

Producción de un inoculante líquido de *Bradyrhizobium japonicum* con alto impacto en la siembra mecanizada de la soya en Cuba

✉ Carmen Menéndez¹, Luis E Trujillo¹, Ricardo Ramírez¹, Dianevys González-Peña², Davel Espinosa³, Gil A Enriquez¹, Lázaro Hernández¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA
Carretera a Tapaste, Km 3½, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba

³ Unión Agropecuaria Militar Cubasoy
Carretera Venezuela, Km 12, Coralina, Ciego de Ávila, Cuba
✉ carmen.menendez@cigb.edu.cu

RESUMEN

La fijación simbiótica del nitrógeno es un proceso clave en la obtención de altos rendimientos en el cultivo de la soya (*Glycine max* L. Merrill) con protección del medio ambiente. Se describe una metodología para la producción masiva de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* de alta eficiencia simbiótica, en una zaranda orbital de plataformas múltiples, y el empleo del cultivo bacteriano como bioinoculante para variedades de soya bajo condiciones de siembra mecanizada en Cuba. La optimización del medio de crecimiento y el establecimiento de un sistema de inoculaciones seriadas y escaladas permitieron mantener el cultivo en continua fase logarítmica e incrementar su volumen 100 veces en 7 días. El cultivo final con viabilidad promedio de 5×10^{10} u.f.c./mL y alto contenido de exopolisacáridos no requiere aditivos y se mantiene estable en conservación a 4 °C durante al menos 8 meses. La aplicación del inoculante a las semillas fue a dosis equivalente de 150 mL/ha durante las campañas de 2010-2013 en la empresa Cubasoy, de la provincia Ciego de Ávila. Las plantas de campo inoculadas mostraron nodulación abundante en la zona del cuello de la raíz y mantuvieron un estado nutricional adecuado durante todo el ciclo vegetal. La bacteria reaislada de nódulos de raíces en plantaciones al azar mostró el mismo fenotipo de la cepa inoculada, lo que confirma la efectividad de la inoculación. El inoculante líquido obtenido es técnicamente compatible con el empleo de las máquinas sembradoras, favorece la supervivencia de la bacteria en el suelo y su simbiosis eficiente con la planta hospedera.

Palabras clave: *Bradyrhizobium japonicum*, soya, *Glycine max* L. Merrill, fijación de nitrógeno, inoculante

Biotecnología Aplicada 2014;31:111-115

ABSTRACT

Production of a liquid *Bradyrhizobium japonicum* inoculant with high impact on the mechanized sowing of soybean in Cuba. Symbiotic nitrogen fixation is critical for high soybean (*Glycine max* L. Merrill) yields with protection to the environment. This paper describes a procedure for massive production of *Bradyrhizobium japonicum* in an orbital multi-platform shaker and the use of the bacterial culture for seed inoculation in soybean areas under mechanized sowing. The *B. japonicum* strain was selected based on its highly efficient symbiotic interaction with major soybean varieties cropped in Cuba. Optimization of the growth medium and the use of serial and scaled inoculations allowed maintaining the cultures in continuous logarithmic phase while increasing its volume 100-fold in 7 days. The final culture having average cell viability of 5×10^{10} f.u.c./mL and high exopolysaccharides content does not require additives and can be stably stored for at least 8 months at 4 °C. Soybean seeds were sprayed with the inoculant at equivalent dose of 150 mL/ha and sowed mechanically in production fields of Ciego de Avila province during the campaigns 2010-2013. The plants showed abundant nodulation and a proper nutritional state during the whole cycle. The bacterium strain was reisolated from root nodules of inoculated plants and its identity was confirmed by phenotype characterization. The high-cell density liquid inoculant rich in polysaccharides produced in this work is compatible with mechanized seed sowing, favors the bacterium survival in soil, and promotes the establishment of an efficient symbiotic interaction with the host plant.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, *Glycine max* L. Merrill, nitrogen fixation, inoculant

Introducción

La soya (*Glycine max* L. Merrill) es una legumbre altamente nutritiva, cuyos granos contienen alrededor de 35 % de proteínas. Posee todos los aminoácidos esenciales menos la metionina, que se logra con la combinación de soya con cereales, como sugieren los procedimientos dietéticos clásicos [1]. El grano de soya se utiliza ampliamente como componente proteico en el pienso para alimentación animal. En los últimos años, la producción mundial de soya ha

superado las 250 millones de toneladas, repartidas principalmente entre Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India, Paraguay y Canadá [2]. La producción de soya en Cuba es una prioridad de la política económica actual de sustitución de importaciones de granos. Por lo que en los últimos cinco años ha habido un incremento notable de las áreas para la producción de soya y de la tecnificación del cultivo en el país.

