

SELECCION DE SOPORTES PARA LA PRODUCCION DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS.

ANA L. RONCHI y A.P. BALATTI¹

Recibido: 16-09-91

Aceptado: 25-02-92

RESUMEN

*Si bien la turba constituye uno de los mejores soportes para la elaboración de inoculantes comerciales, su utilización está condicionada a su disponibilidad y/o costo. En este trabajo se estudia la posibilidad de utilización, a nivel industrial, de un silicoaluminato de producción nacional, de gran disponibilidad, que eventualmente puede reemplazar a la turba como soporte para la industrialización de inoculantes. A tal fin, empleando este nuevo material que posee alta capacidad de retención de agua se realizaron una serie de experiencias donde se estudió la cinética de crecimiento y/o sobrevivencia de diferentes cepas que se emplean en la elaboración de inoculantes comerciales. Así, usando el material indicado en mezcla de suelo y con el agregado de nutrientes se alcanzan valores de sobrevivencia del orden de 10^8 a 10^9 células /gramo a los ocho meses de su impregnación. Estos resultados corresponden a experiencias empleando cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium meliloti*.*

Palabras clave: inoculante, silicoaluminato, *Bradyrhizobium japonica*, *Rhizobium meliloti*

SELECTION OF CARRIERS FOR INOCULANTS SEED LEGUMES PRODUCTION

SUMMARY

*Despite the fact that the peat constitutes one of the best carriers for the elaboration of commercial inoculants, its use is conditioned to availability and/or cost. This paper studies the possibility of using a silicoaluminato of great disponibility, at an industrial level. This silicoaluminato, of national production, can eventually replace the turf as carrier, in the industrialization of inoculants. For this purpose a series of experiences were done, employing this new material that possesses a high water retentive capacity. In them, the kinetic of growth and/or survival of differents strains, employed in the elaboration of commercial inoculants, was studied. Thus, using the indicgted material, mixing it with soil or with the additive of nutrients, counts of the order of 10^8 - 10^9 cel/g were obtained, eight months after its impregnation. These results correspond to experiences done while using strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium meliloti*.*

Key words: carriers, silicoaluminato, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti*.

¹PROMIQA: Programa de Microbiología y Química Agrícola. Dpto. de Química.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de La Pampa. 6300 -La Pampa- Argentina

INTRODUCCION

La tecnología de producción de inoculantes ha evolucionado marcadamente en los últimos años en razón de los aportes y conocimientos que nos brindan las ciencias biológicas y químicas, como así también la tecnología. Esto ha permitido alcanzar productos de muy alta calidad otorgando al agricultor una mayor seguridad en los procesos de inoculación de leguminosas (Burton, 1967; Burton, 1979; Date y Roughley, 1977; Gault, 1981; Jung et al.; 1982; Labandera, 1985; Roughley, 1970; Roughley, 1985). Sin embargo, en muchos países, especialmente latinoamericanos, existen dificultades en los procesos de elaboración en razón de limitaciones que podrían ser atribuidas, en algunos casos a un incorrecto uso de la tecnología disponible y en otros a la falta de materia prima. Con referencia a este último aspecto, si consideramos principalmente a inoculantes al estado de polvo fino o granulares el soporte utilizado en mayor extensión es la turba. Este material puede presentar grandes variaciones en cuanto a su composición, su capacidad de retención de agua y su comportamiento en relación a las características fisiológicas de los microorganismos que se utilizan que pertenecen a los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium. La turba de por sí puede presentar grandes variaciones con referencia a las características y propiedades mencionadas, (Balatti y Mazza, 1979; Lopreto y col, 1975; Mussini, 1985) y además, a esto se suma que en algunos países como es el caso de la Argentina su costo es extremadamente alto. Los valores de turba están alrededor de 1 dolar el kilogramo, expresado en materia seca, en el área de Buenos Aires y los yacimientos se encuentran a 3500 km de distancia, en el sur, donde existen actualmente dos yacimientos en explotación (por supuesto nos referimos a las turbas de mejor calidad). Todas estas consideraciones nos han llevado a estudiar el comportamiento de un producto que actualmente se comercializa a nivel industrial

para su aplicación como material filtrante, aislante y para incrementar la porosidad de algunos tipos de suelos con el objeto de mejorar el grado de aeración de los mismos. Químicamente es un silicoaluminato que se presenta al estado de polvo fino (200 mesh) de alta capacidad de retención de agua y que ofrecería la posibilidad de su utilización como soporte, empleado solo o en mezclas con otros materiales. Es de destacar que este producto tiene un valor en el mercado inferior al valor de la turba.

