



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero
Agrónomo

Modalidad: Proyecto

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y LA CAPACIDAD
INFECTIVA DE RIZOBIOS SIMBIONTES DE SOJA
EMPLEADOS EN FORMULACIONES COMERCIALES**

Herrmann, Claudio Hernán

DNI: 35259416

Directora: Dra. Marta Dardanelli

Co-Director: Ing. Agr. Guillermo Cerioni

Río Cuarto – Córdoba

Marzo 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Evaluación de la viabilidad y la capacidad infectiva de rizobios simbios de soja empleados en formulados comerciales.

Autor: Herrmann, Claudio Hernán.
DNI: 35259416

Directora: Marta Dardanelli.
Co-Director: Guillermo Cerioni.

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Dra. Fernandez Elena Mercedes _____

Dra. Thuar Alicia María _____

Dra. Marta Dardanelli _____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

DEDICATORIA

- Dedico este trabajo a mis padres, hermano y amigos por el apoyo incondicional a lo largo del camino recorrido por la Universidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y a la Facultad de Agronomía y Veterinaria.

A los integrantes del laboratorio 17 del departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la UNRC por su apoyo, orientación y contribución a la elaboración de este Trabajo Final, especialmente quiero agradecer al Microbiólogo Julio Vicario.

A los profesores de la Universidad Nacional de Río Cuarto, por transmitir su experiencia y por ayudarme a formarme como profesional, especialmente a mi directora Marta Dardanelli.

A mi familia, compañeros y amigos por ser el soporte emocional lejos de casa.

ÍNDICE GENERAL

Página.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS GENERALES	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Microorganismo empleado	7
Condición de cultivo y medio de conservación	8
Medios utilizados	8
Estudio del crecimiento bacteriano	9
Ensayo de desecación	9
Integridad de la membrana celular.....	13
Ensayo de aptitud simbiótica en condiciones de desecación	13
RESULTADO Y DISCUSIÓN	15
Ensayo de tolerancia a desecación formulado N°1	15
Ensayo de tolerancia a desecación formulado N°2.....	17
Ensayo de tolerancia a desecación formulado N°3.....	19
Ensayo de tolerancia a desecación formulado N°4.....	21
Integridad celular de células del formulado N°4	22
Desecación y test de Burton del formulado 4 de 75 días de post envasado	23
CONCLUSIÓN	40
BIBLIOGRAFÍA CITADA	41
ANEXO	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Envase con formulación comercial provista por la empresa	7
Figura 2. Espectrofotómetro utilizado para determinar crecimiento bacteriano por turbidez	9
Figura 3. Sistema de filtración en campana de esterilidad.....	10
Figura 4. Placas de Petri con recuento de células viables (UFC/ml)	11
Figura 5. Procedimiento experimental para ensayo de desecación.....	12
Figura 6. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B). La flecha blanca señala los nódulos. En todos los ensayos las plantas controles sin inocular, no presentaron formación de nódulos	23
Figura 7. Plantas de soja inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación con la adición de un protector bacteriano. La flecha blanca señala los nódulos.....	25
Figura 8. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B). La flecha blanca señala los nódulos	27
Figura 9. Plantas de soja inoculadas con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y tiempo 45 días de desecación con la adición de un protector bacteriano. La flecha blanca señala los nódulos.....	29
Figura 10. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 62 días de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B). Ausencia de nódulos en la mayoría de las plantas	31
Figura 11. Plantas de soja inoculadas con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y tiempo 62 días de desecación con la adición de un protector bacteriano. La flecha blanca señala los nódulos.....	33
Figura 12. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B).....	35
Figura 13. Planta de soja inoculadas con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y tiempo 72 días de desecación con la adición de un protector bacteriano.....	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Recuento de células viables del formulado 1 tiempo 75 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	15
Cuadro 2. Recuento de células viables del formulado 1 tiempo 150 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	16
Cuadro 3. Recuento de células viables del formulado 1 tiempo 400 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	16
Cuadro 4. Recuento de células viables del formulado 2 tiempo 75 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	17
Cuadro 5. Recuento de células viables del formulado 2 tiempo 150 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	17
Cuadro 6. Recuento de células viables del formulado 2 tiempo 540 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	18
Cuadro 7. Recuento de células viables del formulado 3 tiempo 75 días post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	19
Cuadro 8. Recuento de células viables del formulado 3 tiempo 150 días post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	19
Cuadro 9. Recuento de células viables del formulado 3 tiempo 600 días de post incubación en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).	20
Cuadro 10. Recuento de células viables del formulado 4 tiempo 75 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	21
Cuadro 11. Recuento de células viables del formulado 4 tiempo 150 días de post envasado de en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación)	21
Cuadro 12. Recuento de células viables del formulado 4 tiempo 400 días post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).....	22
Cuadro 13. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	24
Cuadro 14. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	24
Cuadro 15. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de	

75 días de post envasado y tiempo 0 días de desecación con la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.....	25
Cuadro 16. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado de tiempo 0 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.....	26
Cuadro 17. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	28
Cuadro 18. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.....	27
Cuadro 19. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación con la adición de un protector bacteriano, según lo estipulado en indicaciones de test de Burton	29
Cuadro 20. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y 45 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	30
Cuadro 21. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 62 días de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	32
Cuadro 22. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	32
Cuadro 23. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 62 días de desecación con la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	33
Cuadro 24. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	34

Cuadro 25. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 72 días de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	36
Cuadro 26. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	36
Cuadro 27. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 72 días de desecación con la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton	37
Cuadro 28. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.....	38

INDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 1, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 52 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml).....	43
Anexo 2. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 2, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 45 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml).....	43
Anexo 3. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 3, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 45 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml).....	44
Anexo 4. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 3, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 65 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml).....	44

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y LA CAPACIDAD INFECTIVA DE RIZOBIOS SIMBIONTES DE SOJA EMPLEADOS EN FORMULACIONES COMERCIALES

RESUMEN

Este trabajo presenta el resultado del estudio de diferentes formulaciones de inoculantes sometidas a ensayos de desecación y test de Burton. El ensayo de desecación se obtuvo colocando las bacterias sobre soporte inerte incubada en estufa a 35% de valor de humedad, la condición control en presencia de agua se realizó colocando las bacterias sobre soporte inerte en un medio agar-agua 1,2% en estufa a 75% de valor de humedad. Posteriormente las células se separaron del filtro y fueron estudiadas desde el punto de vista de la microscopía y la viabilidad celular estimada por el recuento de células viables por mililitro (UFC/ml). Los rizobios sometidos a desecación en soporte inerte, fueron resuspendidos en solución fisiológica para obtener un valor de células viables por ml de 10^7 . Esta suspensión fue inoculada sobre semillas de soja provistas por el semillero Asociados Don Mario a fin de realizar el ensayo de infectividad Test de Burton, tomando como positivas aquellas plantas que posean 3 o más de un nódulo, ubicados dentro de un cilindro imaginario de 2,5 cm de diámetro, con eje central en la raíz principal. A fin de facilitar el reconocimiento, se cortaron las raíces a la longitud de 2,5 cm del cuello. De los cuatro formulados evaluados, el formulado 4 presentó la mayor tolerancia al estrés por desecación sin observarse diferencias entre los 3 tiempos post envasado evaluados, a los 52 días de exposición de los formulados a sequía, presentaron un recuento del orden de 10^3 UFC/ml. Las nuevas formulaciones de inoculantes para soja aumentan la tolerancia a la desecación del rizobio y no afectan la aptitud simbiótica del mismo frente a la leguminosa. Se destaca la importancia de protectores bacterianos a la hora de realizar los ensayos de aptitud simbiótica.

EVALUATION OF THE FEASIBILITY AND INFECTIVE CAPACITY OF SOYBEAN SIMILION RIZOBES USED IN COMMERCIAL FORMULATIONS

ABSTRACT

This paper presents the results of different formulations of inoculants subjected to drying tests and test Burton. The drying test was obtained by placing the bacteria on inert support incubated in an oven at 35% humidity value; the presence of water control condition is done by placing the bacteria on inert support in a water-agar medium 1.2% oven to 75% moisture value. The cells were separated from the filter and were studied from the point of view microscopy and estimated by the viable cell count per millilitre (CFU / ml) cell viability. Rhizobia subjected to drying in an inert support, they were resuspended in saline to obtain a value of viable cells per ml of 10^7 . This suspension was inoculated on soybean seeds provided by the seedbed Associates Don Mario to perform the assay of infectivity Test Burton, taking as positive those plants having 3 or more of a node, located within an imaginary cylinder of diameter 2.5 cm, with central axis in the main root. In order to facilitate recognition, it is recommended to cut the roots length 2.5 cm neck. Of the four formulated evaluated, formulated in April showed the highest resistance to stress by drying with no difference between 3 times post packaging evaluated after 52 days of exposure of formulated to drought, presented an account of the order of 10^3 CFU / ml . The new formulations of inoculants for soybean increase desiccation tolerance of rhizobia and do not affect the ability of the same symbiotic against the legume.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas a los que se enfrenta la industria agrícola es la de mantener un carácter sustentable, además de ser respetuosa con el medio ambiente y garantizar una producción de alimentos para todos los habitantes del planeta. Según, recientes reportes de la Food and Agricultural Organization (FAO), para 2050 se espera que la población mundial sea de 9,1 mil millones de habitantes y que durante estos años la producción de la agricultura necesitará un crecimiento del 70% en relación al valor actual (Vieira *et al.*, 2010). Si consideramos que hay evidencias que señalan que cambios en las condiciones climáticas pueden afectar la productividad de los cultivos y la actividad de los microorganismos en el suelo (French *et al.*, 2009), se podría anticipar que la agro economía estará severamente afectada. Por ello, la inversión en la agricultura es fundamental y el progreso científico y tecnológico debe contribuir al aumento en la productividad económica y ser de beneficio social.