1. Producción de determinados productos básicos agrícolas, Grupo I (2004). In: FAO. Anuario estadístico de la FAO. 2005-2006. Roma: FAO; 2004. p. 79-82.

2. Clive J. ISAAA Brief 42. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. New York: International Service for de Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA); 2010.

Para producir una tonelada de granos de soya, se estima que la planta necesita absorber 80 kg de nitrógeno, lo que equivale a una demanda aproximada de 240 kg/ha. La planta puede obtenerlo del suelo en forma del nitrato o amonio provenientes de la mineralización de nitrógeno orgánico o de la fertilización química; o de la atmósfera, mediante la fijación biológica de nitrógeno. Este es un proceso esencial en la biosfera, por el cual los microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en amonio. Ello no ocasiona contaminación ambiental y contribuye a evitar el empobrecimiento de los suelos [3]. Una alta disponibilidad de nitrato o amonio en el suelo inhibe la fijación biológica de nitrógeno. Las bacterias denominadas rizobios, que establecen interacciones simbióticas específicas con especies de plantas leguminosas, median una forma especializada de ese proceso, que es la fijación simbiótica del nitrógeno. Esta es la forma más eficiente de fijar biológicamente que existe en la naturaleza y su contribución oscila entre el 60 y el 80 % del total de nitrógeno fijado. La interacción rizobio-planta hospedera resulta en la formación de nódulos, estructuras especializadas que ocurren generalmente en las raíces y donde la bacteria dispone de un ambiente idóneo para reducir el nitrógeno gaseoso hasta amonio. En esta simbiosis, la planta aporta la fuente de carbono y recibe el nitrógeno fijado.

Bradyrhizobium japonicum es una bacteria gram-negativa en forma de bacilos pequeños, que habita en el suelo y establece FSN con su hospedero específico: la soya [4]. Produce abundantes exopolisacáridos con funciones específicas en las etapas iniciales de interacción con la planta, que constituyen fuentes de carbono de reserva y barreras de protección, que alargan la supervivencia de la planta en el suelo bajo condiciones adversas. Otras dos especies del género *Bradyrhizobium*: *B. elkanii* y *B. liaoningense*, también logran nodulación en soya [5]. *B. japonicum* tiene un crecimiento lento en medio de cultivo y se ha empleado ampliamente en la producción de inoculantes líquidos y sólidos que se aplican a las semillas antes de la siembra [6]. Los inoculantes sólidos utilizan turba irradiada u otro soporte al que se le añade el caldo de cultivo. La turba que cubre la semilla inoculada favorece la supervivencia de la bacteria en el suelo. Por tanto, el peletizado de las semillas con productos sólidos es el método de inoculación que se prefiere en la siembra manual. Sin embargo, cuando la siembra es mecanizada, las semillas se deben tratar con inoculantes líquidos de alta densidad celular que incorporen elevados niveles de bacteria al suelo y no provoquen problemas técnicos en las máquinas sembradoras.

Para la producción extensiva de soya en Cuba se escogieron los suelos llanos de la provincia de Ciego de Ávila, con el empleo de máquinas sembradoras. Este trabajo describe un método de producción masiva de cultivos puros de *B. japonicum* de alta densidad celular en condiciones optimizadas de crecimiento en zaranda. El inoculante líquido contiene un elevado contenido de exopolisacáridos naturales, se mantiene estable en conservación a 4 °C, durante al menos 8 meses y se aplicó con eficacia en cuatro campañas productivas mediante la siembra mecanizada.

Materiales y métodos

Cepas de *B. japonicum* y variedades de soya

Las cepas Semia 5079 y Semia 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* y la cepa ICA 8001 de *B. elkanii* [5] se emplearon en el experimento comparativo de eficiencia de la interacción simbiótica con las variedades de soya IncaSoy-36 [7], Conquista [8] y CubaSoy-23 [9] en condiciones de invernadero. La cepa Semia 5080 se empleó para la producción del inoculante.

