

NUEVO INOCULANTE LIQUIDO PARA SEMILLAS DE SOJA (*Glycine max*).

J.G. COZZI, GRACIELA B. BENINTENDE y J.C. PACHECO BASURCO⁽¹⁾

Recibido: 16/08/93

Aceptado: 14/08/96

RESUMEN

Se evaluó el comportamiento de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (E-109 y E-110) en un nuevo inoculante formulado con base líquida acuosa.

Los ensayos incluyeron: -Supervivencia de bradyrizobios almacenados durante 180 días a diferentes temperaturas (4-6°C, 27-29°C y una combinación de ambas), -Viabilidad sobre semilla inoculada conservada durante 7 hs a 25-27°C, -Control de aptitud en cámaras iluminadas y -Ensayo en campo.

En las pruebas de supervivencia en el producto líquido, todos los tratamientos superaron a los 180 días de almacenamiento el valor de 1×10^8 unidades formadoras de colonias/ml, con la sola excepción de la cepa E-110 conservada a 27-29°C.

En los ensayos de supervivencia sobre semilla, la pérdida de viabilidad fue del 44% para la estirpe E-109 y del 72% para la E-110. Sin embargo, dicha pérdida no impidió lograr una buena nodulación en cámaras iluminadas.

En campo, todos los tratamientos inoculados incrementaron significativamente el rendimiento en grano y el porcentaje y peso total de nitrógeno, no detectándose diferencias entre el inoculante líquido y el elaborado con base turba.

El soporte desarrollado ha demostrado su aptitud para preservar la supervivencia y mantener las características de infectividad y efectividad de las cepas ensayadas.

Palabras clave: Inoculantes para leguminosas, *Bradyrhizobium japonicum*, *Glycine max*.

NEW LIQUID INOCULANT FOR SOYBEAN SEEDS (*Glycine max*)

SUMMARY

The behavior of two strains of *Bradyrhizobium japonicum* (E-109 and E-110) in a new inoculant formulated in an aqueous liquid base was evaluated.

The tests included: -Survival of bradyrizobia stored during 180 days at different temperatures (4-6°C, 27-29°C and a combination of both), -Viability on inoculated seed stored for 7 hours at 25-27°C, -Aptitud control in illuminated chamber and -Field test.

The value of 1×10^8 colony forming units/ml overcame the 180 days of storage in all the treatments on the survival tests into the liquid product, with the only exception of the strain E-110 which was stored at 27-29°C.

The viability lost was 44% for the lineage E-109 and 72% for E-110 in the survival tests on seed. However, this loss did not avoid to achieve a good nodulation into the illuminated chambers.

On the field, all the inoculated treatments increased significantly the yield in grain and the percentage and the total weight of nitrogen, without detecting difference between the liquid inoculant and the elaborated on peat base.

The developed support had demonstrated its aptitude to save the survival and keep the symbiotics features of the tested strains.

Key Words: Legume inoculants, *Bradyrhizobium japonicum*, *Glycine max*.

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

INTRODUCCION

En la Argentina el cultivo de la soja tiene gran importancia económica. Esto puede deducirse a través de los siguientes datos correspondientes al ciclo agrícola 93/94: Superficie sembrada: 5.664.000 hectáreas y Producción total: 11.715.000 toneladas, de acuerdo a las estimaciones agrícolas de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación.

También debe considerarse que en el año 1990 el monto de las exportaciones de grano y subproductos del complejo soja superó la cifra de US\$ 3.000.000.000 (Muñoz, 1991).

Del análisis de estos valores surge la importancia de brindar aportes científicos y tecnológicos, que permitan el aumento de productividad y eficiencia del sistema agrícola involucrado en este cultivo.

Sin lugar a dudas el aspecto nutricional del cultivo adquiere singular relevancia y presenta una característica especial, ya que la soja puede establecer simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium* y de esta manera emplear para su nutrición, nitrógeno atmosférico fijado biológicamente (Singleton *et al*, 1992).