De particular importancia para la agroecología y la economía han sido los estudios realizados sobre microorganismos del suelo con efectos benéficos sobre las plantas y en particular sobre el grupo denominado *rizobio*, que pueden fijar nitrógeno biológicamente al asociarse simbióticamente con las leguminosas. En el suelo y en la rizosfera, los rizobios están sujetos a diversas fluctuaciones ambientales como por ejemplo variaciones de temperatura, de disponibilidad de agua y nutrientes, de liberación de exudados por parte de la planta, entre otros. Igualmente, la desecación es particularmente importante cuando los rizobios son empleados como inoculantes debido a que se afecta su viabilidad cuando son almacenados y utilizados para obtener las semillas pre inoculadas (Reina-Bueno *et al.*, 2012). Por lo tanto, además de la eficiencia simbiótica, una mayor supervivencia de rizobios en condiciones adversas puede constituirse en un rasgo importante en las formulaciones microbianas. Aunque la supervivencia y el almacenamiento de semillas inoculadas ha sido el foco del estudio de la desecación, relativamente pocos trabajos se han centrado sobre la respuesta fisiológica a la desecación, posiblemente por su complejidad (Catroux *et al.*, 2001; Deaker *et al.*, 2011).

En 1932, Fred *et al.*, reportaron pérdida de viabilidad en rizobios usados como inoculantes y sugirieron que factores como el pH, la temperatura y la naturaleza del medio de crecimiento, son importantes en la supervivencia del inóculo, recomendando a los agricultores que evitaran usar los rizobios en forma seca. Vincent *et al.* (1961) mostraron que la disminución de *Rhizobium trifolli* durante el secado sobre esferas de vidrio se correlaciona con la extracción de agua. Desde esas tempranas observaciones a la fecha, el progreso en el conocimiento de la supervivencia en condiciones de desecación de rizobios ha sido exiguo y

orientado principalmente a la selección de cepas que puedan tolerar la desecación. Potts *et al.* (2005) indicaron diferentes enfoques que podrían aplicarse para tratar de acrecentar la tolerancia a la desecación y que consisten en la selección del microorganismo después de varias exposiciones al estrés, acumulación intracelular y uso extracelular de agentes protectivos, y la manipulación del metabolismo y la fisiología de la célula previa a la exposición del estrés. En la práctica, casi todos estos enfoques son necesarios de manejar en forma conjunta no solamente para evitar la pérdida de la viabilidad, sino para lograr una elevada tasa de recuperación de células sin la merma de sus funciones en un ambiente en particular (Potts *et al.*, 2005). En coordinación con lo anterior debemos señalar que los datos a la fecha se refieren sobre desecación tienen un carácter sesgado al contemplar solamente condiciones extremas de estudio, sin tener en cuenta la fases de crecimiento sobre la que se aplica el estrés, el efecto de gradientes y la combinación de diferentes tipos de estreses (tolerancia cruzada), que se asocian a la desecación como lo es por ejemplo el estrés térmico (Gash, 2002).

Bacterias residentes en la rizosfera asiduamente se encuentran frente a la desecación y requieren de estrategias para persistir durante el período que el estrés es impuesto. Los efectos negativos sobre la célula son amplios e incluyen la desnaturalización de proteínas, la degradación del ADN y la pérdida de identidad de la membrana (Billy y Potts, 2002). Por lo tanto no resulta extraño pensar que los mecanismos que se requieren para tolerar la desecación sean complejos con participación de múltiples genes (Humann *et al.*, 2009). Asociado a la desecación se han reportado cambios metabólicos como una disminución del crecimiento, acumulación de ciertos metabolitos, variaciones de volumen celular, entre otros (Potts, 1994). Este estrés no solamente ocurre en el suelo, sino que puede manifestarse durante la conservación del inoculante así como durante el proceso simbiótico y de fijación de nitrógeno. Vriezen *et al.* (2012) resumen un listado de factores que colaboran con la desecación, la muerte celular y la condición de bacteria viable no cultivable (VBNC) en *Sinorhizobium meliloti*, destacando la importancia de conocer el estado y destino de la población de rizobios que acompaña a la semilla y que requieren una etapa de secado en la formulación microbiana.

Una estrategia de las empresas para afrontar los problemas de desecación es producir un inoculante donde el microorganismo a aplicar está acompañado por diversas moléculas con la finalidad de potenciar su tolerancia a factores estresantes, fundamentalmente a la desecación. Esto ha generado que diferentes artistas de la ciencia deban trabajar en forma conjunta para estudiar la tolerancia a desecación con un enfoque multidisciplinar. Si bien en el mercado podemos encontrar productos de diferentes empresas que promocionan tecnologías de protección para el microorganismo a comercializar, es necesario garantizar no

solamente la permanencia de la bacteria en el producto en la cantidad de rizobios exigibles por la legislación vigente (Resolución N° 0264/2011 del SENASA), sino también, si tiene aptitud para establecer una asociación simbiótica con la leguminosa que los puede hospedar (Peticari *et al.*, 2013).

Es por ello, que los estudios de viabilidad y de capacidad de cultivar a los rizobios en los formulados, deben ser acompañados con estudios de aptitud simbiótica. Una forma segura de verificar si los rizobios que contiene el inoculante son aptos para nodular a las especies vegetales indicadas en el marbete del producto, es mediante el desarrollo de un bioensayo de colonización y nodulación efectiva (Burton, 1979). La capacidad de formar nódulos por el microorganismo desde el inoculante no garantiza que esto pueda ocurrir en el campo. No obstante, es un requisito y un indicio de calidad mínima que debe tener un inoculante (Peticari *et al.*, 2013). Al mismo tiempo, la falta o escasa nodulación en condiciones de laboratorio debe ser considerada como un indicador de posible fracaso en las condiciones de campo (Thompson, 1980).

La empresa Rizobacter Argentina S.A., dentro de su marco de estrategia a 5 años, pretende desarrollar nuevas formulaciones microbianas con la adición de diferentes productos de origen biológico y químico para los nuevos inoculantes de soja. Estos necesitan ser caracterizados a fin de corroborar la tolerancia a desecación que el simbiote de soja posee con las nuevas formulaciones y demostrar que efecto puede tener sobre la aptitud simbiótica. Además, dentro de las acciones que la empresa intenta llevar a cabo se encuentra el estudio de la viabilidad de los productos formulados, con diferentes tiempos de envasado y también periodos de desecación.

HIPÓTESIS

Las nuevas formulaciones de inoculantes para soja aumentan la tolerancia a la desecación del rizobio y no afectan la aptitud simbiótica del mismo frente a la leguminosa.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto que tienen las nuevas formulaciones comerciales de inoculantes para soja sobre la tolerancia a desecación y la capacidad de establecer una simbiosis exitosa con esta leguminosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismo empleado

El microorganismo utilizado que formó parte de las cuatro formulaciones comerciales estudiadas, fue *Bradyrhizobium* sp. Las muestras de trabajo (envase plástico de 150 ml) fueron enviadas por el Mag. Montero (Rizobacter Argentina S.A), por Empresa Chevallier S.A., y recibidas en Río Cuarto en la UNRC.

Fecha de envío 22 de abril de 2014:

Formulado 1 con tiempos de 75, 150 y 400 días de envasado.

Formulado 2 con tiempos de 75, 150 y 540 días de envasado.

Formulado 3 con tiempos de 75, 150 y 600 días de envasado.

Fecha de envío 13 de mayo de 2014:

Formulado 4 con tiempos de 75, 150 y 400 días de envasado.

Los formulados fueron almacenados bajo condiciones ambientales. Para la separación de la bacteria del producto comercial, previamente el contenido del envase se agitó manualmente, se desinfectó superficialmente con alcohol 70 y se procedió a la extracción de una cantidad de 5 ml de formulado desde el envase mediante una jeringa estéril y en condiciones bajo campana de flujo laminar. Luego el líquido extraído se colocó en tubos eppendorff y se centrifugó por medio de agitación mecánica (tipo Vortex). Al mismo tiempo de la extracción de las bacterias del formulado, se realizaron las pruebas microbiológicas para descartar contaminación del producto comercial, colocando una alícuota del producto en medio TSA (agar tripticasa soja) para incubar las placas a 28°C en estufa durante 3 días y la visualización microscópica y de tinción de Gram. En los casos donde el producto presentó contaminación, se descartó el material y se procedió a realizar la extracción desde otro envase.



Figura 1. Envase con formulación comercial provista por la empresa.

2. Condiciones de cultivo y medio de conservación

La temperatura de incubación para la bacteria cultivada en medio líquido YEM, fue de 30°C y a una agitación de en equipo rotatorio de 150 rpm. En caso de realizar crecimiento en medio sólido, el medio YEM contó con la adición de 15 g/l de agar. La esterilización fue realizada en autoclave a 120 °C por 20 minutos.

