

CINETICA DE SOBREVIVENCIA DE *Rhizobium meliloti* B-36 SOBRE SEMILLA PREINOCULADA CON DIFERENTES ADHESIVOS Y COBERTURAS

M.M. ALCARAZ, M.D. PASTOR y A.P. BALATTI

Recibido: 17/03/94

Aceptado: 19/05/94

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la cinética de sobrevivencia del *Rhizobium meliloti* B-36 sobre semilla de alfalfa preinoculada. La velocidad de muerte del *Rhizobium* es similar independientemente de la cobertura ensayada (carbonato, perlita y caolín) usando goma arábica o etilmetilcelulosa como adhesivo. El número de bacterias sobre la semilla preinoculada disminuye durante el ensayo pero la concentración remanente es del orden de 104 células viables/semilla a las 12 semanas.

Del análisis de estos ensayos surge la posibilidad de emplear a nivel industrial caolín, perlita y carbonato como coberturas y etilmetilcelulosa como adhesivo.

Palabras clave: inoculante, semillas preinoculadas, *Rhizobium meliloti*.

KINETIC OF *Rhizobium meliloti* B-36 SURVIVAL ON PREINOCULATED ALFALFA SEED WITH DIFFERENT COAT SEEDS

SUMMARY

In this paper the kinetic of *Rhizobium meliloti* B-36 survival on preinoculated alfalfa seed is studied. The death rate of *Rhizobia* is similar with different coat seeds (lime, perlite and caolin) using arabic gum and ethylmetilcelulose.

In the preinoculated seed during 12 weeks a reduction of bacteria occurs but the concentration of remanent viable microorganisms ensured a cell concentration of 104 viable cells/seed.

From this series of experiment is concluded the industrial possibility of employing caolin, perlite and lime as coats and ethylmetilcelulose as adhesive.

Key words: inoculant, preinoculated seed, *Rhizobium meliloti*.

INTRODUCCION

El número de microorganismos por semilla es según (Date, 1970) uno de los factores más importantes que influye positivamente en la inoculación de leguminosas. Por lo tanto, es importante disponer de inoculantes con una elevada concentración

de microorganismos por gramo de producto. Hoy día, existe una tendencia, sobre todo en semillas pequeñas, de preinocular las mismas, a los efectos de obtener condiciones que actúen moderando o minimizando algunos efectos adversos del suelo y además facilitando la tarea del agricultor (Crawford *et al.* 1982; Punenborg *et al.* 1990; Hoben *et al.* 1991 y Catroux, 1991).

PROMIQA: Programa de Microbiología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de La Pampa. 6300 -La Pampa- Argentina.

En nuestros laboratorios como consecuencia de estudios precedentes se han logrado inoculantes con una concentración del orden de 2-5.10¹⁰ células viables/gramo (Ronchi *et al.* 1991). Esto nos ha permitido llegar a obtener productos de gran eficiencia simbiótica.

Si consideramos los factores que pueden influir en la longevidad del *Rhizobium* sobre la semilla preinoculada debemos incluir: temperatura y humedad de almacenamiento, tipo de adhesivo y cobertura, tipo de inoculante, microorganismo. (Bonish *et al.* 1983; Brockwell *et al.* 1962; Brockwell *et al.* 1970; Elegba *et al.* 1984; Gault, 1981; Kremer *et al.* 1982; Kremer *et al.* 1983; Norris, 1971). Últimamente se ha determinado también que otro factor a tener presente es la edad fisiológica del inoculante (Materon *et al.* 1984). Teniendo en cuenta los factores antes indicados y tomando como base estudios realizados anteriormente (Alcaraz *et al.* 1994), se programó el presente trabajo, donde se estudia la optimización de la preinoculación de semillas de alfalfa considerando el uso de caolín, carbonato y perlita como cobertura y etilmetilcelulosa como adhesivo.

