación de dichos metabolitos, como los realizados por Zuluaga *et al.* (2023), han descrito la producción de ácidos cítrico, fumárico, cetoglutarico, málico y oxálico por *Enterobacter* spp., los cuales intervienen directamente en la solubilidad y biodisponibilidad del fósforo. Estos resultados incentivan a indagar sobre qué mecanismos utilizan las cepas bacterianas en estudio para solubilizar fuentes de fósforo de baja solubilidad y si estos se diferencian de los empleados para las fuentes de zinc.

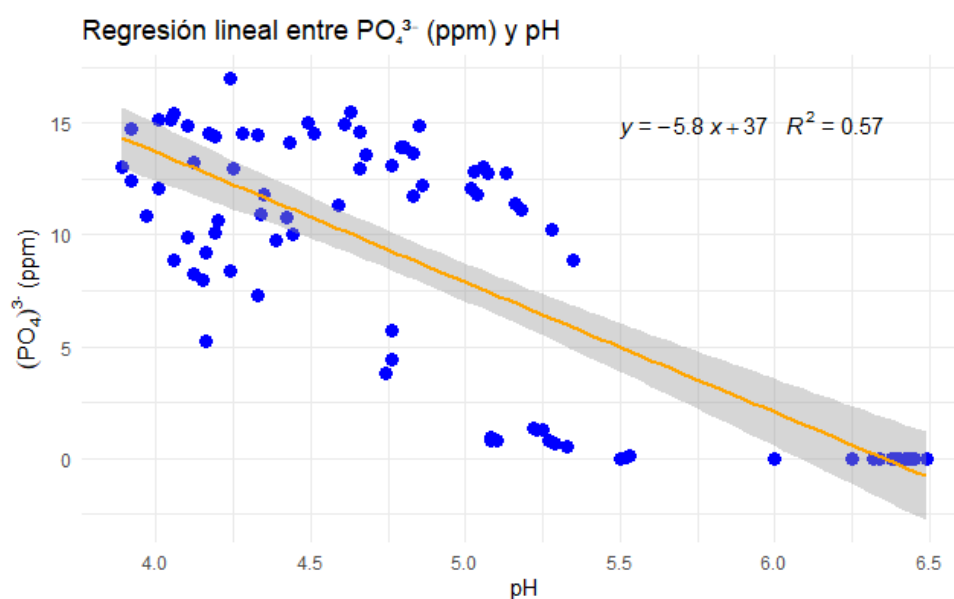


Figura 12. Relación entre el pH y la concentración de ortofosfato (ppm) en medio NBRIP.

Los puntos azules representan los valores observados. La línea naranja corresponde al ajuste lineal con su intervalo de confianza. Se incluye la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) como medida de ajuste.

4.8 Actividad ureasa

Al evaluar la actividad ureasa, se identificó que únicamente la cepa SSO5 presentó una fuerte capacidad ureolítica, coincidiendo con lo expuesto por Du *et al.* (2015), quién determina esta actividad en especies del género *Sphingobacterium*.

La respuesta positiva se manifestó mediante un cambio cromático uniforme en todo el estrato del medio tras la incubación, lo que indicó una secreción eficiente de la enzima y la consecuente liberación de amoníaco (NH_3). Al ser una base débil, el amoníaco reacciona con el agua del medio generando grupos oxhidrilos (OH^-), cuya acumulación provoca la alcalinización del entorno. Este incremento del pH es el causante del viraje del indicador rojo de fenol, presente en el medio de cultivo, de amarillo a rosado/fucsia, confirmando así la hidrólisis de la urea por parte de la cepa.

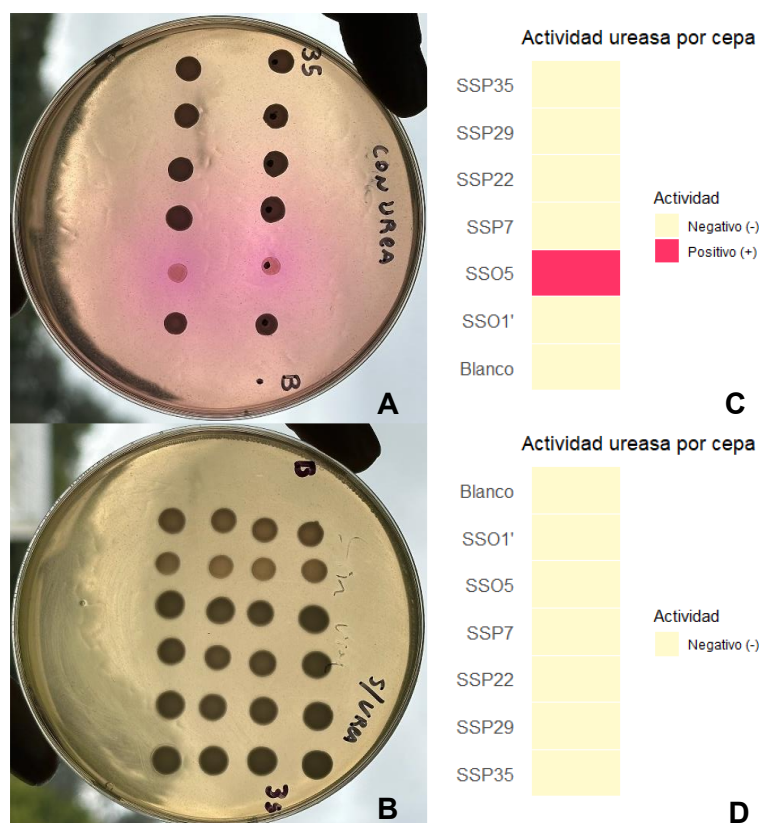


Figura 13. Perfil de actividad ureasa en cepas seleccionadas.

Evaluación cualitativa de la actividad ureolítica mediante el viraje de color en medio Christensen (MC). **(A)** Ensayo de gota (*drop plate*) en medio suplementado con urea; se presentan dos réplicas técnicas por cepa y un control negativo (Blanco), dispuestos en orden descendente: SSP35, SSP29, SSP22, SSP7, SSO5, SSO1' y Blanco. **(B)** Control de crecimiento en medio MC sin suplementación de urea, junto a su correspondiente *heatmap* de control **(D)** que confirma la ausencia de viraje inespecífico. **(C)** *Heatmap* de actividad binaria: presencia (+, rosado) o ausencia (–, amarillo) de actividad. Se observan cuatro réplicas técnicas con el orden de siembra invertido respecto a la placa A (Blanco, SSO1', SSO5, SSP7, SSP22, SSP29 y SSP35).

4.9 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

La cuantificación de amoníaco (NH_3) se realizó mediante una curva de calibración que presentó un ajuste lineal con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9795, garantizando la confiabilidad de los valores determinados.

En cuanto a la capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FBN), las cepas aisladas a partir de fosfato de zinc (SSP7, SSP22, SSP29 y SSP35) mostraron los mayores niveles de acumulación, sin diferencias significativas entre sí. A

continuación, la cepa SSO1' con una capacidad intermedia, no diferenciándose significativamente de la cepa SSP22. Por el contrario, la cepa SSO5 no presentó diferencias significativas respecto al control negativo (blanco), indicando una actividad nula o despreciable bajo las condiciones ensayadas (Figura 14).

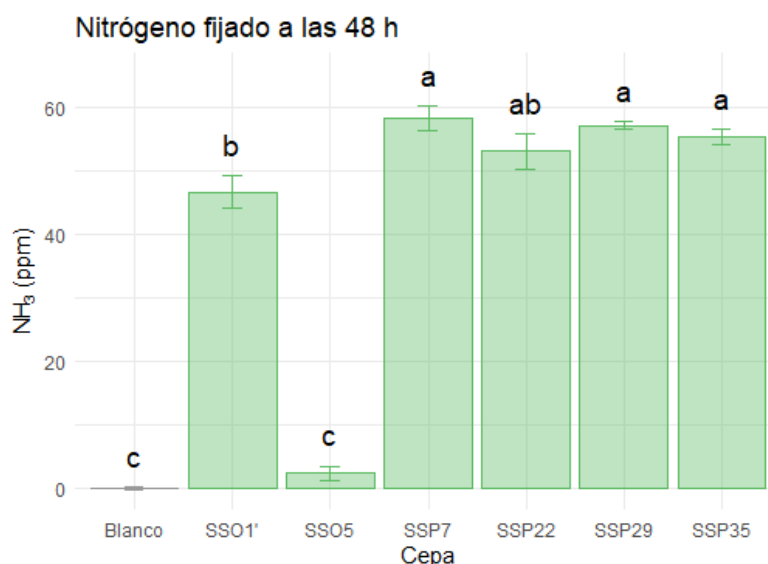


Figura 14. Capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FBN) de las diferentes cepas.

Los valores se expresan en partes por millón (ppm) de NH₃ acumulado en el medio tras 48 h de incubación sin agitación. Las columnas representan la media, mientras que las líneas de error indican el error estándar (SE). Las letras sobre las mismas denotan diferencias significativas entre las cepas, de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

Es interesante notar que las cepas aisladas del MM-Zn₃(PO₄)₂, identificadas como *Klebsiella* spp., presentan resultados de fijación de nitrógeno consistentes con lo descrito en la literatura. En este género, dicha capacidad está respaldada por la presencia y expresión del complejo de genes *nif* (específicamente *nifH*), los cuales codifican para la enzima nitrogenasa responsable de la reducción del N₂ atmosférico (Glöer *et al.*, 2008). Esta coincidencia refuerza el potencial biotecnológico de estos aislamientos no solo en la solubilización de minerales, sino también como diazótrofos de vida libre.

4.10 Curvas de crecimiento bacteriano

Con el objetivo de determinar las concentraciones de células bacterianas viables previo a los ensayos de interacción con plantas, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano (Figura 15). Para cada cepa se estableció la relación entre la densidad óptica (DO) y el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). En todos los casos, el modelo mostró un buen ajuste a los datos experimentales, con coeficientes de determinación (R^2) elevados, indicando que la densidad óptica constituye un predictor confiable de la concentración celular en las cepas evaluadas. Fan *et al.* (2020), Fan & Smith (2021) y Romero *et al.* (2019) plantean algo similar; inocularon plántulas o semillas ajustando las concentraciones microbianas tras medir la absorbancia a 600 nm de longitud de onda.