Medios de cultivo

A partir de variaciones del medio comercial YM (manitol 10 g/L, extracto de levadura 1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L) [10], se diseñaron cinco medios de cultivo, cuya composición se muestra en la tabla 1. El pH inicial de los medios se ajustó a 6.8 y se mantuvo libre durante el crecimiento de la bacteria. El medio que propició mayor rendimiento de biomasa se denominó YMG y se empleó en la producción del inoculante.

Aislamiento de bacteroides a partir de nódulos

Las raíces de plantas inoculadas y crecidas en invernadero o campo se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. El aislamiento de bacteroides se realizó a partir de nódulos activos (coloración interna roja) del cuello de la raíz de las plantas en estadio de floración. Los nódulos se desprendieron de forma manual, se sumergieron en etanol al 70 % durante 5 min para su descontaminación superficial, y se cortaron de forma transversal con un bisturí estéril en una cabina de flujo laminar vertical. Los bacteroides de la parte central del nódulo se tomaron con una asa y se sembraron en placas de Petri con medio YM sólido, suplementado o no con carbenicilina (100 mg/L) y el colorante indicador rojo congo (0.25 %, p/v). Las colonias de *Bradyrhizobium* mostraron una coloración blanquecina y apariencia mucosa después de 10 días de crecimiento a 28 °C.

Selección de la cepa de *Bradyrhizobium* y confección del banco de células primario

La eficiencia de la interacción simbiótica entre las tres cepas de *Bradyrhizobium* y las tres variedades de soya en estudio, se evaluó en un experimento de invernadero sobre soporte de zeolita y sin aplicación de nitrógeno. Una semana después de la germinación de las semillas, las plántulas se inocularon con 1 mL del

3. Singh MS. Effect of *Bradyrhizobium* inoculation on growth, nodulation and yield attributes of soybean - A Review. *Agric Rev.* 2005;26(4):305-8.

4. Appelbaum, E. The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-legume symbiosis. In: Gresshoff PM, editor. *The molecular biology of symbiotic nitrogen fixation*. Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 131-58.

5. Hollis AB, Kloos WE, Elkan GE. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J Gen Microbiol.* 1981;123(2):215-22.

6. Alberton O, Kaschuk G, Hungria M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem.* 2006;38(6):1298-307.

7. Soto N, Ferreira A, Delgado C, Enriquez GA. Regeneración *in vitro* de plantas de soya de la variedad cubana IncaSoy-36. *Biotechnol Apl.* 2013;30(1):29-33.

8. Romero-Arias A, Peña-Molina L, González-Cruz M, González M. Evaluación de cultivares de soya (*Glycine max*) en las condiciones edafoclimáticas del municipio Majibacoa, Las Tunas. *Innov Tecnol.* 2013;19:1-9.

9. Díaz MF, Padilla C, Torres V, González A, Curbelo F. Caracterización bromofológica de variedades de soya (*Glycine max*) en producción de forrajes, forrajes integrales y granos de siembras de verano. *Rev Cubana Cienc Agríc.* 2003;37(3):311-7.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo estudiados para el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum**

| Reactivos | Medios de cultivo | | | | | |
|-----------------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | YM | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Manitol (g/L) | 10.0 | - | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Glicerol (% v/v) | - | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| Extracto de levadura (g/L) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 4.0 |
| K_2HPO_4 (g/L) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (g/L) | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| NaCl (g/L) | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| $FeCl_3$ (% p/v) | - | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| KNO_3 (g/L) | - | - | - | - | - | 0.8 |
| $(NH_4)_2HPO_4$ (g/L) | - | - | - | - | - | 0.3 |

* Cantidades necesarias para obtener un litro del medio de cultivo.

cultivo bacteriano diluido a razón de 2×10^6 células viables/maceta. Las plantas se colectaron en el momento de la floración. Los indicadores de la eficiencia simbiótica se cuantificaron (Tabla 2).