El requerimiento promedio de nitrógeno de un cultivo de soja ha sido estimado en 220 kg/ha (Hansen *et al*, 1989), de los cuales 70 pueden ser provistos por una adecuada simbiosis (Darwich, 1989).

De estos datos se desprende la importancia de una eficiente asociación soja-*Bradyrhizobium*. Esto puede lograrse mediante la inoculación de la semilla con productos que contengan estos microorganismos fijadores de nitrógeno en cantidad y calidad adecuadas.

Existen en el mercado de insumos agropecuarios inoculantes para soja en polvo y líquidos. Los primeros son elaborados en su gran mayoría empleando turba como portador de los bradyrizobios, siendo su calidad más constante.

En cuanto a los líquidos los hay formulados con base oleosa y acuosa, de calidad variable y con períodos de vida útil no mayores de dos ó tres meses.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes y considerando la demanda de productos formula-

dos en forma líquida por parte del productor agropecuario, se iniciaron trabajos que tenían como objetivo el desarrollo de un nuevo inoculante líquido para semillas de soja en soporte acuoso, de alta calidad, larga vida útil, fácil aplicación y costo competitivo.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

1) Soportes: -líquido acuoso de pH neutro y -turba de musgos (*Sphagnum* spp) procedente de turberas de Río Grande, Provincia de Tierra del Fuego, República Argentina.

2) Cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) (Jordán, 1982) provenientes de la colección del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, C.I.C.A., INTA.

E-109: enviada por el Department of Scientific and Industrial Research (D.S.I.R.) Plant Division Culture Collection, Nueva Zelanda. Número original 2860 (ex Cadwell 31 IB 138 y USDA 138).

E-110: suministrada por el Microbiological Resources Center (MIRCEN), Porto Alegre, Brasil. Número original 5019 (29W del Nitrogen Fixation Laboratory, EMBRAPA, Brasil).

3) Medios de cultivo: se usaron medios líquidos para la multiplicación de los bradyrizobios y agarizados para las determinaciones de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) (Cozzi y Benintende, 1989).

4) Semilla: soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivar Federada I INTA, con un poder germinativo del 97%.

5) Envase de los inoculantes: polietileno de baja densidad de 50 μ m de espesor para los inoculantes en base turba, y ampollas de vidrio de 25 cm³ de capacidad cerradas herméticamente, para los líquidos.

Métodos

1) **Procesamiento de los soportes.** El soporte líquido una vez formulado y balanceado fue esterilizado en autoclave a 1 kg/cm² de presión, durante 20 minutos. La turba fue secada en estufa a 50-60°C hasta obtener un contenido de humedad ca 10%. Se realizó una molienda en un molino a cuchillas, obteniéndose un 95% de partículas de diámetro nominal 90 μ m (malla 120 U.S. Standard Sieve Series). Se ajustó el pH a 6,5 con carbonato de calcio precipitado extraliviano.

2) **Preparación de los cultivos líquidos de bradyrizobios.** (Cozzi y Benintende, 1989). Los títulos de los caldos para la elaboración de todos los inoculantes fueron de $9,3 \times 10^9$ y $1,1 \times 10^{10}$ u.f.c./ml para las cepas E-109 y E-110 respectivamente.

3) **Preparación de los inoculantes.** Para el procesamiento de los inoculantes en soporte líquido se operó asepticamente separando por centrifugación (FCR: 1.500 g, durante 10 minutos a 15-20°C) la biomasa de rizobios a partir de los cultivos producidos según Métodos 2. Dicha masa bacteriana fue luego resuspendida en el soporte líquido esterilizado. Los inoculantes elaborados con base de turba fueron preparados según trabajos previos (Cozzi y Benintende 1989), con los cultivos obtenidos según Métodos 2.

