

## EVOLUCION DE POBLACIONES DE RHIZOBIUM MELILOTI EN TURBA

J.G. COZZI y GRACIELA B. BENINTENDE (1)

Recibido:04-10-89

Aceptado:21-05-90

### RESUMEN

Se estudió la evolución de 3 cepas de *Rhizobium meliloti* en turba de *Carex spp*, analizando la incidencia de la temperatura de almacenamiento ( $10 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) cuando se utilizó soporte no esterilizado, evaluando sus comportamientos en inoculantes preparados con turba esterilizada por radiación gamma, almacenados a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Las concentraciones rizobianas (número más probable de rizobios infectivos  $\text{g}^{-1}$  de inoculante), fueron determinadas inmediatamente después de la preparación de los inoculantes, a los 60, 120 y 180 días de almacenamiento.

Independientemente del comportamiento experimentado por cada cepa conforme el tratamiento aplicado, todos los inoculantes ensayados evidenciaron al cabo de 180 días, concentraciones bacterianas adecuadas, no menores a  $1 \times 10^8$  rizobios viables  $\text{g}^{-1}$  de producto, valor exigido por la Resolución N° 1131/88 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

Se analizó el pH y contenido de humedad de los inoculantes durante el almacenamiento, los cuales no mostraron variaciones destacables.

**Palabras clave:** *Rhizobium meliloti*, inoculantes, turba, supervivencia, temperatura.

### EVOLUTION OF RHIZOBIUM MELILOTI POPULATIONS IN PEAT

#### SUMMARY

The evolution of 3 strains of *Rhizobium meliloti* in *Carex spp* peat was studied. The incidence of storage temperature ( $10 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) was analyzed when non sterilized carrier was utilized. Their behavior was also evaluated in inoculants prepared with peat sterilized by gamma radiation and stored at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

The rhizobial concentrations (most probable number of infective rhizobia  $\text{g}^{-1}$  of inoculant) were determined immediately after inoculant preparation and at 60, 120 and 180 days of storage.

Independently to the behavior showed by each strain according to the applied treatment, all the tested inoculants had bacterial concentrations not less than  $1 \times 10^8$  viable rhizobia  $\text{g}^{-1}$  of product after 180 days. That is the value required by the Agriculture, Cattle and Fishery Secretary of the Argentine Republic according to Resolution N° 1131/88.

pH and moist content of the inoculants during storage was analyzed not showing out standing variations.

**Key words:** *Rhizobium meliloti*, inoculants, peat, survival, temperature.

(1) Instituto de Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias (CICA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), C.C. 25 -1712-Castelar, Buenos Aires - Argentina -

## INTRODUCCION

Entre las leguminosas forrajeras utilizadas en la Argentina, la alfalfa y los tréboles de olor ocupan un lugar de indiscutida relevancia. Esto se desprende de la gran superficie ocupada por dichos cultivos (7.000.000 ha) y por el importante aporte que significaría la eficiente captación del nitrógeno a través de la asociación de los mismos con su rizobio específico.

Durante los últimos años, el Instituto de Microbiología del CICA, INTA, ha recibido numerosas consultas sobre aspectos de la producción de inoculantes para forrajeras por parte de la industria. Simultáneamente se ha observado un importante incremento en los volúmenes producidos de inoculantes para alfalfa (según datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación).

La idea que generó la realización del presente trabajo fue aportar datos para el mejor conocimiento del comportamiento de inoculantes para esta especie forrajera.

Uno de los aspectos importantes que hacen a la práctica de la inoculación es la calidad de estos insumos y su mantenimiento durante la conservación de los mismos.

Diversos trabajos a nivel internacional han estudiado la supervivencia de cepas de *Rhizobium meliloti* informando resultados variables de acuerdo a la cepa y tipos de turba empleadas (Roughley y Vincent, 1967; Roughley, 1968; Strijdom y Van Rensburg, 1981).