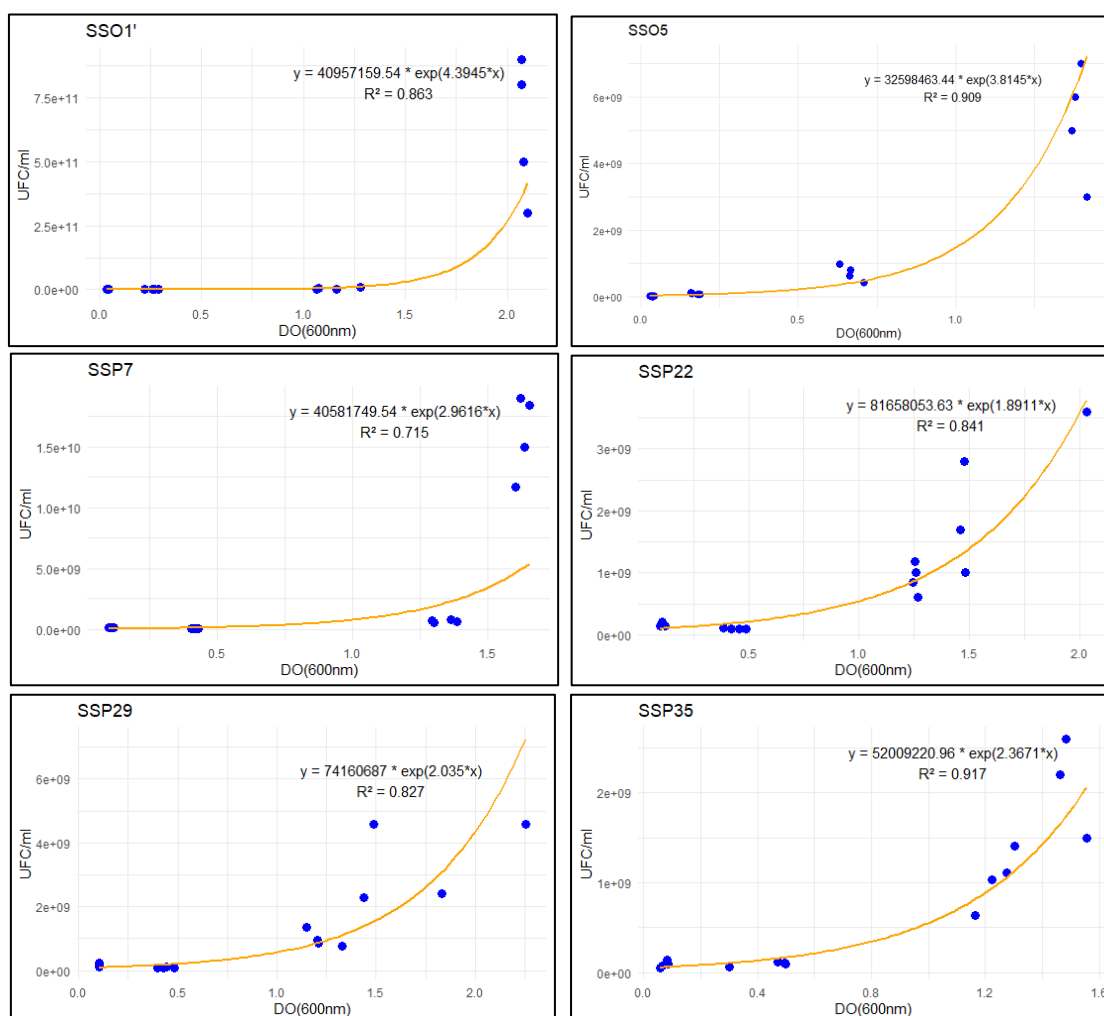


Figura 15. Curvas de crecimiento bacteriano.

Las curvas relacionan la densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) con las unidades formadoras de colonia (células bacterianas viables) por mililitro (UFC/mL), registradas cada 2 horas durante un período total de 6 horas de incubación. Los puntos azules representan los valores observados, mientras que la línea naranja corresponde al ajuste exponencial. Se incluye la ecuación del modelo y el coeficiente de determinación ajustado (R^2) como medida de la calidad del ajuste.

4.11 Eficiencia de encapsulación bacteriana

Tras la caracterización e identificación de las cepas bacterianas seleccionadas por la capacidad de solubilizar Zn, se evaluó la respuesta a la interacción en planta modelo (arroz). Con el fin de reducir la extensión del ensayo, y considerando que las cepas aisladas del $MM-Zn_3(PO_4)_2$ fueron identificadas todas como *Klebsiella* spp., se descartaron de las siguientes evaluaciones las cepas SSP29 y SSP35, manteniendo la variabilidad descrita en el punto 4.3. En consecuencia, la preparación de las perlas coloidales se limitó únicamente a las cepas SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22, que posteriormente fueron utilizadas para la inoculación de plantas cultivadas en suelo.

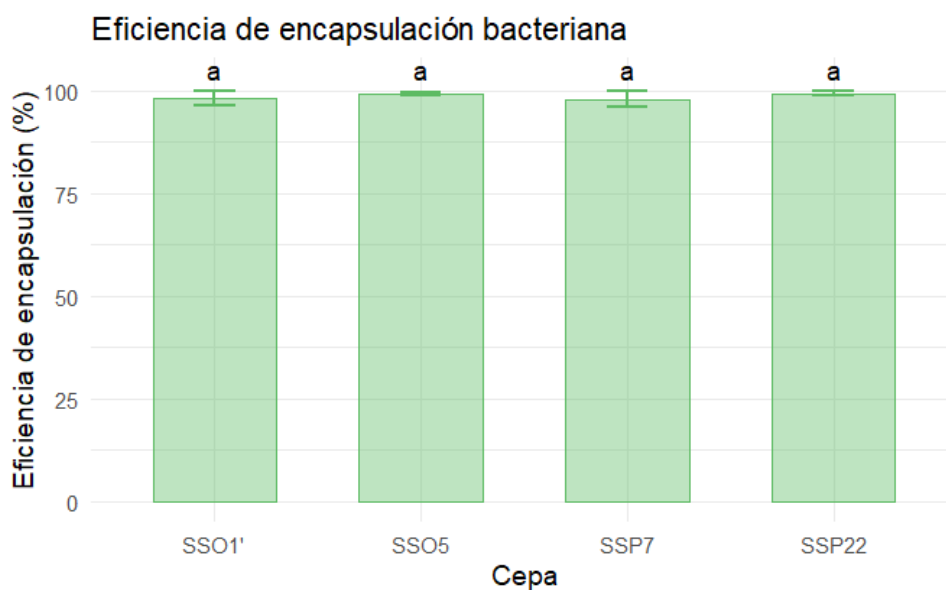


Figura 16. Eficiencia de encapsulación bacteriana en perlas coloidales.

Las bacterias se encapsularon e inmediatamente se cuantificaron las UFC/mL para determinar la concentración bacteriana. La eficiencia de encapsulación se calculó como el logaritmo en base 10 de las UFC/mL dividido por el logaritmo en base 10 de las inoculadas (10^7 UFC/mL). Las barras muestran la media $\pm$ error estándar de cuatro repeticiones biológicas. Las letras indican diferencias significativas entre cepas (ANOVA seguido de prueba de Tukey, $p < 0,05$).

La encapsulación bacteriana resultó completamente exitosa en las cuatro cepas evaluadas, manteniendo la concentración inicial inoculada de 10^7 UFC/mL. Este resultado confirma la estabilidad del método, que se presenta como una herramienta útil para la posterior inoculación de plantas, tanto en condiciones controladas en maceta como en ensayos a campo.

4.12 Viabilidad bacteriana mediante refrigeración en perlas coloidales

La encapsulación bacteriana no solo simplifica la administración de un inoculante en diferentes condiciones experimentales, sino que también constituye un método de conservación de las cepas para su posterior uso a corto plazo. Por ello, se evaluó la viabilidad de las bacterias encapsuladas tras 28 días de conservación en frío ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Al finalizar dicho período, las perlas coloidales mantuvieron la viabilidad de todas las cepas por igual (Figura 17), mostrando únicamente una leve tendencia a la reducción, sin diferencias estadísticamente significativas entre el día 0 y el día 28, independientemente del género bacteriano considerado.

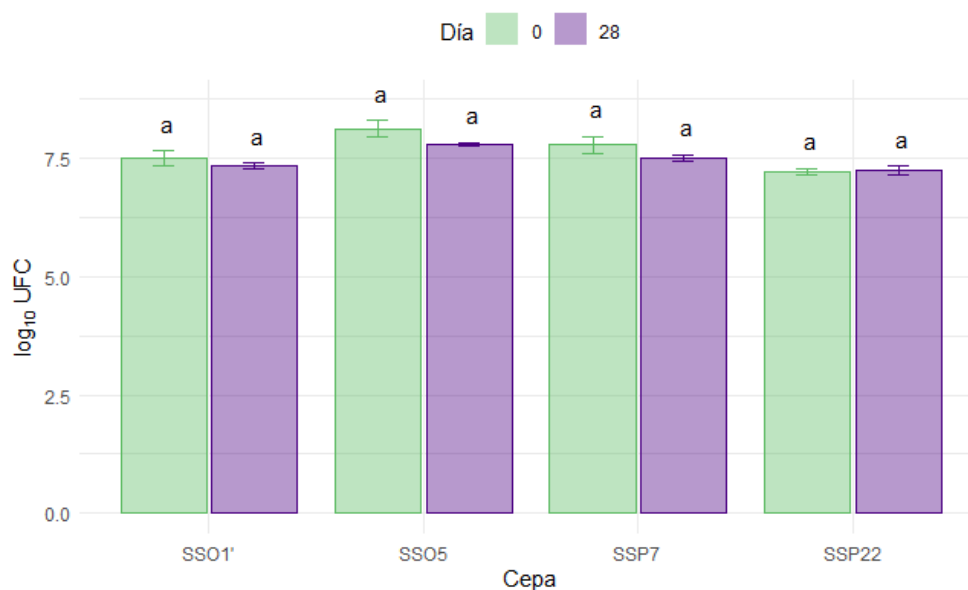


Figura 17. Viabilidad de las cepas bacterianas encapsuladas tras un período de 28 días de refrigeración.

Las barras muestran la media $\pm$ error estándar (SE). Los colores indican el día de evaluación (verde = día 0; púrpura = día 28). Letras distintas sobre las barras señalan diferencias significativas entre días de evaluación para una misma cepa según ANOVA seguido de comparaciones post-hoc ($p < 0,05$).