4) **Conservación de los inoculantes.** Los preparados con turba se almacenaron a 4-6°C. Los líquidos bajo tres condiciones distintas: a 4-6°C, a 27-29°C y por último a 4-6°C pero 30 días antes de las evaluaciones fueron colocados a 27-29°C.

5) **Determinación de la supervivencia de la población de bradyrizobios en los inoculantes.** Se hicieron recuentos de u.f.c. por el método de dilución en placas (Vincent, 1975), también se utilizó la técnica de infección en plantas basada en el número más probable (NMP) (Weaver y Frederick, 1972). Este análisis se efectuó inmediatamente después de la preparación de los inoculantes y a los 30, 60, 90, 120 y 180 días.

6) **Desinfección y germinación de semillas.** Según Cozzi y Benintende (1989).

7) **Determinación de la supervivencia de los bradyrizobios sobre la semilla.** Se emplearon los inoculantes líquidos conservados durante 60 días a 4-6°C y luego 30 días a 27-29°C, se inocularon porciones de 100 g de semilla de soja, con 0,5 ml de los mismos. Inmediatamente se tomaron 100 semillas de cada tratamiento y se colocaron en sendos erlenmeyers conteniendo 100 ml de solución salina (7,5 g de NaCl/L de agua destilada), con 0,01% de Tween 40. Luego de una hora de agitación vigorosa se procedió a la determinación de u.f.c. de bradyrizobios según Métodos 5. El resto de la semilla inoculada se conservó a 25-27°C durante 7 hs para ser evaluada nuevamente.

8) **Control de los inoculantes en cámaras iluminadas.** Se empleó el método publicado por Burton (1978), pero para aumentar su nivel de exigencia se colocó solamente 1 semilla por maceta. Este ensayo se realizó empleando los inoculantes líquidos conservados durante 180 días e inoculantes en turba de la misma data, cuyas concentraciones de bradyrizobios fueron: 5,6 y 4,9x10⁸/g para las cepas E-109 y E-110 respectivamente. Los inoculantes líquidos se emplearon según Métodos 7 (5 ml/kg de semilla) y los preparados con turba, humedeciendo la semilla con agua destilada (7,5 ml/kg) e inmediatamente agregando el inoculante a razón de 5 g/kg de semilla. A continuación se colocaron 20 semillas en sendas macetas plásticas de 250 cm³ conteniendo vermiculita esterilizada, humedecida con

solución nutritiva (Weaver y Frederick, 1972). Esta misma solución se empleó para los riegos posteriores. A los 14 días de la germinación se realizó el recuento de los nódulos ubicados en cuello y raíz principal.

9) **Ensayo en campo.** Se llevó a cabo en Castelar, Pcia de Buenos Aires, siguiendo un diseño de parcelas subdivididas con cuatro repeticiones. Se consideraron dos tratamientos, cepas E-109 y E-110, y siete subtratamientos, 1- testigo, 2- inoculado con producto en base turba, 3- idem 2 sembrado luego de 6 hs de la inoculación, 4- inoculado con producto líquido, 5- idem 4 sembrado luego de 6 hs de la inoculación, 6- inoculado con producto líquido diluido 1:3 con agua destilada, 7- idem 6 sembrado luego de 6 hs de la inoculación. Los inoculantes empleados en el ensayo tenían 180 días de almacenamiento a 4-6°C.

El tamaño de la subparcela fue de 5 m de largo con 4 surcos distanciados a 0,7 m. Estas fueron separadas por caminos de 1 m para evitar infecciones entre subtratamientos.

Se determinó el rendimiento en granos, cosechando plantas de los dos surcos centrales, eliminando 0,5 m de cada cabecera de subparcela (superficie cosechada: 5,6 m²) y porcentaje de nitrógeno en grano por análisis micro Kjeldahl (Niederl y Niederl, 1946).