El banco de células primario (BCP) de la cepa Semia 5080 se confeccionó partir de una colonia proveniente de un bacteroide aislado de un nódulo activo de la raíz de una planta de soya, variedad CubaSoy-23, previamente inoculada con un cultivo puro de la bacteria y crecida en invernadero hasta el comienzo de la floración. Se inoculó un tubo de ensayo que contenía 5 mL de medio líquido YM a partir de una colonia. Se incubó a 28 °C durante 3 días en girador circular. A partir de este inóculo comenzó el crecimiento de la bacteria hasta la fase logarítmica en 300 mL de medio YM a 28 °C en zaranda. El cultivo mostró una pureza homogénea en el análisis por tinción de Gram. Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con medio YMG estéril, se resuspendieron en medio YMG frío suplementado con glicerol al 30 % (v/v), se dispensaron en viales de crioconservación colocados en hielo, y se almacenaron a -70 °C. El BCP mostró una viabilidad superior a 10^7 u.f.c./mL y la ausencia de contaminantes microbianos en la certificación emitida por la Dirección de Control de la Calidad, del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), de La Habana, Cuba.

Producción del inoculante, control de la calidad y estabilidad en conservación

Para la obtención de colonias aisladas, se sembraron diluciones 10^6 y 10^7 de una alícuota del BCP de la cepa Semia 5080 en placas de Petri con medio YMG suplementado con carbenicilina (100 mg/L) y rojo congo (0.25 %, p/v). Después de 10 días de incubación de las placas a 28 °C, las colonias de *B. japonicum* se mostraron blanquecinas, por la no absorción del colorante, y con una apariencia mucosa, debido a la presencia de exopolisacáridos. Para la producción del inóculo primario, se inocularon tubos de ensayos con 5 mL de medio líquido YM y una colonia de la bacteria. Se crecieron a 28 °C durante 3 días en un girador circular. Para la producción del inóculo secundario, se inoculó erlenmeyers con 150 mL de medio YMG y 15 mL del inóculo primario. Se crecieron a 28 °C durante 3 días en una zaranda orbital de 3 plataformas, con agitación a 150 rpm. Para la producción del cultivo final, se inoculó erlenmeyers que contenían 3 L de medio YMG con 300 mL de inóculo secundario. Se crecieron a 28 °C durante 4 días en la misma zaranda, con agitación a 150 rpm. A cada erlenmeyer con inóculo secundario o cultivo final se le hizo un análisis expedito de pureza mediante el método de tinción de Gram y se visualizó a través del microscopio óptico. Los cultivos finales con crecimiento homogéneo de bacilos pequeños gramnegativos característicos de *B. japonicum* se mezclaron en lotes de 5 L, se envasaron en bidones plásticos estériles y se conservaron a 4 °C hasta su comercialización. La confirmación de la ausencia de contaminantes microbianos en cada lote de cultivo final (bidón de 5 L) se logró mediante el método de estriado por agotamiento en placas con medio YM rojo congo sin antibióticos. La viabilidad de los lotes se determinó mediante el método de diluciones seriadas [11] y el conteo de colonias en placas de Petri con medio YM

Tabla 2. Selección de la cepa élite de *Bradyrhizobium japonicum* de alta eficiencia simbiótica con variedades comerciales de soya (*Glycine max* L.)*

| Variedad de soya | Cepa de <i>B. japonicum</i> | Número nódulos/planta | PF nódulos (g)/planta | PF foliar (g)/planta | PS foliar (g)/planta |
|------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Conquista | Semia 5079 | 110 ± 19 | 1.9 ± 2 | 22.1 ± 10 | 10.7 ± 2 |
| | Semia 5080 | 121 ± 15 | 2.11 ± 1 | 24.3 ± 12 | 11.5 ± 3 |
| | ICA 8001 | 135 ± 13 | 2.26 ± 1 | 18.8 ± 10 | 7.2 ± 1 |
| CubaSoy-23 | Semia 5079 | 109 ± 16 | 1.88 ± 1 | 21.3 ± 11 | 9.2 ± 1 |
| | Semia 5080 | 111 ± 12 | 1.95 ± 2 | 22.9 ± 11 | 10.9 ± 2 |
| | ICA 8001 | 122 ± 15 | 2.14 ± 1 | 17.4 ± 10 | 6.8 ± 1 |
| IncaSoy-36 | Semia 5079 | 64 ± 9 | 1.51 ± 1 | 15.3 ± 10 | 3.9 ± 3 |
| | Semia 5080 | 75 ± 13 | 1.60 ± 1 | 16.8 ± 13 | 4.3 ± 4 |
| | ICA 8001 | 114 ± 12 | 2 ± 1 | 10.2 ± 5 | 2.5 ± 1 |

* Se inocularon 15 plantas de cada variedad de soya. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

PF: peso fresco.

