



TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS ORIENTACIÓN MICROBIOLOGÍA

Efecto del tratamiento de semilla de soja (*Glycine max* L. Merr.) con agroquímicos en la sobrevivencia de *Bradyrhizobium* spp. y en la nodulación

Autor: Mariana González Vilche

Tutor: Dra.Ing. Agr. Margarita Sicardi

Tribunal: Dra. Ing. Agr. Elena Beyhaut

Dr. Ing. Agr. Carlos Perez

Año 2013

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. La necesidad de alimentos en el mundo: las proteínas	4
1.2. La soja y su significado en la alimentación	4
1.3. La fijación biológica de nitrógeno	5
1.4. Significación y eficiencia de la simbiosis Rhizobium-soja	6
1.5. Los inoculantes	7
1.6. Los agroquímicos: tecnología actual en el cultivo de soja	9
1.6.1. Fungicidas curasemillas.....	10
1.6.2. Insecticidas.....	11
1.6.3. Bioestimulantes	12
1.6.4. Polímeros	12
1.7. Efectos biológicos de los agroquímicos.....	13
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Cepas de <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	15
2.2. Semillas e inoculantes	15
2.3. Agroquímicos	15
2.4. Estrategia de investigación	16
2.4.1. Efecto de productos agroquímicos en cepas de <i>Bradyrhizobium</i> spp.: medio de cultivo sólido	16
2.4.2 Efecto de productos agroquímicos en cepas de <i>Bradyrhizobium</i> spp. : medio de cultivo líquido	17
2.4.3. Protectores de semillas como posibles fuente de carbono para los Bradyrhizobios.....	18
2.4.4. Compatibilidad de productos agroquímicos con <i>Bradyrhizobium</i> . spp en semillas y en la nodulación de soja	19

2.4.5. Estudio de la mortandad de bradyrizobios; ejemplo práctico.....	22
2.4.6 Análisis estadístico	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1 Efecto de productos agroquímicos en cepas de <i>Bradyrhizobium</i> spp.: medio de cultivo sólido	24
Fungicidas	24
3.2 Efecto de productos agroquímicos en cepas de <i>Bradyrhizobium</i> . spp.: medio de cultivo líquido	29
3.3. Protectores de semillas como posibles fuentes de carbono	34
3.4 <i>Compatibilidad de productos agroquímicos con Bradyrhizobium</i> . spp en semillas y en la nodulación de soja	35
3.4.1 Supervivencia de <i>Bradyrhizobium</i> spp. en semillas	36
3.4.2 Evaluación de la nodulación	40
3.5 Estudio de la mortandad de bradyrizobios; ejemplo práctico.....	42
4. CONCLUSIONES	44
5. AGRADECIMIENTOS	44
6. BIBLIOGRAFÍA	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La necesidad de alimentos en el mundo: las proteínas

La población mundial ha crecido abismalmente en los últimos años, según datos de la UN (United Nations) el número demográfico alcanzó la cifra de siete mil millones de habitantes en el año 2011 (<http://esa.un.org/wpp/Excel-Data/population.htm>). Debido a este aumento significativo, en especial, en países en desarrollo de África, Medio Oriente y América Latina y a la disminución de la productividad agrícola por sistemas de baja sustentabilidad, el mundo se enfrenta, desde hace varias décadas, a una crisis alimenticia (Repetto et. al., 1989).

Las proteínas son la base de la alimentación humana y animal, forman parte de la estructura básica de los tejidos, desempeñan funciones metabólicas, reguladoras y pueden ser utilizadas como energía. Por lo tanto, hay un desafío en producir una mayor cantidad de alimentos ricos en proteínas para satisfacer las necesidades alimenticias del crecimiento demográfico mundial (Perez y Zamora, 2002).

Focalizando en los cultivos agrícolas, nos enfrentamos con la necesidad de producir volúmenes de alimentos cada vez mayores en la misma superficie, enfrentados a suelos empobrecidos en su fertilidad, por el mal uso agrícola- pastoril durante muchos años. De ahí que muchos países apuntan a la intensificación de los procesos productivos con el objetivo de aumentar la productividad por hectárea (ha), buscando innovaciones tecnológicas que cambien las técnicas tradicionales de manejo vegetal y animal. Por ejemplo, siembra directa, mejoramiento genético vegetal y animal y uso de insumos agroquímicos con diferentes finalidades (Arbeletche y Carballo, 2008).

1.2. La soja y su significado en la alimentación

La soja (*Glycine max* L. Merrill) pertenece a la familia de las *Leguminoceae* o *Fabaceae*, subfamilia *Faboideae*. Esta familia contiene entre 16.000 a 19.000 especies arbóreas y herbáceas (Allen y Allen, 1981). Tienen por fruto una legumbre o chaucha y según datos proporcionados por la FAO, su cultivo suministra varias ventajas, entre ellas alto rendimiento/ha, alto contenido de proteínas y un gran valor nutritivo en general (Corbera y Hernandez, 1997) así como múltiples subproductos de interés económico.

La soja es un cultivo de gran importancia agrícola en Estados Unidos, Asia y en América del Sur, tanto en superficie, en producción, rentabilidad y rendimiento en grano/ha. Para la zafra 2012/2013 se estima un rendimiento de 82 millones de toneladas en Brasil, 56 en Argentina y 8.6 en Paraguay.

En nuestro país, la soja ha adquirido gran importancia agrícola, llegando a ser en los últimos años el principal cultivo de grano. En el año 2012, se sembraron aproximadamente 1.25 millones de ha, esperándose una producción de 3.1 millones de toneladas de grano (www.elobservador.com.uy, 12/2012).

