



Foto: Santiago Gohnet

# DESARROLLO DE UN BIOFERTILIZANTE MICROBIANO PARA AUMENTAR LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EN EL CULTIVO DE SOJA<sup>1</sup>

Ing. Agr. MSc PhD Nora Altier<sup>1</sup>, Ing. Agr. Dr. Eduardo Abreo<sup>1</sup>, Ing. Agr. MSc PhD Elena Beyhaut<sup>1</sup>, Lic. Bioq. Mag Silvia Garaycochea<sup>2</sup>, Ing. Agr. Mag Pablo Torres<sup>1</sup>, Lic. Bioq. Mag Victoria Cerecetto<sup>1</sup>, Quím. Mag Nadia Martín<sup>1</sup>, Ing. Agr. MSc María José Cuitiño<sup>3</sup>, DMTV PhD Martina Crispo<sup>4</sup>, TMN Ana Paula Arévalo<sup>4</sup>, Lic. Biol. MSc Natalia Rego<sup>5</sup>, Ing. Agr. Guillermo Arrospide<sup>6</sup>, Ing. Agr. Martín Lage<sup>7</sup>, Ing. Quím. Gustavo Sundberg<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Plataforma de Bioinsumos, Programa de Investigación en Producción y Sustentabilidad Ambiental - INIA

<sup>2</sup>Plataforma de Bioinsumos, Unidad de Biotecnología - INIA

<sup>3</sup>Programa de Investigación en Cultivos de Secano - INIA

<sup>4</sup>Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur Montevideo

<sup>5</sup>Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur Montevideo

<sup>6</sup>Calister S.A.

<sup>7</sup>Lage y Cía. S.A.

<sup>8</sup>Lafoner S.A.

A partir de la exitosa experiencia de nuestro país sobre elaboración y uso de inoculantes en base a rizobios, INIA junto a socios del sector público y privado trabajan en el desarrollo de inoculantes para la movilización de fósforo del suelo. Una futura producción a escala comercial de biofertilizantes permitirá brindar un insumo tecnológico para mejorar la nutrición fosfatada en los sistemas de producción, contribuyendo a reducir el impacto ambiental negativo asociado al agregado de fertilizantes minerales.

## INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes esenciales para las plantas, luego del nitrógeno (N). En interacción con este, suele limitar la productividad de los cultivos en vastas regiones del mundo. Al igual que lo que ocurre en muchos países del hemisferio sur, los suelos de Uruguay presentan niveles de P disponible insuficientes para la mayoría de los cultivos. Históricamente, el agregado de fertilizantes fosfatados, importados en

su totalidad y elaborados a partir de reservorios de roca fosfórica finitos y no renovables, ha sido la forma de levantar esta limitante. Además de pesar de manera significativa en los costos de producción, la eficiencia de uso de los fertilizantes fosfatados es baja, ya que reaccionan con fracciones orgánicas e inorgánicas del suelo, lo que los convierte rápidamente en formas no disponibles para los cultivos. Adicionalmente, el uso de fertilizantes fosfatados impacta negativamente sobre la salud ambiental por mecanismos asociados a

<sup>1</sup>Proyecto: Desarrollo de inoculantes para la movilización de fósforo como insumo en la producción agrícola. INIA/IP/EMPRESAS. Proyecto financiado por la herramienta Alianzas para la Innovación de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

la erosión, lo que ha generado creciente preocupación a nivel mundial, regional y nacional por el deterioro causado en cuerpos de agua superficiales. Con el fin de abordar esta problemática, a nivel mundial se han conformado plataformas de trabajo en red, con atención al uso y manejo sostenible del recurso en los sistemas productivos y a la protección de la salud ambiental de ríos, mares y océanos (European Sustainable Phosphorus Platform (ESPP), Global Phosphorus Research Initiative (GPRI), Sustainable Phosphorus Alliance).