En una primera etapa se estudia la influencia de la edad del inoculante sobre la sobrevivencia del *Rhizobium meliloti* empleando caolín en comparación con perlita y carbonato utilizando goma arábiga como adhesivo. En una segunda etapa se considera, empleando inoculantes de 4 semanas de edad, la influencia de la etilmetilcelulosa sobre la sobrevivencia de la bacteria utilizando las mismas coberturas.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo: Se empleó una cepa de *Rhizobium meliloti* B-36 suministrada gentilmente por el Ing. Pacheco Basurco, INTA Castelar. Dicha cepa fue conservada en subcultivos en tubos con medio extracto de levadura-manitol-agar y se mantuvo a 5°C.

Medio: el medio empleado contenía (g/l): sacarosa, 10; Extracto de levadura, 4; KNO₃, 0,8; MgSO₄·7H₂O, 0,2; NaCl, 0,1; MnSO₄·4H₂O and FeCl₃·6H₂O, 0,006; K₂PO₄, 0,5. El medio fue neutralizado a pH 6,8-7,0 antes de esterilizar.

Cultivos líquidos: Se obtuvieron cultivos líquidos

de alta concentración celular (1,0-2,5.10¹⁰ células viables/ml) en erlenmeyers con 1/5 de volumen de medio en un agitador rotatorio con 2,5 cm de excentricidad y a 250 r.p.m. a 28°C.

Preparación del inoculante: Se utilizó Turba de Tierra del Fuego como soporte. Este material fue molido hasta obtener un polvo malla tamiz 200, neutralizado a pH 7 con carbonato de calcio y preesterilizado durante 2 horas en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión. Posteriormente fue distribuido en bolsas de polipropileno de 38 micrones de espesor y fue esterilizado durante 30 minutos. Luego del proceso de esterilización las bolsas fueron totalmente selladas con un contenido de humedad aproximado del 10%. Estos soportes fueron inoculados con cultivos de *Rhizobium* de alta concentración, obteniéndose un valor de humedad del 50-55%.

Semilla: Se empleó semilla de alfalfa ecotipo pampeano cedida gentilmente por el Ing. Romero del INTA Anguil. Provincia de La Pampa.

Esterilización de las semillas: Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas sumergiéndolas en alcohol etílico 95% durante 3 minutos y luego en bicloruro acidificado durante 3 minutos. Luego fueron lavadas en agua destilada estéril cinco o seis veces y secadas en flujo laminar sobre papel de filtro estéril. Posteriormente fueron manipuladas bajo condiciones de esterilidad.

Coberturas: Se utilizó carbonato de calcio precipitado, malla 300; perlita marca Perfiltra, malla 300 y caolín precipitado, malla 400, de origen de cantera de Olavarría, cedido gentilmente por el Ing. Pacheco Basurco del INTA Castelar.

Adhesivos: Se empleó goma arábiga Mallinckrodt y etilmetilcelulosa: Celofax A de Duperial.

Preinoculación de la semilla: 100 semillas, con una humedad relativa del 11-12%, fueron tratadas con una mezcla de 5 g de inoculante y 7 ml de goma arábiga al 40% ó 12,5 ml de etilmetilcelulosa al 5%. Esta suspensión fue distribuida sobre la superficie de la semilla. Luego se adicionó la cobertura ensayada: 30 g de carbonato de calcio u 8 g de perlita ó 30 g de caolín, mientras se rotaba vigorosamente el frasco para obtener una distribución uniforme de los materiales usados como cobertura. Las bolsas que contenían las semillas peleteadas fueron almacenadas a temperatura ambiente 20-25°C.

Determinación de la cinética de sobrevivencia: Se extrajo asepticamente 1 gramo de inoculante en un erlenmeyer con 99 ml de agua destilada estéril. Este erlenmeyer fue agitado en un shaker rotatorio durante 15 minutos. Luego la muestra fue diluida extrayendo 0,1 ml de suspensión con micropipeta y se colocó en un tubo de ensayo con 9,9 ml de agua destilada estéril. Este procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario hasta obtener una concentración de 30 a 300 bacte-

rias por ml, luego se adicionaron submuestras del cultivo en cajas de petri y se cultivaron a 29°C.

Cuando se evaluó la sobrevivencia del *Rhizobium* sobre la semilla se extrajeron 20 semillas de cada bolsa y se procedió de la misma manera que en el recuento de bacterias en el inoculante.