4.13 Tasa de liberación bacteriana en suelo

Al momento de iniciar el ensayo (día 0) se inoculó, en promedio, a razón de $3,26 \times 10^4$; $9,26 \times 10^4$; $4,88 \times 10^4$ y $2,75 \times 10^4$ UFC/gramo de suelo para las cepas SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22, respectivamente. A medida que transcurría el tiempo, se determinó la dinámica de liberación bacteriana desde las perlas coloidales utilizadas como inoculante en los ensayos *in planta*. Luego de 5 días, la concentración bacteriana viable en el suelo no presentó diferencias significativas entre las cepas, aunque se observó una tendencia al aumento (Figura 18). A los 10 días, los valores registrados para las cepas SSO1', SSO5 y SSP22 fueron significativamente mayores, pero no para SSP7. Al día 30, las concentraciones dejaron de mostrar diferencias significativas respecto de los días previos, indicando que estadísticamente la concentración bacteriana al mes es equivalente a la

registrada al inicio del tratamiento. Estos resultados permiten inferir una tasa de liberación paulatina de las bacterias desde las perlas hacia el suelo, así como su supervivencia y multiplicación en este ambiente. Esto complementa investigaciones como la de Hernández-Martínez *et al.* (2022), quienes también han encapsulado bacterias con actividad PGPR.

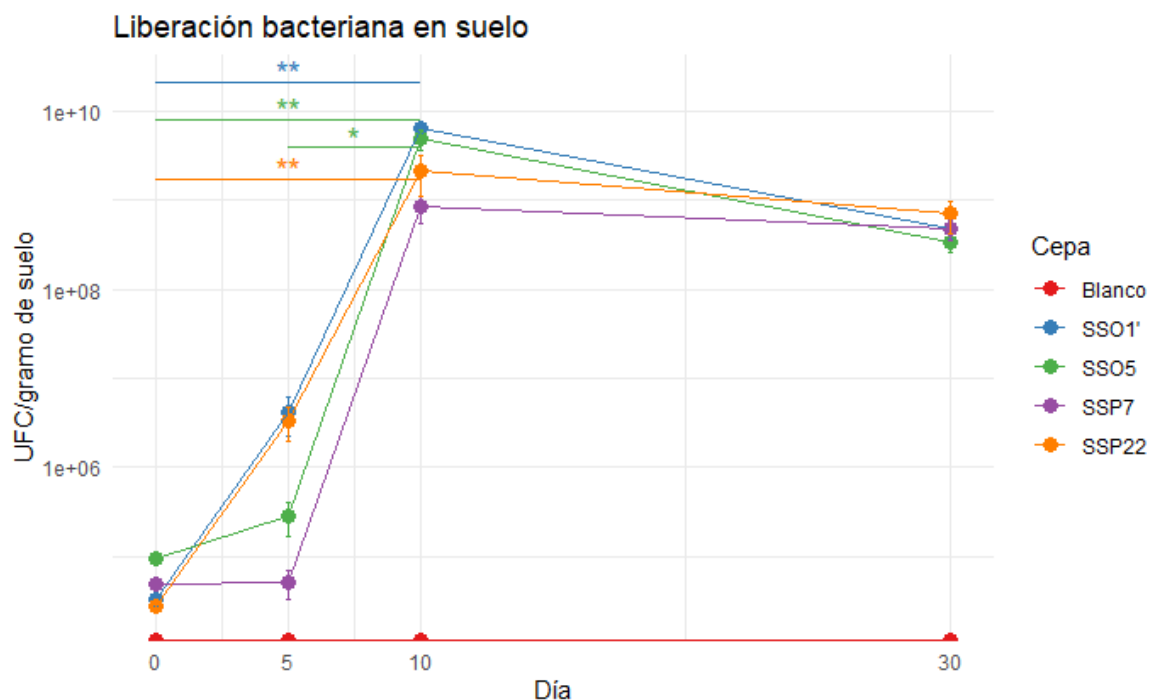


Figura 18. Liberación y persistencia bacteriana en suelo.

Expresada como UFC/gramo de suelo en escala log10 para las distintas cepas evaluadas. Los puntos representan la media $\pm$ error estándar (SE) en cada día de muestreo (0, 5, 10 y 30 días post-inoculación). Las líneas conectan los valores medios por cepa. Los corchetes indican las comparaciones realizadas entre días (principalmente entre el día 0 y el día 10, y en un caso entre los días 5 y 10). Los símbolos señalan diferencias significativas según el test de Dunn con corrección de Bonferroni ($p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**)).

4.14 Efecto de la interacción *in planta* con *Oryza sativa*

Con el fin de estudiar la interacción bacteriana en una matriz compleja, se evaluó el efecto de la inoculación en plantas de *Oryza sativa* L. var. *Cambá* bajo condiciones semicontroladas en macetas con suelo (*in planta*). En esta instancia, no se registraron diferencias significativas en ninguna de las variables respuesta

evaluadas (Figura 19). Los tratamientos inoculados con las distintas cepas bacterianas mostraron un comportamiento estadísticamente equivalente al control no inoculado (Blanco) en todos los parámetros analizados: número de macollos, altura de planta, peso fresco y seco aéreo y porcentaje de materia seca.

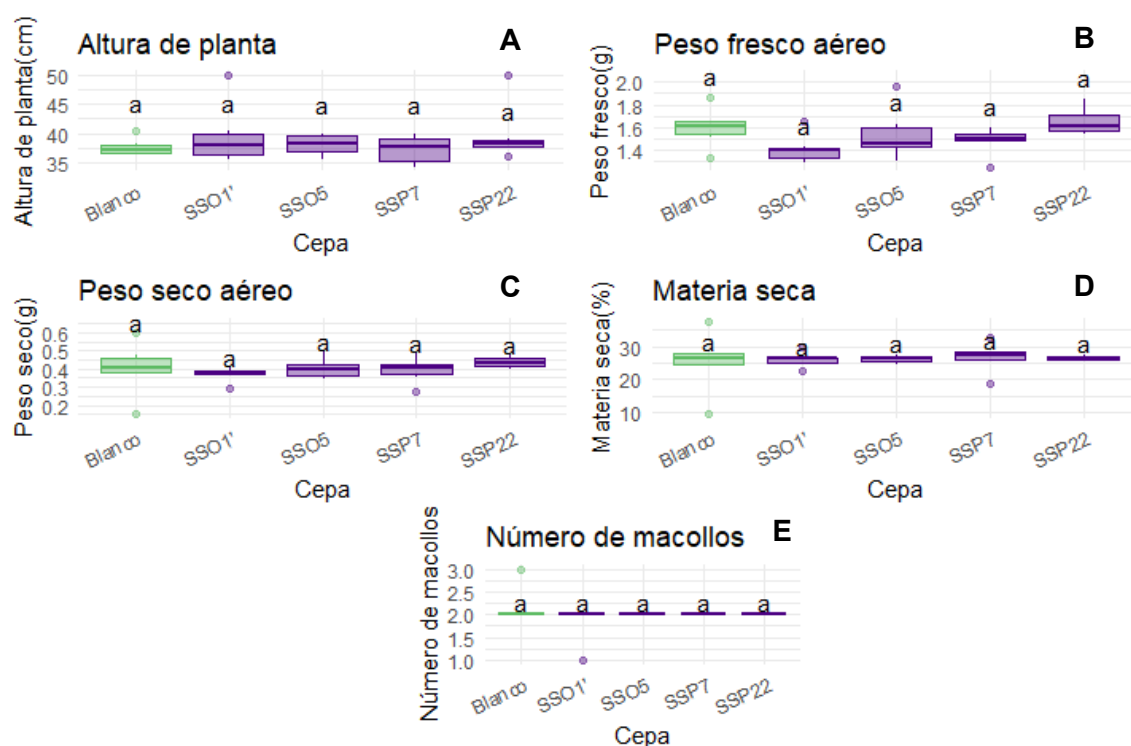


Figura 19. Variables de crecimiento y biomasa de *Oryza sativa* L. luego de la inoculación con las cepas bacterianas *in planta*.

El panel integra las variables de: (A) Altura de planta (cm); (B) Peso fresco total (g); (C) Peso seco total (g); (D) Materia seca (%) y (E) Número de macollos por planta. Se comparan los efectos de los aislamientos SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22 frente al control no inoculado (Blanco). Las cajas representan la distribución de los datos con su respectiva mediana y rango intercuartílico. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) tras el análisis de ANOVA y test de Tukey (para datos paramétricos) o Kruskal-Wallis y test de Dunn (para datos no paramétricos).

El análisis del contenido de clorofila total reveló un comportamiento homogéneo entre todos los grupos evaluados, sin registrarse variaciones significativas tras la inoculación con las diferentes cepas bacterianas. Como se observa en la Figura 20, los niveles de pigmentos en las plantas tratadas se mantuvieron en niveles equivalentes a los del grupo control. Esta estabilidad sugiere que la interacción con

los aislados SSO y SSP no interfiere con la síntesis de clorofila ni altera el estado nutricional nitrogenado del cultivo de arroz bajo las condiciones del ensayo.

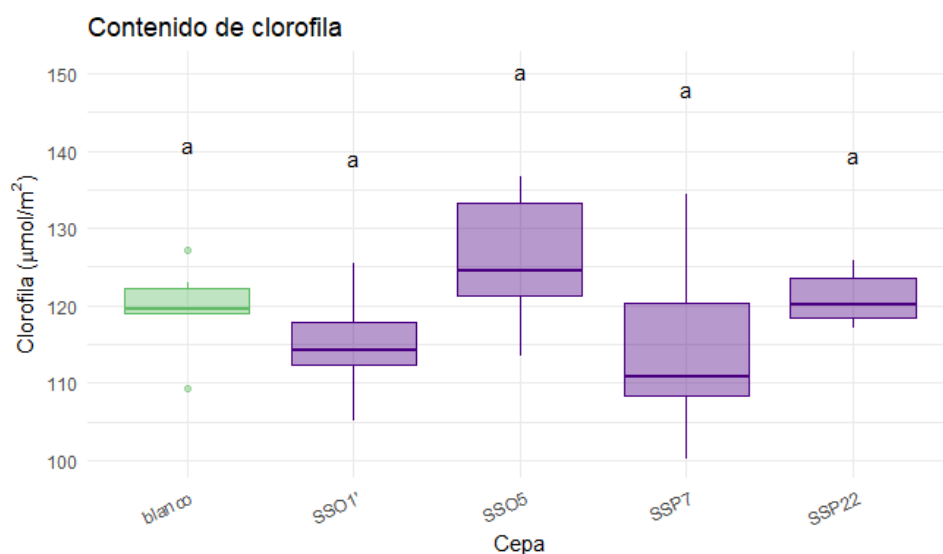


Figura 20. Contenido de clorofila total en hojas de *Oryza sativa* L. inoculadas con las cepas bacterianas *in planta*.

Las cajas representan los cuartiles de la distribución y la línea interna indica la mediana. Las unidades se expresan en densidad de flujo de clorofila ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$). Letras iguales sobre las cajas indican la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p > 0,05$).