En la Argentina se ha estudiado el comportamiento de cepas de *R. meliloti* sobre turbas esterilizadas, habiéndose obtenido una excelente supervivencia (Mazza et al., 1985; Pastor et al., 1987) pero, es imposible a nivel industrial esterilizar el soporte necesario por carecerse de la infraestructura requerida. En consecuencia, se consideró importante, estudiar la evolución de poblaciones de cepas de rizobios pertenecientes al grupo de

inoculación de la alfalfa, empleando turba no esterilizada. Como control se empleó el mismo portador esterilizado con radiación gamma.

## MATERIALES Y METODOS

**Soporte:** turba de ciperáceas (*Carex* spp) originaria de El Hoyo, provincia del Chubut, molida (76% pasó por malla 140, US Standard Sieve Series) y con un contenido de humedad ca 10%.

Los análisis físico-químico, químico y microbiológico de este material se detallan a continuación:

Conductividad eléctrica (mmhos $\text{cm}^{-1}$ )	1,1
pH	4,3
Cap. retención hídrica (%)	180
Capac. de intercambio catiónico (m.e.100g $^{-1}$ )	80
Materia orgánica (%)	92,12
Cenizas (%)	9,88
Nitrógeno total (%)	0,85
Cationes intercambiables (mg 100g $^{-1}$ )	
Calcio (Ca $^{++}$ )	268
Magnesio (Mg $^{++}$ )	48
Sodio (Na $^{+}$ )	22
Potasio (K $^{+}$ )	12
Hongos g $^{-1}$ de turba seca	3,7x10 $^6$
Bacterias aeróbicas g $^{-1}$ turba seca	7,0x10 $^6$

**Procesamiento de soporte:** el pH fue ajustado a 6,5 con carbonato de calcio precipitado extraliviano. Una parte del soporte fue envasada en bolsas de polietileno de baja densidad de 50  $\mu\text{m}$  de espesor, a razón de 100g, y esterilizadas mediante radiación gamma (4 M rad).

**Cepas de *R. meliloti*** provenientes del cepario del Instituto de microbiología, CICA, INTA.

**B-58:** procedente del Instituto Experimental de investigación y Fomento Agrícola de la

provincia de Santa Fe; original de la Estación Agrícola de Gröningen, Holanda.

**B-251:** aislada de nódulos de **Medicago sativa** en la provincia de Santa FE.

**B-323:** procedente del Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Australia. Número original C.C. 2068.

**-Medios de cultivo:** el crecimiento de los rizobios se realizó en el medio líquido indicado para **R. meliloti** (Fanti et al., 1976).

Para las determinaciones de unidades formadoras de colonias (ufc) se utilizó el medio agarizado de Fred y Waksman N° 79 modificado (Schiel y Ragonese, 1942). El medio agarizado de Jensen (Vincent, 1975) fue utilizado para el crecimiento de plantas en tubos.

**-Preparación de los cultivos líquidos:** las cepas fueron sembradas en erlenmeyers de 1.000 ml conteniendo 500 ml de medio de cultivo líquido. La incubación se realizó durante 48 h a  $29 \pm 0,5^\circ\text{C}$  en agitador rotatorio (180 rpm y 2,5 cm de excentricidad).

**-Determinación del título en los cultivos rizobianos líquidos:** según el método de dilución en cajas de petri (Vincent, 1975). Las concentraciones obtenidas fueron **B-58:**  $2,9 \times 10^9$ ; **B-251:**  $7,5 \times 10^9$  y **B-323:**  $5,2 \times 10^9$  ufc de rizobios  $\text{ml}^{-1}$ .

**-Preparación de los inoculantes:** los elaborados sobre la base de turba no esterilizada de acuerdo a trabajos previos (Cozzi y Benintende, 1986) con respecto a los inoculantes en soporte esterilizado, cada bolsa se impregnó inyectando el caldo en cantidad suficiente para lograr un contenido de humedad ca 48% (base húmeda). El orificio de inyección se cubrió con

tela adhesiva plástica y cada bolsa se homogenizó manualmente para asegurar la uniforme distribución de rizobios en el soporte.