PS: peso seco.

suplementado con rojo congo (0.25 %, p/v) y el antibiótico carbenicilina (100 mg/L), que no inhibe el crecimiento de la cepa Semia 5080. La prueba de eficacia de los lotes del inoculante líquido se realizó en semillas asperjadas, a dosis de campo de soya y sembradas en macetas con zeolita. Las plantas se crecieron durante 30 días en invernadero sin aplicación de nitrógeno y se corroboró la nodulación de las raíces.

La estabilidad del inoculante se evaluó en lotes almacenados a temperaturas de 4, 28 y 37 °C durante 8 meses. En cada tratamiento se emplearon 6 lotes y se determinó la viabilidad y pureza de muestras de 1 mL colectadas mensualmente.

Inoculación de las semillas en campos con siembra mecanizada

Las semillas certificadas de cada variedad de soya se asperjaron con el inoculante a dosis equivalente de 150 mL/ha, previo a la siembra mecanizada en áreas de suelo ferralítico rojo de la Empresa Cubasoy, de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba, durante las campañas 2010, 2011, 2012 y 2013. Estas áreas no se habían utilizado antes para el cultivo de la soya y por tanto, nunca se había aplicado un inoculante a base de *Bradyrhizobium*. Previo a la siembra, se efectuó una fertilización química de fondo, a dosis de 50, 60 y 45 kg/ha de los macronutrientes nitrógenos, fósforo y potasio, respectivamente. Durante la etapa de cultivo vegetal, no se aplicó urea. La efectividad de la inoculación se determinó sobre la base de los datos de la nodulación (distribución, número, tamaño y coloración interna de los nódulos en la raíz) y la ausencia de síntomas de deficiencia nutricional en las plantas.

Resultados y discusión

Selección de una cepa de *B. japonicum* de elevada eficiencia simbiótica con las principales variedades de soya (*Glycine max* L.) cultivadas en Cuba

Se evaluó la eficiencia de la simbiosis de tres cepas comerciales de *Bradyrhizobium* con las variedades de soya IncaSoy-36, Conquista y CubaSoy-23, en condiciones de invernadero, con soporte de zeolita sin aplicación de nitrógeno. Todos los tratamientos provocaron abundante nodulación, aunque con diferente contribución a la masa foliar de las plantas (Tabla 2).

La inoculación con la cepa ICA 8001 *B. elkanii* indujo la mayor cantidad de nódulos en las tres variedades de soya; pero esto no conllevó a diferencias marcadas en el peso fresco promedio de los nódulos. La inoculación con la cepa Semia 5080 de *B. japonicum* produjo los mejores resultados en producción de materia seca foliar y, por tanto, se seleccionó para la producción del inoculante. En todos los casos, los nódulos se distribuyeron ampliamente en la región del cuello de la raíz (Figuras 1A y 1B) y mostraron coloración roja interna (Figura 1C) por la presencia de la proteína leg-hemoglobina, indicador indirecto de la ocurrencia del proceso de fijación del nitrógeno gaseoso. Las plantas inoculadas mantuvieron un color verde intenso durante el experimento.

Establecimiento de un medio cultivo rentable para el crecimiento de *B. japonicum* con elevada densidad celular