Los parámetros que se consideran son cinética de crecimiento y/o sobrevivencia.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se emplearon dos cepas una de Bradyrhizobium japonicum (E-45) y otra de Rhizobium meliloti (B-36), (ambas cepas fueron suministradas gentilmente por el Ing. Pacheco Basurco, de INTA Castelar, quienes las recomiendan para la elaboración de inoculantes comerciales). Estos microorganismos fueron conservados en un medio que contiene fundamentalmente manitol, extracto de levadura, nitrato de potasio, sales y agar; en la heladera a una temperatura de 5°C en tubos pico de flauta, dentro de bolsas de polietileno selladas (Balatti et al. 1987).

Medios

Los microorganismos fueron desarrollados en los medios indicados en el Cuadro N°1, y para el desarrollo de los inóculos se emplearon medios similares pero con el 50% de extracto de levadura y fuente de carbono.

Inóculos

Los inóculos fueron sembrados a partir de un repique en tubo con agar inclinado. Los inóculos se transfirieron con valor de

Selección de soportes para la producción de...

Cuadro N°1: Composición de medios de cultivo

Componente g/l	Microorganismos	
	Bradyrhizobium japonicum	Rhizobium meliloti
K_2HPO_4	0,5	0,5
KH_2PO_4	0,5	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4\text{H}$	0,3	
FeSO_4	0,8	0,8
NaCl	0,1	0,1
FeCl ₃ (*)	2 gotas	2 gotas
H_2SO_4 (*)	2 gotas	2 gotas
E. C. Levadura	4	4
Glicerol	10	
Sacarosa		10

(*) Solución 10%.

Cuadro N°2: Características físico-químicas de los soportes utilizados

%	Turba	Suelo	Carbón vegetal	Perlita
pH	4,0	5,8	7,5	-
N	6,7	5	1	-
Carbono	13,20	5	15	-
Capacidad de retención de agua	120	20	10	60
SiO ₂	-	-	-	76
Al ₂ O ₃	-	-	-	17
Fe ₂ O ₃	-	-	-	0,3
CaO	-	-	-	0,44
MgO	-	-	-	0,04
H ₂ O	-	-	-	2
H ₂ O	-	-	-	4,6
pH	5	6,3	6,7	6,68

densidad óptica entre 4 y 5 de manera de obtener en los procesos una concentración

inicial de aproximadamente 108 cel/ml.

Crecimiento celular

El crecimiento celular fue evaluado en base a medidas de densidad óptica, a 600 nm, peso seco y número de células viables (Koch, 1981).

Recuento de células viables en los inoculantes obtenidos

Para determinar el número de células

viables, como todos estaban preparados estérilmente, se realizaron recuentos en cajas de Petri. Para ello se tomó 1 gramo de inoculante que se colocó en un erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de agua destilada estéril, las suspensiones se colocaron en agitador rotatorio durante 10 minutos, y a partir de ellas se hicieron diluciones decimales.

Material soporte

En el presente trabajo se utiliza turba de Tierra del Fuego como testigo y un silicoaluminato solo y en mezclas con suelo, turba y carbón vegetal.(Cuadro N°2)

Los soportes fueron caracterizados en

cuanto a su capacidad de retención de agua. Se estima la capacidad de retención de agua como la cantidad de agua que admite el soporte manteniendo sus características de polvo fino sin aglomerarse a la presión entre los dedos. Los soportes convenientemente molidos (malla tamiz 200) fueron secados hasta tener una humedad menor al 4%. Posteriormente fueron esterilizados, primero a granel durante 1 hora a 121 °C y luego envasados en bolsas de polipropileno de 30 micrones de espesor y esterilizados nuevamente durante 30 minutos a 121 °C. Finalmente se ajustó el contenido de humedad a un tenor de 8-10%. La impregnación se realizó mediante inyección de la cantidad de cultivo necesaria para llegar a un contenido final de humedad entre 50-60% asegurando una concentración inicial del orden de 10^{10} cel/g. Estas bolsas una vez impregnadas fueron mantenidas a la temperatura de laboratorio de 20-25 °C.