La conservación de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante congelamiento de cultivos crecidos hasta fase exponencial tardía en tubos de conservación con la adición de glicerol estéril a concentración final de 20 % y almacenados a -20 °C y -80 °C.

3. Medios utilizados

3.1. Medio agua-agar 1,2%

Agar	12 g
Agua	1,0 l

3.2. Medio TSA (tripteina soya agar)

Tripteina	15,0 g
Peptona de soya	15,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 l

Ajuste de pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

3.3. Medio YEM

Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	1,0g
Fósforo bipotasico	0,5 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Cloruro de sodio	0,1 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 l

4. Estudio del crecimiento bacteriano

A partir de un cultivo inicial de la bacteria en medio YEM (D.O.600 nm entre 0,8 y 1) se inculó un erlenmeyer con 20 ml del mismo medio de cultivo (D.O.600 nm cercana a 0,01-0,02) y se determinó la variación de la D.O.600 nm a lo largo del tiempo. Los erlenmeyers fueron incubados a 30°C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Paralelamente se realizó un recuento de células viables determinada como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en distintos puntos de la curva, para establecer una correcta relación entre turbidez (D.O.) y viabilidad celular. Todos los ensayos se realizaron tres veces en forma independiente.



Figura 2. Espectrofotómetro utilizado para determinar crecimiento bacteriano por turbidez.

5. Ensayo de desecación

Para la realización del ensayo de desecación, se utilizaron las bacterias obtenidas de la alícuota de 5 ml (apartado 1 de Materiales y Métodos). Posterior a la obtención del volumen de trabajo, se procedió a obtener las células libres del formulado mediante la filtración sobre filtros de nitrato de celulosa (NC) de 0,22 μm en condiciones de esterilidad. Luego se incubaron los filtros en placa de medio YEM por 24 horas con el objetivo de recuperar las bacterias del estrés causado por el filtrado y separación.



Figura 3. Sistema de filtración en campana de esterilidad.

Una vez obtenidas las bacterias libres, se analizó sobre ellas su tolerancia a la desecación y la integridad celular. El ensayo de desecación consistió en someter a las bacterias presente en el soporte inerte de nitrato de celulosa (filtro) a condiciones de desecación, y observar su respuesta. El método se realizó cortando los filtros en dos partes, una mitad fue utilizada para observar la condición desecación y la otra parte para la condición control (figura 5). La condición de desecación se obtuvo colocando las bacterias sobre soporte inerte caja de Petri vacía solo con aire, incubada en estufa a 35% de valor de humedad y a 30°C, mientras que la condición control en presencia de agua se realizó colocando la mitad del filtro sobre soporte inerte caja de Petri en un medio agar-agua 1,2% en estufa a 75% de valor de humedad y 30°C. Estos valores se han seleccionado en base a lo indicado por el Ing. González Anta de Rizobacter Argentina S.A, porque son los valores de humedad que poseen los lugares de almacenamiento de semillas para su tratamiento. Estos dos tratamientos realizados a las bacterias (condición control y condición desecación), son incubados por 15, 30, 45 y 52 días en la estufa según el formulado analizado. A continuación, se detallan para cada formulado y tiempo post envasado, el periodo de incubación al que se sometieron:

- Formulado 1 con 75 y 150 días post envasado fueron incubados 15 y 30 días en estufa.
- Formulado 1 con 400 días post envasado fue incubado 10, 30 y 52 días en estufa.
- Formulado 2 con 75 y 150 días post envasado fueron incubados 15 y 45 días en estufa.
- Formulado 2 con 540 días post envasado fue incubado 15, 30 y 45 días en estufa.

- Formulado 3 con 75, 150 y 600 días post envasado fueron incubados 15, 30 y 45 días en estufa.
- Formulado 4 con 75 días post envasado fue incubado 15, 30, 45 y 65 días en estufa.
- Formulado 4 con 150 y 400 días post envasado fueron incubados 15, 30, 45, 52 y 65 días en estufa.

Cada formulado fue sometido a distintos periodo de incubación, de acuerdo a su evolución durante el transcurso del ensayo ya que, las bacterias que fueron sometidas a desecación se consideran viables para ser aplicadas sobre semillas hasta un recuento mínimo de 10^4 UFC/ml y por debajo de este valor, no se continuó con el ensayo por considerarse valores no aptos para los formulados comerciales (valores estipulados considerados por la empresa Rizobacter Argentina S.A.).

Posteriormente, las células de cada tiempo de incubación y tratamiento se separaron del filtro colocando el mismo en 5 ml de solución fisiológica (0,85% p/v de NaCl en agua destilada) en un tubo falcon y se centrifugó durante 5 min a 10000 rpm. Luego se realizaron las diluciones del líquido sobrenadante en tubos eppendorf con solución fisiológica, y se colocaron en placas YEMA y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias (UFC/ml). Después se procedió a realizar el recuento de bacterias viables de cada placa y condición y el análisis de los datos (Figuras 4 y 5).

También, las bacterias fueron estudiadas desde el punto de vista de la microscopía (determinar forma y tamaño celular) e integridad celular. Los ensayos para cada formulado, tiempo y condición de desecación se realizaron por triplicado.

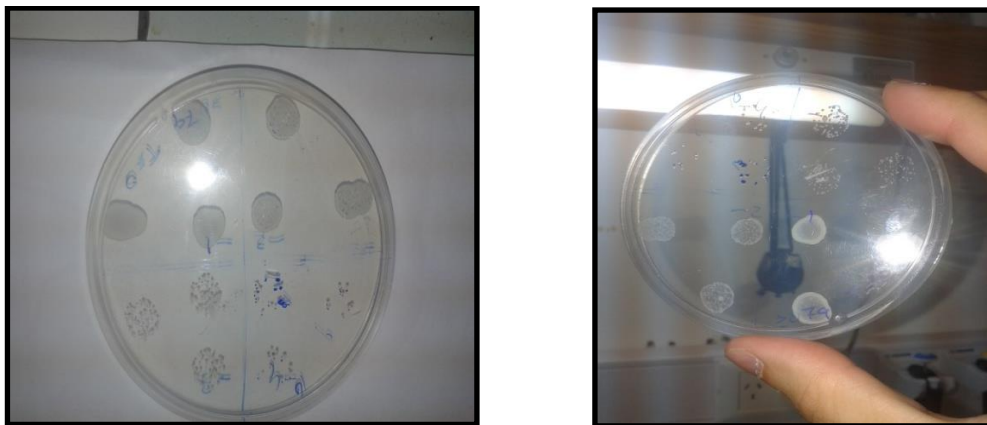
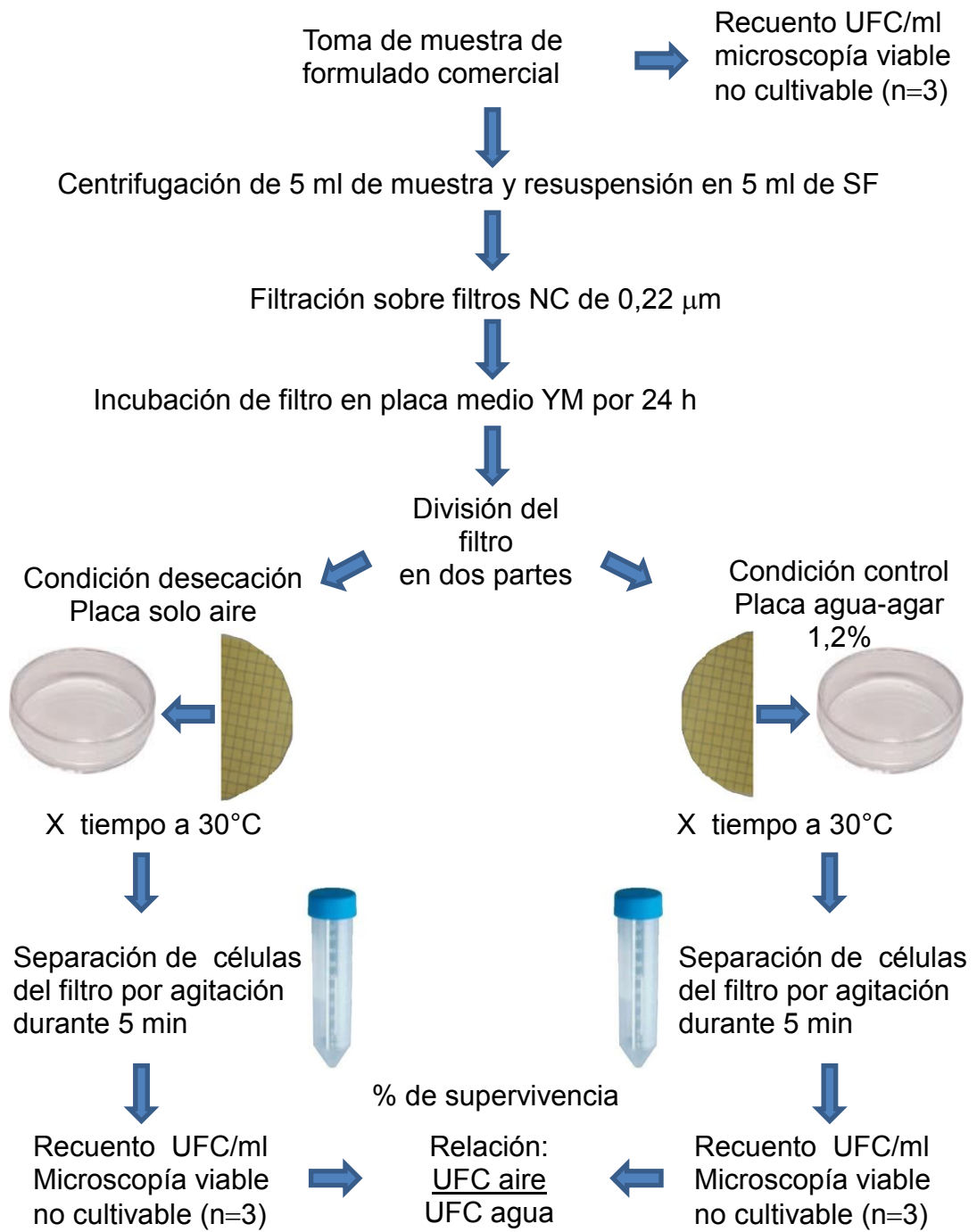


Figura 4. Placas de petri con recuento de células viables (UFC/ml).