Evaluación de la capacidad simbiótica de las semillas preinoculadas: Los cultivos de semilla de alfalfa preinoculada y cultivadas artificialmente se realizaron de acuerdo al método recomendado por la bibliografía (Vincent, 1970) según el siguiente esquema: Tratamiento 1: semillas sin inocular; Tratamientos 2; 3 y 4 utilizando semillas preinoculadas empleando caolín, carbonato de calcio y perlita como cobertura. Se determinó el peso de la planta y contenido de nitrógeno de la parte aérea, con los valores obtenidos se realizaron análisis numéricos con el método de la variancia y se determinaron las diferencias mínimas significativas por la prueba de Tuckey (Pimentel, 1958).

Análisis Estadístico: La cinética de sobrevivencia fue analizada a través de un modelo de regresión lineal, transformando los datos experimentales obtenidos en logaritmos base 10. (Bussab, 1986; Dachs, 1978; Hoaglin *et al.* 1983 y Stanier *et al.* 1984).

RESULTADOS

La cinética de sobrevivencia de sobre semilla de alfalfa para todos los casos es representada por un modelo de regresión lineal ($\log y = a + bx$).

En la Fig 1 se presentan los resultados obtenidos en estudios de sobrevivencia de *Rhizobium meliloti* B-36 sobre semilla preinoculada con inoculantes de diferente edad fisiológica: recién preparado, de 1; 2; 3; 4 y 10 semanas; empleando caolín como cobertura y goma arábica como adhesivo. Se muestra que el comportamiento de esta cobertura es semejante a los obtenidos en un trabajo anterior con otros materiales (Alcaraz *et al.* 1994), ya que el valor de la pendiente de las regresiones obtenidas que representa la velocidad de muerte de la bacteria sobre la semilla es menor ($b=-0,010$; $SE= 0,0039$) cuando se emplean inoculantes de 4 semanas de elaborados.

En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos en experiencias donde se utilizan inoculantes de 4 semanas de edad, se evalúa el comportamiento del caolín frente a carbonato y perlita usando goma arábica como adhesivo. Como

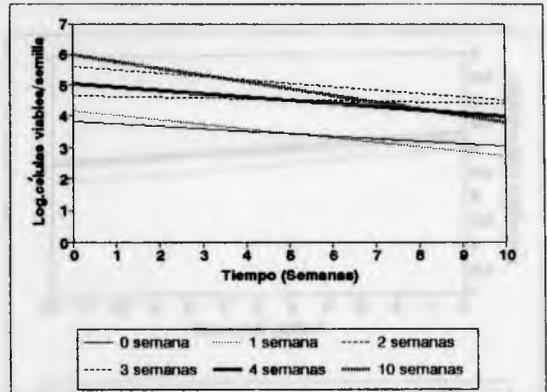


Figura 1: Influencia de la edad fisiológica del inoculante sobre la velocidad de muerte del *Rhizobium meliloti* B-36 sobre semilla de alfalfa preinoculada utilizando caolín como cobertura y goma arábica como adhesivo.

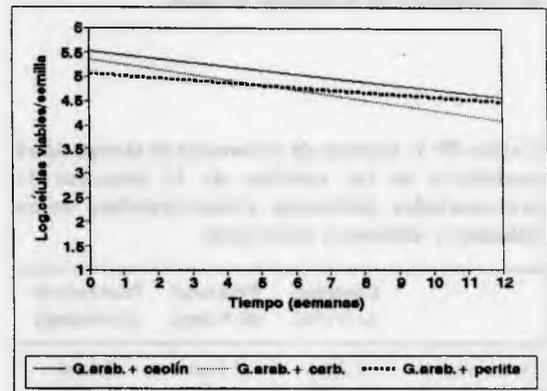


Figura 2: Cinética de sobrevivencia del *Rhizobium meliloti* cepa B-36 sobre semilla de alfalfa preinoculada usando caolín, carbonato de calcio y perlita como cobertura y goma arábica como adhesivo utilizando inoculantes de 4 semanas de edad.

se observa los valores de pendientes son muy semejantes: Caolín ($b=-0,010$; $SE= 0,0039$); Carbonato ($b=-0,014$; $SE= 0,0056$) y Perlita ($b=-0,0064$; $SE= 0,0048$).