El análisis del estado fisiológico de las plantas de arroz inoculadas con las cepas SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22 no mostró alteraciones negativas en la maquinaria fotosintética. Cabe aclarar que el estudio de parámetros de fluorescencia de la clorofila se posiciona como una metodología no destructiva que funciona como indicador de estrés e incluso permite predecir el rendimiento en diversos cultivos, incluido el arroz (Rodríguez *et al.*, 2023). Por lo tanto, se puede afirmar que estas bacterias no ejercen efectos nocivos sobre los parámetros de estrés en plantas crecidas en suelo, lo que sugiere su inocuidad respecto a la sanidad vegetal.

Los parámetros derivados de la fluorescencia inducida de la clorofila a (JIP-test) se mantuvieron en niveles comparables al tratamiento control (Blanco), con valores de F_v/F_m situados en el rango de 0,78 a 0,81, lo cual es indicativo de plantas

saludables y sin daño fotoinhibitorio en el Fotosistema II (PSII). Aunque se observaron variaciones numéricas en parámetros como el índice de rendimiento (PI abs) y la densidad de centros de reacción activos (RC/CS), el análisis estadístico mediante la prueba de Dunnett confirmó que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las cepas evaluadas y el Blanco (Figura 21). La cepa SSO1' presentó la mayor tendencia incremental en la densidad de centros activos (RC/CS = 1,12 relativo al Blanco), mientras que la cepa SSP7 exhibió la mayor reducción en el índice de rendimiento absoluto (PI abs = 0,65), aunque con una alta variabilidad intrínseca que impidió alcanzar significancia estadística.

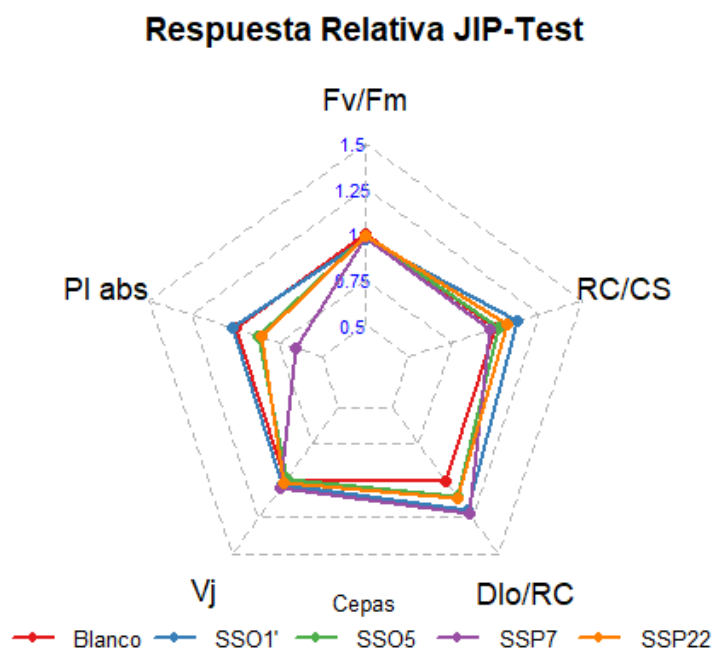


Figura 21. Perfil multivariado de parámetros de fluorescencia de clorofila a (JIP-test) de *Oryza sativa* L. inoculadas con las cepas bacterianas *in planta*.

Los valores representan el promedio de 6 repeticiones, normalizados respecto al tratamiento control (Blanco = 1,0). No se observaron diferencias significativas entre las cepas bacterianas y el Blanco para ninguno de los parámetros evaluados (Dunnett, $p > 0,05$). Fv/Fm: eficiencia cuántica máxima; PI abs: índice de rendimiento; Vj: cierre de centros de reacción; Dlo/RC: disipación térmica; RC/CS: centros de reacción activos.

El ensayo *in planta* se enfocó en verificar la inocuidad de la interacción bacteria-planta. Debido a la dificultad para garantizar una deficiencia de zinc edáfica fehaciente, este estado se indujo de forma controlada mediante condiciones *in vitro*.

4.15 Efecto de la interacción *in vitro* con *Oryza sativa*

Para las evaluaciones de crecimiento de plántulas de *O. sativa in vitro*, se emplearon medios de cultivo con suficiencia (+Zn) y deficiencia (-Zn) de zinc. Como variables de respuesta asociadas a la morfología radicular, se analizó el largo, el peso fresco y la longitud radicular específica (LRE); esta última utilizada como indicador de la densidad radicular. Asimismo, se determinó el peso fresco de la sección aérea y la relación entre la biomasa aérea y radicular (A/R).

En cuanto al largo radicular (Figura 22), se observó de manera general que no existieron diferencias significativas entre los medios de cultivo (+Zn y -Zn), manteniendo las cepas tendencias de comportamiento similares, independientemente de la disponibilidad de zinc. En el análisis intercepa, los aislamientos SSO1' y SSO5 mostraron un desempeño estadísticamente equivalente al control (Blanco). Por el contrario, las cepas SSP7 y SSP22 se distinguieron significativamente del resto, con excepción de la condición de suficiencia de zinc, donde la SSP22 no alcanzó diferencias significativas respecto al control.

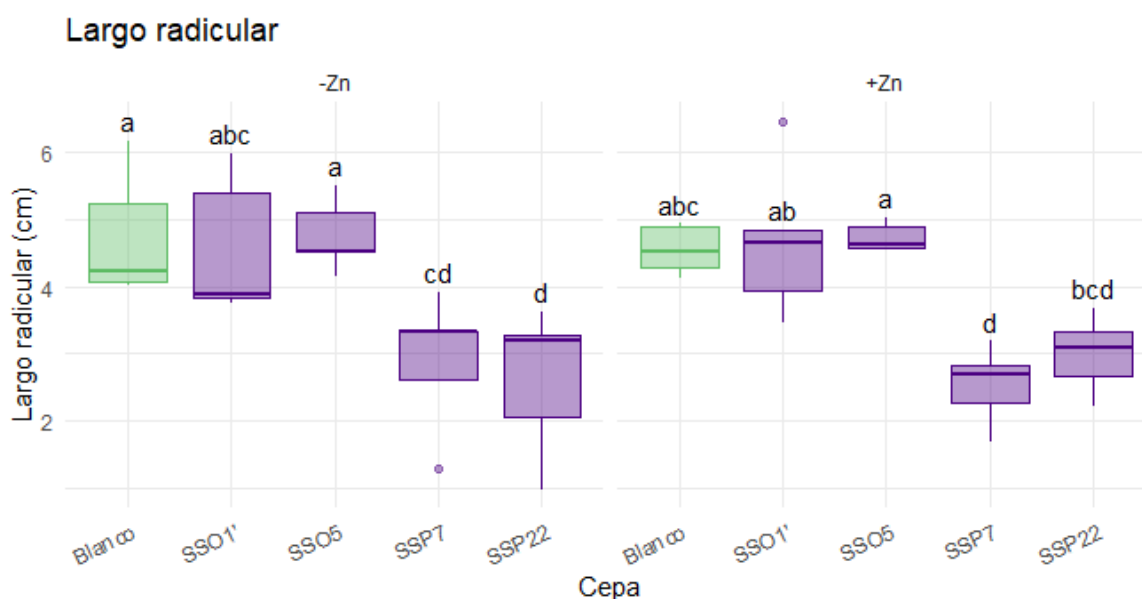


Figura 22. Largo radicular de plántulas de *Oryza sativa* cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.

Se representa la longitud máxima alcanzada por la raíz (cm) tras 14 días de crecimiento en medios con deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc. Se comparan los efectos de las cepas SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22 frente al control no inoculado (Blanco). Las cajas representan la distribución de los datos; las letras indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$), permitiendo la comparación tanto entre cepas dentro de un mismo medio como entre los dos regímenes de zinc (-Zn vs. +Zn).

En la Figura 23 los resultados muestran que, a los 14 días de evaluación, entre los controles sin inocular, la deficiencia de Zn en el medio produjo un aumento del peso fresco radicular; lo mismo se observa en plántulas inoculadas con SSO5. En dos tratamientos de inoculación (SSO1' y SSP7) no se detectan diferencias significativas; y sólo en el caso plántulas inoculadas con SSP22 el peso fresco de raíz fue menor que con suficiencia de Zn.

Estos resultados sugieren que en el estadio de plántula y en un cultivar de arroz poco susceptible a la deficiencia de Zn (Salazar *et al.*, 2023), la concentración de zinc en el medio de cultivo, sumada a las reservas de la semilla, podría explicar las respuestas observadas (Gu *et al.*, 2012).

El contenido de zinc endospermático representa el 75 % del total del mineral en el grano de arroz (Jiang *et al.*, 2008), con lo cual, la siembra *in vitro* del embrión sin endosperma podría ser un modelo de evaluación. Esto se pudo evidenciar en la puesta a punto del protocolo de extracción de endosperma de cariopses de *O. sativa*, logrando inducir deficiencia de zinc en este cultivar (Figura 27).

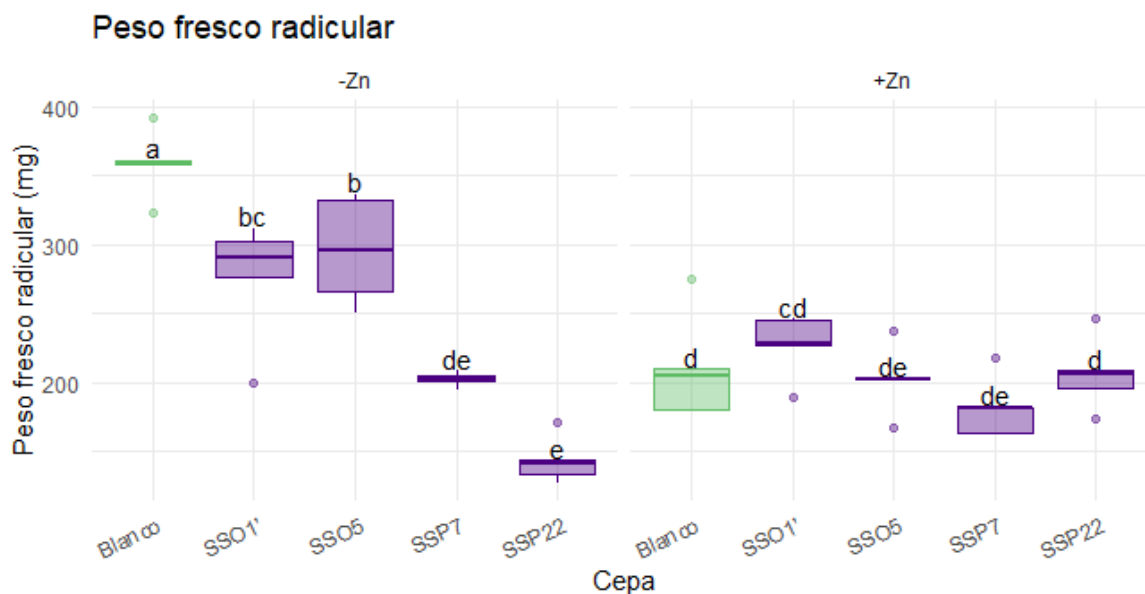


Figura 23. Peso fresco radicular de *Oryza sativa* cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.