Previo a la utilización de los diferentes soportes empleados en nuestros estudios se realizaron algunos ensayos sobre su posible toxicidad o inhibición crecimiento celular. Para tal fin se realizaron dos ensayos: a) en matraces erlenmeyers de 1 litro de capacidad fueron colocados 60 gramos de los soportes utilizados (turba de Tierra del Fuego, perlita, suelo, carbón vegetal), adicionados de 300 ml de agua y mantenidos en un agitador rotatorio por 24 horas a la temperatura de 28 °C. La suspensión fue filtrada y el líquido fue empleado en lugar de agua para preparar el medio de cultivo (Cuadro N°1). b) a 100 ml de medio de cultivo (indicado en Cuadro N°1) se incorporaron 5 gramos de turba de Tierra del Fuego, perlita, carbón vegetal y suelo. El conjunto fue esterilizado en un matraz erlenmeyer de 500 ml durante 20 minutos a 121 °C. Estos erlenmeyers fueron sembrados con un inóculo de manera de tener al comenzar los ensayos una concentración inicial de aproximadamente 10^8 cel/ml. Es

de destacar que los soportes empleados en estas experiencias ya habían sido esterilizados durante una hora a 121 °C, como ya fuera indicado anteriormente.

Condiciones de operación en los procesos fermentativos

Todos los inóculos como los procesos fueron realizados en matraces erlenmeyers con 1/5 de volumen de medio con respecto del volumen del frasco. Los mismos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Los procesos fueron mantenidos por 36 horas para *Rhizobium meliloti* y 70 horas para *Bradyrhizobium japonicum* a 28 °C en agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad, habiendo alcanzado al cabo de estos períodos valores de densidad óptica de 8-9.

Métodos de inoculación de plantas en cámara climatizada

Los ensayos de cultivos de plantas de soja inoculadas y cultivadas artificialmente se hicieron de acuerdo a lo indicado por Lopreto, Mazza y Balatti (1973), y los ensayos de inoculación de plantas de alfalfa se realizaron de acuerdo al método recomendado por Vincent (1970), según el siguiente esquema: tratamiento 1: sin inocular; tratamiento 2: con inoculación usando inoculantes obtenidos a base de turba; tratamiento 3: con inoculación usando inoculantes obtenidos a base de perlita-suelo 70:30. Para cada tratamiento se hicieron 5 repeticiones.

Se determinó peso de planta y contenido de nitrógeno de parte aérea. Con los valores obtenidos se efectuó el análisis numérico por el método de la variancia y se determinaron las diferencias mínimas significativas por la prueba de Tukey.

Selección de soportes para la producción de...

RESULTADOS

Ensayos de crecimiento en medio líquido integrado con los soportes empleados o su extracto acuoso

En la Figura 1 se muestran los valores de recuentos de viables de procesos en los cuales se trató de determinar si los soportes empleados pudieran tener algún grado de toxicidad o inhibición en el desarrollo microbiano. Como se puede apreciar en la Figura 1 (que corresponde a las experiencias donde se incorpora el soporte como tal al medio de fermentación), los valores de

perlita, suelo, turba de Tierra de Fuego, a razón de 5 gr/100ml de medio. recuento celular determinados en cajas de Petri demuestran que en todos los casos se obtuvo un desarrollo semejante al medio testigo (sin ningún agregado), alcanzándose valores de viables del orden de 10^{10} cel/ml. Por otra parte es de destacar que con los extractos se obtuvieron resultados similares.

Ensayos comparativos de sobrevivencia en soportes a base de turba, perlita y perlita más suelo

En la Figura 2 se muestran los primeros ensayos de sobrevivencia realizados durante seis meses donde se utilizaron soportes constituidos por: perlita 100%, perlita-suelo 50:50, perlita-suelo 70:30, perlita-turba 50:50, perlita-turba 70:30, perlita-carbón 50:50, se usó como testigo turba de Tierra del Fuego. Los resultados obtenidos nos indican que en general la perlita adicionada de suelo, carbón o turba tiene un comportamiento más aceptable ya que todos los valores de concentración microbiana se encuentran por encima de 10^8 cel/g., a los seis meses de comenzada la experiencia. No obstante, existe un valor crítico para perlita sola que está alrededor de los cinco meses para ambos microorganismos ya que la concentración celular se encuentra por debajo

de 10^8 cel/g.