SF: solución fisiológica, NC: nitrato de celulosa; YM: medio YEMA; UFC: unidades formadoras de colonia.

Figura 5. Procedimiento experimental para ensayo de desecación.

6. Integridad de la membrana celular

Esto fue verificado para el rizobio aislado de los filtros que toleren la desecación siguiendo las indicaciones del kit de viabilidad Live/Dead Bac Light (Molecular Probes, Invitrogen). El mismo contiene dos colorantes, Syto 9 y propidium iodide que tiñen el ADN y difieren en sus espectros y en su habilidad para penetrar en las células. Cuando se usa solo Syto 9, se marca toda la población de bacterias ya sea con membranas intactas o dañadas (tinción verde). En contraste, propidium iodide (PI) penetra solamente en bacterias que tiene las membranas dañadas causando la reducción del Syto 9 cuando ambos colorantes están presentes (tinción roja). Las células se visualizaron con ayuda de un microscopio de epifluorescencia Eplipse 50i (Nikon), recorriendo 20 campos por condición experimental (Basaglia y col. 2007).

7. Ensayo de aptitud simbiótica de rizobios sometidos a desecación

Los rizobios sometidos a desecación en soporte inerte, fueron resuspendidos en solución fisiológica para obtener un valor de células viables por ml de 10^7 . Esta suspensión fue inoculada sobre semillas de soja provistas por el semillero Asociados Don Mario (Chacabuco, provincia de Buenos Aires). Posteriormente, se realizó el ensayo de infectividad Test de Burton, según las especificaciones de SENASA (Resolución N° 0264/2011) y las recomendaciones de la Red Nacional de Control de Calidad de Inoculantes (Red CAI, División Agrícola y Ambiental de la Asociación Argentina de Microbiología, 2013).

Los tratamientos evaluados en el test de Burton fueron control sin inocular y el inoculado con células estresadas del formulado con y sin protector bacteriano. La dosis de inoculante empleada para las semillas fue de 150 ml y de protector bacteriano de 50 ml cada 50 kg de semilla. Estos últimos fueron provistos por Rizobacter Argentina S.A. Cada tratamiento consistió en 12 soportes de vermiculita con semillas de soja las cuales se dejaron crecer por un tiempo de 21 días, luego se cosecharon las plantas y se evaluó el número de nódulos de raíz principal y lateral según la normativa vigente. El siguiente cronograma detalla las fechas del ensayo de infectividad:

Fecha 28/11/14: Obtención de células del formulado y ensayo de desecación.

Fecha 29/11/14: Recuento de viables + Test de Burton con rizobios de Tiempo 0 días.

Fecha 11/12/14: Recuento de viables + Test de Burton con rizobios de Tiempo 45 días.

Fecha 29/12/14: Recuento de viables + Test de Burton con rizobios de Tiempo 62 días.

Fecha 5/1/15: Cosecha de plantas de Test de Burton tiempo 45 días.

Fecha 8/1/15: Recuento de viables + Test de Burton con rizobios de Tiempo 72 días.

Fecha 19/1/15: Cosecha de plantas de Test de Burton tiempo 62 días.

Fecha 1/2/15: Cosecha de plantas de Test de Burton tiempo 72 días.

Se tomaron como positivos aquellos tratamientos cuyas plantas de soja presentaron 3 o más de un nódulo, ubicados dentro de un cilindro imaginario con eje central en la raíz principal, un diámetro de 2,5 cm y una longitud de 2,5 cm. A fin de facilitar el reconocimiento, se recomendó cortar las raíces a la longitud de 2,5 cm del cuello. Los resultados se expresaron como porcentaje de plantas noduladas satisfactoriamente. Se consideró como satisfactorio aquel ensayo que cuente con un mínimo de 80% de plantas positivas (noduladas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cada formulado mostró un aspecto lechoso de color crema, con una gran turbidez lo que implicó que la obtención de células para realizar los estudios de desecación, se desarrollara lentamente en la campana de flujo laminar.

Dentro de los recuentos de rizobios, la mención a tiempo 0 se refiere al número de bacterias viables inicial que tenía el formulado a estudiar al momento de realizar el ensayo.

A continuación se presentan los resultados del ensayo de tolerancia a desecación de los 4 formulados.

1. Ensayo de tolerancia a desecación de formulados

1.a. Formulado 1

2.a.1. Tiempo 75 días post envasado:

El cuadro 1 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulado 1 con 75 días de post envasado. El recuento del formulado en el tiempo 0 fue de $6,5 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Cuadro 1. Recuento de células viables del formulado 1 tiempo 75 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	1,00E+10	10	1,00E+10	10
15	3,50E+09	9,54	0,00E+00	0
30	3,16E+09	9,49	0,00E+00	0

1.a.2. Tiempo 150 días post envasado:

El cuadro 2 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulado 1 con 150 días de post envasado. El recuento del formulado en el tiempo 0 fue de $6,5 \times 10^9$ UFC/ml.

Cuadro 2. Recuento de células viables del formulado 1 tiempo 150 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	4,70E+09	9,67	4,70E+09	9,67
15	1,00E+10	10	9,00E+03	3,95
30	3,50E+09	9,54	0,00E+00	0

1.a.3. Tiempo 400 días post envasado:

El cuadro 3 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulado 1 con 400 días de post envasado. El recuento del formulado en el tiempo 0 fue de $5,5 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Cuadro 3. Recuento de células viables del formulado 1 tiempo 400 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	2,80E+09	9,45	2,80E+09	9,44
15	1,10E+10	10	1,00E+06	6
30	2,00E+09	9,30	1,00E+05	5
52	4,00E+08	8,60	1,25E+02	2,10

Como puede apreciarse, en este formulado 1 hay un marcado efecto de la desecación sobre la viabilidad de células a medida que transcurre el tiempo de incubación, en comparación con el recuento de bacterias que provienen del filtro embebido en un soporte sólido con disponibilidad de agua. Se observó un efecto del tiempo post envasado sobre la viabilidad de las bacterias sometidas a estrés, donde los mayores valores de viabilidad y cumpliendo con el límite establecido para el ensayo de 10^4 UFC/ml; se obtuvieron con células provenientes del envase de 400 días post envasado y sometidas a día 30 de desecación (cuadro 3).

Estos resultados se encuentran resumidos para su interpretación grafica en el anexo 1.

1.b. Formulador 2

1.b.1. Tiempo 75 días post envasado:

El cuadro 4 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulador 2 con 75 días de post envasado. El recuento del formulador en el tiempo 0 fue de $4,9 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Cuadro 4. Recuento de células viables del formulador 2 tiempo 75 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	1,00E+10	10	1,00E+10	10
15	4,15E+09	9,61	4,00E+04	4,60
45	5,15E+09	9,71	2,60E+02	2,41

2.b.2. Tiempo 150 días post envasado:

El cuadro 5 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulador 2 con 150 días de post envasado. El recuento del formulador en el tiempo 0 fue de $3,2 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Cuadro 5. Recuento de células viables del formulador 2 tiempo 150 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	2,85E+10	10,45	2,85E+10	10,45
15	1,08E+10	10,04	5,00E+06	6,70
45	1,30E+10	10,11	2,80E+03	3,45

1.b.3. Tiempo 540 días post envasado:

El cuadro 6 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulador 2 con 540 días de post envasado. El recuento del formulador en el tiempo 0 fue de $5,25 \times 10^9$ UFC/ml.

Cuadro 6. Recuento de células viables del formulado 2 tiempo 540 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	7,50E+09	9,87	7,50E+09	9,87
15	5,65E+09	9,75	3,00E+06	6,48
30	6,70E+09	9,82	4,50E+05	5,65
45	8,50E+08	8,93	9,00E+02	2,95

Como puede apreciarse, en este formulado no se observó efecto del tiempo post envasado sobre la viabilidad de las bacterias en condición de estrés por desecación, observándose en todos los casos a los 45 días un recuento inferior a 10^4 UFC/ml, límite establecido para el ensayo (apartado 5, materiales y métodos). A su vez, los mayores valores de bacterias viables sometidas a estrés y cumpliendo con el límite establecido para el ensayo de 10^4 ; se obtuvieron con células provenientes de envase de 540 días post envasado y sometidas a 30 días de desecación (cuadro 6).