10) **Análisis estadístico.** Los datos de supervivencia de la población de bradyrizobios fueron expresados como logaritmos decimales. Se estudió un modelo que contempló los tres factores principales intervinientes: cepa, temperatura y tiempo de almacenamiento. Se estudió el comportamiento de los seis tratamientos que surgen de la combinación cepa y temperatura, dentro de cada tiempo de almacenamiento. Posteriormente, se realizó otro análisis para estudiar el comportamiento de los tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Los resultados del ensayo en campo (rendimiento, porcentaje de nitrógeno y peso total de nitrógeno), fueron analizados por el método de la varianza, estableciéndose la significancia de las diferencias entre medias por prueba de rangos múltiples de Duncan ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro N° 1 se presentan los logaritmos decimales correspondientes a los datos de u.f.c. de todos los tratamientos, a lo largo de los 180 días de almacenamiento bajo diferentes condiciones de temperatura. Según el análisis estadístico realizado surge la existencia de interacción triple ($\alpha=0,05$), por lo que no se pueden extraer conclusiones generales sobre los factores intervinientes. Entonces se estudió el comportamiento de los tratamientos a lo largo del

Cuadro N° 1: Supervivencia de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (E-109 y E-110), en inoculante líquido a diferentes temperaturas (Log. unidades formadoras de colonias/ml)

Trata- miento	Tiempo de almacenamiento (días)						
	(+)	0	30	60	90	120	180
1		9,62 a*	9,48 b	9,45 b	9,22 c	9,11 c	9,12 c
2		9,62 a	9,18 b	9,20 b	9,05 c	8,45 e	8,80 d
3		9,62 a	9,18 b	8,99 c	8,75 d	8,56 e	8,11 f
4		9,53 a	9,34 b	8,85 c	8,89 c	8,62 d	8,30 e
5		9,53 a	8,81 c	9,00 b	8,45 d	8,08 f	8,30 e
6		9,53 a	8,81 b	8,82 b	8,10 c	8,05 c	7,52 d

(+) 1: E-109, 4-6°C; 2: E-109, 4-6°C y 30 días a 27-29°C; 3: E-109, 27-29°C; 4: E-110, 4-6°C; 5: E-110, 4-6°C y 30 días a 27-29°C y 6: E-110, 27-29°C.

(*) Dentro de cada tratamiento, valores seguidos de letras iguales no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$).

ensayo para cada cepa y temperatura de almacenamiento.

Puede observarse que la cepa E-109 presenta mejores características de supervivencia que la E-110. Esto concuerda con la experiencia de los autores en estudios realizados con las mismas cepas en la elaboración de inoculantes en turba (Cozzi y Benintende, 1989). Si se analiza el comportamiento de cada cepa en forma individual, ambas se ven influenciadas negativamente por el almacenamiento, aumentando la mortalidad a medida que aumenta la temperatura de conservación. A pesar de esta pérdida de viabilidad y con la sola excepción de la cepa E-110 almacenada a 27-29°C, los tratamientos superan a los 180 días el valor de 1×10^8 u.f.c./ml, suficiente como para aportar en el momento de la inoculación aproximadamente 100.000 bradyrizobios por semilla (mínimo exigido por la legislación vigente).

Con el objeto de complementar los datos de supervivencia expresados como u.f.c./ml y corroborar la persistencia de la capacidad de formación de nódulos de los bradyrizobios en el inoculante almacenado, se efectuaron a los 90 y 180 días, determinaciones del N.M.P.. Los resultados obtenidos en

estas evaluaciones se muestran en el Cuadro N° 2.

Se observa coincidencia entre los valores de u.f.c. y N.M.P. para las muestras evaluadas, tanto a los 90 como a los 180 días. De esto puede inferirse que las bacterias han mantenido su capacidad infectiva.

Es muy importante para el establecimiento de la simbiosis que el inoculante proteja a los rizobios posibilitando una adecuada supervivencia de los mismos sobre la semilla inoculada. Para medir este efecto, se realizó un ensayo (Métodos 7), cuyos resultados figuran en el Cuadro N° 3.