El medio comercial YM es de amplio uso en el crecimiento de especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* a escala de laboratorio; pero el empleo de manitol como única fuente resulta una opción extremadamente cara para la producción masiva de inoculante. En la tabla 3 se compara el crecimiento de la cepa Semia 5080 de *B. japonicum* en el medio YM y otros cinco medios de composición definida. El reemplazo de manitol por glicerol como fuente de carbono en el medio 1 redujo notablemente la producción de polisacáridos en el cultivo. Ello pudiera repercutir negativamente en la eficiencia de la inoculación en condiciones de campo. Los exopolisacáridos son componentes primarios de la biopelícula que protege a la bacteria de la desecación en el suelo, constituyen una fuente energética de reserva y son esenciales en la interacción de los rizobios con la planta hospedera [11]. A su vez, el aumento de la viscosidad del cultivo por la producción de exopolisacáridos favorece la adhesión de *B. japonicum* a la semilla en el momento de la inoculación [12, 13]. La combinación de manitol (2 g/L) y glicerol (1.2 %) abarata los medios 2, 3, 4 y 5, sin que disminuya notablemente la producción de exopolisacáridos con respecto al medio control YM. El aumento del contenido de extracto de levadura en los medios 4 y 5, cuyo consumo lleva a la producción de amoníaco, mantuvo neutro el pH del medio, y propició el crecimiento de la bacteria en condiciones de pH óptimo [10]. La adición de sales nitrogenadas en el medio 5 contribuyó al aumento de la densidad celular hasta 17.2 g de biomasa húmeda por litro de cultivo, con conteo de viables superior a 5×10^9 u.f.c./mL. Por estos resultados y el bajo costo de sus insumos (0.67 USD/L), se seleccionó el medio 5 (YMG) para producir el inoculante.

Producción en zaranda de cultivos puros de *B. japonicum* de alta densidad celular

B. japonicum, a diferencia de las especies del género *Rhizobium*, presenta un crecimiento lento en medios de cultivo [4] lo que impone un reto mayor a la producción masiva del inoculante para soya en condiciones de zaranda. El establecimiento de un sistema de dos inoculaciones seriadas con diluciones 1/10 permitió mantener el crecimiento de la bacteria en constante fase logarítmica en el medio de producción YMG y lograr una alta viabilidad promedio (5×10^{10} u.f.c./mL)

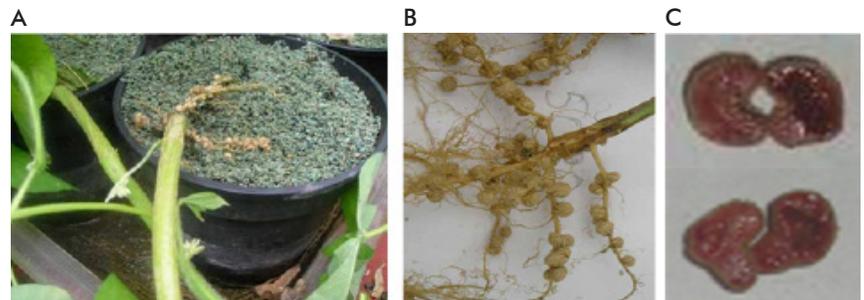


Figura 1. Selección de la cepa élite de *Bradyrhizobium japonicum* de alta eficiencia simbiótica con variedades comerciales de soya. A) Plántula de soya inoculada con *B. japonicum*, 7 días después de la germinación y evaluada 30 días después de la inoculación. B) Presencia de nódulos en las raíces de una de las plántulas inoculadas. C) Masa nodular con coloración roja interna, que indicó la producción de leghemoglobina, necesaria para la fijación de nitrógeno atmosférico.

en el cultivo final. El tiempo que medió entre la inoculación de los precultivos a partir de colonias aisladas y la cosecha del cultivo final fue 10 días. Sin embargo, el tiempo total de crecimiento en zaranda se limitó a 7 días, en los que se incrementó 100 veces el volumen del cultivo inicial. La superposición en tiempo de las etapas de crecimiento del inóculo secundario y del cultivo final en la zaranda orbital multiplataforma permitió dos producciones del inoculante cada semana.