Se representa el peso fresco radicular (mg) tras 14 días de crecimiento en medio MS con deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc. Se comparan las cepas SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22 frente al control no inoculado (Blanco). Las cajas representan la distribución de los datos; las letras indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$), evaluando tanto las variaciones entre cepas dentro de cada medio como la interacción entre los tratamientos de zinc.

Se evaluó la longitud radicular específica (LRE), que según Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013), este parámetro vincula la capacidad de adquisición de recursos minerales (longitud de la raíz) con la inversión de biomasa radicular. Una LRE elevada indica que la planta desarrolla una mayor extensión radicular por unidad de biomasa invertida, lo cual generalmente se asocia con tasas superiores de absorción de agua y nutrientes.

Los resultados obtenidos (Figura 24) muestran que, independientemente de la disponibilidad de zinc o del tratamiento con los distintos aislamientos bacterianos, no existieron diferencias significativas entre las cepas ni entre los medios de cultivo.

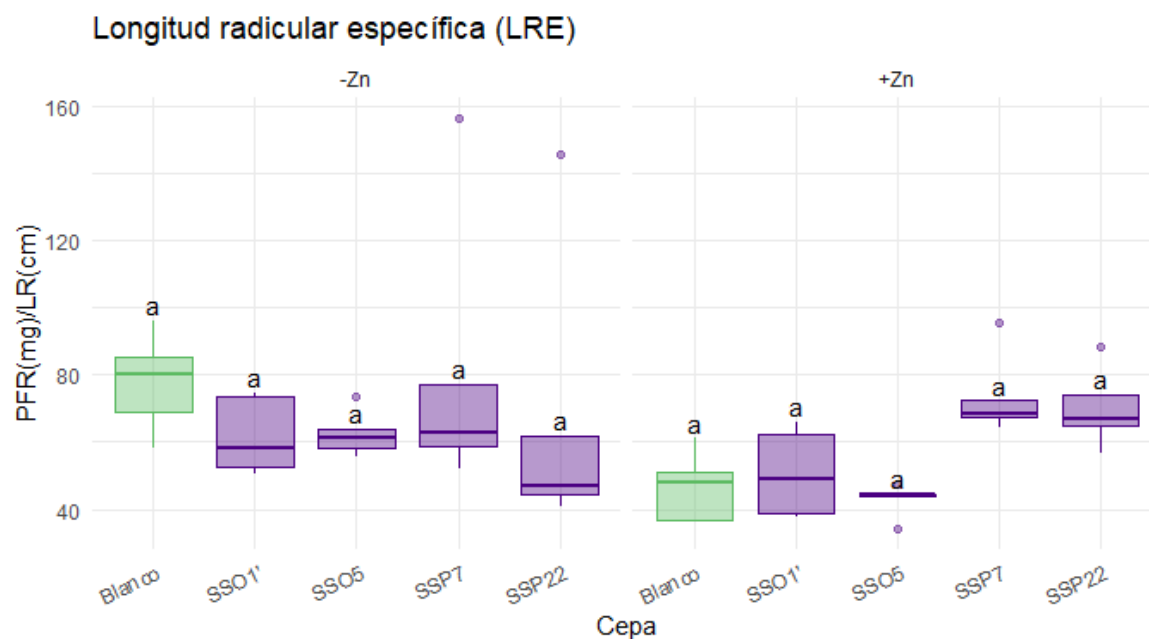


Figura 24. Longitud radicular específica (LRE) de *Oryza sativa* cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.

Se representa la relación entre la longitud radicular (LR, cm) y la biomasa fresca radicular (PFR, mg) tras 14 días de tratamiento en medios con deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc. Se comparan los efectos de las cepas SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22 frente al control no inoculado (Blanco). Las cajas representan la distribución de los datos; las letras indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$), evaluando tanto las variaciones entre cepas dentro de cada medio como la interacción entre los dos regímenes de zinc (-Zn vs. +Zn).

Respecto a la biomasa fresca aérea (Figura 25), no se detectaron diferencias significativas entre los aislamientos al comparar los tratamientos de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc, con excepción de la cepa SSP22, la cual exhibió un incremento significativo en su peso aéreo bajo condiciones de suficiencia en relación con su desempeño en ausencia del micronutriente. Asimismo, destaca que, ante la suficiencia de zinc (+Zn), únicamente la cepa SSO1' logró un crecimiento significativamente superior al del control sin inocular (Blanco), sin lograr diferenciarse del resto de las plantas inoculadas.

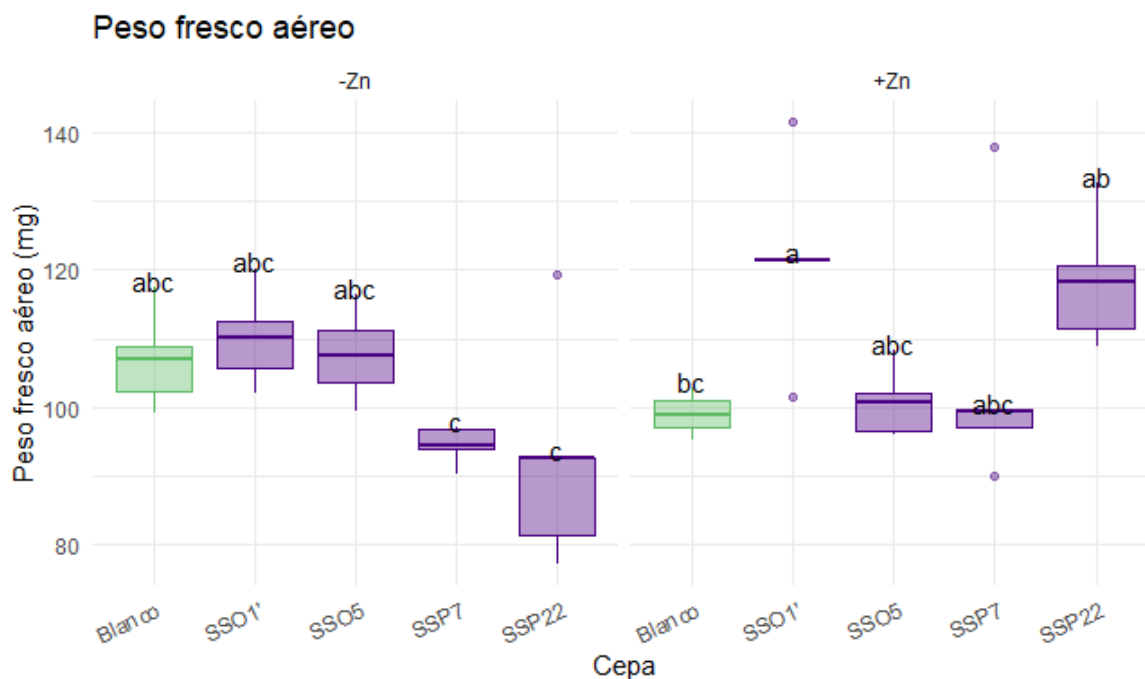


Figura 25. Biomasa aérea de *Oryza sativa* cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.

Se representa el peso fresco del vástago (mg) en medios con deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc. Se comparan los efectos de los aislamientos SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22 frente al control no inoculado (Blanco). Las cajas representan la distribución de los datos; las letras indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$), evaluando tanto las variaciones entre cepas dentro de cada medio como la interacción entre los dos regímenes de zinc (-Zn vs. +Zn).

Para dilucidar la influencia de la deficiencia de zinc y la presencia de las cepas bacterianas, se evaluó la relación entre el peso fresco aéreo y el peso fresco radicular (A/R). En la Figura 26 se observa cómo, de forma general, con excepción de las cepas SSP7 y SSP22, la deficiencia de zinc (-Zn) reduce significativamente la relación A/R. Este resultado permite inferir una partición y distribución diferencial de fotoasimilados hacia el sistema radicular como respuesta adaptativa al sensado de la deficiencia del micronutriente.

Sin embargo, al contrastar estos datos con las Figuras 23 y 25, se advierte que no existen diferencias significativas en el peso fresco aéreo entre tratamientos. Esto indica que la variación del índice A/R entre las condiciones +Zn y -Zn está

determinada exclusivamente por un incremento en la biomasa radicular en respuesta al estrés nutricional.

Las plantas inoculadas con las cepas del grupo SSP exhibieron un comportamiento diferencial positivo en este índice bajo condiciones de deficiencia de zinc (-Zn). Sin embargo, esta respuesta no se observó en condiciones de suficiencia (+Zn), donde el efecto de las bacterias se vio atenuado por la disponibilidad del micronutriente, sin mostrar diferencias significativas respecto al control no inoculado. A excepción del comportamiento general, la cepa SSP22, incrementó significativamente el PFA (Figura 25) bajo condiciones de suficiencia de zinc. Asimismo, se destacó por ser la única cepa que mostró reducir el PFR (Figura 23) ante condiciones de deficiencia de Zn. Por lo tanto, el comportamiento contrapuesto de estos componentes explica la respuesta observada en la relación A/R para las plantas inoculadas con la cepa.

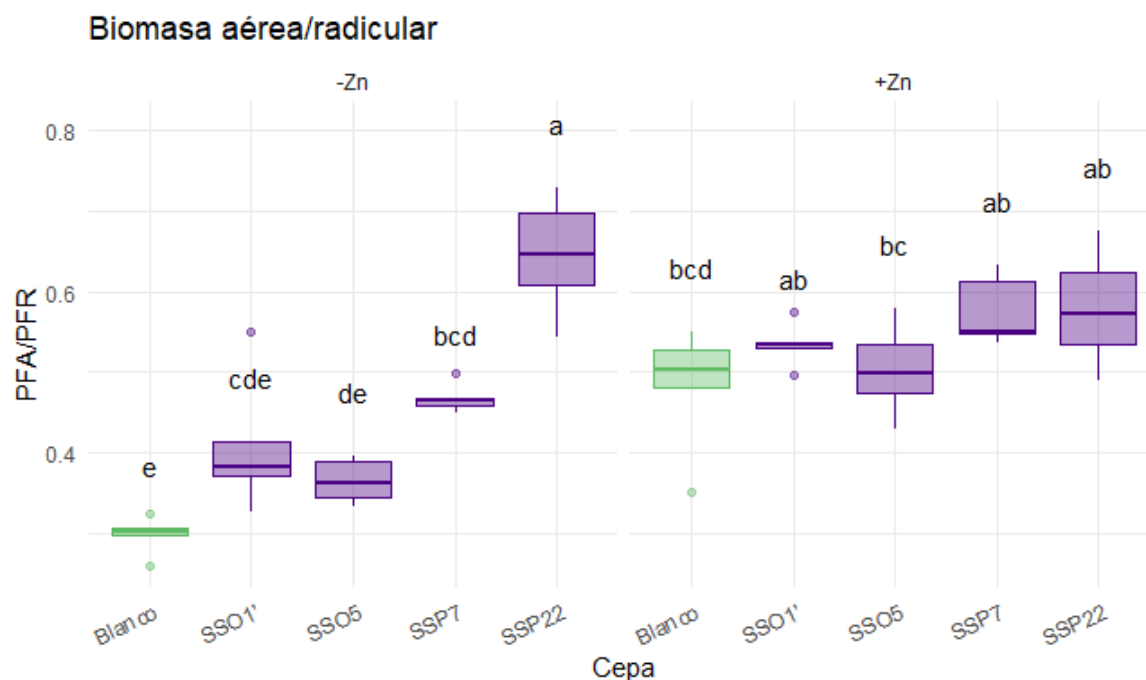


Figura 26. Relación peso fresco aéreo (PFA) y peso fresco radicular (PFR) de *Oryza sativa* cultivadas bajo condiciones de deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc e inoculación con las cepas seleccionadas.