Dado que los microorganismos del suelo cumplen roles clave en el ciclo biogeoquímico del P, mediando en la fitodisponibilidad de este nutriente, y con base en una demanda manifiesta del MGAP, este proyecto tuvo como objetivo general el desarrollo de un inoculante (biofertilizante) basado en bacterias capaces de incrementar la disponibilidad de P para el cultivo de soja, a partir del reservorio del suelo. Como antecedente, en Uruguay se dispone de la tecnología para la elaboración de inoculantes de calidad en base a rizobios, llevada adelante con éxito por el sector público y privado en forma conjunta. Desde 1960, el uso de inoculantes ha sido ampliamente adoptado por el sector productivo, con significativos beneficios económicos, ambientales y sociales.

El modelo de gestión del proyecto (ANII-Alianzas) fue fundamental para el logro del producto, al reunir un consorcio académico-empresarial con actores del sector público (INIA, Institut Pasteur Montevideo) y actores del sector industrial (Calister S.A., Lafoner S.A., Lage y Cía. S.A.). Considerando las fortalezas del equipo de la Alianza, la complementariedad de capacidades y acciones, y la formación de recursos humanos (estudiantes de posgrado), se diseñó una estrategia de trabajo a partir de la demanda tecnológica y se delinearon siete objetivos específicos, de acuerdo con el diagrama de la Figura 1.

Biofertilizante: bioinsumo elaborado en base a una o más cepas de microorganismos benéficos que, aplicado al suelo o a las semillas, promueve el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera.

## PROSPECCIÓN Y COLECCIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS SENSU LATO*

Se conformó una colección de cepas de trabajo identificadas inicialmente a nivel de género y especie en base a secuencias de ADN de la región 16S y del gen GyrB. La colección cuenta con 181 cepas de *Bacillus s.l.* (*B. pumilus*, *B. aryabhatai*, *B. megaterium*, *B. cereus sensu lato*, *B. thuringiensis*, *B. simplex*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Paenibacillus barcinonensis*), obtenidas a partir de suelos sojeros (aislamientos rizosféricos y endófitos de raíz) y suelos de campo natural, incluyendo 17 cepas provistas por INIA y las empresas. Las cepas se conservan liofilizadas y en solución de glicerol a -20°C y -80°C, en la colección INIA Las Brujas Bacterias (ILBB).

## CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS POR ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*

En ensayos de laboratorio, se caracterizaron *in vitro* 181 cepas de *Bacillus s.l.* Se aplicaron sucesivos niveles de *screening*, para confeccionar una lista de cepas ordenadas y seleccionar las cepas de elite. Se consideraron: la actividad mineralizadora de P orgánico (actividad fitasa y producción de ácidos orgánicos) y solubilizadora de P inorgánico (P-Ca, P-Fe, P-Al), en medio sólido y líquido; la producción de auxinas AIA y enzima ACC desaminasa, la capacidad de fijación de N; la producción de biofilm, movilidad y motilidad (características asociadas a la rizocompetencia). Como resultado de los tres niveles de *screening* se estableció un núcleo de 12 cepas promisorias (ILBB7, ILBB15, ILBB19, ILBB44, ILBB55, ILBB63, ILBB64, ILBB68, ILBB95, ILBB139, ILBB173, ILBB592), que fueron avanzadas para la evaluación en planta junto a la cepa ILBB510 (control negativo, -P). En el Cuadro 1 se presenta la caracterización de las cepas que luego se destacaron en los ensayos en planta.

## EVALUACIÓN EN PLANTA: CO - INOCULACIÓN *BACILLUS*-RIZOBIO

En esta etapa, las cepas promisorias identificadas en los ensayos de laboratorio fueron caracterizadas por la eficiencia de absorción de P cuantificada en plantas de soja y la promoción de crecimiento vegetal. Se realizaron bioensayos en invernáculo, evaluando el efecto de la co-inoculación de *Bradyrhizobium elkanii* (U1301/U1302) y *Bacillus* spp. sobre la nodulación y la promoción del crecimiento en plantas de soja (peso seco de la parte aérea, número de nódulos y biomasa nodular de la raíz principal y secundaria, contenido de P y N en parte aérea).

