

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado
para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo

**Efecto de la aplicación exógena de biofertilizante líquido
sobre la nodulación en el cultivo de soja (*Glycine max L.*)**

PERALTA, Matías
D.N.I: 30.538.490

Director: Ing. Agr. MSc. RICOTTO, Alcides
Co-Director: Ing. Agr. SARMIENTO, Claudio

Río Cuarto – Córdoba
Agosto de 2009

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del trabajo final: **Efecto de la aplicación exógena
de biofertilizante líquido sobre la nodulación en el
cultivo de soja (*Glycine max L.*)**

Autor: PERALTA MATÍAS NICOLÁS

D.N.I: 30.538.490

Director: Ing. Agr. MSc. RICOTTO, Alcides

Co-Director: Ing. Agr. SARMIENTO, Claudio

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la
comisión evaluadora:

Ing. Agr. BAROTO, Omar -----

Ing. Agr. BERNARDO, Isabel -----

Ing. Agr. VIALE, Susana -----

Fecha de presentación: -----/-----/-----

Aprobado por Secretaría Académica: -----/-----/-----

Secretario Académico

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
<i>Ensayos con biofertilización</i>	4
<i>Morfología y taxonomía del cultivo de soja (Glycine max L.)</i>	5
<i>Exigencias climáticas</i>	6
<i>Exigencias nutricionales del cultivo de soja (Glycine maxL.)</i>	7
<i>Situación actual del cultivo en Argentina</i>	7
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
<i>Objetivo general</i>	9
<i>Objetivo específico</i>	9
MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS	10
<i>Caracterización climática</i>	10
<i>Régimen térmico</i>	10
<i>Régimen pluviométrico</i>	11
<i>Caracterización de Suelo</i>	12
<i>Rotación</i>	12
<i>Análisis de suelo de la campaña 06/07.</i>	13
<i>Material vegetal</i>	13
<i>Biofertilizante</i>	13
<i>Forma de preparación</i>	14
<i>Análisis realizado al biofertilizante</i>	14
<i>Diseño estadístico</i>	15
<i>Tratamientos realizados</i>	16
<i>Croquis del ensayo</i>	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
<i>Infectividad</i>	17
<i>Nodulación</i>	18
<i>Distribución</i>	19
<i>Nódulos efectivos</i>	20
<i>Peso</i>	21
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24
ANEXO	27

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Temperaturas media, máxima, mínima desde julio del 2006 hasta junio del 2007 y promedio histórico desde julio a junio (1961 – 1990)	10
Gráfico 2: Precipitaciones medias normales desde Julio a Junio (1961 - 1990) y temperaturas medias desde julio del 2006 hasta junio del 2007.....	11
Gráfico 3: Balance hídrico desde julio de 2006 a junio de 2007.....	12
Gráfico 4: Infectividad expresada como porcentaje de plantas con más de tres nódulos en el estado fisiológico de V ₃ en soja (<i>Glycine max L.</i>).....	17
Gráfico 5: Valores medios del número de nódulos logrados por planta en R ₄ en el cultivo de soja (<i>Glycine max L.</i>) en los distintos tratamientos.....	18
Gráfico 6: Valores medios de cantidad y distribución de nódulos totales obtenidos en R ₄ en el cultivo de soja (<i>Glycine max L.</i>) en los distintos tratamientos.....	20
Gráfico 7: Valores medios de cantidad y distribución de nódulos efectivos obtenidos en R ₄ en el cultivo de soja (<i>Glycine max L.</i>) en los distintos tratamientos.....	21
Gráfico 8: Peso medio por nódulo efectivo obtenido en R ₄ en el cultivo de soja (<i>Glycine max L.</i>) en los distintos tratamientos.....	22

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Requerimientos y exportación de nutrientes para el cultivo de soja.....	7
Tabla 2: Rotaciones realizadas en el lote sobre el cual se llevó a cabo el ensayo.....	13
Tabla 3: Análisis de suelo de la campaña 06/07.....	13
Tabla 4: Relación C/N en distintos materiales orgánicos.....	14
Tabla 5: Resultados obtenidos de los análisis microbiológicos.....	15

RESUMEN

La producción agrícola basada en leguminosas es fundamental para la alimentación humana, especialmente si es en equilibrio con el ambiente. La interacción natural de estas plantas con una bacteria del suelo a nivel de la raíz es ecológicamente importante como medida para disminuir el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados que deterioran el suelo y contaminan el ambiente. Por lo tanto el uso de inoculantes reduce la aplicación de fertilizantes químicos al suelo; incrementa el contenido de N en el cultivo vegetal, su peso seco y mantiene el rendimiento en las leguminosas. El siguiente trabajo se realizó con el fin de estudiar el efecto de la aplicación exógena de biofertilizante líquido sobre la nodulación en el cultivo de soja (*Glycine max L.*). El mismo se llevó a cabo en la zona de Espinillo a 23 Km. al Norte de la ciudad de Río Cuarto, provincia de Córdoba. Se realizó un ensayo con cuatro tratamientos T₀: Testigo, T₁: Biofertilizante líquido enriquecido aplicado a suelo en el momento de siembra 100 lts ha⁻¹ al 30%, T₂: Biofertilizante líquido enriquecido aplicado al suelo en siembra 100 lts ha⁻¹ al 30% repitiéndose en R₁ en una dosis 100 lts ha⁻¹ al 10% y T₃: Biofertilizante líquido enriquecido aplicado en R₁, con una dosis 100 lts ha⁻¹ al 10%. Se realizaron cuatro repeticiones donde las parcelas fueron agrupadas con un Diseño en Bloques (DB), cada bloque constituyó una repetición representando todos los tratamientos una sola vez, y la distribución de los mismos dentro de la parcela (unidad experimental) se realizó en forma sistemática. Esta experiencia mostró que únicamente las plantas tratadas en R₁ (T₃), presentaron mayor cantidad de nódulos planta⁻¹ en relación con los restantes tratamientos. Observando así que, el biofertilizante afecta positivamente la fijación biológica del nitrógeno de manera indirecta, esto es, contribuye a mantener un alto nivel de fotoasimilados en las plantas necesario para sostener el alto costo energético que exige este proceso.

Palabras claves: biofertilizante, fijación biológica del nitrógeno, leguminosas, nodulación, sustentabilidad.

SUMMARY

The agricultural production based on leguminous is fundamental for human feeding, especially if it states an environmental balance. The natural interaction of these plants with a soil bacterium at root level is ecologically important as a means to diminish the excessive use of nitrogenous fertilizers which deteriorate the soil and pollute the environment. Therefore, the use of inoculates reduces the application of chemical fertilizers to the soil; increases the N content in the vegetal crop, its dried weight and maintains the yielding in the leguminous. The following paper was written with the aim of studying the effect of the exogenous application of liquid biofertilizer over the nodulation in soy bean (*Glycine max* L.). The paper was carried out in the Espinillo region, 23 km North from Río Cuarto City, Province of Córdoba. A test was performed with four treatments T₀: witness, T₁: enriched liquid fertilizer applied to sowing moment 100 lts ha⁻¹ al 30%, T₂: enriched liquid biofertilizer applied to sown soil 100 lts ha⁻¹ al 30% repeating it on R₁ on one dose 100 lts ha⁻¹ at 10% and T₃: enriched liquid biofertilizer applied on R₁, with a dose 100 lts ha⁻¹ at 10%. Four repetitions were carried out, where the plots were gruped in a block design (BD). Each block constituted one repetition representing all the treatments once, and the distribution of these within the plot (experimental unit) was systematically done. This experience showed that only the plants treated with R₁ (T₃) presented a major amount of plant nodule⁻¹ in relation with the remaining treatments. It was observed that the biofertilizer positively affects the biological fixation of nitrogen in an indirect way. That is to say, it contributes to the maintenance of a high level of photoassimilated necessary to hold the high energetic cost that this process demands.

Key words: biofertilizer, biological fixation of nitrogen, leguminous, nodulation, sustainability.

INTRODUCCIÓN

La velocidad y magnitud del cambio global, la creciente conectividad de los sistemas sociales y naturales, la complejidad cada vez mayor de las sociedades y sus impactos sobre la biosfera, ponen de relieve que el desarrollo sostenible debe orientarse no sólo a preservar y mantener la base ecológica del desarrollo y la habitabilidad, sino también a aumentar la capacidad social y ecológica de hacer frente al cambio, la capacidad de conservar y ampliar las opciones disponibles para enfrentar un mundo natural y social en permanente transformación (Gallopín, 2003).