Por último, en la figura 3 los resultados indicados corresponden a ensayos en los cuales se usan las mismas coberturas que en el caso anterior, pero se reemplaza la goma arábica por etilmetilcelulosa.

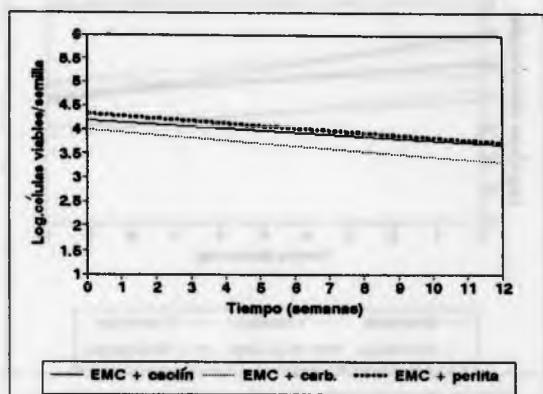


Figura 3: Cinética de sobrevivencia del *Rhizobium meliloti* cepa B-36 sobre semilla de alfalfa preinoculada usando caolín, carbonato de calcio y perlita como cobertura y etilmetilcelulosa como adhesivo utilizando inoculantes de 4 semanas de edad.

Cuadro N° 1: Ensayos de evaluación de la capacidad simbiótica de las semillas de 12 semanas de preinoculadas utilizando etilmetilcelulosa como adhesivo y diferentes coberturas.

	Cantidad de N (%)	Peso total de N (mg)	Peso seco de planta (mg)
Tratamiento 1	1,4 (a)	0,1 (a)	9,6 (a)
Tratamiento 2	3,6 (b)	1,0 (b)	29,2 (b)
Tratamiento 3	3,2 (b)	0,9 (b)	28,5 (b)
Tratamiento 4	3,5 (b)	1,0 (b)	28,7 (b)

Tratamiento 1: semilla sin inocular.

Tratamiento 2: semilla preinoculada utilizando caolín como cobertura.

Tratamiento 3: semilla preinoculada utilizando perlita como cobertura.

Tratamiento 4: semilla preinoculada utilizando carbonato de calcio como cobertura.

Los valores indicados por la misma letra no difieren entre sí en forma significativa (Tuckey P=0,05).

Como se ve las pendientes de las regresiones son también similares: Caolín ($b=-0,0054$; $SE=0,0036$); Carbonato ($b=-0,0076$; $SE=0,0036$) y Perlita ($b=-0,0065$; $SE=0,0047$)

Es de destacar que además de evaluar la sobrevivencia de las cepas, los conglomerados fueron evaluados en su capacidad de germinación y su comportamiento fisiológico con determinaciones de nitrógeno y poder nodulante (Cuadro N° 1), donde se muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos en que se emplea semilla preinoculada con diferentes coberturas y que los valores obtenidos con la semilla tratada son significativamente mayores que los alcanzados con la semilla sin preinocular.

DISCUSION

Analizando los resultados de la figura 1 surge que se puede utilizar con seguridad inoculantes de 4 semanas de preparado, ya que los resultados obtenidos concuerdan con los alcanzados en un trabajo anterior empleando otras coberturas y el mismo adhesivo (Alcaraz, 1994).

También se demuestra que el caolín tiene un comportamiento similar a la perlita y el carbonato permitiendo llegar a valores de sobrevivencia de 104 a 105 bacterias por semilla a las 12 semanas. (Figura 2).

Por último analizando la figura 3 surge claramente que para las coberturas estudiadas: caolín, perlita y carbonato; la etilmetilcelulosa puede reemplazar a la goma arábiga en razón de que los valores de sobrevivencia son del orden de 104 bacterias viables por semilla a las 12 semanas de preinoculadas.

Estos resultados se consideran de trascendencia tecnológica en razón de que tanto las coberturas como el adhesivo son materiales de bajo costo, que se traduce en una real optimización de proceso, asegurando semillas preinoculadas con una tasa de 104 bacterias por semilla a las 12 semanas sin alterar la capacidad simbiótica de la cepa y el poder germinativo de la semilla. No obstante se contempla en una segunda etapa realizar experiencias en campo a fin de establecer definitivamente el comportamiento de la semilla preinoculada en diferentes tipos de suelos.