En base a los resultados anteriores se hizo una nueva serie de ensayos donde se utilizó como soporte base la perlita, adicionada de 30% de suelo en comparación con soportes preparados con perlita sola y turba. Se estudió la respuesta a la sobrevivencia y/o crecimiento empleando en la impregnación: caldo fermentado más 50% de agua, caldo fermentado más 50% de caldo fresco, caldo fermentado más 50% de caldo fresco más micronutrientes.

En las Figuras 3 y 4 se indican los resultados obtenidos donde se muestra que la turba tiene un comportamiento muy similar en todas las experiencias; en lo que respecta a la perlita se observa que cuando es suplementada mejora la sobrevivencia del microorganismo, tanto para *Rhizobium meliloti* como para *Bradyrhizobium japonicum*. Si consideramos los resultados utilizando perlita más 30% de suelo y suplementada con distintos tipos de medio, se observa que existe un buen comportamiento en general en todos los preparados estudiados en razón de que los nuevos valores de viables están por encima de 5×10^8 cel/g a los seis meses de obtenidos los inoculantes.

En el Cuadro N°3 se indican los resultados obtenidos en el ensayo de plantas de soja y de alfalfa cultivadas artificialmente utilizando uno de los inoculantes a base de perlita y que presentara altos valores de sobrevivencia.

Como se puede observar el comportamiento fisiológico de las cepas fue muy aceptable en razón de que los valores de las plantas inoculadas se diferencian significativamente de los lotes sin inocular, ($P=0,05$).

DISCUSION

En primer término debemos considerar los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento en medio líquido utilizando los

Cuadro N°3: Ensayos de plantas inoculadas con preparados a base de perlita y turba.

	Plantas de soja		Plantas de alfalfa	
	Cant. de N %	Peso seco planta/g	Peso seco mg/planta	Numero de nódulos/planta
Trat. 1	1,49(a)	4,85(a)	2,51(a)	
Trat. 2	3,15(b)	7,60(b)	7,94(b)	15(b)
Trat. 3	3,10(b)	7,90(b)	8,91(b)	16(b)
Error estándar		0,126		0,160

Trat. 1: testigo no inoculado

Trat. 2: inoculado a base de turba

Trat. 3: inoculado a base de perlita

Los valores indicados por las mismas letras no difieren entre si en forma significativa. (Tukey P=0,05)