Muchas prácticas productivas que caracterizan a las propuestas de agricultura alternativa han surgido de las acciones e investigaciones de agricultores preocupados por encontrar formas de producción compatibles con el desarrollo social y ecológico. Parte de las soluciones propuestas tienden a disminuir el uso de fertilizantes artificiales y encontrar una alternativa mejor para obtener buenas cosechas. El uso exhaustivo de fertilizantes sintéticos adicionan grandes cantidades de nitrógeno y otros promotores del crecimiento al suelo, produciendo su contaminación, además son arrastrados a los embalses, contaminando el agua y produciendo fenómenos de eutroficación. Para evitar estas situaciones se han desarrollado tecnologías como la de los bioabonos que son fertilizantes obtenidos de la fermentación anaeróbica de sustancias orgánicas, generalmente desechos de sistemas agropecuarios o de otras fuentes. Estas fermentaciones realizadas principalmente para la obtención de biogás, dejan como subproducto una materia orgánica estabilizada, rica en elementos minerales que puede ser usada como fertilizante y acondicionador de suelo (PACD, 2001). La biofertilización es una técnica que incluye la adición de microorganismos a las semillas o inoculación (hongos micorrizas – bacterias fijadoras de N_2 y/o solubilizadoras de fósforo), como también de otras sustancias al resto de la planta (micronutrientes, enzimas, hormonas, etc.). Estos elementos producen efectos positivos de particular importancia como mayor desarrollo de cultivos, mejor calidad fitosanitaria y aumento del contenido de materia orgánica en el suelo. Los microorganismos básicamente trabajan sobre el abastecimiento de nitrógeno, fósforo, azufre y otros oligoelementos hacia el vegetal, extrayéndolos del suelo y haciéndolos disponibles para la absorción por parte de las raíces del vegetal. Los nutrientes minerales merecen una atención adecuada en cuanto a la reposición, en este punto debemos conocer las necesidades del cultivo para que pueda expresar su potencial de rendimiento: “darles lo que necesitan”. Las propiedades sobresalientes de los biofertilizantes pasan por un mejor aprovechamiento de la riqueza nutricional del suelo (Frontera, 2006).

Los micronutrientes son esenciales en el desarrollo de las plantas, los efectos de las deficiencias pueden ser muy severos, tales como achaparramiento, bajos rendimientos, marchitamiento e incluso muerte de la planta. Otros oligoelementos no son aparentemente

esenciales en sí mismo en la nutrición vegetal o animal, pero la pueden afectar indirectamente: por ejemplo el Vanadio afecta ciertas funciones microbiológicas; el Aluminio afecta la disponibilidad de Fósforo, etc. Otra de las funciones características de los elementos menores es su importancia como activador de enzimas. Es importante tener presente que la aplicación de oligoelementos sólo tiene valor cuando el suelo está bien provisto de macronutrientes (Satorre *et al.*, 2003).

La adecuada nutrición de los cultivos, es fundamental para asegurar el crecimiento y desarrollo de los mismos. El Nitrógeno (N) forma parte de toda célula viva, en las plantas es constituyente de la clorofila, de las proteínas, incluyendo enzimas y de muchos otros compuestos. La gran necesidad de N en las plantas y la limitada oferta de nitrógeno disponible, hace que sea el nutriente más limitante para la producción (Bernardo *et al.*, 2004). No hay que olvidar que el nitrógeno es un gas muy abundante en la atmósfera y que puede ser incorporado al suelo como materia orgánica nitrogenada por medio de la fijación biológica del nitrógeno (Frontera, 2006).

La soja presenta una alta acumulación de proteínas en la semilla lo cual la convierte en el cultivo con la mayor demanda de nitrógeno y la menor producción de biomasa por fotoasimilado producido. Por eso el nitrógeno es el nutriente más crítico para este cultivo. Se estima que se requieren 80kg. de nitrógeno para producir una tonelada de grano. Al ser la soja una leguminosa puede cubrir sus requerimientos de nitrógeno a partir del aporte de nitrógeno del suelo y por medio de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Echeverría y García, 2005).

La productividad a largo plazo de los sistemas terrestres depende de otro proceso biológico regulado por la existencia de una población microbiana en el suelo que es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico (N_2) y así mantener al reservorio de nitrógeno de suelo como fuente renovable de este nutriente. Los microorganismos fijadores de nitrógeno constituyen un grupo muy diverso de procariotes que contienen la enzima nitrogenasa, que cataliza la reducción del N_2 a NH_3 (amoníaco). La FBN, se produce por intermedio de microorganismos que establecen asociaciones simbióticas con las plantas. Dentro de estas asociaciones, es de particular interés la que forman las leguminosas con bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, obteniéndose como resultado de dicha unión la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Dentro de esta familia, los principales géneros son tres: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium*. Los dos primeros son los géneros simbióticos por excelencia que nodulan a las leguminosas, y es *Bradyrhizobium* el que establece la simbiosis con soja (*Glicine max L.*) (Satorre *et al.*, 2003).

La importancia de la fijación biológica está dada no sólo por la cantidad de nitrógeno que aporta (50-400 kg ha⁻¹ año) sino también porque dicho aporte se produce durante el período de llenado de grano (R₅) cuando los requerimientos se hacen máximos,

disminuyendo así la retraslocación y, por lo tanto, la senescencia foliar. La provisión de N₂ a la planta mediante la simbiosis incluye dos procesos principales: el proceso de infección y nodulación y el proceso de fijación biológica de N (FBN) (Satorre *et al.*, 2003).

A partir de lo mencionado anteriormente, en cuanto a buscar nuevas alternativas para hacer más sustentable la producción agrícola y poder cumplir con los aportes de nitrógeno necesarios que requiere el cultivo de soja, resulta de interés conocer si la adición de un biofertilizante obtenido de la fermentación anaeróbica aumenta la nodulación en el cultivo de soja

Para comprobar el efecto de este producto, el estudio se basó en la aplicación de biofertilizante líquido enriquecido en dos etapas claves del ciclo ontogénico del cultivo de soja evaluando los efectos sobre la nodulación y cuantificando su respuesta.

ANTECEDENTES

Ensayos con biofertilización.

Una producción sustentable debe considerar diferentes aspectos: la genética, la edafología, la agronomía y su coevolución con la sociedad en la que se desenvuelve. Sin embargo, debemos siempre tener presente que una técnica por sí sola y aislada no será suficiente (por mejor que sea ésta) para poder implementar un sistema de producción ecológico y sostenible. La implementación de la agricultura ecológica requiere de muchas técnicas para brindarle al suelo, a la planta y al medio ambiente, las condiciones de equilibrio nutricional necesarias para su bienestar (Gallopín, 2003).

Recientemente, agricultores y técnicos han investigado y desarrollado con éxito varias fórmulas de estiércoles líquidos y biofertilizantes. Pioneros como el Ing. Carlos Vairondos Santos en Rio de Janeiro – Brasil y el profesor e Ing. Sebastián Pinheiro han sentado las bases de los procesos de fermentación y fueron los primeros en concebir la posibilidad de usar micronutrientes minerales de una forma orgánica (Piamonte Peña y Flores Escudero, 2000).

Los biofertilizantes son tecnologías que apoyan el desarrollo agrícola utilizando bacterias que llevan nutrientes del aire a las raíces de las plantas. En la Universidad Nacional Autónoma de México (CIFN-UNAM), más precisamente, en el Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno, probaron estos biofertilizantes en cultivos de sorgo, café, trigo, cebada, poroto y maíz, observando incrementos en el rendimiento por hectárea en comparación con fertilizantes químicos tradicionales. Reduciendo un 50 por ciento el consumo de agua de riego para los incrementos del rendimiento de cultivos de frijón, maíz y otras semillas, estimulando el crecimiento de las plantas a través de procesos biológicos que sustituyen las sustancias químicas contaminantes (Hernández Delgado, 2001).

El Ministerio de Agricultura y Gandería (MAG) de Costa Rica, conjuntamente con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), a través del Proyecto Nacional de Agricultura Orgánica (PNAO) y el Proyecto PLAGSALUD, han unido esfuerzos con el objeto de contribuir al fomento de una agricultura libre de agroquímicos sintéticos y sustancias tóxicas y así fomentar la protección de la salud humana y el medio ambiente a través de la utilización de abonos orgánicos como meta importante para recuperar y mantener la fertilidad de los suelos (Sepúlveda y Castro, 2001).

La Corporación Educativa para el Desarrollo Costarricense (CEDECO), con su programa de Ecodesarrollo y el Proyecto Promoción de la Salud y Seguridad del Trabajo en la Agricultura en América Central, de la Organización Internacional del Trabajo (OIT), han

aunado sus esfuerzos para lograr que los agricultores que han incorporado las prácticas de la agricultura orgánica en sus parcelas, no solamente saquen mayores ventajas de los procesos naturales y de la interacción biológica del suelo, sino que también reduzcan considerablemente el uso de recursos externos aumentando la eficiencia de los recursos básicos, desarrollando así, abonos orgánicos fermentados para la utilización en viveros favoreciendo la germinación de las plántulas, como así también para la preparación de los almácigos para las hortalizas (Restrepo, 2000).