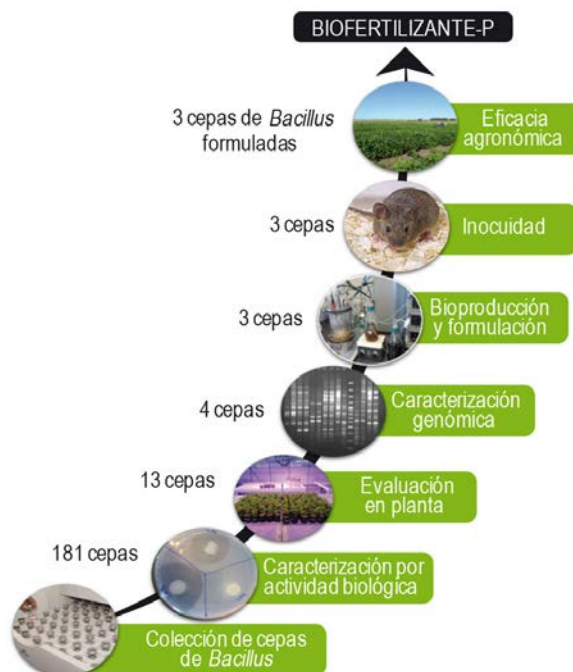


Figura 1 - Estrategia de trabajo diseñada para el desarrollo de un biofertilizante-P en base a cepas de *Bacillus*.

**Cuadro 1** - Descripción de las tres cepas de *Bacillus* spp. seleccionadas y de la cepa ILBB510 (control negativo, -P) según sus características de movilización de fósforo (P), promoción de crecimiento vegetal y rizocompetencia, evaluadas *in vitro*. AIA: ácido indolacético, HCN: ácido cianhídrico.

	Movilización de fósforo (P)		Promoción del crecimiento vegetal				Rizocompetencia		
	Mineralización P Org (P- $\mu$ mol/L)	Solubilización P Inorg (P- $\mu$ mol/L)	Actividad ACC-desaminasa	Fijación de N	AIA ( $\mu$ g/ml)	Producción HCN	Biofilm (OD <sub>570</sub> )	Movilidad (swimming, mm)	Motilidad (swarming, mm)
ILBB95	3,8	60,0	+	+	11,0 $\pm$ 0,4	-	0,06 $\pm$ 0,14	85,0 $\pm$ 0,0	12,7 $\pm$ 1,6
ILBB44	3,7	105,0	+	-	-	-	0,01 $\pm$ 0,01	71,0 $\pm$ 6,1	59,3 $\pm$ 11,0
ILBB592	2,7	80,0	+	-	8,0 $\pm$ 1,0	+	0,57 $\pm$ 0,05	44,7 $\pm$ 1,2	11,0 $\pm$ 0,4
ILBB510 (-P)	0,0	0,0	+	+	2,0 $\pm$ 0,1	-	0,01 $\pm$ 0,01	37,0 $\pm$ 3,5	10,7 $\pm$ 0,6

### Trabajando juntos

“La articulación de la Alianza ha permitido la creación de capacidades con alcance para el sector biotecnológico del país. El modelo de proyecto permitió impulsar acciones público-privadas con un fin productivo y relevante para la sociedad uruguaya.

Ha contribuido a la formación de recursos humanos en carreras de posgrado y pasantías, con alta especialización para su inserción en la industria. Además, ha fortalecido las acciones propuestas por la Unidad Mixta Pasteur + INIA (UMPI), conformándose un espacio de integración de los equipos de trabajo de ambas instituciones.”

### Equipo de trabajo

Investigadores de la Plataforma de Bioinsumos, Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental y Programa de Cultivos de Secano del INIA, investigadores de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) y de la Unidad de Bioinformática del Institut Pasteur Montevideo, y staff técnico de las empresas Calister S.A., Lage y Cía S.A. y Lafoner S.A. Estudiantes de grado y posgrado, en el Programa de Maestría en Biotecnología de la Facultad de Ciencias y de Doctorado en Ciencias Agrarias de la Facultad de Agronomía, Udelar.