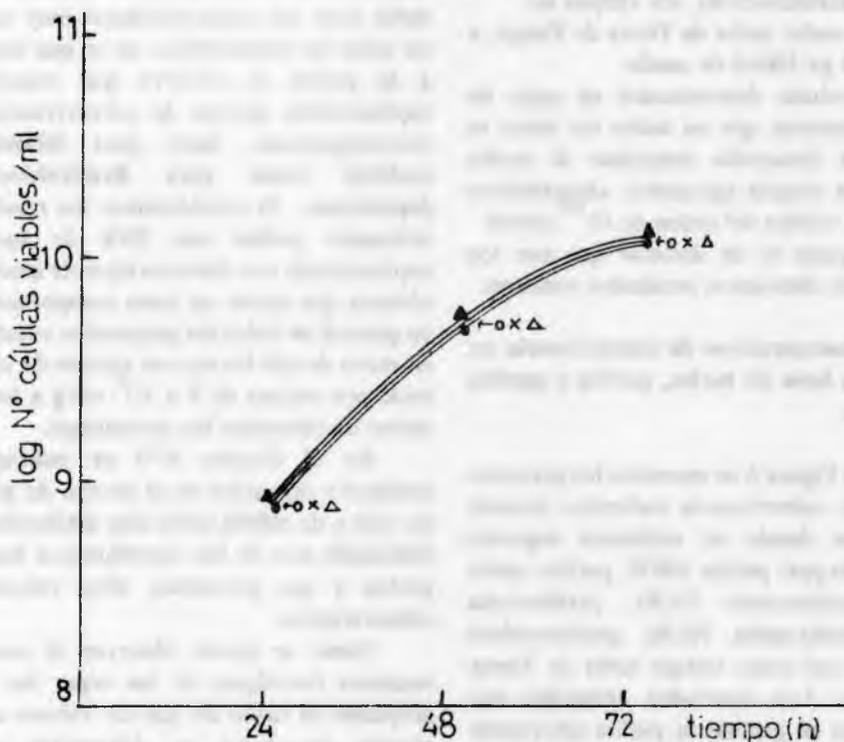


Figura 1: Crecimiento celular de *Bradyrhizobium japonicum* (45) y *Rhizobium meliloti* (B 36) en medios de cultivos adicionados de carbón vegetal, perlita, suelo, turba de Tierra del Fuego, a razón de 5 gr/100 ml del medio.

soportes que se integran a los medios y donde se demuestra que no presentan toxicidad ya que la evolución de las curvas de crecimiento son similares en todos los casos con un desarrollo muy semejante al medio testigo.

En la Figura 2 donde se representan las mezclas de perlita con otros materiales se demuestra que sola tiene limitaciones para la sobrevivencia después de los cinco meses; sin embargo, cuando se adiciona de suelo o

Selección de soportes para la producción de...

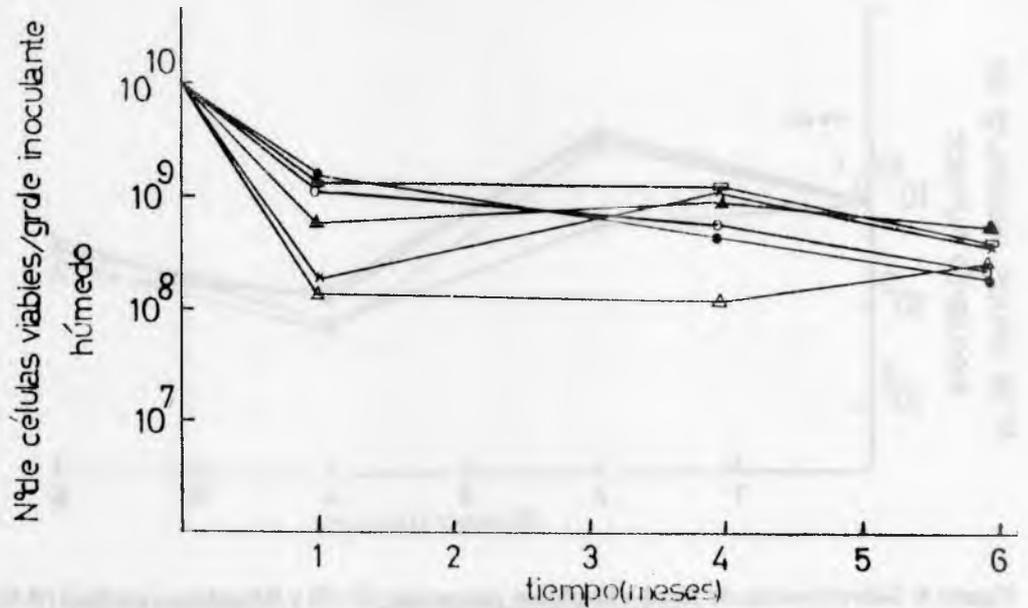


Figura 2: Sobrevivencia de *Bradyrhizobium japonicum* (E 45) y *Rhizobium meliloti* (B 36) sobre soporte a base de perlita; perlita + suelo (50:50); perlita + suelo (70:30); perlita + turba (50:50); perlita + turba (70:30); perlita + carbón (50:50)