Se representa la relación peso fresco del vástago (mg)/peso fresco radicular (mg), en medios con deficiencia (-Zn) y suficiencia (+Zn) de zinc. Se comparan los efectos de los aislamientos SSO1', SSO5, SSP7 y SSP22 frente al control no inoculado (Blanco). Las cajas representan la distribución de los datos; las letras indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$), evaluando tanto las variaciones entre cepas dentro de cada medio como la interacción entre los dos regímenes de zinc (-Zn vs. +Zn).

4.16 Deficiencia de zinc inducida mediante extracción de endosperma en *Oryza sativa*

El contenido de zinc presente en el tejido endospermático de los cariopses de arroz (*Oryza sativa* L.), documentado por Jiang *et al.* (2008), permite que esta técnica se consolide como una alternativa eficaz para la inducción temprana de deficiencia de zinc, incluso en cultivares con baja susceptibilidad como la variedad comercial *Cambá* (Salazar *et al.*, 2023). Los resultados obtenidos en este estudio (Figura 27) presentan un contraste significativo con los evaluados mediante el uso de cariopses enteros, constatando que la concentración de zinc disponible para las plántulas de arroz ha sido superior al óptimo (Figura 23).

En términos de biomasa, se registraron diferencias significativas en el peso fresco de vástagos y raíces bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de zinc, manteniéndose conservada la relación biomasa aérea/radicular. Otros indicadores de crecimiento, como la longitud del vástago y parámetros de desarrollo radicular (área y perímetro radicular total) muestran diferencias significativas con respecto a la disponibilidad de zinc. Esto guarda concordancia con el papel del zinc en la síntesis del triptófano, aminoácido precursor de hormonas con acción auxínica (Babar *et al.*, 2013), influyendo como modulador de la arquitectura radicular.

De este modo, el hecho de quitar las reservas endospermáticas resulta interesante para evaluar en periodos cortos de tiempo (32 días) y etapas tempranas del desarrollo vegetativo deficiencias de micronutrientes mediante el uso de metodologías de cultivo *in vitro*.

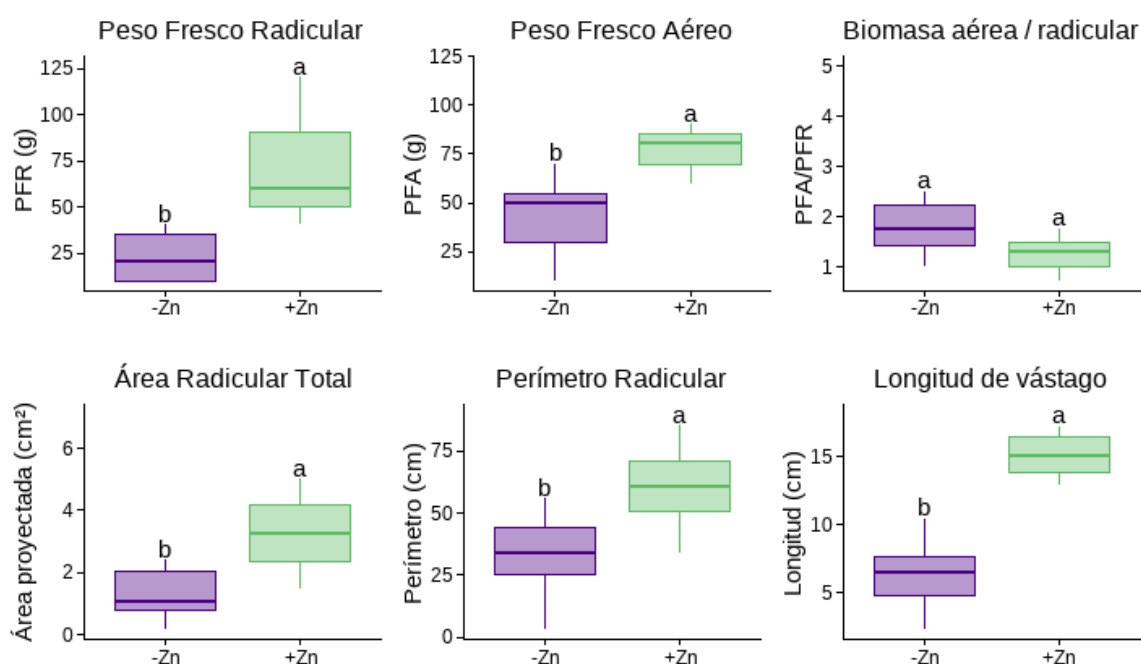


Figura 27. Variables de crecimiento y biomasa de *Oryza sativa* L., sometidas a extracción del endosperma, bajo distintas disponibilidades de zinc durante 32 días de tratamiento.

De izquierda a derecha: Peso fresco radicular (PFR), Peso fresco aéreo (PFA), Relación parte aérea/raíz (PFA/PFR), Área radicular total, Perímetro radicular y Longitud de vástago. Las cajas representan el rango intercuartílico, la línea media indica la mediana y los bigotes se extienden hasta el valor máximo y mínimo. Los diferentes colores indican los tratamientos: púrpura para deficiencia (-Zn) y verde para suficiencia (+Zn). Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$) posterior a un análisis de varianza (ANOVA).

CONCLUSIONES

La presente investigación logró cumplir con los objetivos de bioprospección de cepas solubilizadoras de zinc, la evaluación *in planta* y avances en el ajuste de la técnica de evaluación *in vitro* forzando la deficiencia de zinc. A partir de los resultados obtenidos, se desprenden las siguientes conclusiones principales:

1. Bioprospección: se aislaron 44 cepas bacterianas de suelos destinados al cultivo de arroz y se valoró su comportamiento como solubilizadoras de zinc. Para realizar el cribado se ha respaldado de dicho comportamiento y la tipificación bacteriana mediante el uso de huellas genómicas. De este modo, se continuó investigando con 6 cepas correspondientes a los géneros *Acinetobacter*, *Sphingobacterium* y *Klebsiella*, identificadas mediante secuenciación del gen del ARN ribosomal 16s.

Las determinaciones bioquímicas para inferir sobre la capacidad PGPR de las cepas se realizó a través del tiempo, y en las solubilizaciones se correlacionó con el pH. De este modo se pudo evaluar la tasa en la que las bacterias expresan su actividad metabólica y si la misma está vinculada a mecanismos de excreción de ácidos al medio extracelular. La fijación biológica de nitrógeno y la producción de indoles, aún sin el agregado de triptófano, posicionan a las cepas como de elevado interés biotecnológico promoviendo continuar con investigaciones futuras sobre dichas actividades metabólicas.

2. Curvas de crecimiento y formulación de inoculante: uno de los resultados más interesantes ha sido confeccionar las curvas de crecimiento bacteriano, en la cual se ha correlacionado la absorbancia del medio de cultivo (DO₆₀₀) a las unidades formadoras de colonias (UFC). Esto enriquece los conocimientos sobre

los géneros bacterianos que actualmente se están posicionando como PGPR y eficientiza el estudio de los mismos ya que reduce el tiempo de los ensayos al lograr ajustar concentraciones bacterianas eludiendo el conteo en placa.

Los estudios de curvas de crecimiento bacteriano han sido la base para lograr formular un inoculante mediante encapsulación en perlas coloidales, para las cuales hemos evaluado la tasa a la que se liberan las bacterias al suelo y cómo éstas subsisten en la matriz edáfica a través del tiempo. Además, se estudió su viabilidad mediante refrigeración como óptimo sistema de conservación del inoculante. Estos resultados posicionan al sistema de encapsulación como prometedor en estudios de laboratorio y de una tecnología viable para realizar estudios a campo con prospección de escalar a sistemas productivos sustentables.

3. Inocuidad de las cepas: se logró inferir en la inocuidad de las cepas bacterianas mediante ensayos *in planta*. A pesar de los robustos indicadores bioquímicos bacterianos (solubilización de zinc, fósforo, producción de indoles y fijación de nitrógeno), que las posicionaron como candidatas a ser PGPRs, mostraron efectos neutros en los parámetros morfofisiológicos evaluados bajo las condiciones de estudio. Cabe destacar que el suelo utilizado en los ensayos no presentaba deficiencia de zinc. Además, los cariopses de arroz poseen reservas endopermáticas con suficiente cantidad de este metal como para retrasar la aparición de los síntomas de deficiencia. No obstante, los parámetros de fluorescencia de clorofila que se evaluaron denotan que no hubo estrés a nivel de fotosistema por parte de las bacterias. Esto ha promovido a continuar con estudios *in vitro* para exacerbar las condiciones de deficiencias nutricionales.

4. Biotecnología aplicada al estudio de micronutrientes: las técnicas de cultivo *in vitro* se presentan como una herramienta de alta confiabilidad para el estudio de deficiencias de micronutrientes como el zinc y el análisis exhaustivo de la arquitectura radicular. Los resultados obtenidos en condiciones gnotobióticas permiten identificar mecanismos de acción básicos y respuestas moleculares precisas asociadas a modificaciones morfofisiológicas. En estadios vegetativos tempranos, este sistema permitió inducir y controlar estados de deficiencia con una precisión que sería muy difícil de alcanzar en sustratos complejos. Sorprendentemente, la cepa del género *Acinetobacter* (SSO1'), mostró incremento en el peso fresco aéreo en condición de suficiencia de zinc, posicionándose como candidata para continuar con evaluaciones pertinentes.