Mediante análisis de componentes principales se estudió la asociación de estas variables evaluadas en planta con las características observadas en el laboratorio asociadas a la promoción de crecimiento y la rizocompetencia, identificándose tres cepas de interés: ILBB592 (*B. megaterium*), ILBB95 (*B. aryabhatai*), ILBB44 (*B. pumilus*). Estas cepas promovieron el crecimiento de las plantas, aumentaron la masa nodular y los contenidos de N y P en planta (Cuadro 2).

### CARACTERIZACIÓN GENÓMICA

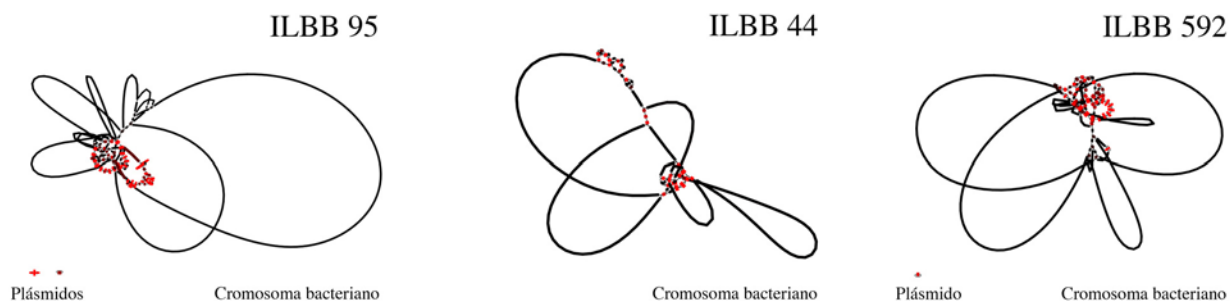
Las tres cepas seleccionadas por presentar actividad fitasa positiva, características de promoción del crecimiento y mejor desempeño en los bioensayos en planta, fueron avanzadas para profundizar su caracterización mediante análisis genómico (Figura 2). En primer lugar, se confirmó la identificación de ILBB592 como *B. megaterium*, ILBB44 como *B. pumilus*, e ILBB95 como *B. aryabhatai* según secuencias obtenidas del genoma completo. En el análisis se incluyó además la cepa ILBB510 (*B. aryabhatai*), utilizada como control negativo en los ensayos de laboratorio y bioensayos.

Para estas cepas se obtuvieron las secuencias genómicas (en promedio 99% del total de contenido génico) y la correspondiente identificación de genes (Cuadro 3).

**Cuadro 2** - Efecto de la co-inoculación de *Bradyrhizobium elkanii* U1301/U1302 (R) con una de las tres cepas de *Bacillus* spp. seleccionadas y con la cepa ILBB510 (control negativo, -P), sobre la biomasa nodular y el contenido de fósforo (P) y nitrógeno (N) en plantas de soja cultivadas en invernáculo en un sustrato arena-vermiculita. El tratamiento control corresponde a semillas inoculadas solo con *Bradyrhizobium elkanii* U1301/U1302 (R).

Tratamientos	Peso seco de nódulos	Contenido de P	Contenido de N
	30 días (g)	60 días (mg P/planta)	60 días (mg N/planta)
R + ILBB95	0,084 $\pm$ 0,009	2,76 $\pm$ 0,51	51,90 $\pm$ 9,60
R + ILBB44	0,077 $\pm$ 0,011	2,92 $\pm$ 0,45	52,50 $\pm$ 5,90
R + ILBB592	0,092 $\pm$ 0,005	2,21 $\pm$ 0,41	51,20 $\pm$ 9,90
R + ILBB510 (-P)	0,078 $\pm$ 0,014	1,99 $\pm$ 0,40	51,10 $\pm$ 9,20
Control (R)	0,075 $\pm$ 0,011	2,21 $\pm$ 0,68	49,70 $\pm$ 8,30





**Figura 2** - Representación de las secuencias genómicas de las tres cepas de *Bacillus* seleccionadas: ILBB95 (*B. aryabhatai*), ILBB44 (*B. pumilus*) e ILBB592 (*B. megaterium*).