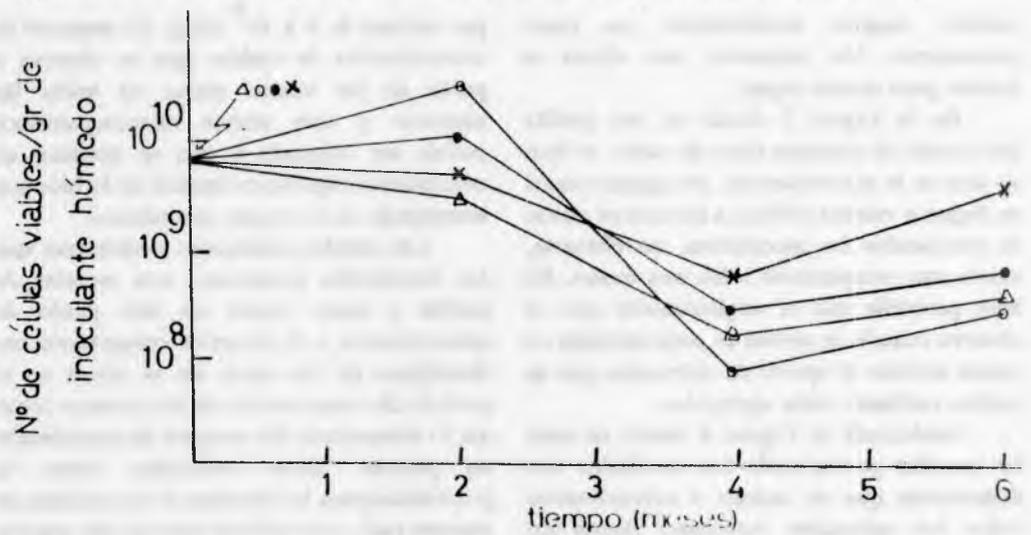


Figura 3: Sobrevivencia de *Bradyrhizobium japonicum* (E 45) y *Rhizobium meliloti* (B 36) en perlita adicionada de: 50% caldo fermentado + 50% de agua; 50% de caldo fermentado + 50% de caldo fresco; 50% de caldo fermentado + 50% de caldo fresco + micronutrientes; turba + 50% de caldo fermentado + 50% de agua.

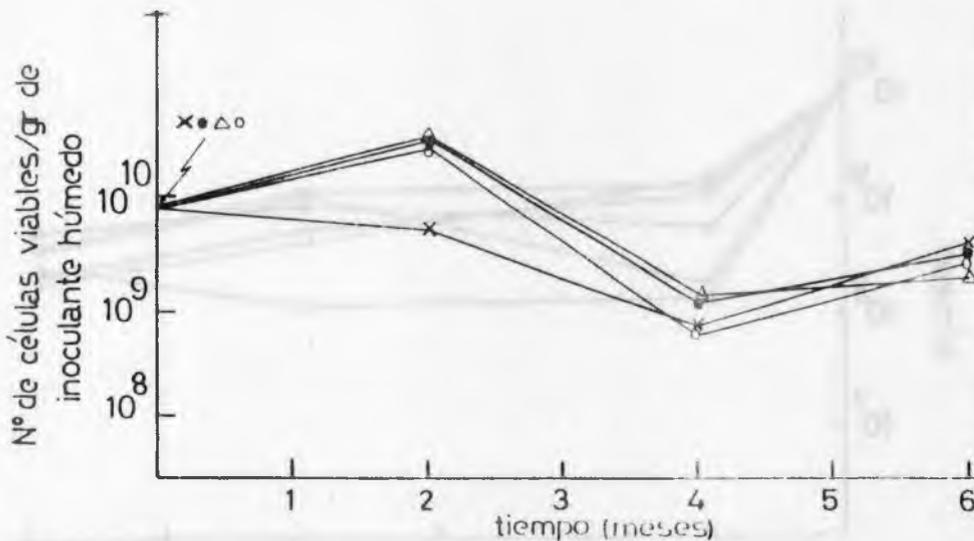


Figura 4: Sobrevivencia de *Bradyrhizobium japonicum* (E 45) y *Rhizobium meliloti* (B 36) en perlita-suelo, (70:30) adicionada de: 50% de caldo fermentado + 50 % de agua; 50% de caldo fermentado + 50% de caldo fresco; 50% de caldo fermentado + 50% de caldo fresco + micronutrientes; turba + 50% de caldo fermentado + 50% de agua.

carbón, mejora notablemente su comportamiento. Por supuesto, este efecto es similar para ambas cepas.

En la Figura 3 donde se usa perlita adicionada de distintos tipos de caldo, si bien se mejora la sobrevivencia, en algunos casos se llegan a valores críticos a los cuatro meses de producidos los inoculantes, no obstante, existe una recuperación a los seis meses. Es muy probable que el mejoramiento que se observa cuando la perlita es suplementada se pueda atribuir al aporte de nutrientes que se realiza mediante estos agregados.