Estos resultados se encuentran resumidos para su interpretación gráfica en el anexo 2.

1.c.- Formulad 3

1.c.1. Tiempo 75 días post envasado:

El cuadro 7 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulad 3 con 75 días de post envasado. El recuento del formulad en el tiempo 0 fue de $2,25 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Cuadro 7. Recuento de células viables del formulad 3 tiempo 75 días post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	2,45E+10	10,39	2,45E+10	10,39
15	4,85E+10	10,68	3,55E+06	6,55
30	9,35E+08	8,97	3,35E+03	3,52
45	1,75E+09	9,24	9,00E+02	2,95

1.c.2. Tiempo 150 días post envasado:

El cuadro 8 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulad 3 con 150 días de post envasado. El recuento del formulad en el tiempo 0 fue de $2,8 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Cuadro 8. Recuento de células viables del formulad 3 tiempo 150 días post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	8,50E+09	9,92	8.50E+09	9,92
15	7,12E+09	9,85	5.25E+06	6,72
30	1,65E+10	10,21	Contaminación	
45	2,20E+10	10,34	7.30E+02	2,86

1.c.3. Tiempo 600 días post envasado:

El cuadro 9 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulado 3 con 600 días de post envasado. El recuento del formulado en el tiempo 0 fue de $5,25 \times 10^9$ UFC/ml.

Cuadro 9. Recuento de células viables del formulado 3 tiempo 600 días de post incubación en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	\log_{10} UFC/ml	UFC/ml	\log_{10} UFC/ml
0	3,00E+09	9,48	3,00E+09	9,48
15	3,90E+09	9,59	8,20E+06	6,91
30	9,75E+09	9,98	Contaminación	
45	Contaminación		Contaminación	

Como puede apreciarse, en este formulado no se pudo determinar el efecto del estrés a 600 días post envasado, debido a la contaminación que se presentó, lo cual impidió el correcto desarrollo del experimento (cuadro 9). Al igual que en el formulado 2, no se observaron diferencias entre las bacterias con 75 y 150 días post envasado, presentando a los 45 días de estrés por desecación, un recuento inferior de 10^4 UFC/ml, limite determinado para el ensayo de desecación (apartado 5, materiales y métodos).

Estos resultados se encuentran resumidos para su interpretación grafica en el anexo 3.

1.d. Formulador 4

1.d.1. Tiempo 75 días post envasado:

El cuadro 10 resume los valores de recuento de viables en las dos condiciones de estudio sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulador 4. El recuento del formulador fue de $5,25 \times 10^9$ UFC/ml.

Cuadro 10. Recuento de células viables del formulador 4 tiempo 75 días de post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	2,45E+10	10,39	2,45E+10	10,39
15	1,25E+10	10,01	2,75E+07	7,44
30	3,30E+10	10,52	3,40E+06	6,53
45	4,20E+09	9,62	8,00E+04	4,90
65	7,80E+09	9,89	4,55E+03	3,66

1.d.2. Tiempo 150 días post envasado:

El cuadro 11 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulador 4 con 150 días de post envasado. El recuento del formulador en el tiempo 0 fue de $2,5 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Cuadro 11. Recuento de células viables del formulador 4 tiempo 150 días de post envasado de en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml	UFC/ml	log ₁₀ UFC/ml
0	2,15E+10	10,33	2,15E+10	10,33
15	2,30E+10	10,36	5,90E+06	6,77
30	7,15E+09	9,85	Contaminación	
45	2,35E+10	10,37	Contaminación	
52	5,15E+09	9,71	6,45E+03	3,81
65	5,80E+09	9,76	1,00E+03	3

1.d.3. Tiempo 400 días post envasado:

El cuadro 12 resume los valores de recuento de viables sobre filtros incubados en presencia o ausencia de desecación del formulado 4 con 400 días de post envasado. El recuento del formulado en el tiempo 0 fue de $7,65 \times 10^9$ UFC/ml.

Cuadro 12. Recuento de células viables del formulado 4 tiempo 400 días post envasado en condición control (condición agua) y bajo estrés (condición desecación).

Días de incubación	Condición agua		Condición desecación	
	UFC/ml	\log_{10} UFC/ml	UFC/ml	\log_{10} UFC/ml
0	5,85E+09	9,77	5,85E+09	9,77
15	9,80E+09	9,99	3,45E+06	6,54
30	5,80E+09	9,76	3,15E+06	6,49
45	5,90E+09	9,77	3,89E+04	4,59
52	3,30E+09	9,52	2,20E+03	3,34
65	5,58E+09	9,75	3,65E+03	3,56

El formulado 4 presento la mayor tolerancia a desecación, debido a la obtención de valores superiores a 10^4 de células viables (limite considerado para ensayo de desecación), hasta 45 días de incubación; independientemente del tiempo post envasado. En comparación con los otros productos comerciales estudiados, la composición del formulado 4, en base a los resultados obtenidos, permitiría mejorar la tolerancia a desecación.

Estos resultados se encuentran resumidos para su interpretación grafica en el anexo 4.

2. Integridad celular de bacterias del formulado 4

En base a los resultados obtenidos, las células que se utilizaron en el ensayo de integridad celular, fueron las del formulado 4 de 75 días de post envasado, por ser el tiempo que permitido mayores recuentos de células viables a 15, 30 y 45 días de desecación en comparación a los otros tiempos de post envasado. Además el tiempo empleado para la filtración utilizando muestra con 75 días post envasado, era menor a diferencia de los otros formulados con diferente tiempo de envasado. Todas las muestras presentaron células viables no cultivables, cuyo número aumentó a medida que aumentaron los días de envasado. Estos datos han sido registrados para la empresa Rizobacter Argentina S.A.

3. Desección y ensayo de Test Burton del formulado 4 de 75 días de post envasado

Los resultados de viabilidad celular y tolerancia a desecación (cuadro 10) e integridad celular del formulado 4 en comparación con los resultados de los otros formulados, indican que la composición del mismo tiene un efecto de protección mayor que el resto de la composición de los demás formulados. En base a ello, el estudio de infectividad se realizó empleando rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado, previamente desecados e incubados por tiempo 0, 45, 62 y 72 días de incubación.

3.a. Ensayo de Test de Burton de formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación

De acuerdo al cronograma detallado en materiales y métodos (apartado 6), se procedió a la cosecha de plantas. Las mismas presentaban un tamaño uniforme en su tallo y raíz (figura 6). Los resultados del recuento y ubicación de nódulos de rizobios inoculados sin protector bacteriano se resumen en el cuadro 13 y 14.

A



B



Figura 6. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B). La flecha blanca señala los nódulos. En todos los ensayos las plantas controles sin inocular, no presentaron formación de nódulos.

Cuadro 13. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Parámetros nódulos Tratamiento	N° NRP	N° NRL	N° NT	Porcentaje de nodulación
1 Formulado 4	4,40	7,50	11,90	100,0
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 14. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	10	7	2	14	No	16
2	13	12	10	8	No	18
3	13,5	14	0	8	No	8
4	11	8	10	7	RL	17
5	14	11	5	1	RL	6
6	11	5	2	6	RL	8
7	17	13	3	2	No	5
8	13	10	7	4	No	11
9	13,5	12	5	7	No	12
10	20	15	3	5	RL	8
11	13	7	4	9	No	13
12	12	5	2	19	RL	21

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT: número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Como puede observarse en los cuadros 13 y 14, el tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación sin el protector bacteriano **SI cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). Con este ensayo demostramos la capacidad infectiva de los rizobios aislados del formulado 4 de 75 días de post envasado y desecados por 0 día. Cuando el ensayo se realizó con rizobios y la adición de un protector bacteriano, se obtuvieron los siguientes resultados resumidos en la figura 7 y los cuadros 15 y 16.



Figura 7. Plantas de soja inoculadas con formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación con la adición de un protector bacteriano. La flecha blanca señala los nódulos.

Cuadro 15. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 días de desecación con la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Parámetros nódulos Tratamiento	N° NRP	N° NRS	N° NT	Porcentaje de nodulación
1 Formulado 4 + protector bacteriano	7,08	5,25	12,33	100,0
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRS: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 16. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado de tiempo 0 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	10	5	3	0	RL	3
2	13	12	9	2	RP	11
3	11	5	2	4	RL	6
4	13	8	12	5	No	17
5	11	10	5	0	RL/RP	5
6	11	13	6	9	No	15
7	11	12	10	6	No	16
8	11	13	13	5	No	18
9	10	13	4	13	RL	17
10	10	10	11	6	RL	17
11	11	5	4	10	No	14
12	13	3	6	3	No	9

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Como puede observarse en los cuadros 15 y 16, el tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 0 día de desecación con la adición del protector bacteriano **SI cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). Con este ensayo demostramos la capacidad infectiva de los rizobios aislados del formulado con 0 día de desecación y que el protector bacteriano no afecta la capacidad infectiva del rizobio. Es de destacar que si bien el número total de nódulos es similar tanto en ausencia como en presencia del protector bacteriano, las raíces principales poseen un número de nódulos mayor cuando el protector se adicionó.