A partir del análisis de estos datos podemos

Cuadro N° 2: Supervivencia de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (E-109 y E-110), en inoculante líquido a diferentes temperaturas (Log del número mas probable de bradyrizobios infectivos/ml)

Trata- miento	Tiempo de almacenamiento (días)		
	(+)	90	180
1		9,23#	9,11
2		8,90	8,90
3		8,90	8,52
4		8,52	8,69
5		8,36	8,52
6		8,36	8,04

(+) 1: E-109, 4-6°C; 2: E-109, 4-6°C y 30 días a 27-29°C; 3: E-109, 27-29°C; 4: E-110, 4-6°C; 5: E-110, 4-6°C y 30 días a 27-29°C y 6: E-110, 27-29°C.

(#) Los límites de confianza del 95% están comprendidos entre $\pm 0,52$.

Cuadro N° 3: Supervivencia de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (E-109 y E-110), sobre semilla inoculada con inoculante líquido almacenado 90 días (Log. unidades formadoras de colonias/semilla).

CEPA	Tiempo de conservación	
	0 HS	7 HS
E-109	6,00 (6,04)#	5,75
E-110	5,56 (5,69)	5,00

(#) Los valores entre paréntesis corresponden a los números teóricos calculados a partir de la concentración de bradyrizobios en el inoculante empleado.

apreciar que la semilla inoculada, luego de ser conservada durante 7 hs, mantiene un adecuado número de bradyrizobios viables, aún a pesar de que durante dicho lapso la temperatura (25-27°C) podría haber afectado en mayor proporción la supervivencia.

Esto se debería a las características físico-químicas del soporte, que protegería a las bacterias de la excesiva pérdida de humedad.

También en este ensayo se destaca la cepa E-109, cuya pérdida de viabilidad fue del 44% mientras que en la E-110, este porcentaje se elevó al 72%.

Con el objeto de completar los estudios de este inoculante líquido en laboratorio, se procedió a realizar un control en cámaras iluminadas (Métodos 8). De los resultados obtenidos (Cuadro N° 4) se puede concluir que todos los tratamientos inoculados, aún los sometidos a las condiciones de almacenamiento más rigurosas, superaron ampliamente los requisitos de aptitud exigidos por esta metodología (un mínimo de 80% de las plantas con 3 ó más nódulos en cuello

y raíz principal). Es conveniente mencionar que el tratamiento 6 (cepa E-110 a 27-29°C), que no alcanzaba el valor mínimo exigido (1x10⁸ u.f.c./ml), se comportó satisfactoriamente.

Los resultados del ensayo en campo se presentan en el Cuadro N° En ninguno de los análisis hubo interacción entre tratamientos y subtratamientos, detectándose diferencias significativas (: 0,05) entre subtratamientos. Todos los tratamientos inoculados incrementaron el rendimiento en grano entre un 11 y un 16%, el porcentaje de nitrógeno entre el 3 y el 4% y el peso total de nitrógeno entre el 15 y el 20%. Es de destacar la ausencia de diferencias entre los tratamientos inoculados, ya sea con productos líquidos o en turba.

CONCLUSIONES

El soporte líquido acuoso desarrollado, ha demostrado su capacidad para preservar la supervivencia

Cuadros N° 4: Aptitud de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (E-109 y E-110) en inoculantes líquidos y en turba, almacenados 6 meses. (Porcentaje de plantas noduladas y número promedio de nódulos en cuello y raíz principal).

Tratamiento (+)	Plantas noduladas (%)	Número de nodulos (promedio)
1	95	9
2	91	8
3	81	7
4	100	10
5	100	9
6	83	9
7	83	7
8	88	6
Testigo	0	0

(+) 1: E-109, 4-6°C; 2: E-109, 4-6°C y 30 días a 27-29°C; 3: E-109, 27-29°C; 4: E-109 en turba, 4-6°C; 5: E-110, 4-6°C; 6: E-110, 4-6°C y 30 días a 27-29°C; 7: E-110, 27-29°C y 8: E-110 en turba, 4-6°C.