El requisito de calidad establecido para la comercialización del inoculante fue la ausencia de contaminantes microbianos y la obtención de una densidad celular mayor o igual a 5×10^9 u.f.c./mL. Este valor permite aportar 1.6×10^6 bacterias viables por semilla, según la dosis de aplicación en campo de 150 mL/ha. Por tinción de Gram, en cada etapa de crecimiento en zaranda se observaron al microscopio poblaciones homogéneas de pequeños bacilos gramnegativos característicos de rizobios, excepto cuando había contaminantes microbianos. La siembra de los lotes del inoculante en el medio sólido YM en presencia de rojo congo y sin antibióticos, se utilizó como criterio de confirmación de pureza. En este medio, *B. japonicum* forma colonias mucosas de color blanquecino que no absorben el colorante indicador. La determinación de la pureza en los erlenmeyers con inóculo secundario por el método expedito de tinción de Gram y la visualización al microscopio óptico, permitió que el índice de rechazo de los cultivos finales por contaminaciones microbianas fuera inferior al 2 %. En la figura 2 se muestra el resultado del ensayo de eficacia de tres lotes del inoculante evaluados en condiciones de invernadero. A diferencia del control no tratado, las plantas inoculadas tenían un follaje vigoroso, de color verde intenso (Figura 2A) y abundante formación de nódulos en el cuello de la raíz (Figura 2B).

Tabla 3. Comparación del rendimiento productivo de los medios de cultivo estudiados para la obtención de bioinoculante de *Bradyrhizobium japonicum*

| Parámetros | Medios de cultivo | | | | | |
|------------------|-------------------|-----|-----|-----|------|---------|
| | YM | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 (YMG) |
| pH inicial | 6.8 | 6.8 | 6.8 | 6.8 | 6.8 | 6.8 |
| pH final | 5.8 | 5.4 | 5.4 | 5.9 | 7.0 | 6.9 |
| Exopolisacáridos | ++ | - | ++ | ++ | + | + |
| Biomasa (g/L) | 6.3 | 4.5 | 4.8 | 4.6 | 15.3 | 17.2 |

++, +, - Criterios de medida de densidad del exopolisacárido según el aspecto de las colonias (muy mucoso, levemente mucoso, y sin mucosidad, respectivamente).

10. Somasegaran P, Hoben HJ. Handbook for rhizobia. Methods in legume-Rhizobium technology. New York: Springer-Verlag New York, Inc.; 1994.

11. Louch HA, Miller KJ. Synthesis of a low-molecular-weight form of exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(2):1011-4.

12. Maurice S, Beauclair P, Giraud J, Sommer G, Hartmann A. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merrill) liquid inoculants after longterm storage. World J Microbiol Biotech. 2001; 17(6):635-43.

13. Subba Rao NS. Soil microorganisms and plant growth. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co.; 1977.

Conservación del inoculante líquido

La estabilidad del inoculante se evaluó en seis lotes almacenados a temperaturas de 4, 28 y 37 °C durante 8 meses (Figura 3). La conservación refrigerada no provocó la disminución notable del inoculante durante el estudio. En cambio, los tratamientos a 28 y 37 °C mostraron valores de viables inferiores al límite de calidad establecido (5×10^9 u.f.c./mL) a partir de los meses 1 y 2, respectivamente.

Eficiencia de la aplicación del inoculante en campos de soya con siembra mecanizada

La siembra de soya en la empresa Cubasoy, de la provincia de Ciego de Ávila, se realiza de forma mecanizada, lo que imposibilita el empleo del inoculante tradicional sólido a base de turba. La aplicación del inoculante líquido a las semillas se realizó a dosis equivalente de 150 mL/ha, con un consumo anual de 800, 570, 900 y 1030 L durante las campañas 2010-2013, respectivamente. Los muestreos de plantas en fase de floración, realizados anualmente en campos inoculados, evidenciaron abundantes nódulos con actividad nifijadora (coloración interna roja), distribuidos principalmente en la región del cuello de la raíz (Figura 4A). Las plantaciones mostraron un estado nutricional excelente con un follaje vigoroso y de color verde intenso. Los ensayos de caracterización fenotípica de la bacteria reaislada del interior de los nódulos provenientes de campos seleccionados al azar, corroboraron la identidad de la cepa de *Bradyrhizobium* inoculada. Los criterios de identidad empleados fueron resistencia a los antibióticos carbenicilina (100 mg/L) y rifampicina (100 mg/L), producción de colonias mucosas blanquecinas en medio YM suplementado con el colorante rojo congo (Figura 4B) y la no acidificación del medio YM suplementado con indicador de pH bromotimol azul (Figura 4C).