3.b. Ensayo de Test de Burton de formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación

De acuerdo al cronograma detallado en materiales y métodos (apartado 6), se procedió a la cosecha de plantas. Las mismas presentaban un tamaño uniforme en su tallo y raíz (figura 8). Los resultados del recuento y ubicación de nódulos de rizobios inoculados sin protector bacteriano se resumen en los cuadros 17 y 18.

A



B

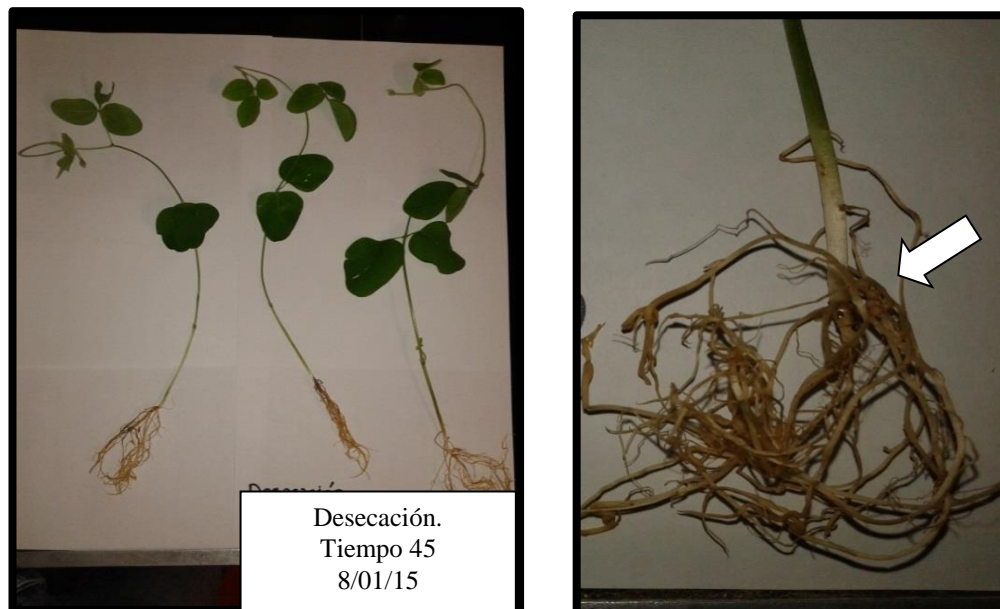


Figura 8. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B). La flecha blanca señala los nódulos.

Cuadro 17. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Parámetros nódulos Tratamiento	N° NRP	N° NRS	N° NT	Porcentaje de nodulación
1 Formulado 4	0,50	3,42	3,92	66,7
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRS: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 18: Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	40	11	0	5	No	5
2	44	11	0	7	No	7
3	37	10	0	2	No	2
4	39	8	0	1	No	1
5	30	7	0	0	RL	3
6	50	13	1	7	No	8
7	37	8	0	2	No	2
8	46	10	0	0	No	
9	30	10	4	0	No	4
10	50	9	0	3	No	3
11	47	9	0	11	No	11
12	30	8	1	3	No	4

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Como puede observarse en los cuadros 17 y 18, el tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin protector bacteriano **NO cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). Con este ensayo si bien demostramos que existe capacidad infectiva de los rizobios aislados del formulado 4 sometidos 45 días a desecación, estos no responden de acuerdo a lo estipulado por SENASA porque su grado de infectividad no es suficiente para ser considerado positivo. Cuando el ensayo se realizó con rizobios y la adición del protector bacteriano se obtuvieron los resultados resumidos en la figura 9 y los cuadros 19 y 20.



Figura 9. Plantas de soja inoculadas con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y tiempo 45 días de desecación con la adición de un protector bacteriano. La flecha blanca señala los nódulos.

Cuadro 19. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación con la adición de un protector bacteriano, según lo estipulado en indicaciones de test de Burton.

Parámetros nódulos	N° NRP	N° NRS	N° NT	Porcentaje de nodulación
Tratamiento				
1 Formulado 4 + protector bacteriano	1,08	4,42	5,50	92,0
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRS: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 20. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y 45 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	47	14	1	3	No	4
2	42	9	2	4	No	6
3	25	4	2	6	No	8
4	40	10	1	2	No	3
5	39	8	0	6	No	6
6	48	9	0	4	No	4
7	38	9	1	3	No	4
8	41	11	1	0	No	1
9	42	10	0	15	No	15
10	33	9	1	4	No	5
11	24	8	2	2	No	4
12	30	7	2	4	No	6

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Como puede observarse en los cuadros 19 y 20, el tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación con la adición del protector bacteriano **SI cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). Con este ensayo si bien demostramos que existe capacidad infectiva de los rizobios aislados del formulado 4 de 45 días sometidos a desecación, el resultado positivo para Test de Burton se logra cuando el protector bacteriano acompaña a los rizobios.

3.c. Ensayo de Test Burton de formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 62 días de desecación

De acuerdo al cronograma detallado en materiales y métodos (apartado 6), se procedió a la cosecha de plantas. Las mismas presentaban un tamaño uniforme en su tallo y raíz (figura 10). Los resultados del recuento y ubicación de nódulos de rizobios inoculados sin protector bacteriano se resumen en los cuadros 21 y 22.



Figura 10. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 62 días de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B). Ausencia de nódulos en la mayoría de las plantas.

Cuadro 21. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 62 días de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Parámetros nódulos Tratamiento	N° NRP	N° NRS	N° NT	Porcentaje de nodulación
1 Formulado 4	0,00	0,58	0,58	8,3
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRS: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 22. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	28	10	0	0	No	0
2	33	10	0	0	No	0
3	29	8	0	0	No	0
4	33	10	0	0	No	0
5	33	11	0	0	No	0
6	28	13	0	0	No	0
7	33	11	0	0	No	0
8	32	9	0	0	No	0
9	24	7	0	1	No	1
10	30	11	0	5	No	5
11	28	11	0	1	No	1
12	28	11	0	0	No	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Los cuadros 21 y 22 muestran los datos del tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 62 días de desecación sin la adición del protector bacteriano **NO cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). La mayor parte de las raíces de soja no presentaban nodulación. Cuando el ensayo se realizó con rizobios y la adición del protector bacteriano se obtuvieron los siguientes resultados resumidos en la figura 11 y los cuadros 23 y 24.

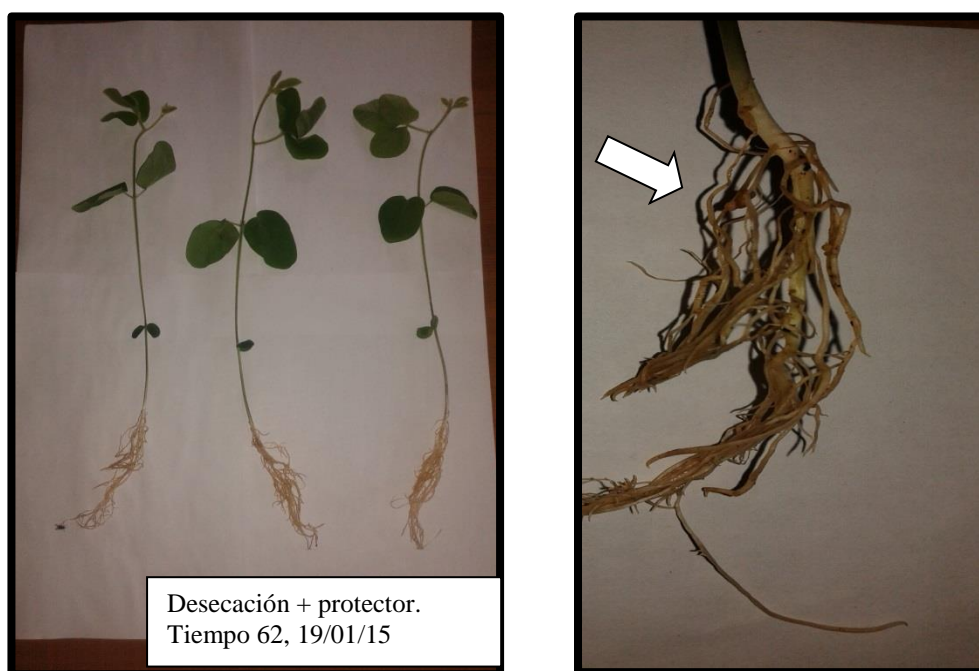


Figura 11. Plantas de soja inoculadas con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y tiempo 62 días de desecación con la adición de un protector bacteriano. La flecha blanca señala los nódulos.

Cuadro 23. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 62 días de desecación con la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Parámetros nódulos	N° NRP	N° NRS	N° NT	Porcentaje de nodulación
1 Formulado 4 + protector bacteriano	0,00	1,00	1,00	25,0
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRS: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 24. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	28	13	0	4	No	4
2	28	9	0	0	No	0
3	34	11	0	3	No	3
4	27	8	0	0	No	0
5	34	9	0	1	No	1
6	26	10	0	0	No	0
7	26	10	0	0	No	0
8	29	13	0	0	No	0
9	29	9	0	0	No	0
10	27	10	0	0	No	0
11	31	9	0	3	No	3
12	30	8	0	1	No	1

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Los cuadros 23 y 24 muestran los datos del tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 62 días de desecación con la adición del protector bacteriano **NO cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). Pero a diferencia del tratamiento sin la adición de protector bacteriano, aquí el número de plantas noduladas fue dos veces mayor.