En Argentina, unos 30 productores de Misiones utilizan los biofertilizantes desde hace casi 3 años. Estos productos son usados por los pequeños productores que trabajan de forma orgánica o están haciendo un camino de reconversión hacia lo orgánico. Lo utilizan sobre todo para la producción de verduras para venta y autoconsumo al aire libre y en invernáculos. En esta provincia se está usando en las localidades de Oberá, El Dorado, San Vicente, San Pedro, Andresito, para fertilizar plantaciones de cítricos, flores, plantas ornamentales y en plantaciones de frutilla. En Entre Ríos hay un grupo de productores orgánicos de citrus y un productor de arroz orgánico (medianas a grandes producciones) que también lo están usando. El biofertilizante también ha sido usado en Chile en fincas abocadas a la producción de uva orgánica de mesa (SAGPyA, 2003).

La principal función del biofertilizante líquido enriquecido, es la de promover el equilibrio nutricional del suelo aumentando su fertilidad natural, estimulando los microorganismos benéficos (*Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azopirillum*, *Micorrizas*, etc). Con los tratamientos realizados al suelo se pretende obtener resultados más duraderos buscando estimular la recuperación de la fertilidad de los mismos. El biofertilizante es rico en enzimas, minerales, aminoácidos, vitaminas, hormonas y antibióticos, lo que ayuda a hacer más resistente al cultivo contra el ataque de plagas y enfermedades originadas por un exceso o una carencia de uno o diversos elementos que rompen el equilibrio fisiológico normal de la planta, con su consecuente disminución de su resistencia natural (Labrousse, 1932 citado por Chaboussou, 1999).

Morfología y taxonomía del cultivo de soja (Glycine max L.).

- *Familia:* Fábaceas
- *Subfamilia:* Papilionóideas.
- *Especie:* *Glycine max (L.)*.
- *Origen:* Procede de otra especie silvestre (*Glycine ussuriensis*). Su centro de origen se sitúa en el Extremo Oriente (China, Japón, Indochina).

- *Planta:* Planta herbácea anual, de primavera-verano, cuyo ciclo vegetativo oscila de tres a siete meses y de 40 a 100 cm de envergadura. Las hojas, los tallos y las vainas son pubescentes, variando el color de los pelos de rubio a pardo más o menos grisáceo.
- *Tallo:* Rígido y erecto, adquiere alturas variables, de 0,4 a 1,5 metros, según variedades y condiciones de cultivo. Suele ser ramificado. Tiene tendencia a encamarse, aunque existen variedades resistentes al vuelco.
- *Sistema radicular:* puede alcanzar hasta un metro de profundidad, aunque lo normal es que no sobrepase los 40-50 cm. En la raíz principal o en las secundarias se encuentran los nódulos, en número variable.
- *Hojas:* Son alternas, compuestas, excepto las basales, que son simples. Son trifoliadas, con los folíolos oval-lanceolados, de color verde característico que se torna amarillo en la madurez, quedando las plantas sin hojas.
- *Flores:* Se encuentran en inflorescencias racemosas axilares en número variable. Son amariposadas y de color blanquecino o púrpura, según la variedad.
- *Fruto:* Es una vaina dehiscente por ambas suturas. La longitud de la vaina es de dos a siete centímetros. Cada fruto contiene de tres a cuatro semillas.
- *Semilla:* La semilla generalmente es esférica, del tamaño de un guisante y de color amarillo. Algunas variedades presentan una mancha negra que corresponde al hilo de la semilla. Su tamaño es mediano (100 semillas pesan de 5 a 40 gramos, aunque en las variedades comerciales oscila de 10 a 20 gramos). La semilla es rica en proteínas y en aceites. En algunas variedades mejoradas presenta alrededor del 40-42% de proteína y del 20-22% en aceite, respecto a su peso seco. En la proteína de soja hay un buen balance de aminoácidos esenciales, destacando lisina y leucina (Infoagro, 2007).

Exigencias climáticas.

Las temperaturas óptimas para el desarrollo del cultivo de soja están comprendidas entre los 20 y 30° C, siendo las temperaturas próximas a 30° C las ideales para su desarrollo. El crecimiento vegetativo de la soja es pequeño o casi nulo en presencia de temperaturas próximas o inferiores a 10° C, quedando frenado por debajo de los 4° C. Sin embargo, es capaz de resistir heladas de -2 a -4° C sin morir. Temperaturas superiores a los 40° C provocan un efecto no deseado sobre la velocidad de crecimiento, causando daños en la floración y disminuyendo la capacidad de retención de legumbres (Infoagro, 2007).

Las temperaturas óptimas oscilan entre los 15 y los 18° C para la siembra y los 25° C para la floración. Sin embargo, la floración de la soja puede comenzar con temperaturas próximas a los 13° C. Las diferencias de fechas de floración, entre años, que puede presentar

una variedad, sembrada en la misma época, son producto de variaciones de temperatura (Infoagro, 2007).

Exigencias nutricionales del cultivo de soja (Glycine max L.).

El objetivo de una fertilización es satisfacer los requerimientos de nutrientes del cultivo, en las situaciones en las que el suelo no puede proveerlos en su totalidad, y así aumentar los rendimientos (Echeverría y García, 2005). La tabla 1 muestra los requerimientos de nutrientes para el cultivo de soja.

Tabla 1: Requerimientos y exportación de nutrientes para el cultivo de soja.

Nutriente	Requerimiento	Índice de Cosecha	Exportación
Macronutrientes	Kg Tn⁻¹		Kg Tn⁻¹
Nitrógeno (N)	80	0.75	60
Fósforo (P)	8	0.84	7
Potasio (K)	33	0.59	19
Calcio (Ca)	16	0.19	3
Azufre (S)	9	0.30	3
Magnesio (Mg)	7	0.67	5
Micronutrientes	gr Tn⁻¹		gr Tn⁻¹
Boro (B)	25	0.31	8
Cobre (Cu)	25	0.53	13
Hierro (Fe)	300	0.25	75
Manganeso (Mn)	150	0.33	50
Molibdeno (Mo)	5	0.85	4
Zinc (Zn)	60	0.70	42

Fuente: adaptado de García (1999) citado por Echeverría y García (2005).

Situación actual del cultivo en Argentina.

En la Argentina, el cultivo de soja ocupa una amplia zona ecológica que se extiende desde los 23° a los 39° de latitud sur, concentrándose principalmente en la Región Pampeana, con cerca del 89% de la superficie sembrada y el 92% de la producción total del país. Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires representan las provincias con mayor superficie sembrada y los mayores rendimientos por unidad de superficie (INTA, 2007).

En las últimas campañas agrícolas la producción promedio fue de 45.000.000 de tn, prácticamente el 50% de la producción granaria de Argentina (INTA, 2007).

HIPÓTESIS

El uso de biofertilizantes líquidos enriquecidos incrementa la nodulación en el cultivo de soja (*Glycine max L.*).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si el biofertilizante líquido enriquecido influye sobre la nodulación en el cultivo de soja (*Glycine max L.*).

Objetivo específico

Determinar la infectividad y efectividad de los nódulos.

Evaluar el número, distribución y peso de los nódulos en el cultivo de soja (*Glycine max L.*).

MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el establecimiento perteneciente al productor agropecuario Héctor Hugo ROMAGNOLI, ubicado en la zona de Espinillo a 23 Km. al Norte de la ciudad de Río Cuarto.

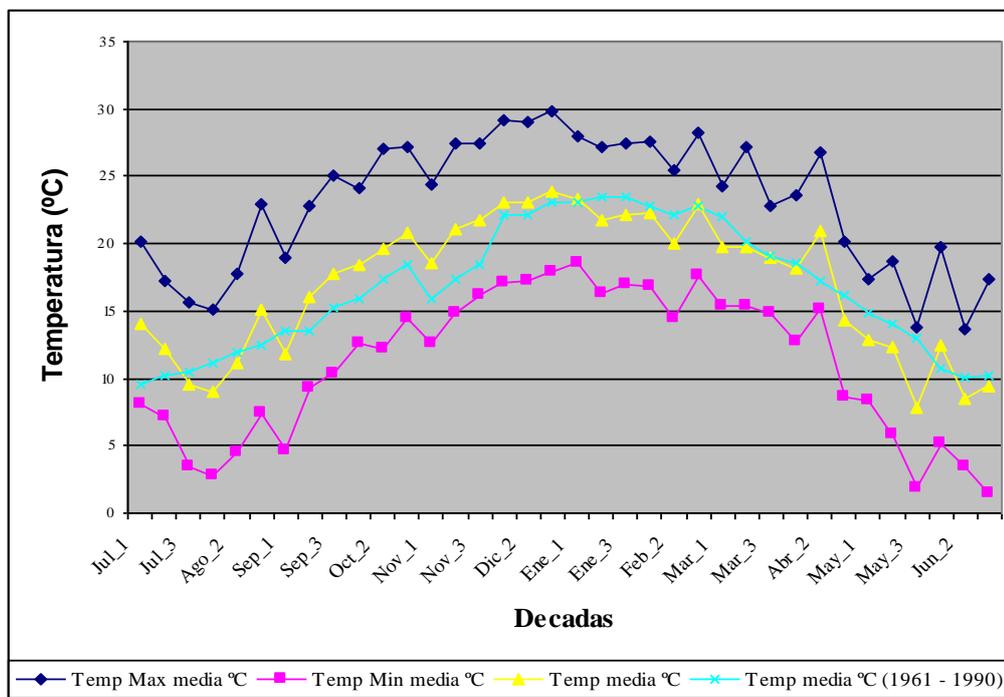
Caracterización climática

El Departamento de Río Cuarto está ubicado en la región caracterizada como llanuras bien drenadas con invierno seco.