La falta de respuesta contundente de las plantas a la deficiencia de zinc en los medios de cultivo llevó a realizar la extracción del endosperma. Dados los prometedores resultados obtenidos mediante la extracción de este tejido de reserva, incluso de una variedad poco susceptible a deficiencia de zinc como lo es *Cambá*, esta técnica se consolidó como un recurso clave para futuros estudios de nutrición de micronutrientes en estadios temprano del desarrollo vegetativo, enfatizando en la interacción planta-microorganismo frente dicho estrés abiótico.

5. Valor del arroz como especie modelo e interés comercial: el uso *Oryza sativa* en estadios tempranos demostró ser una herramienta sencilla para el estudio de mecanismos básicos y la bioprospección rápida, debido a su amplio antecedente en investigaciones genético-moleculares y su fácil adaptación al cultivo *in vitro*, caracterizándose como una especie modelo. Sin embargo, su importancia radica en que se sitúa como uno de los cultivos de mayor interés agronómico a nivel mundial.

6. Proyecciones: el desarrollo de esta tesis logró fomentar la vinculación científico-tecnológica entre ambos institutos de investigación (IIPAAS-INTECH) que abre las puertas a continuar estudios vinculados a la deficiencia nutricional de zinc. Los resultados prometedores de la extracción de tejido endospermático promueven al estudio detallado de esta deficiencia, aún en cultivares con baja susceptibilidad a la carencia de zinc. Por lo que el siguiente trabajo se concentra en evaluar la interacción de las cepas bacterianas caracterizadas con plántulas de arroz previa extracción del tejido endospermático. Así mismo, se desarrollará y evaluará una comunidad bacteriana sintética solubilizadora de zinc (*SynCom-Zn*), fomentado en el uso de consorcios microbianos que logren integrar diversas cualidades PGPRs en plantas enfrentadas a estreses abióticos multifactoriales como la deficiencia nutricional, sequía, salinidad y alcalinidad.

Queda pendiente de estudio el análisis exhaustivo de los mecanismos moleculares mediante los cuales las bacterias logran solubilizar zinc y cotejar si los mismos difieren de la solubilización de otros minerales como el fósforo. Por otro lado, resulta de gran interés ahondar en el estudio de la modulación genético-molecular que rige en la interacción entre las plantas y las bacterias.

INVESTIGACIONES FUTURAS Y ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

La presente tesis de grado ha trascendido el ámbito académico, fomentando la consolidación de vínculos científico-tecnológicos y contribuyendo a la formación de recursos humanos dentro del sistema científico nacional.

Como resultado directo de esta investigación, se han establecido sólidos lazos de cooperación entre el Instituto de Investigación sobre Producción Agropecuaria, Ambiente y Salud (IIPAAS) y el Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH). Esta sinergia interinstitucional no solo ha fortalecido las líneas de investigación existentes, sino que ha potenciado el intercambio de conocimientos y recursos técnicos, fundamentales para el abordaje de problemáticas agrícolas complejas.

En el marco de estas actividades, se han concretado las siguientes contribuciones en eventos científicos:

- Alfano, F. M., Salazar, A., Romero, M., Rodríguez, A., Maiale, S. J., Pesqueira, J. (2025) "Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de zinc provenientes de suelos arroceros". Presentado en la VIII Jornada Bonaerenses de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable (JOBMAS).
- Alfano, F. M., Pesqueira, J., Maiale, S. J. (2025). "Aislamiento y establecimiento de embriones de arroz (*Oryza sativa* L.) *in vitro* como herramienta biotecnológica para el estudio de deficiencia de zinc en plántulas". Presentado en el 1er Encuentro de Redes de Biotecnología de Argentina.

Asimismo, la continuidad de esta línea de investigación se refleja en la postulación de dos becas de entrenamiento científico de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), actualmente en proceso de evaluación. Estas convocatorias subrayan el rol de la tesina como plataforma de introducción para jóvenes investigadores al sistema científico-tecnológico argentino.

Hacia el futuro, se proyecta profundizar en el estudio del microbioma de la rizosfera asociado a la deficiencia de micronutrientes y la evaluación de los mecanismos moleculares subyacentes. Este enfoque busca fomentar el entendimiento de los procesos básicos implicados en la interacción planta-microorganismo, proporcionando conocimientos críticos que permitan el desarrollo de programas de mejoramiento genético y el diseño de prácticas agronómicas más sustentables.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, I., Ehsan, M., Sin, Y., Paek, J., Khalid, N., Hayat, R., & Chang, Y. H. (2014). *Sphingobacterium pakistanensis* sp. Nov., a novel plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere of *Vigna mungo*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(2), 325-333. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0077-0>
- Alloway, B. J. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5), 537-548. <https://doi.org/10.1007/s10653-009-9255-4>
- Apine, O. A., & Jadhav, J. P. (2011). Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1235-1244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04976.x>
- Babar, H., Yusop, M., & Saleem, M. (2013). Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *American journal of Experimental Agriculture*. 50(1): 374-391. Hafeez B., Khanif Y. M., Saleem M. 2013, 1, 374-391.
- Bakki, M., Banane, B., Marhane, O., Esmael, Q., Hatimi, A., Barka, E. A., Azim, K., & Bouizgarne, B. (2024). Phosphate solubilizing *Pseudomonas* and *Bacillus* combined with rock phosphates promoting tomato growth and reducing bacterial canker disease. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1289466>
- Bargaz, A., Elhaisoufi, W., Khourchi, S., Benmrid, B., Borden, K. A., & Rchiad, Z. (2021). Benefits of phosphate solubilizing bacteria on belowground crop performance for improved crop acquisition of phosphorus. *Microbiological Research*, 252, 126842. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126842>
- Bashir, K., Ishimaru, Y., & Nishizawa, N. K. (2012). Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. *Plant and Soil*, 361(1), 189-201. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1240-5>
- Cakmak, I., & Kutman, U. (2017). Agronomic biofortification of cereals with zinc: A review: Agronomic zinc biofortification. *European Journal of Soil Science*, 69. <https://doi.org/10.1111/ejss.12437>
- Carillo, P., Brown, P., Jong, T., du Jardin, P., Cassan, F., Ferrante, A., Fotopoulos, V., & Manganaris, G. (2025). Rethinking biostimulants: Toward a functional framework for resilient agriculture. *Chronica Horticulturae*, 65, 6-8.

- Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., & Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1151-1165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x>
- Choi, E. Y., Graham, R., & Stangoulis, J. (2007). Semi-quantitative analysis for selecting Fe- and Zn-dense genotypes of staple food crops. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(6), 496-505. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.01.004>
- Cordova-Rodriguez, A., Rentería-Martínez, M. E., López-Miranda, C. A., Guzmán-Ortíz, J. M., & Moreno-Salazar, S. F. (2022). Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures. *MethodsX*, 9, 101917. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101917>
- Corrêa, G. M., Pereira, C. D. S., Queiroz, A. T. D. S., Silva, M. P. D., Mello, M. E. D., Oliveira, T. M. L. D., Araújo, L. C., Frade, L. F. D. S., Santos, J. B. D., Silva, C. M. D., & Silva, A. V. D. (2025). Use of Bioinputs in Sustainable Agriculture: Trends, Challenges and Perspectives for Reducing the Use of Agrochemicals. *Revista de Gestão Social e Ambiental*, 19(5), e011955. <https://doi.org/10.24857/rgsa.v19n5-003>
- Covelli, J. M. (2013). *Biofertilización con Bradyrhizobium japonicum para la agricultura sustentable: Aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación* [Tesis, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/27577>
- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. M. (2009). *Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques*.
- Doolette, C. L., Read, T. L., Li, C., Scheckel, K. G., Donner, E., Kopittke, P. M., Schjoerring, J. K., & Lombi, E. (2018). Foliar application of zinc sulphate and zinc EDTA to wheat leaves: Differences in mobility, distribution, and speciation. *Journal of Experimental Botany*, 69(18), 4469-4481. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery236>
- Du, J., Singh, H., Won, K., Yang, J.-E., Jin, F.-X., & Yi, T.-H. (2015). *Sphingobacterium mucilaginosum* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of a rose. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_9), 2949-2954. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000361>

- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- Duran-Bedolla, J., Garza-Ramos, U., Rodríguez-Medina, N., Aguilar Vera, A., & Barrios-Camacho, H. (2021). Exploring the environmental traits and applications of *Klebsiella variicola*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 2233-2245. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00630-z>
- Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., & Sanjuán, J. (2009). Genetic Diversity and Host Range of Rhizobia Nodulating *Lotus tenuis* in Typical Soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1088-1098. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-08>
- Fahri, A., Sabrina, T., Sembiring, M. Br., & Girsang, S. S. Br. (2026). The use of biofertilizers to increase zinc content in rice plants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1591(1), 012006. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1591/1/012006>
- Fan, D., & Smith, D. L. (2021). Characterization of Selected Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Non-Host Growth Promotion Effects. *Microbiology Spectrum*, 9(1), e00279-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00279-21>
- Fan, D., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2020). Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 10(1), 12740. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69713-5>
- Forno, D. A., Asher, C. J., & Yoshida, S. (1975). Zinc Deficiency in Rice: II. Studies on Two Varieties Differing in Susceptibility to Zinc Deficiency. *Plant and Soil*, 42(3), 551-563.
- Gandhi, A., & Muralidharan, G. (2016). Assessment of zinc solubilizing potentiality of *Acinetobacter* sp. Isolated from rice rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*, 76, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.06.006>
- Gavilanes, A. S. D., & Cáliz, J. F. M. (2017). *Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de Lactobacillus plantarum en yogur sin sabor*.
- Glöer, J., Thummer, R., Ullrich, H., & Schmitz, R. A. (2008). Towards understanding the nitrogen signal transduction for nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. *The FEBS Journal*, 275(24), 6281-6294. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06752.x>

- Gontia-Mishra, I., Sapre, S., & Tiwari, S. (2017). Zinc solubilizing bacteria from the rhizosphere of rice as prospective modulator of zinc biofortification in rice. *Rhizosphere*, 3, 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.013>
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric Estimation of indoleacetic Acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192-195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Gu, H.-H., Zhan, S.-S., Wang, S.-Z., Tang, Y.-T., Chaney, R. L., Fang, X.-H., Cai, X.-D., & Qiu, R.-L. (2012). Silicon-mediated amelioration of zinc toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant and Soil*, 350(1), 193–204. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0894-8>
- Heracle BioSoft. (2022). *DNA Baser Sequence Assembler* (Versión 5.15) [Software]. Heracle BioSoft. <https://dnabaser.com>
- Hernández-Martínez, R., García-Aguado, L. R., Rico-Ramírez, M. V., Peña-Caballero, V., & Luna, B. E. G. (2022). Encapsulación en perlas de alginato de bacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de áreas naturales protegidas. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16, 1-9.
- Jiang, W., Struik, P. c., Van Keulen, H., Zhao, M., Jin, L. n., & Stomph, T. j. (2008). Does increased zinc uptake enhance grain zinc mass concentration in rice? *Annals of Applied Biology*, 153(1), 135-147. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00243.x>
- Khan, M., Ahamad, F., & Sharma, P. (2021). *Rice: Bacterial blight, Leaf streak and Khaira disease* (pp. 119-131).
- Krithika, S., & Balachandar, D. (2016). Expression of Zinc Transporter Genes in Rice as Influenced by Zinc-Solubilizing Enterobacter cloacae Strain ZSB14. *Frontiers in Plant Science*, 7, 446. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00446>
- Lazar, I. (2023). *GelAnalyzer* (Versión 23.1.1) [Software]. <http://www.gelanalyzer.com>
- Lee, J.-H., & Lee, J. (2010). Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 426-444. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x>
- Maliha, R., Samina, K., Najma, A., Alam, S., & Farooq, L. (2004). Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under in vitro Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2). <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.187.196>