**-Hospedero:** alfalfa (**M. sativa**) ecotipo pampeano, con un poder germinativo del 88%.

**-Desinfección, germinación y siembra de semillas:** según metodología indicada por Vincent (1975).

**-Determinación de supervivencia de rizobios infectivos:** se empleó el método del número más probable (NMP) (Alexander, 1965) por la técnica de infección en plantas (Vincent, 1975).

Paralelamente se realizaron determinaciones de ufc de rizobios por la metodología de dilución en cajas de petri. En el caso de inoculantes preparados en soporte no estéril, ésta última se utilizó sólo en la determinación inicial.

Las plantas crecieron en cámara iluminada con fotoperíodo de 12 h durante 21 días, al cabo de los cuales se efectuaron las observaciones.

Estas evaluaciones fueron realizadas inmediatamente después de la preparación de los inoculantes, a los 60, 120 y 180 días.

**-Determinaciones de pH y humedad de los inoculantes:** (Cozzi y Benintende, 1986). Se realizaron en los tiempos indicados en el ítem anterior.

**-Conservación de los inoculantes:** los preparados con turba estéril fueron almacenados a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y los elaborados con turba no estéril fueron separados en dos fracciones almacenándose una de ellas a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  y la otra a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 1 muestra la evolución de las poblaciones rizobianas durante el