Analizando la Figura 4 donde se usan las mezclas perlita-suelo los resultados nos demuestran que en cuanto a sobrevivencia todos los agregados realizados tienen un efecto favorable en razón de que a los seis meses los valores de viables se encuentran

por encima de 5×10^8 cel/g. El aumento de concentración de viables que se observa a partir de los cuatro meses en todas las muestras y con ambos microorganismos podría ser asignado a que se produce un crecimiento críptico en función de la biomasa acumulada en las etapas precedentes.

Los estudios realizados demuestran que los inoculantes preparados con mezclas de perlita y suelo tienen un alto grado de sobrevivencia y el posterior comportamiento fisiológico de las cepas no se altera en el período de conservación de los mismos como así lo demuestran los ensayos de inoculación en plantas. Estos resultados abren la posibilidad para la industria de inoculantes de nuestro país, para utilizar este tipo de soporte como un material alternativo de la turba que presenta un costo mucho mayor.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BALATI, A.P. y L.A. MAZZA. 1979. Esterilización de turba con óxido de etileno. Obtención de inoculantes para soja a base de turbas de Tierra del Fuego, esterilizadas por vapor y óxido de etileno. *Rev. Arg. Microbiol.*, 11:38-88.
- 2) BALATTI, A.P.; L.A. MAZZA y E. MORETTI. 1987. Aeration requirements of Rhizobium culture. *MIRCEN. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.*,:227-234.
- 3) BURTON, J.C. 1967. Rhizobium culture and use in Microbial Technology. Ed. Pepler J. Reinhold Publishing Corporation. New York. 1-13.
- 4) Burton, J.C. 1979. Rhizobium species in Microbial Technology. Vol I. Ed. Pepler. H.J. y Ferlman. D. Academic Press. New York. 29-58.
- 5) DATE, R.A. and R.J. ROUGHLEY. 1977. Preparation of legume seed inoculants in "A Treatise on Dinitrogen Fixation". Sec. IV. cap. 7. Ed. Hardy R.W.F. and W. Silver. John Wiley and Sons. New York. 243-275.
- 6) GAULT, R.R. 1981. A study of developments and trends associate with legume inoculant for use with new legume crops. *Rhizobium Newsletter*, 26:16-44.
- 7) JUNG, G.; J. MUGNIER; H.G. DIEM and DOMMERGUES. 1982. Polymerentrapped Rhizobium as an inoculant for legumes. *Plant and Soil*, 65:219-231.
- 8) KOCH, A. 1981. Growth Measurement in "Manual of Methods for General Bacteriology". Whashington D.C. American Society for Microbiology, 179-207.
- 9) LABANDERA, C. 1985. Inoculant production an quality control Uruguay and Latin American. *Proceeding of the Workshop on Rhizobium/Legume Inoculants. Porto Alegre. Brasil.* 179- 187.
- 10) LOPRETO, C.P.; L.A. MAZZA y A.P. BALATTI. 1973. Condiciones de medio y operación en la producción de *Rhizobium japonicum* en procesos sumergidos. *Rev. Fac. Agronomía. La Plata.* 3a. época. Tomo XLIX:201-212.
- 11) LOPRETO, C.P.; MAZZA, L.A.; BALATTI, A.P. 1975. Producción de inoculantes para soja. Estudios sobre soportes obtenidos con materiales de origen nacional. *Rev. Fac. Agronomía. La Plata.*, 51:35-41.
- 12) MUSSINI, J. 1985. Situation of production and quality control of Leguminous Inoculants in the Argentine Republic. *Proceeding of the Workshop on Rhizobium/Legume Inoculants. Porto Alegre. Brasil.* 211-214.
- 13) ROUGHLEY, R.J. 1970. The Preparation and use of legume seed Inoculant. *Plant and Soil*, 32:675-701.
- 14) ROUGHLEY, R.J. 1985. Production and quality control of legume seed inoculants in Australia. *Proceeding of the Workshop on Rhizobium/Legume Inoculants. Porto Alegre. Brasil.*, 37- 42.
- 15) VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication. Oxford.