En particular, mediante la comparación con genes de función conocida de bases de datos públicas y/o locales, se identificaron genes codificantes de enzimas fitasas y elementos reguladores de la expresión, sensores, y reguladores transcripcionales de las fosfatasa alcalinas (esenciales para la movilización del fósforo orgánico). Asimismo, se identificaron los repertorios de genes involucrados en la obtención de otros nutrientes (ejemplo: urea - ureABC; mejora en la competencia por la adquisición de nutrientes - phzADEFEG), el conjunto de genes relevantes para la función de colonización de raíz y crecimiento (ejemplo: movilidad - flgBCDEGKLMN; colonización rizosférica - xerCD, formación de biofilm y exopolisacáridos), y de genes codificantes de hormonas involucradas en la promoción del crecimiento.

### BIOPRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN

Para la cepa ILBB592 se optimizó el medio de cultivo de esporulación a partir de materias primas disponibles en el mercado, alcanzando un título de esporas de  $2,0 \times 10^9$  ufc/mL en matraz.

Se optimizaron las condiciones de producción de ILBB592 en un biorreactor de escala de laboratorio mediante el modo de operación en fed-batch (Figura 3), con una estrategia de alimentación escalable, alcanzándose un título de esporas en un orden satisfac-

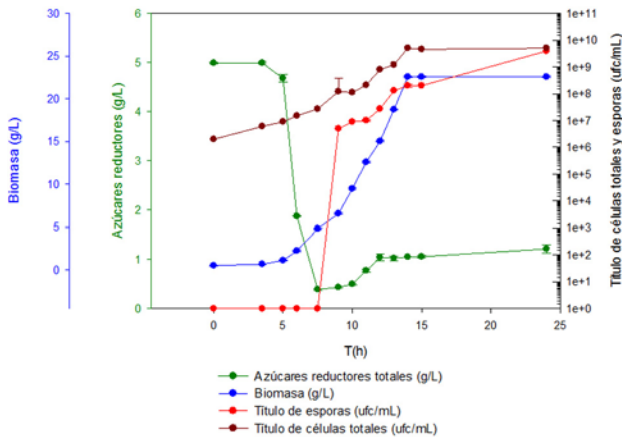
torio para el desarrollo de un bioinsumo ( $5,0 \times 10^9$  ufc/mL). Se obtuvieron formulaciones sólidas y líquidas con una carga de esporas en torno a la factibilidad de implementación del formulado logrado. Al finalizar el proyecto en julio de 2019, se obtuvo un prototipo de biofertilizante formulado en polvo seco en base a caolín, apto para las pruebas de toxicidad en mamíferos y para los ensayos de eficacia agronómica a campo. Para las cepas ILBB592 e ILBB44 se obtuvo una concentración cercana a la esperada, en el orden de  $10^9$  esporas/g formulado seco.

### INOCUIDAD

En diciembre de 2018 se seleccionaron las cepas ILBB592, ILBB95 e ILBB44, para la realización de análisis de inocuidad en mamíferos siguiendo las Guías Internacionales de la OECD, de acuerdo con los requerimientos de la Dirección General de Servicios Agrícolas del MGAP. Inicialmente se realizaron estudios de toxicidad oral aguda en ratones BALB/cJ para las cepas no formuladas. Una vez acordada la formulación de las tres cepas en vehículo sólido (caolín), se realizó el mismo estudio de inocuidad para el producto formulado. Según la Guía OECD 425, los análisis realizados indicaron que los animales no mostraron signos externos o internos de toxicidad oral aguda, y los parámetros de bienestar evaluados

**Cuadro 3** - Caracterización estructural y funcional de los genomas de las tres cepas de *Bacillus* spp. con actividad movilizadora de fósforo (P) y la cepa ILBB510 (control negativo, -P). GC%: porcentaje del contenido de guaninas - citocinas en el genoma, % Completitud: porcentaje de genes de copia única identificados, número de plásmidos, número de genes totales, Genes P: repertorio de genes involucrados en la movilización del P orgánico, Genes otros nutrientes: repertorio de genes involucrados en la obtención de otros nutrientes (C, N, S, K), Genes colonización raíz: repertorio de genes involucrados en la colonización de las raíces, Genes hormonas: repertorio de genes identificados en la codificación de hormonas, actividad P: organismo capaz de utilizar el P orgánico en los ensayos de laboratorio.