Cuadro N° 5: Comportamiento en campo de *Bradyrhizobium japonicum*, en inoculantes líquidos y en turba, almacenados durante 6 meses a 4-6°C.

Sub-tratamiento (+)	Parámetro analizado		
	Rendimiento (g/parcela)	Nitrógeno (%)	Peso total N (g/parcela)
1	1.180 a#	6,08 a	71,7 a
2	1.356 b	6,30 b	85,4 b
3	1.373 b	6,29 b	86,4 b
4	1.305 b	6,32 b	82,5 b
5	1.328 b	6,29 b	83,5 b
6	1.326 b	6,26 b	83,0 b
7	1.311 b	6,28 b	82,3 b
Error de la media (%)	6,08	1,68	5,98

(+) 1: Testigo; 2: inoculado con producto en base turba; 3: idem 2 sembrado luego de 6 hs de la inoculación; 4: inoculado con producto líquido; 5: idem 4 sembrado luego de 6 hs de la inoculación; 6: inoculado con producto líquido diluido 1:3 con agua destilada; 7: idem 6 sembrado luego de seis horas de la inoculación.

(#) Medias acompañadas de letras iguales no difieren significativamente (: 0,05).

cia de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* ensayadas.

Esta supervivencia se mantuvo en niveles adecuados, aún bajo condiciones de almacenamiento consideradas críticas, tanto en el producto almacenado como sobre la semilla luego de la inoculación.

A través de los ensayos realizados en cámaras iluminadas y en campo, quedó demostrado que las cepas empleadas conservan sus características generales de infectividad y efectividad. Asimismo pudo

comprobarse la facilidad de empleo del producto.

Del análisis conjunto de las evaluaciones llevadas a cabo, surge la aptitud del producto desarrollado.

AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Nora Abbiati (Departamento de Estadística, INTA).

A la señora Carmen Mercado y al señor Pedro Herrero por su eficiente colaboración.

BIBLIOGRAFIA

- BURTON, J.C. 1978. Monitoring quality in legume inoculants and preinoculated seed. En *Actas IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium*. México. Pág. 308-325.
- COZZI, J.G. y G.B. BENINTEDE. 1989. Influencia de la esterilización de la turba en la supervivencia de *Bradyrhizobium japonicum*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 31: 275-278.
- DARWICH, N.A. 1989. *Manual de Fertilidad de Suelos*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. República Argentina. INTA. 147p.
- HANSEN, A.P.; M.B. PEOPLES; P. M. GRESSHOFF; C. A. ATKINS; J.S. PATE and B.J. CARROLL. 1989. Symbiotic performance of supernodulating soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) mutants during development on different nitrogen regimes. *J. Exp. Bot.*, 40 (216): 715-724.
- JORDAN, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen.nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 136-139.
- MUÑOZ, R.R. 1991. Competitividad y valor agregado de las exportaciones argentinas del complejo soja. *En Actas Primera Reunión Nacional de Oleaginosos*, Rosario, Rep. Argentina. pp: 463-467.
- NIEDERL, J.B. and V. NIEDERL. 1946. *Micromethods of quantitative organic analysis*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. N.York. 347p.
- SINGLETON, P.W.; B.B. BOHLOOL and P.L. NAKAO. 1992. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities. En *Myths and Science of Soils of the Tropics*. Soil Sci. Soc. of America and Am. Soc. of Agron. *Special Publ.* 29: 135-155.
- VINCENT, J.M. 1975. *Manual Práctico de Rizobiología*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 200p.
- WEAVER, R.W. and L.R. FREDERICK. 1972. A new technique for most probable-number counts of rhizobia. *Plant and Soil*, 36: 219-222.