Régimen térmico:

Es templado, la temperatura media anual es de 16,8 °C, la temperatura media del mes más caluroso (Enero) es de 23.3 °C y la correspondiente al mes más frío (Julio) es de 10 °C. En el gráfico 1 se observan las Temperatura media, máxima, mínima desde julio del 2005 hasta junio del 2006 y promedio histórico desde Julio a Junio (1961 - 1990).

Gráfico 1: Temperaturas media, máxima, mínima desde julio del 2006 hasta junio del 2007 y promedio histórico desde Julio a Junio (1961 - 1990).



Fuente: Servicio Meteorológico Nacional, (2007)

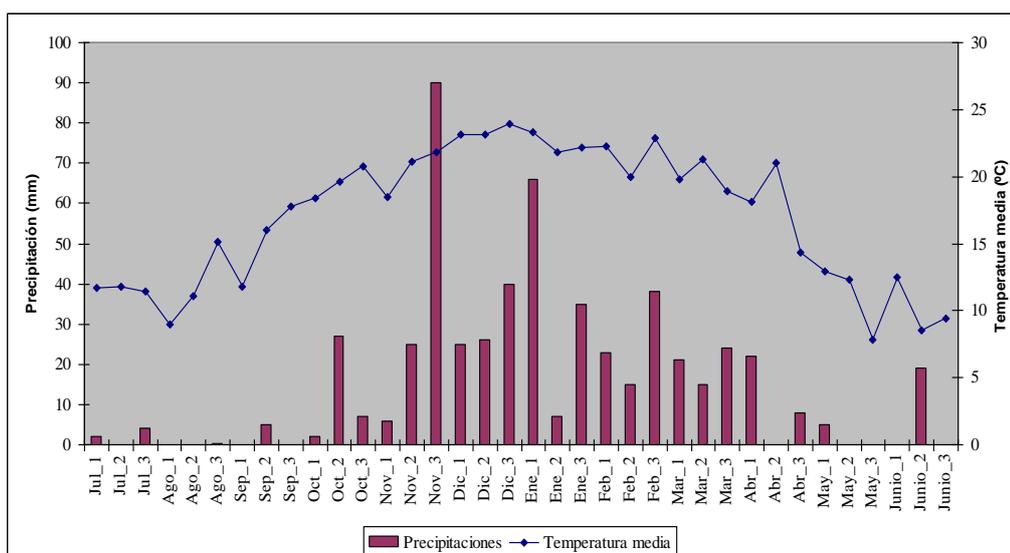
El período libre de heladas es en promedio de 240 días, y se extiende desde el 11 de septiembre hasta el 11 de mayo. Para las heladas extremas el período va desde el 16 de abril al 29 de octubre, con 167 días en promedio (Cantero *et al.*, 1986).

Régimen pluviométrico

Las precipitaciones registradas anualmente en la zona de Río Cuarto se encuentran entre los 800 y 900 mm, con un régimen de distribución monzónico por concentrar el 80% de las precipitaciones entre los meses de octubre a abril (Cantero *et al.*, 1986).

En el gráfico 2 se pueden observar las precipitaciones medias normales desde Julio a Junio (1961 – 1990).

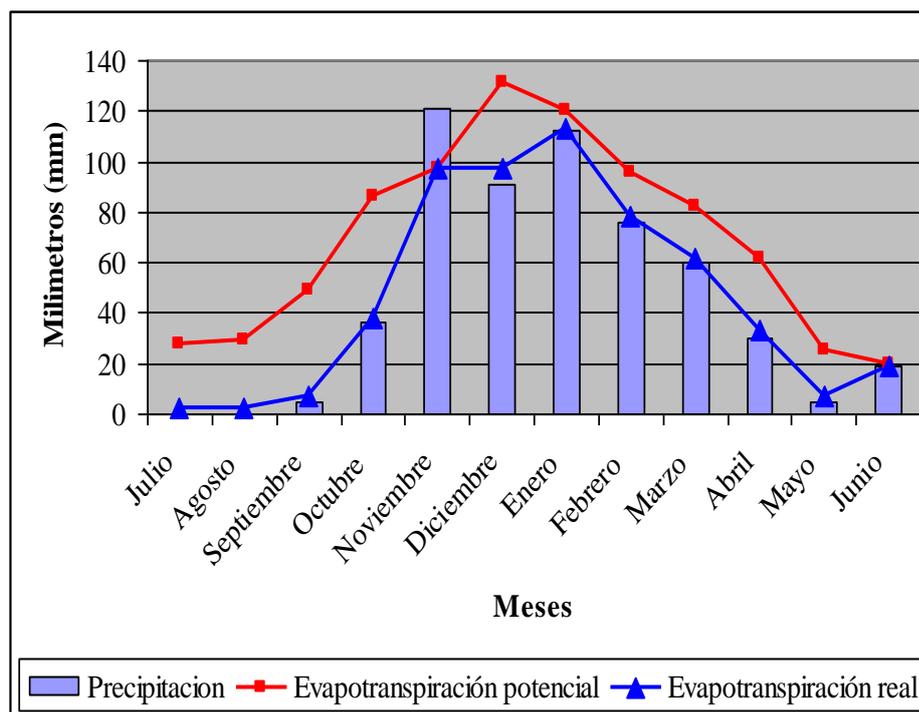
Gráfico 2: Precipitaciones medias normales desde Julio a Junio (1961 - 1990) y temperaturas medias desde julio del 2006 hasta junio del 2007.



Fuente: Servicio Meteorológico Nacional, (2007)

El balance hídrico se emplea para evaluar la disponibilidad de agua en el suelo para los cultivos y pasturas. A través de éste se puede tener una idea aproximada de las posibles épocas con deficiencias o excesos de agua. Se puede observar en el gráfico 3 que para la campaña en la cual se llevó a cabo el ensayo de biofertilización en el cultivo de soja, los meses de noviembre - diciembre y febrero hubo un déficit hídrico.

Grafico 3: Balance hídrico desde julio del 2006 hasta junio del 2007.



Fuente: Servicio Meteorológico Nacional, (2007)

Caracterización del Suelo

El suelo sobre el cual se realizó el ensayo es un Haplustol éntico con una secuencia de horizontes A_p (0-24 cm); AC (24-56); C₁ (56-75 cm) y C_{2Ca} (75 a +) (Agencia Córdoba Ambiente, 2003) y se encuentra en la planicie periserrana proximal ondulada. El mismo posee aptitud de uso clase IV, debido a que las limitaciones son muy severas y restringen la elección de plantas por lo que se requiere un manejo muy cuidadoso. Esto se debe a características permanentes como susceptibilidad moderada a la erosión por el agua o por el viento. Este suelo es de textura franco arenoso, ligeramente inclinado (0,5 – 1%) (Cisneros y Cholaky, 2004).

Rotación

Antes de la campaña 00/01 el lote sobre el cual se realizó el ensayo de biofertilización, estaba dividido en pequeños piquetes donde se llevaba adelante la actividad porcina. A partir de aquí se rotura la pradera de alfalfa que estaba implantada hacia 4 años.

Tabla 2: Rotaciones realizadas en el lote sobre el cual se llevó a cabo el ensayo.

Campañas	1999/2000	00/01	01/02	02/03	03/04	04/05	05/06	06/07
Cultivos	Alfalfa	Maíz	Maíz	Soja	Trigo-soja	Maíz	Soja	Soja

Análisis de suelo de la campaña 06/07

Tabla 3: Resultados del análisis de suelo.

pH en agua	M.O %	N-NO₃⁻ (ppm)	P₂O₅ (ppm)	S (ppm)
6,8	1,8	30	10	9

Material vegetal

Se utilizaron semillas de soja, variedad Don Mario 4800 de primera multiplicación. Antes del comienzo del ensayo (15 / 10 / 2006) se realizaron los análisis de Poder y Energía Germinativa, de acuerdo a las normas de la Internacional Seed Test Asociation (ISTA, 1996); los cuales arrojaron como resultado un 95 % de Energía y Poder Germinativo, estos datos se utilizaron para realizar el cálculo correspondiente a la densidad de siembra necesaria para obtener una población de 345.000 plantas hectárea⁻¹. La siembra se efectuó el 11/11/06.