La aplicación del inoculante líquido de alta densidad celular y rico en polisacáridos resultó técnicamente compatible con el empleo de las máquinas sembradoras, permitió la supervivencia de la bacteria en el suelo y promovió el establecimiento de una interacción simbiótica eficiente con las diferentes variedades de soya cultivadas en Cuba. En las áreas de campo inoculadas se realizó una fertilización química de fondo con baja dosis de nitrógeno y no se aplicó urea durante el cultivo. En presencia de niveles no inhibitorios de nitrógeno en el suelo, la fijación simbiótica de nitrógeno gaseoso permitió la nutrición adecuada de la planta, contribuyó a la eficiencia del proceso fotosíntesis y la obtención de altos rendimientos del grano. Los residuos foliares de soya aportaron parte del nitrógeno fijado al suelo con beneficios colaterales a la nutrición del cultivo de rotación, principalmente maíz.

En resumen, se estableció el proceso de producción en zaranda de un inoculante líquido de *B. japonicum*, con alta viabilidad celular y rico en exopolisacáridos, que se mantiene estable durante al menos 8 meses en conservación refrigerada a 4 °C. El escalado de la tecnología es sencillo y no requiere grandes instalaciones ni equipos costosos. La inoculación de las semillas en



Figura 2. Evaluación de la eficacia del inoculante en ensayo de invernadero. A) Plantas de soya de la variedad IncaSoy-36 provenientes de semillas tratadas con el inoculante o no. B) Presencia de nódulos en el cuello de la raíz de una planta inoculada.

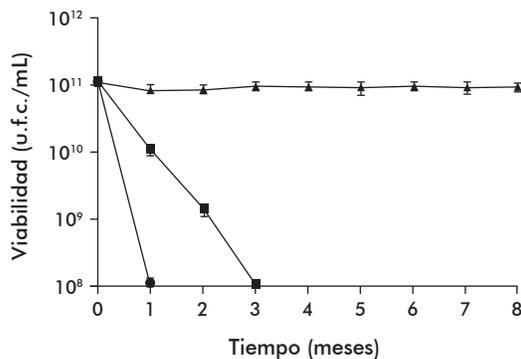


Figura 3. Estabilidad del inoculante durante su conservación a diferentes temperaturas. Los tratamientos fueron a 4 °C (triángulo), 28 °C (cuadrado) y 37 °C (círculo). Los valores corresponden a la media de seis lotes independientes.

campo fue compatible con el uso de máquinas sembradoras, produjo abundante nodulación y las plantas mantuvieron un buen estado nutricional durante el ciclo de cultivo. El empleo del inoculante en sustitución de la fertilización química nitrogenada, reduce el costo de la producción nacional de soya y contribuye a la protección del medio ambiente.

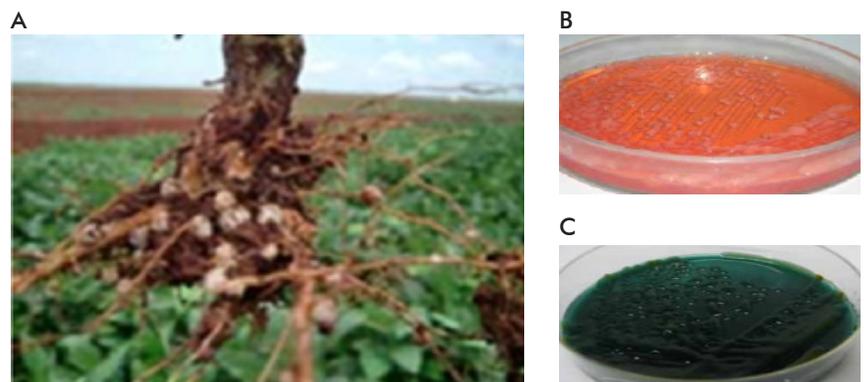


Figura 4. Comprobación de la eficacia de la inoculación en campo por presencia de nódulos en la raíz y buen estado nutricional de las plantas. A) Planta escogida al azar de un campo inoculado, posee abundantes nódulos en el cuello de la raíz y buen estado nutricional. B y C) Fenotipo de la bacteria aislada de nódulos de la planta de campo y crecida en el medio YM suplementado con rojo congo al 0.25 % (B) o bromotimol azul al 0.025 % (C).

Recibido en diciembre de 2013.

Aprobado en marzo de 2014.