BIBLIOGRAFIA

- ALCARAZ, M.M.; PASTOR, M.D. y BALATTI, A.P. 1994. Comunicación personal.
- BONISH, P.M. and NEVILLE, F.J. 1983. Survival of Rhizobia on commercially lime-pelleted with clover and lucerne seed. *New Zealand. J. Exp. Agric.* 11: 275-278.
- BROCKWELL, J. 1962. Studies of seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. Coating material adhesives, and methods of inoculation. *Aust. J. Agric. Res.* 13: 638-649.
- BROCKWELL, J. and PHILLIPS, J. 1970. Studies on seeds pelleting as aid to legume seed inoculation. Survival of Rhizobium applied to seeds sown into hot, dry soil. *Aust. J. Expt. Agric. Anim. Husb.* Vol 10: 631-636.
- BUSSAB, W. de O. 1986. Análise de Variância e de Regressão. ATUAL. Editora Ltda. Sao Paulo. Brasil.
- CATROUX, G. and ARNAUD, F. 1991. Compatibility of a soybean peat inoculant with some seed applied fungicides and microgranular insecticides. *Toxicol. and Environ. Chem.* 30: 229-239.
- CRAWFORD, S.L. and BERRYHILL. 1982. Survival of Rhizobium phaseoli in Coal-Based Legume Inoculants Applied to Seeds. *Appl. and Environ. Microbiol.* p: 703-705.
- DACHS, J.N.W. 1978. Análise de Dados e Regressão. IMECC-UNICAMP. S.P. Brasil.
- ELEGBA, M. S. and RENNIE, J. 1984. Effect of different inoculant adhesive agents on survival, nodulation and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybeans (*Glycine max. L. Merrill*). *Can. J. Soil Sci.* 64: 631-636.
- GAULT, R.R. 1981. Inoculant production and usage in Current Perspectives in Nitrogen Fixation Proceeding of the Four International Symposium on Nitrogen Fixation. Camberra, Australia Edited by Dr. Alan Gibson. Inoculant Production and Uses. p. 341-342.
- HOAGLIN, D.C.; MUSTELLER, E.A. and TUKEY, J.W. 1983. Understanding Robust and Exploratory Data Analysis. John Wiley and Sons.
- HOBEN, H.J.; AUNG, Nwe Nwe; SOMASEGARAN and KANG UI-GUM. 1991. Oils as adhesives for seed inoculation and their influence on the survival of *Rhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* spp. on inoculated seeds. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 7: 324-330.
- KREMER, R.J. and PETERSON, H.L. 1982. Effect of suspending agent and temperature on survival of Rhizobium in fertilizer. *Agron. J.* 46: 539-542.
- KREMER, R.J. and PETERSON, H.L. 1983. Effect of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. development of an improved type of inoculant. *Appl. Env. Microbiol.* 45: 1790-1794.
- MATERON, L.A. and WEAVER, R.W. 1984. Inoculant maturity influences survival of Rhizobia on seed. *Appl. Environ. Microbiol.* p: 465-467.
- NORRIS, D.D. 1971. Seed pelleting to improve nodulation of tropical and subtropical legumes. The variable response to lime and rock phosphate pelleting of eight legumes in the field. *Aust. J. Expt. Agric. Anim. Husb.* 11: 282-289.
- PIJNENBORG, J.W.M. and LIE, T. A. 1990. Nitrogen fixation of lucerne (*Medicago sativa*) in an acid soil: The use of rhizotrons as a model system to simulate field conditions. *Plant nutrition-physiology and applications.* p: 449-453.
- PIMENTEL, G.F. 1958. Curso de Estadística Experimental. Ed. Hemisferio Sur S.A. p. 173-176.
- RONCHI, A.L. y BALATTI, A.P. Selección de soportes para la producción de inoculantes para leguminosas. *Rev. Fac. de Agronomía.* 12 (3): 209-217.
- STANIER, Y.; ALDERBERG, E.A. and INGRAHAM, J. 1984. Microbiología. Cap. 9: 262 Ed. Reverté.
- VINCENT, J.M. 1970. A Manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication, Oxford. U.K. p: 164.