Biofertilizante

Para llevar adelante el medio de cultivo de los microorganismos se utilizó:

- I. Fuente de Carbono (energía).
- II. Fuente de Nitrógeno.
- III. Base Mineral.

Se deben cumplir ciertas relaciones elementales para no afectar la calidad del producto obtenido a través de esta técnica, se debe mantener una relación C/N óptima (30:1). La relación adecuada entre estos dos nutrientes, favorece un buen crecimiento y reproducción de los microorganismos. Si ésta relación (C/N) esta en el orden de los 10:1 indica que el material tiene más N, por lo tanto hay mayores pérdidas de formas asimilables de N, lo cual reduce la calidad del material digerido. Si es mayor a 40:1 se inhibe el crecimiento debido a la falta de N, por lo tanto requiere para su biodegradación un mayor número de generaciones de microorganismos.

La preparación del biofertilizante se realizó dentro de un bidón de 20 litros de capacidad que ofició de digestor. En el mismo se introdujeron los ingredientes para realizar la fermentación anaeróbica, utilizando como fuentes orgánicas (compost, cama de pollo y aserrín de pino), además sales minerales (sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato de hierro y

óxido de manganeso) y agua. Una vez completada la preparación, se dejó reposar durante 6 meses.

Forma de preparación

Dentro del recipiente de 20 litros se incorporaron 1.440 gr de materia orgánica, la cual estaba constituida por 650 gr de compost, 500 gr de cama de pollo y 290 gr de aserrín.

Para la obtención de la relación C/N de los diferentes compuestos se utilizaron los datos de la tabla 4:

Tabla 4: Relación C/N de distintos materiales orgánicos

MATERIALES	C %	N %	C / N
<i>Aserrín</i>	40	0.1	400
<i>Cama de pollo</i>	30	2	15
<i>Compost</i>	10	1	10

Fuente: Sztern, 2002

Para enriquecer el biofertilizante se agregaron 60 gr. de SO_4Zn ; 14 gr SO_4Cu ; 14 gr SO_4Fe y 14 gr MnO . Estas cantidades de sales minerales se obtuvieron de experiencias realizadas por el IDMA (Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente) de Lima – Perú en el año 2000 (Piamonte Peña y Flores Escudero, 2000).

Análisis realizado al biofertilizante

En una primera instancia se realizó un análisis de la concentración hormonal y el valor de pH que poseía el líquido, dichos estudios fueron realizados por el laboratorio de la cátedra de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Río Cuarto. A través de un potenciómetro se determinó el pH del biofertilizante arrojando un valor de 7,04, siendo éste un indicador previo para el análisis de hormonas. Para la determinación de Citocininas (Zeatina) y Auxinas (AIA) se utilizó el HPLC-UV y como resultado se obtuvieron concentraciones de $4,34 \mu\text{g. ml}^{-1}$. de cultivo y $2,6 \mu\text{g. ml}^{-1}$. de cultivo respectivamente.

En un segundo paso se efectuó un análisis microbiológico del biofertilizante, el cual fue realizado por la cátedra de Microbiología Agrícola de nuestra facultad. Se utilizaron diferentes medios para determinar la presencia de colonias de microorganismos. Para el caso de microorganismos fijadores en simbiosis se utilizó el medio de EMA, para los fijadores de vida libre (*Azospirillum*) el NFB, también se utilizó el medio de cultivo de Margaret – Brown para determinar la presencia de colonias de *Azotobacter*. Por último se preparó un

medio de Agar papa para determinar la presencia de hongos. Los resultados se observan en la tabla 5.

Tabla 5: Resultados obtenidos en los análisis microbiológicos.

Resultados del análisis Microbiológico			
EMA (Ufc ml ⁻¹)	NFB (Ufc ml ⁻¹)	Margaret - Brown (Ufc ml ⁻¹)	A. papa
4 x 10⁴	3 x 10⁸	1,2 x 10⁵	- 9 colonias de Actinomicetes. - 7 colonias de levadura.

Estos resultados muestran que existen un bajo número de microorganismos fijadores en simbiosis (4×10^4), no así para el caso de los fijadores en vida libre (3×10^8). Según la Resolución N° 310/1994 del SENASA los inoculantes deben contener no menos de 1000 millones (10^9) por gr. o ml. de producto a la fecha de elaboración y no menos de 100 millones (10^8) por gr. o ml. a la fecha de vencimiento. Por el método de inoculación se deben incorporar 80 mil rizobios por semilla de soja (Peticari, 2004).

Diseño estadístico

Las semillas se sembraron el 11 de Noviembre de 2006 en 16 parcelas sobre las que se aplicaron cuatro tratamiento con cuatro repeticiones, cada parcela midió 2.60 mts. de ancho (5 surcos a 0.52 mts.) por 5 mts. de largo, a su vez las parcelas se agruparon en cuatro bloques en un Diseño en Bloques (DB). Cada bloque constituyó una repetición en la que estuvieron representados todos los tratamientos una sola vez, y donde la distribución de la unidad experimental (parcela) dentro de cada bloque se realizó en forma sistemática. Las muestras fueron extraídas en forma sistemática al azar, evaluando 2 plantas por surco de cada uno de los 5 surcos de cada parcela (10 plantas / repetición/ tratamiento).

Los datos obtenidos fueron cargados en una tabla del programa InfoStat versión 1.1 (Balzarini *et al* 2002), permitiendo realizar una comparación estadística mediante un análisis de varianza ANOVA ($p < 0.05$), seguido por un test de Duncan ($p < 0.05$).

Tratamientos realizados

- T₀: Testigo (condiciones normales del cultivo)
- T₁: Biofertilizante líquido enriquecido aplicado a suelo en el momento de siembra 100 lts. ha⁻¹ al 30%
- T₂: Biofertilizante líquido enriquecido aplicado al suelo en el momento de la siembra (100 lts. ha⁻¹ al 30%) repitiéndose el 27 de diciembre del mismo año en R₁ en una dosis de 100 lts. ha⁻¹ al 10%.
- T₃: Biofertilizante líquido enriquecido aplicado en estado reproductivo 1 (R₁), con una dosis de 100 lts. ha⁻¹ al 10%.

Croquis del ensayo

T ₁	T ₂	T ₃	T ₀
T ₂	T ₃	T ₀	T ₁
T ₃	T ₀	T ₁	T ₂
T ₀	T ₁	T ₂	T ₃



Los surcos dentro de las parcelas estaban ubicados de Este a Oeste.

La metodología que se utilizó para evaluar la nodulación consistió en una determinación agronómica sobre la nodulación temprana que se utiliza como indicador de la abundante cantidad de bacterias en la zona de desarrollo radical desde los primeros estadios de crecimiento del cultivo. Su importancia consiste en que cuanto más temprana sea la nodulación mayor será el tiempo total de fijación de nitrógeno durante el ciclo del cultivo. Un inoculante de alta calidad debe posibilitar que el 100% de las plantas estén noduladas antes de transcurridos los primeros 10 días de la emergencia.

En el estado de V₃ se realizó una evaluación de infectividad de Rhizobium, considerando planta infectada a aquella con más de tres nódulos. En R₄ se cuantificó el N° de nódulos efectivos y se determinó su peso, para lo cual se tomaron 10 plantas al azar de cada tratamiento. En este período se observó la distribución de los nódulos entre raíz principal y secundarias, estando relacionado con el momento en que se produjo la nodulación.

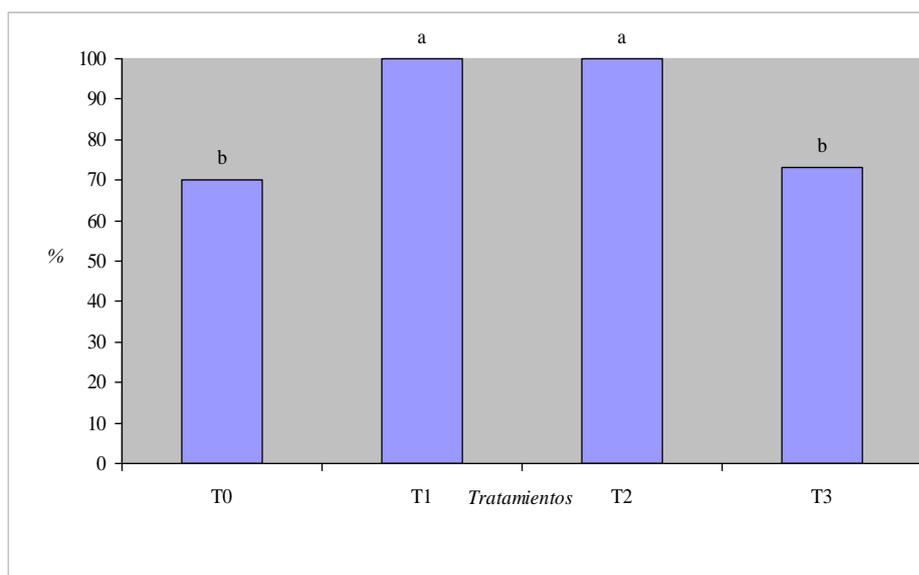
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Infectividad

En áreas con varias secuencias del cultivo de soja, la repetida inoculación anual permitió que los Rizobios introducidos (capaces de nodular soja) se hayan establecido y naturalizado en la mayoría de estos suelos. Las poblaciones de estos microorganismos varían desde 10^2 hasta 10^5 Rizobios por gr de suelo para la región sojera tradicional. Por esta razón es posible observar la presencia de nódulos en las raíces de sojas no inoculadas en suelos con historia en el cultivo. Por tal motivo existe una tendencia a suspender la inoculación luego de varios años de uso repetido en un campo considerando que al observarse nodulación espontánea la fijación de N_2 que requiere el cultivo ya está asegurada. En trabajos de investigación recientes se ha demostrado que los Rizobios que se naturalizan en el suelo, van perdiendo eficiencia en la fijación de N_2 , pero mantienen una alta capacidad para formar nódulos (Peticari, 2004).