4.d. Ensayo de Test Burton de formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación

De acuerdo al cronograma detallado en materiales y métodos (apartado 6), se procedió a la cosecha de plantas. Las mismas presentaban un tamaño uniforme en su tallo y raíz (figura 12). Los resultados del recuento y ubicación de nódulos de rizobios inoculados sin protector se resumen en los cuadros 25 y 26.

A



B



Figura 12. Plantas de soja testigo control sin inocular (panel A), y plantas inoculadas con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación sin la adición del protector bacteriano (panel B).

Cuadro 25. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 72 días de desecación sin la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Parámetros nódulos Tratamiento	N° NRP	N° NRS	N° NT	Porcentaje de nodulación
1 Formulado 4	0,00	0,00	0,00	0
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRS: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 26. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación sin la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	25	11	0	0	No	0
2	20	10	0	0	No	0
3	21	11	0	0	No	0
4	21	10	0	0	No	0
5	27	12	0	0	No	0
6	27	9	0	0	No	0
7	22	10	0	0	No	0
8	19	6	0	0	No	0
9	18	9	0	0	No	0
10	23	7	0	0	No	0
11	27	10	0	0	No	0
12	25	13	0	0	No	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Los cuadros 25 y 26 muestran los datos del tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación sin la adición del protector bacteriano que **NO cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA), registrándose ausencia total de nódulos. Cuando el ensayo se realizó con rizobios y la

adición del protector bacteriano se obtuvieron los siguientes resultados resumidos en la figura 13 y los cuadros 27 y 28.

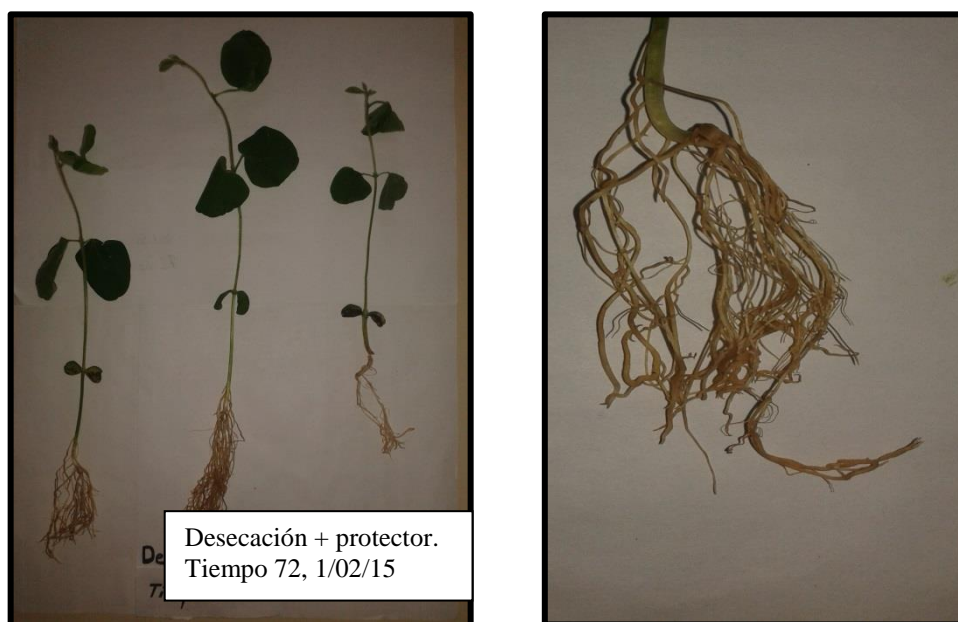


Figura 13. Planta de soja inoculadas con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 de post envasado y tiempo 72 días de desecación con la adición de un protector bacteriano.

Cuadro 27. Resumen del promedio de número de nódulos obtenidos para el formulado 4 de 75 días post envasado y tiempo 72 días de desecación con la adición del protector bacteriano, según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Parámetros nódulos	N° NRP	N° NRS	N° NT	Porcentaje de nodulación
1 Formulado 4 + protector bacteriano	0,00	0,00	1,00	0
2 Testigo no inoculado	0	0	0	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRS: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Cuadro 28. Valores de crecimiento vegetal y ubicación del número de nódulos de las 12 plantas inoculadas con el formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación con la adición del protector bacteriano. Número de nódulos obtenidos según lo estipulado por SENASA para Test de Burton.

Plantas	Largo tallo (cm)	Largo Raíz (cm)	N° NRP	N° NRL	Nódulo fuera de cilindro	N° NT
1	17	9	0	0	No	0
2	20	8	0	0	No	0
3	22	10	0	0	No	0
4	23	6	0	0	No	0
5	17	9	0	0	No	0
6	23	10	0	0	No	0
7	24	10	0	0	No	0
8	20	7	0	0	No	0
9	20	5	0	0	No	0
10	25	9	0	0	No	0
11	21	10	0	0	No	0
12	26	11	0	0	No	0

N° NRP: número de nódulos en raíz principal; N° NRL: número de nódulos en raíz lateral y N° NT número de nódulos totales. Se indica un número fraccionado no entero según promedio.

Los cuadros 27 y 28 muestran los datos del tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de 75 días de post envasado y tiempo 72 días de desecación con la adición del protector bacteriano que **NO cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA).

Los rizobios son utilizados por su capacidad de formar nódulos y fijar nitrógeno biológicamente en forma simbiótica con diferentes leguminosas. En este caso el proceso de comunicación de rizobios con raíces de soja es específico y conduce a la formación de un nuevo órgano en la planta denominado nódulo cuyo desarrollo le da la característica de crecimiento determinado. Por este motivo todos los inoculantes a ser aplicados sobre leguminosas deben demostrar, que no solamente cuentan con el número de bacterias viables exigibles por la legislación y su pureza (SENASA), sino también su capacidad infectiva o aptitud simbiótica.

Aquí primeramente hemos demostrado la capacidad de supervivencia del rizobio simbiote de soja usado comercialmente por la empresa Rizobacter Argentina S.A., el cuál ha sido envasado y almacenado por diferentes tiempos y con diversos desarrollo de formulados.

De todos los formulados el 4 ha sido el que ha mostrado a la hora de someter los rizobios a desecación, los mayores resultados de viabilidad por presentar un número superior a 10^4 de células viables (límite considerado para ensayo de desecación), en comparación con los otros formulados. También dentro de los tiempos de envasado del formulado 4, el tiempo 75 días post envasado permitió obtener mayores recuentos de células viables que el resto de los tiempos.

Cuando se analizó la aptitud simbiótica del formulado 4 tiempo 75 días de post envasado, se observó que la presencia de un protector bacteriano comercial ayuda a que los rizobios desecados de hasta 45 días de desecación tengan aptitud simbiótica positiva para Test de Burton.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis de grado permiten concluir lo siguiente:

- Una nueva formulación de inoculante para soja, formulado 4, tiende a aumentar la tolerancia a la desecación del rizobio.
- El formulado 4 presentó la mayor tolerancia a la desecación, debido a la obtención de valores superiores a 10^4 de células viables sometidos hasta 45 días de desecación; independiente del tiempo de envasado.
- El tratamiento inoculado con rizobios del formulado 4 de tiempo 75 días de post envasado y tiempo 45 días de desecación sin protector bacteriano **NO cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). Con este ensayo si bien demostramos que existe capacidad infectiva de los rizobios aislados del formulado 4 sometidos 45 días a desecación, estos no responden de acuerdo a lo estipulado por SENASA porque su grado de infectividad no es suficiente para ser considerado positivo. Cuando el ensayo se realizó con rizobios y la adición del protector bacteriano se observó que **SI cumple** con el 80% de plantas noduladas (SENASA). Con este ensayo si bien demostramos que existe capacidad infectiva de los rizobios aislados del formulado 4 de 45 días sometidos a desecación, el resultado positivo para Test de Burton se logra cuando el protector bacteriano acompaña a los rizobios.
- El formulado y el protector bacteriano no interfieren con el proceso de interacción.
- Considerar la importancia del protector bacteriano sobre la viabilidad de las bacterias y la capacidad infectiva de las mismas.
- El formulado 4 tiempo 75 días de post envasado, expuesto a más de 45 días a desecación no muestra capacidad infectiva.
- La importancia de obtener formulados comerciales con tolerancia a la desecación y sin afectar la aptitud simbiótica, ha sido demostrado.