- Manasa, S., Mahadevaswamy, Ramesh, Y., Naik, N., Gundappagol, R., & Swamy, M. (2019). *In vivo Efficacy of Zinc Solubilizing Bacteria on Available Zinc Content, Growth and Yield Attributes of Paddy (Oryza sativa)*. 20, 1-9. <https://doi.org/10.9734/JAERI/2019/v20i230105>
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3), 638-649. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Panhwar, Q., Othman, R., Meon, S., Ismail, M., & Malaysia, S. (2009). Solubilization of Different Phosphate Forms by Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Aerobic Rice. *ISSN OnlineMFA*, 11, 1560-8530.
- Pérez-Harguindeguy, N., Diaz, S., Eric, G., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M., Cornwell, W., Craine, J., Gurvich, D., Urcelay, C., Veneklaas, E., Reich, P., Poorter, L., Wright, I., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J., Vos, A., & Cornelissen, J. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 61, 167-234. <https://doi.org/10.1071/BT12225>
- Prathap, S., Subramaniam, T., Prabhakaran, J., Vimalan, B., N O, G., & Anandham, R. (2021). Role of Zinc Solubilizing Bacteria in Enhancing Growth and Nutrient Accumulation in Rice Plants (Oryza sativa) Grown on Zinc (Zn) Deficient Submerged Soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00706-7>
- R Core Team. (2025). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rodríguez, A. A., Vilas, J. M., Sartore, G. D., Bezus, R., Colazo, J., & Maiale, S. J. (2023). Field and genetic evidence support the photosynthetic performance index (PIABS) as an indicator of rice grain yield. *Plant Physiology and Biochemistry*, 201, 107897. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107897>

- Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in Microbiology*, 167(3), 222-233. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.11.001>
- Romero, F. M., Rossi, F. R., Gárriz, A., Carrasco, P., & Ruíz, O. A. (2019). A Bacterial Endophyte from Apoplast Fluids Protects Canola Plants from Different Phytopathogens via Antibiosis and Induction of Host Resistance. *Phytopathology®*, 109(3), 375-383. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0262-R>
- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae, Biostimulants in Horticulture*, 196, 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042>
- Salazar, A., Bezus, R., Rodriguez, A., Llames, M., Romero, F. M., & Maiale, S. J. (2023). *Selección de genotipos de arroz por tolerancia a déficit de Zn evaluados mediante parámetros fisiológicos*. Segundo Simposio de Mejoramiento Genético Vegetal, Córdoba.
- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., & Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66(9), 1794-1798. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.067>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shivaji, S., Ray, M. K., Shyamala Rao, N., Saisree, L., Jagannadham, M. V., Seshu Kumar, G., Reddy, G. S. N., & Bhargava, P. M. (1992). *Sphingobacterium antarcticus* sp. Nov., a Psychrotrophic Bacterium from the Soils of Schirmacher Oasis, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 102-106. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-102>
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., & Vanderleyden, J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, 312(1), 15-23. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9560-1>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants*, 11(22), 3065. <https://doi.org/10.3390/plants11223065>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Vaishnav, A., Singh, J., Singh, P., Rajput, R. S., Singh, H. B., & Sarma, B. K. (2020). Sphingobacterium sp. BHU-AV3 Induces Salt Tolerance in Tomato by Enhancing Antioxidant Activities and Energy Metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 11, 443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00443>
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823-6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, J. F., Lupski, J. R., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Woods, C., Versalovic, J., & Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, 5, 25-40. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.199-207.2005>
- Wissuwa, M., Ismail, A. M., & Yanagihara, S. (2006). Effects of Zinc Deficiency on Rice Growth and Genetic Factors Contributing to Tolerance. *Plant Physiology*, 142(2), 731-741. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085225>
- Zuluaga, M. Y. A., de Oliveira, A. L. M., Valentinuzzi, F., Jayme, N. S., Monterisi, S., Fattorini, R., Cesco, S., & Pii, Y. (2023). An insight into the role of the organic acids produced by Enterobacter sp. strain 15S in solubilizing tricalcium phosphate: In situ study on cucumber. *BMC Microbiology*, 23(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02918-6>

ANEXO

1. Medios de cultivo microbianos

Medios con fuente de zinc de baja solubilidad (MM-Zn)

La capacidad solubilizadora de zinc se evaluó en medio mínimo (MM) con las fuentes correspondientes de zinc, ambos adaptados de Gandhi & Muralidharan (2016) y Gontia *et al.* (2017).

Composición de MM-ZnO

Compuesto	Cantidad (gramos/litro de solución)
$C_6H_{12}O_6$	10
$(NH_4)_2SO_4$	1
KCl	0,2
K_2HPO_4	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
ZnO	1
Agar	10

El pH del medio se ajusta a 7.

Composición de MM-Zn₃(PO₄)₂

Compuesto	Cantidad (gramos/litro de solución)
$C_6H_{12}O_6$	10
$(NH_4)_2SO_4$	1
KCl	0,2
K_2HPO_4	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$Zn_3(PO_4)_2$	1

Agar	10
------	----

El pH del medio se ajusta a 7.

Medio con fuente de fosfato de baja solubilidad

La capacidad solubilizadora de fosfato se evaluó en medio *National Botanical Research Institute's phosphate* (NBRIP).

Compuesto	Cantidad (gramos/litro de solución)
$C_6H_{12}O_6$	10
$(NH_4)_2SO_4$	0,1
KCl	0,2
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25
$Ca_3(PO_4)_2$	5
Agar	15

El pH del medio se ajusta a 7.

Medio de crecimiento general

La evaluación de producción de indoles y el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), para la caracterización de las curvas de crecimiento bacteriano utilizó como medio de cultivo *Plate Count Agar* (PCA).

Composición de PCA

Compuesto	Cantidad (gramos/litro de solución)
$C_6H_{12}O_6$	1
Extracto de levadura	2,5
Peptona ácida de caseína	5

Agar	15
------	----

El pH del medio se ajusta a 7.

Nota: Los medios de cultivo que se han utilizado de forma líquida se evita el agregado del Agar bacteriológico.

Medio para determinar presencia de actividad ureasa

Para determinar la presencia de actividad ureasa de las cepas se utilizó el medio Urea Agar Base, también conocido como Medio Christensen (MC).

Composición de MC

Compuesto	Cantidad (gramos/litro de solución)
$C_6H_{12}O_6$	1
Peptona	1
NaCl	5
Na_2HPO_4	1,2
K_2HPO_4	0,8
Rojo fenol	0,012
Urea	20
Agar	15

El pH del medio se ajusta a 6,8. La urea se esteriliza mediante filtración y se adiciona luego.

Medio Döbereiner para evaluación de fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Adaptado de Cordova-Rodriguez *et al.* (2022).

Compuesto	Cantidad (gramos/litro de solución)
Ácido málico	5
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2

NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01
Fe-EDTA	0,066
Azul bromotimol (0,5 % m/v en KOH 0,2N)	8 mL
KOH	4,5

El pH del medio se ajusta a 6,5.

2. Medios de cultivo vegetal

Medio agar agua (AA)

El medio Agar Agua (AA) se utiliza para la imbibición de semillas/frutos, así como medio básico para el desarrollo inicial radicular *in vitro*. La concentración del mismo puede variar en función del uso que se le quiera brindar. A continuación, se detalla el básico que se encuentra al 0,8 %.

Composición de AA

Compuesto	Cantidad (gramos/litro de solución)
Agar	8

Medio Murashige Skoog (MS) (1962)

Para los ensayos de interacción planta-microorganismo *in vitro*, se utilizó el medio basal Murashige & Skoog (MS) ajustado a una concentración de 0,5X. El pH se fijó en 5,8 mediante el uso de soluciones de ajuste (KOH/HCl).

En las variantes destinadas a evaluar la deficiencia de zinc, se omitió por completo el agregado de ZnSO₄·7H₂O.

Compuesto	Cantidad (mg/litro de solución)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
KI	0,83
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3
Mioinositol	100
Piridoxina HCl	0,5
Glicina	2
Tiamina	0,1
Nicotinamida	0,5
Sacarosa	30.000
Agar	10.000

3. Protocolo de termociclador y componentes de la mezcla de reacción (*Master Mix*) para BOX-PCR.

Adaptado de Castagno *et al.* (2011) y Romero *et al.* (2016).

Composición de *Master Mix*

Compuesto	Cantidades
H ₂ O	10,6 µL
Buffer	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	3,5 µL
DNTPs (25 mM)	1,2 µL
Taq Polimerasa	0,2 µL
Primer (50 pmol)	1,0 µL
Lisado (ADNg)	5,0 µL

Programa del termociclador

Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-ciclo	94 °C	7 min
Ciclo (35 veces)	94 °C	1 min
	53 °C	1 min
	65 °C	8 min
Ciclo final (extensión)	65 °C	16 min

4. Componentes de la *Master Mix* para PCR del ARNr 16S

Compuesto	Cantidades
Buffer (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
dNTPS (10 mM)	0,2 µL
Taq polimerasa	0,2 µL
Primer F (10 µM)	0,5 µL
Primer R (10 µM)	0,5 µL
H ₂ O	17,6 µL
Lisado (ADNg)	2 µL

Para la amplificación del gen ARNr 16S, se utilizaron los cebadores (primers) 41f (5'-GCTCAAGATTGAACGCTGGCG-3') y 1488r (5'-CGGTTACCTTGTTAGCACTTCACC-3'), siguiendo los protocolos descritos por Estrella *et al.* (2009) y Romero *et al.* (2016).

5. Reactivo Salkowski

El reactivo Salkowski se preparó siguiendo el protocolo de Gordon & Weber (1951).

Compuesto	Cantidades (mL)
FeCl ₃ (0,5 M)	1
HClO ₄ (35 %)	49