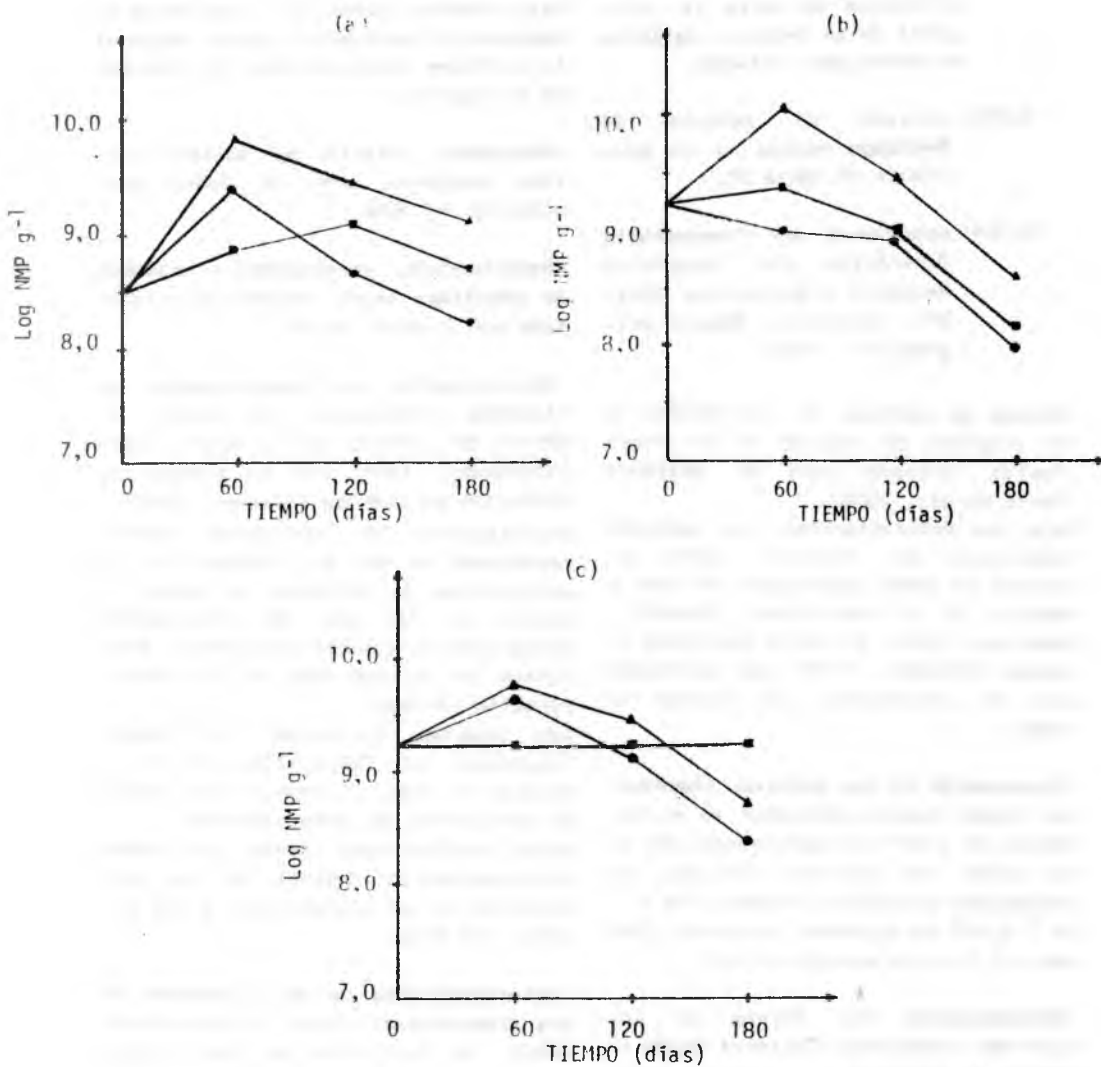


Figura 1: Evolución de cepas de *Rhizobium meliloti* en inoculantes preparados con turba esterilizada y no esterilizada (Logaritmo del número más probable -NMP- de rizobios infectivos g<sup>-1</sup> de producto húmedo).

Gráfico (a): cepa B 58; (b): cepa B 251; (c): cepa B 323

- ▲ Turba esterilizada, almacenados a 28 ± 2°C
- Turba no esterilizada, almacenados a 10 ± 2°C
- Turba no esterilizada, almacenados a 28 ± 2°C

El factor para límites de confianza 95 % es de 0,5.

almacenamiento de los inoculantes. Los graficos a, b y c corresponden a las cepas de Rhizobium meliloti B-58; B-251 y B-323, respectivamente.

Los valores de cada capa fueron corregidos a una concentración inicial única, aproximadamente igual al promedio del  $\log$  del NMP de rizobios infectivos  $g^{-1}$  de inoculante.

En todos los casos los preparados sobre la base de turba estéril evidenciaron, en mayor o menor grado, un incremento inicial de las poblaciones de rizobios y posterior decaimiento de las mismas, comportamiento que se refleja en las pendientes de las rectas representativas. Dicha evolución era esperada conforme experiencias anteriores propias (inéditas) y de otros autores (Burton, 1979; Mazza et al., 1985).

En el caso de los inoculantes en soporte no estéril, el comportamiento de las cepas fue variable. Las diferencias se observaron fundamentalmente entre la cepa B-251 respecto de B-58 y B-323, ya que éstas últimas presentaron pocas variaciones en las concentraciones durante el almacenamiento a  $10 \pm 2^\circ C$ , lo cual era predecible, ya que el metabolismo celular disminuye sensiblemente en esas condiciones. Por otra parte, la evolución en el caso del almacenamiento a  $28 \pm 2^\circ C$ , se asemeja a lo observado para los inoculantes en turba estéril ya comentado, aunque con concentraciones algo menores, debidas seguramente a la competencia con los microorganismos contaminantes presentes en el soporte.

Por el contrario, la cepa B-251 muestra un similar comportamiento para ambas temperaturas de almacenamiento, evidenciándose a partir de los 120 días un brusco cambio de pendiente en las curvas, cuya explicación no es posible con los datos obtenidos en este trabajo.

Las concentraciones de rizobios viables de los inoculantes preparados con turba estéril, fueron similares a

los NMP de rizobios infectivos obtenidos para las poblaciones estudiadas y en todos los tiempos ensayados.

Los análisis de pH y porcentaje de humedad no evidenciaron variaciones destacables durante el almacenamiento.

#### CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permiten inferir que todos los inoculantes ensayados, ya sea empleando turba estéril o no estéril, con temperatura de almacenamiento de  $10 \pm 2^\circ C$  ó de  $28 \pm 2^\circ C$ , presentaron al cabo de 6 meses, una concentración de rizobios infectivos adecuada para ser utilizados en la inoculación de semillas de alfalfa.

Estas concentraciones se consideran adecuadas ya que cumplen con las exigencias de la Resolución N° 1131/88 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (no menos de  $1 \times 10^8$  rizobios viables  $g^{-1}$ ).

Teniendo en cuenta que la turba empleada es de uso común en la Argentina para la elaboración de inoculantes, y las concentraciones rizobianas en los cultivos líquidos así como las condiciones de trabajo, son perfectamente factibles de obtener en escala industrial, estos resultados son extrapolables a ese nivel.

#### AGRADECIMIENTOS

- Al Ing. Agr. Edgardo Brenzoni (Comisión Nacional de Energía Atómica) por su intervención en la esterilización del soporte.
- Al Instituto San Jorge-Bagó S.A. por el apoyo económico brindado.
- A la firma Magri y Gallardón S.A. por el suministro de la turba empleada en este ensayo.
- A la señora Carmen Mercado y al señor Pedro Herrero por la eficiente colaboración en la ejecución de los trabajos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) ALEXANDER, M. 1965. "Most probable number method for microbial populations". En C.A. Black (Ed.). *Methods of Soil Analysis, Part 2*, pág. 1467-1472. American Society of Agronomy Inc. Publisher, Wisconsin, USA.
- 2) BURTON, J.C. 1979. "*Rhizobium* species". En H.J. Pepller y D. Perlman (Eds.). *Microbial Technology*, 2nd. ed., 1:29-58. Academic Press.
- 3) COZZI, J.G. y G.B. BENINTENDE. 1986. "Supervivencia de *Bradyrhizobium japonicum* en turba no estéril". En *Actas IX Reunión Técnica nacional de Soja*, Resistencia, Chaco, 5-8 de octubre de 1986. R. Argentina, s/n° pág.
- 4) FANTI, O.D., A.P. CERCOS, J.G. COZZI y R.N. DIEGUEZ. 1976. "Producción de inoculantes de alfalfa y de soja por cultivo sumergido". *Rev. Inv. Agrop.*, INTA, Ser. 2, 13:55-69.
- 5) MAZZA, L.M., L.M. AVELLA, M.D. PASTOR y A.P. BALATTI. 1985. "Inoculantes para alfalfa. Influencia del pH en el crecimiento y supervivencia de cepas de *Rhizobium meliloti*". *Rev. Fac. Agron.*, 6(3):169-175.
- 6) PASTOR, M.D.; L. AVELLA, L.M. MAZZA y A.P. BALATTI. 1987. "Crecimiento y sobrevivencia de cepas de *Rhizobium* sobre turbas y tierra de diatomeas". En *Actas 1er. Congreso Latinoamericano de Biotecnología*, San Miguel de Tucumán, 4-8 de octubre de 1987. R. Argentina, s/n° pág.
- 7) ROUGHLEY, R.J. y J.M. VINCENT. 1967. "Some factors influencing the growth and survival of rrot nodule bacteria in peat culture". *J. Appl. Bacteriol.*, 31:259-265.
- 8) ROUGHLEY, R.J. y J.M. VINCENT. 1967. "Growth and survival of *Rhizobium* spp in peat culture" *Ibidem*, 30:362-376.
- 9) SCHIEL, E. y A. RAGONESE. 1942. "Infección de la alfalfa con *Rhizobium meliloti* en la provincia de Santa Fe". *Rev. Arg. Agron.*, 9:114-169.
- 10) STRIJDOM, B.W. y H.J. VAN PESNBURG. 1981. "Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of *Rhizobium* inoculants". *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:1344-1347.
- 11) VINCENT, J.M. 1975. *Manual práctico de Rizobiología*. 1ra. ed. Ed. Hemisferio Sur, Bs. As.