Como se observa en el gráfico 4, las plantas tratadas con biofertilizante al momento de la siembra (T_1) y aquellas a las que se le realizó una doble aplicación (T_2) alcanzaron un 100% de infección cuando se realizó el recuento de nódulos en V_3 , mientras que en las plantas testigo (T_0) y en las tratadas con biofertilizante en R_1 (T_3), el porcentaje de infección fue menor (69 y 72 % respectivamente). Las diferencias de T_1 y T_2 respecto de T_0 y T_3 son estadísticamente significativas.

Gráfico 4: Infectividad expresada como porcentaje de plantas con más de tres nódulos en el estado fisiológico de V_3 en soja (*Glycine max L.*).



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha= 0,05$)

Nodulación

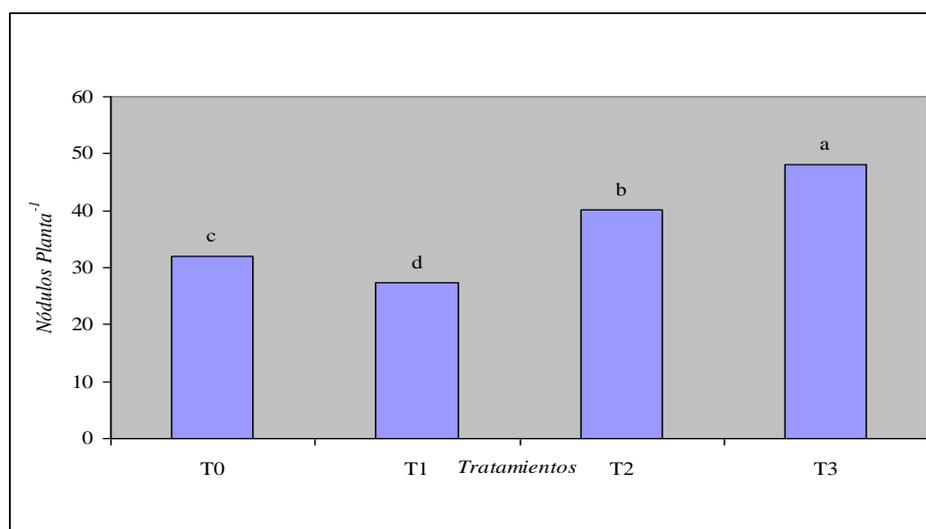
En estado reproductivo R5 - R6 una adecuada nodulación corresponde a 40 - 50 nódulos planta⁻¹, de los cuáles por lo menos 12 deben encontrarse en la parte superior de la raíz primaria (Peticari, 2004).

En cuanto a este ensayo es posible afirmar que las plantas a las que se les aplicó el biofertilizante líquido enriquecido al momento de la siembra (T₁) presentaron el menor número de nódulos planta⁻¹ en relación a las testigo (T₀) y las de los restantes tratamientos (T₂ y T₃). Esto indicaría que la inoculación con biofertilizante disminuiría el número de nódulos y la actividad simbiótica en los primeros estadios vegetativos del cultivo, lo que podría estar relacionado con una baja cantidad de microorganismos simbióticos presente en el producto y con algún efecto inhibitor de la población nativa.

No obstante, estos resultados son llamativos en relación con lo que expresan las bibliografías que tratan este tema. Algunos autores como González y Lluch (1992) marcan la existencia de un sinergismo entre los géneros de *Rhizobium* y *Azospirillum*, lo cual llevaría a una nodulación temprana, a incrementos en el número de nódulos, a altas cantidades de fijación de N₂ y a un mejoramiento general del sistema radical. En el gráfico 5 se representa el número total de nódulos obtenido planta⁻¹ en los diferentes tratamientos. El tratamiento T₁ obtuvo 27 nódulos planta⁻¹ mientras que T₀ 32 nódulos planta⁻¹; T₂ 40 nódulos planta⁻¹ y T₃ 48 nódulos planta⁻¹, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

De todas maneras sería necesario ampliar los estudios sobre los posibles efectos inhibitorios del biofertilizante hacia la población nativa de microorganismos simbióticos.

Gráfico 5: Valores medios en el número de nódulos logrados por planta en R₄ en el cultivo de soja (*Glycine max L.*) en los distintos tratamientos.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha= 0,05$)

Distribución

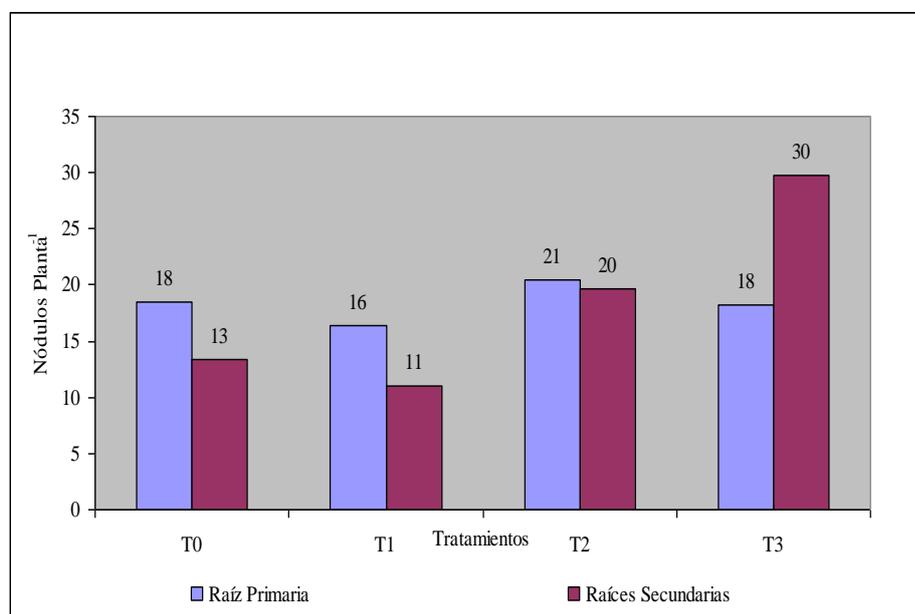
La distribución de los nódulos entre raíz primaria y raíces secundarias se relaciona con el momento en que se produce la nodulación (cuanto mayor sea la proporción de nódulos en la raíz principal más temprana habrá sido la formación de esa nodulación). (Satorre *et al*, 2003).

Como puede observarse en el gráfico 6, las plantas de los tratamientos T₀ y T₁ concentraron el mayor número de nódulos planta⁻¹ en la raíz principal. Esto no ocurrió en las plantas correspondientes al tratamiento T₂, donde se pudo observar que la distribución fue muy similar en ambos tipos de raíces (primaria y secundarias). Mientras que las plantas del tratamiento T₃ mostraron una respuesta diferente, concentrando el mayor número de nódulos en raíces secundarias.

Estos resultados difieren a los hallados en un ensayo llevado a cabo en forma conjunta entre la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC y la Agencia de Extensión Rural del INTA Río Cuarto, en el que se evaluó el efecto de la fertilización fosforada sobre la actividad biológica del nitrógeno y el rendimiento del cultivo de soja mediante distintas fuentes de fertilización fosforada (química y biológica) e inoculación. En este trabajo se encontró que en las parcelas fertilizadas, independientemente de la fuente (ambas fuentes por separado y en combinación) y del momento de aplicación, el número de nódulos en la raíz principal fue siempre superior a los encontrados en las raíces secundarias (Niederhauser *et al.*, 2007).

Se sabe que la fijación biológica de nitrógeno es un proceso altamente costoso para la planta desde el punto de vista energético y que los asimilados necesarios para sostenerla son aportados por la planta (Satorre *et al*, 2003). Por esta razón la aplicación exógena de biofertilizante líquido enriquecido en R₁ (T₃), favorecería la fijación de un mayor número de nódulos planta⁻¹ a partir de que las plantas disponen de una mayor cantidad de fotoasimilados para sostener la fijación, siendo una de las posibles causas de las diferencias encontradas en la distribución de la nodulación entre T₃ y los tratamientos restantes.