Cepa	Especie	GC%	% Completitud	Plásmidos	N° de genes totales	Genes P	Genes otros nutrientes	Genes colonización raíz	Genes Hormonas	Actividad P
ILBB95	<i>B. megaterium</i>	37,74	98,6	1	5531	8	2	5	4	(+)
ILBB44	<i>B. pumilus</i>	41,46	99,6	0	3654	3	0	7	3	(+)
ILBB592	<i>B. aryabhatai</i>	37,82	98,8	2	5471	7	2	5	5	(+)
ILBB510 (-P)	<i>B. aryabhatai</i>	38,44	98,8	1	5621	7	2	5	7	(-)



**Figura 3** - Evolución del número de esporas (ufc/mL), células totales (ufc/mL), biomasa bacteriana (g/L) y concentración de azúcares (g/L) durante la fermentación en medio líquido de la cepa ILBB592, en sistema fed-batch.

permanecieron dentro de los parámetros normales durante el experimento (Figura 4).

La realización de dichos ensayos permitió la generación de capacidades locales para dar respuesta a los requerimientos de los organismos regulatorios nacionales, así como también el proyecto permitió avanzar en la puesta a punto de métodos alternativos (*in vitro*) para la realización de ensayos de inocuidad, evitando así el uso de animales de experimentación y acompañando la tendencia mundial en estos temas.

### EVALUACIÓN DE EFICACIA AGRONÓMICA

La evaluación de la eficacia agronómica se realizó en INIA La Estanzuela en la zafra 2019/2020, en colaboración con el equipo de Evaluación de Cultivares. Los tratamientos consistieron en la aplicación a la semilla del inoculante rizobiano (Active-N U1301/U1302) + una de las cepas de *Bacillus* formulada en caolín (ILBB592 o ILBB44 o ILBB95) + insecticida (Tiametox 350 FS) + fungicida (Fluidox ultra TBZ) –compatibles con las ce-



**Figura 4** - Ratones BALB/cJ utilizados para la evaluación de toxicidad oral aguda (UATE, IPMontevideo).

pas bacterianas– (Figura 5), siendo evaluados en dos cultivares de soja (Génesis 5602 y Nidera 5909). Nidera 5909 es una de las sojas más comercializadas a nivel nacional y Génesis 5602 es un cultivar INIA recientemente liberado de similar ciclo.

Se instalaron dos ensayos en dos sitios con diferencias contrastantes en el contenido de P en el suelo: sitio con alto nivel de P (P Bray I: 38,8  $\mu\text{g P/g}$ ) y sitio con bajo nivel de P (P Bray I: 7,7  $\mu\text{g P/g}$ ) (Figura 6). El diseño experimental consistió en Bloques Completos al Azar (BCA) con cuatro repeticiones, siendo la unidad experimental cada parcela (5 m x 1,6 m). La información obtenida en los ensayos a campo se encuentra en procesamiento y análisis. No obstante, los resultados preliminares confirman varios de los efectos beneficiosos de co-inocular rizobios con las cepas seleccionadas de *Bacillus* en suelos con baja disponibilidad de P. Los ensayos serán repetidos en la próxima zafra 2020-2021.

### CONSIDERACIONES FINALES

A partir de la demanda tecnológica, se elaboró una propuesta basada en el modelo de alianzas estratégicas y en la incorporación de estudiantes.

El desarrollo de la investigación abarcó diversas etapas, desde la prospección, la identificación, la evaluación de actividad biológica, hasta la selección y multiplicación de tres cepas de *Bacillus*, formuladas en condiciones que garantizan la estabilidad y viabilidad del prototipo de producto.