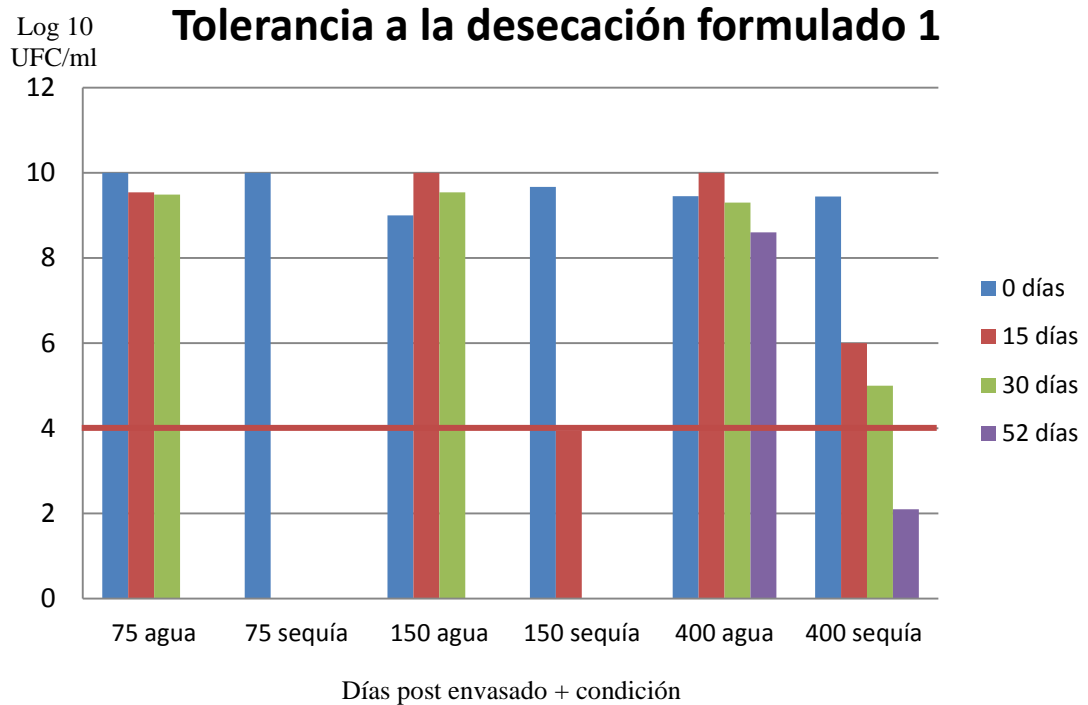
BIBLIOGRAFÍA CITADA

- .- BASAGLIA, M., S. POVOLO y S. CASELLA. 2007. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Rhizobium leguminosarum* Bacteria and Discrimination between Different Biovars in Zinc-Contaminated Soil. *Curr Microbiol.* 54:167-174.
- .- BILLI, D. y M. POTTS. 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* 153:7-12.
- .- BURTON, J.C. 1979. Recent Advances in Biological nitrogen fixation. Ed. Oxford & IBH, New Delhi, India. 308-405 p.
- .- CATROUX, G., A. HARTMANN y C. REVELLIN. 2001. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobium on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *Plant Soil.* 230:21-30.
- .- DEARKER, R., R.J. ROUGHLEY y I.R. KENNEDY. 2004. Legume seed inoculation technology. *Soil Biol Biochem.* 36:1275-1288.
- .- FRENCH, S., D. LEVY-BOOTH, A. SAMARAJEEWA, y col. 2009. Soil Health Indicators Under Climate Change. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:1887-1900.
- .- GASH, A. 2002. The environmental stress response. *Molecular Ecology.* 23: 5886-98.
- .- HUMANN, J., H. ZIEMKIEWICZ y S. YURGEL. 2009. Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *Appl Environ Microbiol* 75:446-453.
- .- PERTICARI, A., S. BENINTENDE, S. TORESANI y col. 2013. *Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes.* Ed. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. 61-70 p.
- .- POTTS, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* 58:755-805.
- .- POTTS, M., S. LAUGHTER , F. HUNNEKE, y col. 2005. Desiccation Tolerance of Prokaryotes: Application of Principles to Human Cells. *Integr Comp Biol.* 45:800-809.
- .- REINA-BUENO, M., M. ARGANDOÑA y J. NIETO. 2012. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiol.* 12:207:1-17.
- .- SENASA. 2011. Resolución N° 0264/2011.
- .- THOMPSON, A.J. 1984. *Production and Quality Control of Carrier-based Legume Inoculants.* Technical Report. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- .- VIEIRA, R.F, I. MENDES, F. REIS-JUNIOR y col. 2010. *Symbiotic nitrogen fixation in tropical food grain legumes: current status.* Ed. Springer; NY; EE.UU, 427-472 p.

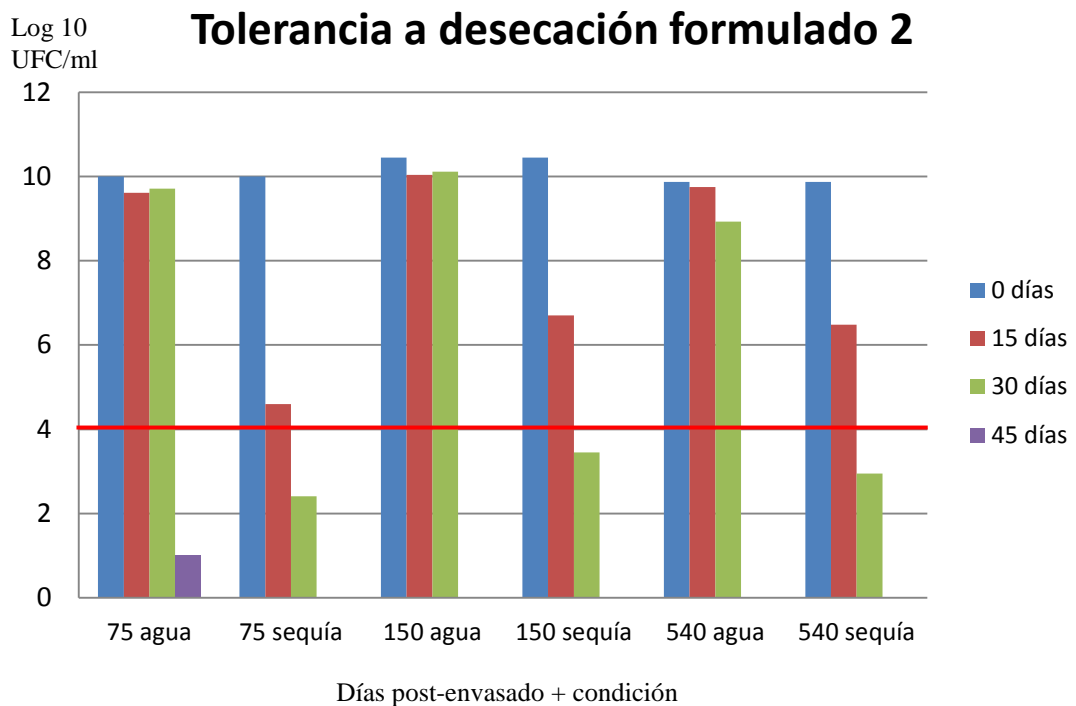
.- VINCENT, J., J. THOMPSON y K. DONOVAN. 1961. Biological Nitrogen Fixation: Ecology, Technology and Physiology. *Aust J Agric Res.* 13:258-270.

ANEXOS

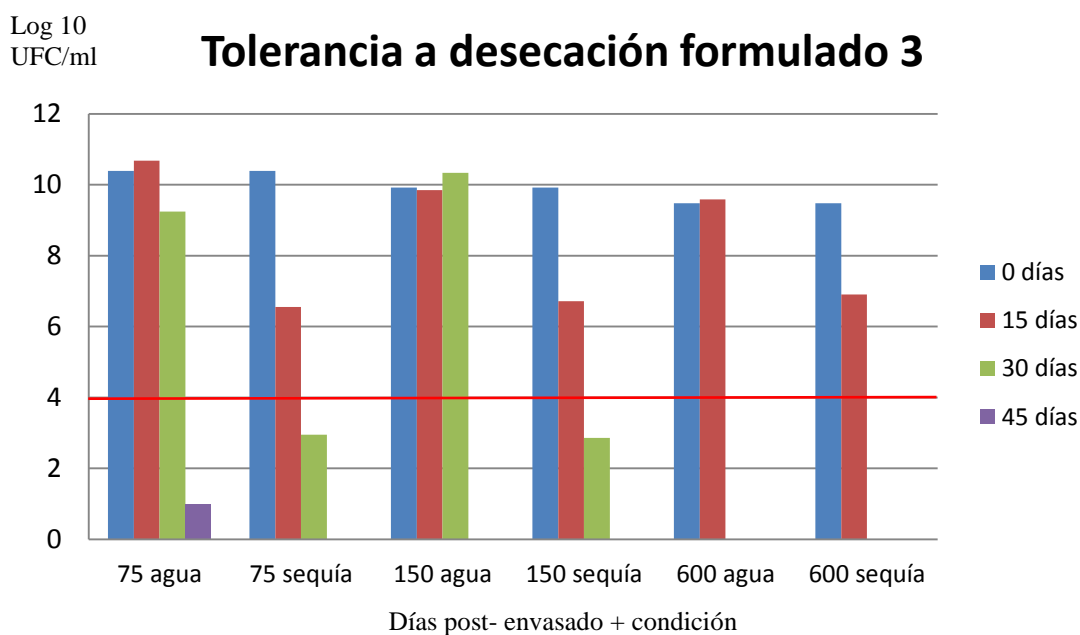
Anexo 1. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 1, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 52 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml)



Anexo 2. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 2, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 45 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml).



Anexo 3. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 3, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 45 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml).



Anexo 4. Gráfico de tolerancia a desecación de rizobios que provienen de diferentes días de post envasado del formulado 3, en diferentes condiciones de agua e incubados hasta 65 días. La línea roja indica el valor óptimo deseado para utilizar sobre semillas (10^4 UFC/ml).