Gráfico 6: Valores medios de cantidad y distribución de nódulos totales obtenido en R₄ en el cultivo de soja (*Glycine max L.*) en los distintos tratamientos.



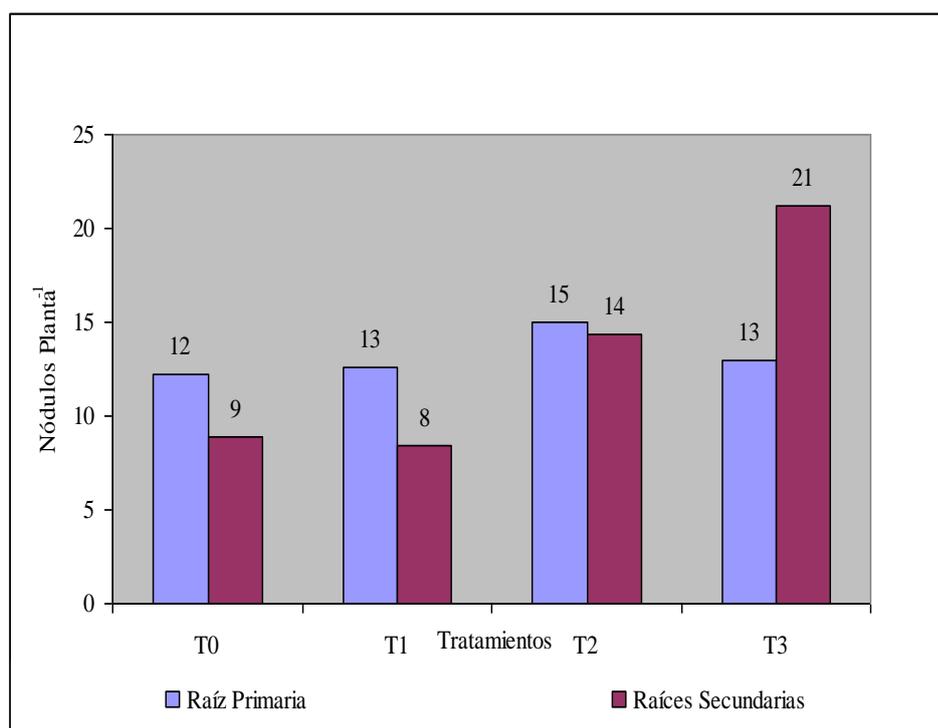
Nódulos efectivos

La actividad de la enzima nitrogenasa requiere baja concentración de oxígeno, que en los nódulos está regulada por la leghemoglobina. Ésta es una proteína que contiene hierro con características similares a la hemoglobina animal con capacidad de unirse al O₂ y es quien provee el suficiente oxígeno para las funciones metabólicas del bacterioide, pero, al mismo tiempo, previene la acumulación de O₂ libre que destruiría la actividad de la nitrogenasa. La leghemoglobina le da el color rojo al interior de los nódulos activos. Si un nódulo tiene el interior rojo, indica que está fijando activamente N₂ y se considera nódulo efectivo. Dentro de cierto rango, cuanto más rojo es el nódulo, más efectivo es. Cuando los nódulos son jóvenes y aún no fijan N₂, su coloración interna es blanca o gris. Los nódulos que ya no fijan N₂ se tornan verdes y pueden ser descartados por la planta. La falta de color rojo en nódulos maduros indica que se formaron por cepas infectivas, pero no efectivas, por lo que nunca serán buenos fijadores de nitrógeno (Fernández Canigia, 2003).

Al observar el gráfico 7 se puede ver que la cantidad y distribución de los nódulos efectivos posee el mismo comportamiento que la cantidad y distribución de nódulos totales vista en el gráfico 6, esto es, T₀ y T₁ concentra sus nódulos en la raíz principal, T₂ lo hace en forma más equitativa entre sus tipos de raíces (principal y secundarias) y T₃ posee el mayor número de nódulos en sus raíces secundarias.

Estos datos muestran que, aún cuando una cepa rizobiana sea capaz de infectar una leguminosa, los nódulos formados pueden no ser efectivos para fijar N_2 . La efectividad, si bien es un proceso regulado genéticamente, también está viculado a factores ambientales que afectan a la planta.

Gráfico 7: Valores medios de cantidad y distribución de nódulos efectivos obtenido en R_4 en el cultivo de soja (*Glycine max L.*) en los distintos tratamientos.



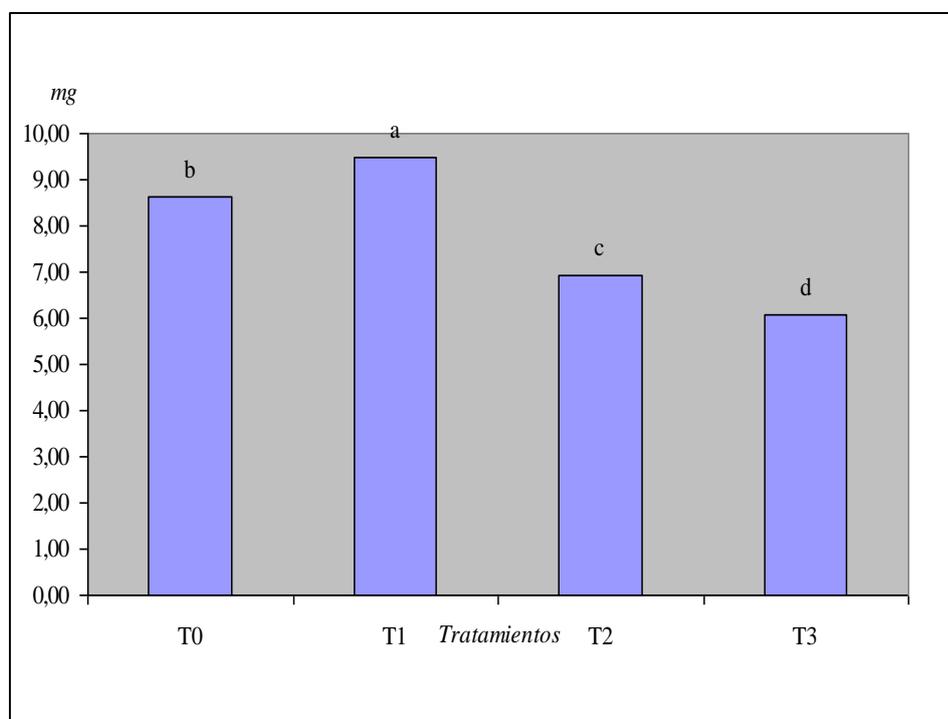
Peso

En el gráfico 8, se observa que las semillas tratadas al momento de la siembra (T_1), lograron nódulos con el mayor peso individual, con un valor de 9,50 mg. Si bien este tratamiento alcanzó el menor número de nódulos obtenido planta⁻¹ (Gráfico 5), los nódulos estaban concentrados en mayor media en la raíz principal (Gráfico 7). Esto indicaría que se formaron más tempranamente implicando un mayor tiempo de crecimiento y desarrollo del nódulo.

El peso individual de los nódulos del testigo (T_0) fue inferior al alcanzado en (T_1), (8,64 mg.) (Gráfico 8). Como la distribución de los nódulos entre los tipos de raíces fue similar en los dos tratamientos, el menor tamaño posiblemente se relacione con la diferencia de cantidad a favor de T_0 . Los nódulos del tratamiento T_2 mostraron un peso de 6,93 mg por nódulo (Gráfico 8), este resultado puede ser producto del efecto combinado de distribución y cantidad ya que no sólo presentó más nódulos en raíces secundarias respecto a T_0 y T_1 (Gráfico 6) sino también presentó mayor cantidad total que los mismos (Gráfico 5). Por último, 6,09 mg. fue el peso logrado por nódulo cuando se trataron las plantas con biofertilizante en el estado fisiológico de R_1 (T_3). Esto estaría relacionado directamente con la mayor cantidad total de nódulos planta⁻¹ y por la ubicación de los mismos (la mayor cantidad se localizó en las raíces secundarias (Gráfico 6) los cuales siempre son de menor tamaño que los ubicados en la raíz principal.

Los resultados obtenidos luego de la inoculación con biofertilizante indican que existen diferencias estadísticamente significativas en el peso medio por nódulo entre los diferentes tratamientos realizados al cultivo de soja (*Glycine max L.*).