Se identificaron tres cepas con las características deseadas (*Bacillus megaterium* ILBB592, *Bacillus aryabhatai* ILBB95 y *Bacillus pumilus* ILBB44), que además presentan



Foto: Pablo Torres

**Figura 5** - Semillas co-inoculadas con inoculante comercial de rizobios + formulado de *Bacillus* + insecticida + fungicida, listas para la siembra de los ensayos a campo.



Foto: Santiago Gonnet



Foto: Eduardo Abreo

**Figura 6** - Vista de los ensayos de eficacia agronómica en INIA La Estanzuela.

capacidad de promoción de crecimiento vegetal. Se analizó el genoma de las cepas y se desarrolló un prototipo de biofertilizante formulado. A partir del prototipo formulado a escala experimental, se inició una etapa de generación de conocimiento sobre inocuidad y eficacia agronómica, ambos requisitos necesarios para su registro ante la autoridad competente (DGSA/MGAP).

El uso de un biofertilizante representa una alternativa tecnológica para aumentar los niveles de P disponible,

El uso de un biofertilizante representa una alternativa tecnológica para aumentar los niveles de fósforo disponible, a expensas del reservorio de fósforo inmovilizado en el suelo.

a expensas del reservorio de P inmovilizado en el suelo. La producción a escala comercial permitirá brindar un insumo tecnológico para mejorar la nutrición fosfatada en los sistemas de producción, contribuyendo a reducir el impacto ambiental negativo asociado al agregado de fertilizantes minerales.

## REFERENCIAS

Cerecetto V (2018) Evaluación de bacterias pertenecientes a colecciones nacionales por su capacidad de actuar sobre la fitodisponibilidad del fósforo: selección, mecanismos involucrados y potencial uso como biofertilizante en plantas de soja (*Glycine max*). Tesis de Maestría en Biotecnología, Udelar.

European Sustainable Phosphorus Platform (ESPP). <https://www.phosphorusplatform.eu/>

George TS, Giles CD, Menezes-Blackburn D, [...] Beyhaut E *et al.* (2018) Organic phosphorus in the terrestrial environment: a perspective on the state of the art and future priorities. *Plant and Soil* 427:191-208. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3391-x>.

Global Phosphorus Research Initiative (GPRI). <http://phosphorusfutures.net/>

Martín N (2019) Prospección, caracterización y bioproducción de *Bacillus sensu lato* movilizadores de fósforo del suelo. Tesis de Maestría en Biotecnología, Udelar.

Sustainable Phosphorus Alliance, Arizona State University. <https://phosphorusalliance.org/>

## FACTORES DE ÉXITO Y LOGROS DESTACADOS

El modelo de trabajo fue un factor clave para el éxito del proyecto y el logro de sus objetivos. Se consolidó un equipo de trabajo integrado por investigadores y técnicos de las instituciones y de las empresas. Se formaron recursos humanos de grado y posgrado. Se realizaron capacitaciones a través de cursos y pasantías en servicio.

Se promovieron intercambios con grupos de trabajo que potenciaron la integración de redes nacionales e internacionales. Se fortalecieron las capacidades para trabajar en análisis genómico y bioinformático. Se crearon capacidades en la UATE para atender los requisitos de registro de productos biológicos, promo-

viendo métodos de análisis de inocuidad alternativos al uso de animales de experimentación.

## DESAFÍOS

Pasar de la etapa de desarrollo tecnológico de un biofertilizante a la etapa de innovación requiere el compromiso de políticas públicas definidas en cuanto a: (1) el Registro de productos biológicos (marco normativo para el registro, comercialización y uso de biofertilizante), competencia de la DGSA/MGAP; (2) la protección de la propiedad intelectual, competencia de la DNPI/MIEM; (3) la promoción de estrategias biológicas para el manejo nutricional de cultivos, acordes al uso sostenible de los recursos naturales y (4) la extensión y educación en el uso de productos biológicos.