Gráfico N° 8: Peso medio por nódulo efectivo obtenido en R_4 en el cultivo de soja (*Glycine max L.*) en los distintos tratamientos.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha= 0,05$)

CONCLUSIONES

- La aplicación exógena de biofertilizante líquido enriquecido al momento de la siembra y su posterior reaplicación en R₁, mostró un efecto positivo sobre la infectividad de los Rizobios en las raíces del cultivo de soja (*Glycine max L.*).
- En forma indirecta, y luego de analizar los datos de campo, se observa que no es el biofertilizante líquido enriquecido quien aporta el inóculo a las semillas sino que existe una población nativa de Rizobios con capacidad de realizar infección, ésto se debe a las prácticas de inoculación que se realizaron en campañas anteriores.
- La aplicación de biofertilizante líquido enriquecido no modificó la efectividad de los nódulos ya que no se apreciaron variaciones en la proporción de nódulos efectivos en relación con los nódulos totales.
- Aplicaciones de biofertilizante líquido enriquecido en estado avanzado del cultivo (R₁) incrementó no sólo el número total de nódulos en las raíces, sino que además generó una redistribución de nódulos hacia las raíces secundarias.
- La aplicación de biofertilizante líquido enriquecido al momento de la siembra (T₁) marcó un incremento en el peso medio por nódulo en relación con los restantes tratamientos realizados.
- A partir de este trabajo se pudo avanzar en la evaluación de una nueva alternativa de fertilización orgánica poco difundida entre los cultivos extensivos. De todas maneras es conveniente continuar con la investigación para corroborar o descartar los resultados obtenidos, dejando así las puertas abiertas para que otros investigadores puedan continuar investigando sobre la relación entre estos biofertilizantes y la fijación biológica de nitrógeno no sólo en el cultivo de soja como en otros.

BIBLIOGRAFIA

- AGENCIA CÓRDOBA AMBIENTE 2003. Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba, Los Suelos. Córdoba – Argentina.
- BALZARINI, M.; GONZALEZ, L; TABLADA, M.; CASANOVES, F.; DI RIENZO, J. y C. ROBLEDO 2002. InfoStat, version 1.1. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Primera Edición, Editorial Brujas, Argentina.
- BERNARDO, I.; BONADEO, E.; MORENO, I.; BONGIOVANNI, M. y R. MARZARI 2004. Sistema Suelo-Planta. Apuntes para clases teóricas Unidad N° 12, 128p. Catedra Sistema Suelo-Planta. Facultad Agr. y Vet. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
- CANTERO, A.; BRICCHI, E.; BECERRE, V.; CISNEROS, J. Y H. GIL 1986. Zonificación y descripción de las tierras del departamento Río Cuarto. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- CHABOUSSOU, F. 1999. Les plantes malades des pesticides 2^a edición. L&PM. 6: 159-198.
- CISNEROS, J. y C. CHOLAKY 2004. Uso y Manejo del Suelo. Apuntes para clases teóricas Unidad: Manejo de las condiciones biológicas y bioquímica de los suelos. Catedra Uso y Manejo de Suelos. Facultad Agr. y Vet. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
- ECHEVERRIA, H. y F. GARCIA 2005. Fertilidad de Suelo y Fertilización de Cultivos I.N.T.A. Balcarce 13: 283-297.
- FERNÁNDEZ CANIGIA, M. V. 2003. Manual de Nodulación. En:
<http://www.nitragin.com.ar/Manual%20de%20nodulacion-Sept03.pdf>. Consultado: 01/02/2008
- FRONTERA, G. 2006. Biofertilización: Aspectos Productivos y Consecuencias en el Manejo y Conservación de la Fertilidad del Suelo. En:
http://www.engormix.com/biofertilizacion_aspectos_productivos_consecuencias_s_articulos_1059_AGR.htm. Consultado: 11/11/2008.
- GALLOPIN, G. 2003. Sostenibilidad y Desarrollo Sostenible: Un enfoque sistémico. En: CEPAL Serie Medio Ambiente y Desarrollo
- GONZALEZ, J. y C. LLUCH 1992. Biología del Nitrógeno. Interección Planta-Microorganismo. Ed. Rueda. Madrid. España

- HERNÁNDEZ DELGADO, G. 2001. Los Biofertilizantes de la Universidad Nacional Autónoma de México.
En: <http://www.invdes.com.mx/antiores/Mayo2001/htm/bio.html>. Consultado: 7/05/2006
- INFOAGRO 2007. El Cultivo de Soja. En:
<http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm>. Consultado: 9/10/2007.
- INTA 2007. Distribución del Área Sembrada de Soja en la Actualidad en la Argentina, por Provincia y Departamentos.
En: http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/santa_fe/milenaria_vigencia/2.pdf Consultado: 20/05/2006.
- ISTA 1996. Reglas Internacionales para el Análisis de Semilla. Zurich, Suiza.
- NIEDERHAUSER, M.; BERNARDO, I.; OLMEDO, C. y J. R. MARCELLINO 2007. Efecto de la Fertilización Fosforada sobre la Actividad Biológica del Nitrógeno y el Rendimiento del Cultivo de Soja. Soja Actualizaciones 2007.
- PACD, J. 2001. Efecto de bioabono sobre el área fotosintéticamente activa, producción de cladodios y eficiencia de recuperación de N en cultivo de tuna (*Opuntia ficus-indica L.*) en el primer año post-plantación. En: <http://www.jpacd.org/JPACD01/garciafnl.pdf> Consultado: 20/05/2006.
- PERTICARI, A. 2004. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN - presentado en Centro Soja 2005. En:
<http://www.planetasoja.com/trabajos/trabajos800.php?id1=3576&publi=&idSec=39&id2=3579>. Consultado: 11/12/2007.
- PIAMONTE PEÑA, R. y P. FLORES ESCUDERO 2000. Biofertilizante líquido enriquecido IDMA (Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente) Lima – Perú.
- RESTREPO, J. 2000. Abonos Orgánicos Fermentados. Experiencias de Agricultores en Centroamérica y Brasil. En:
http://www.motril.es/fileadmin/areas/medioambiente/ae/presentacion/documentos/ABO_NOSORG%C3%81NICOSFERMENTADOS.pdf . Consultado: 08/02/2008.
- SATORRE, E.; BENECH ARNOLD, R.; SLAFER, G.; de la FUENTE, E.; MIRALLES, D.; OTEGUI, M. y R. SAVIN. 2003 Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo 1^{ra} ed. Facultad Agronomía Universidad De Buenos Aires 9: 165-201.

- SAGPyA 2003. Catalogo de Tecnología para Pequeños Productores Agropecuarios. En: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/programas/desarrollo_rural/proinder/catalogo/catalogo/tecno/22.htm Consultado: 20/05/2006
- SEPÚLVEDA, C. y M. CASTRO 2001. Abonos Orgánicos para una Producción Sana. Primera edición. San José. Costa Rica. En: <http://www.cor.ops-oms.org/TextoCompleto/documentos/ABONOS.pdf>. Consultada: 14/06/2007
- S.M.N 2007. Información Histórica. Boletín Agroclimático. Servicio Meteorológico Nacional. En: <http://www.smn.gov.ar/?mod=agro&id=11> Consultado: 18/08/2007.
- SZTERN 2002. Manual para la elaboración de compost. Bases conceptuales y procedimientos. En: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/compost.pdf> Consultado: 20/05/2006.

ANEXOS

Infectividad

Test: Duncan Alfa:=0,05

Error: 0,1056 gl: 153

Tratamientos	Medias	n	
T2	1,00	40	A
T1	1,00	40	A
T3	0,73	40	B
T0	0,70	40	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

- Existen diferencias estadísticamente significativas que T₂ y T₁ difieren de T₃ y T₀.

Nodulación

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Nódulos / Planta	160	0,81	0,80	10,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10152,20	6	1692,03	110,10	<0,0001
Bloque	28,45	3	9,48	0,62	0,6049
Tratamiento	10123,75	3	3374,58	219,59	<0,0001
Error	2351,30153	15,37			
Total	12503,50	159			

- Existen diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.0001$) entre los distintos tratamientos.
- No Existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.6049$) entre los distintos bloques.

Test: Duncan Alfa:=0,05*Error: 15,3680 gl: 153*

Tratamientos	Medias n		
T3	48,08	40	A
T2	40,23	40	B
T0	31,90	40	C
T1	27,30	40	D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

- Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T₃, T₂, T₀ y T₁.

Peso**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso por Nódulo	160	0,60	0,59	14,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,0E-04	6	5,0E-05	39,00	<0,0001
Bloques	6,5E-06	3	2,2E-06	1,70	0,1688
Tratamientos	2,9E-04	3	9,7E-05	76,31	<0,0001
Error	1,9E-04	153	1,3E-06		
Total	4,9E-04	159			

- Existen diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$) en el peso por nódulo entre los distintos tratamientos.
- No Existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,1688$) en el peso por nódulo entre los distintos bloques.

Test: Duncan Alfa:=0,05*Error: 0,0000 gl: 153*

Tratamientos	Medias n		
T1	0,01	40	A
T0	0,01	40	B
T2	0,01	40	C
T3	0,01	40	D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

- Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T₁, T₀, T₂ y T₃.