Entre los factores que han favorecido al cultivo en nuestro país se mencionan: alto precio internacional, cultivo en diferentes tipos de suelos, aplicación de paquete tecnológico, uso de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), total aprovechamiento del grano. La expansión del cultivo en la última década se debe al margen de ganancia que obtienen los agricultores.

Su alto precio en el mercado internacional es atractivo para los agricultores uruguayos en comparación con otros cultivos: oscila en 500 dólares por tonelada resultando rentable para ellos. Si bien requiere suelos fértiles y buena disponibilidad de agua para dar rendimientos mayores a 2000 kg/ha (promedio nacional 1900 kg/ha) se ha visto que su cultivo se extiende a zonas de suelos de menor fertilidad, con rendimientos aún aceptables (promedio 1700 Kg/ha) dado el atractivo del precio internacional (comunicación personal M. Sicardi).

Otro motivo del auge de la soja es el paquete tecnológico disponible a los productores, con esto nos referimos a la sumatoria de técnicas de manejo recomendadas a los productores de soja para lograr altos rendimientos. Por ejemplo, la siembra directa ha facilitado la siembra de grandes extensiones, rotaciones para protección de la erosión, aporte de fertilizante fosfatado y la disponibilidad de inoculantes con bacterias fijadoras de nitrógeno que en general alcanzan a cubrir las necesidades de nitrógeno del cultivo, favoreciendo además la recuperación de la fertilidad de los suelos. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) no sólo ahorra la fertilización nitrogenada sino que disminuye la emanación de óxido nitroso, principal gas de efecto invernadero. A este paquete tecnológico se le suma, principalmente en la última década, la aplicación indistinta de biocidas en las semillas (herbicidas, insecticidas y fungicidas). Por supuesto que la aplicación de las innovaciones tecnológicas mencionadas, revolucionaron al cultivo no sólo en Uruguay sino en otros países de la región (Rocha, 2012).

Además del alto valor nutritivo del grano de soja y sus múltiples aplicaciones industriales, cabe mencionar que contiene aproximadamente 20% de aceite de buena calidad. Se obtiene también la harina de soja, que corresponde a otro subproducto del procesamiento de la semilla que se vende para consumo humano y principalmente para ración animal. La importancia del cultivo se evalúa además porque los principales compradores mundiales son la Unión Europea y China que utilizan la harina como ración animal en los sistemas de ganadería intensiva (Oyhantcabal y Narbondo, 2011).

1.3. La fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno (N) es uno de los nutrientes imprescindibles para la producción de alimentos de origen vegetal y es uno de los más limitantes en el suelo, por lo que se añade en muchos sistemas agrícolas como fertilizante químico. La producción de estos fertilizantes se realiza por el proceso industrial Haber- Bosch (1914), el cual utiliza gas natural para fijar el nitrógeno atmosférico (N₂). Esta situación acarrea algunos inconvenientes, el primero es que el gas natural que se usa como energía es un combustible fósil que encarece la producción del fertilizante y que no es renovable (Tommasino, 2008; Estrada et. al., 2009) En Uruguay, su empleo genera un gasto de divisas que tiene una alta incidencia en los costos de producción de los cultivos cuya principal fuente nitrogenada es el N químico. En el caso de las leguminosas, se calcula que el país ahorra aproximadamente 150 millones de dólares anuales por la sustitución de los fertilizantes nitrogenados por la FBN (Labandera, 2003).

En consecuencia, en nuestro país se prioriza y predomina el aporte de la FBN en soja, evitando además posibles excesos de N en los suelos.

El N₂ se encuentra en grandes cantidades en la atmósfera y es inaccesible para la mayoría de los seres vivos, excepto para un grupo limitado de *Bacterias* y *Archeas* llamadas diazótrofos (diazó= N₂, trofo= nutrición) entre las cuales se destaca el género *Rhizobium* por su relación con las leguminosas. Este grupo de microorganismos sintetizan un complejo enzimático llamado nitrogenasa que convierte el nitrógeno gaseoso en amoníaco, el cual es tóxico para las células en altas concentraciones, por lo que es rápidamente incorporado como amonio en aminoácidos y proteínas (Frioni, 2011).

El proceso de FBN está representado por la siguiente ecuación:



El NH₃ es rápidamente reducido a NH₄ porque es tóxico para las células. El triple enlace del N₂ es extremadamente inerte por lo que el proceso para romperlo requiere de mucha energía por parte de la célula, se calculan entre 14-24 moléculas de ATP para reducir un mol de N₂ (Freixas et. al., 2010).

El complejo enzimático de la nitrogenasa está formado por dos componentes: la hierro proteína o dinitrogenasa reductasa y el hierro- molibdeno proteína o dinitrogenasa. La FBN es una reacción de reducción del N₂ en la cual el oxígeno (O₂) inactiva a la dinitrogenasa reductasa. Si bien hay diazótrofos aerobios, los mismos han desarrollado diversos mecanismos para proteger a la enzima del contacto con el O₂ (Kuzma et. al., 1993).

Los diazótrofos son microorganismos que tienen una alta variabilidad en cuanto a su metabolismo y ecología. Hay fijadores que son heterótrofos aerobios, anaerobios, y anaerobios facultativos, como también hay quimioautótrofos y fotosintéticos. En cuanto a ecología estos procariotas pueden ser de vida libre, pueden encontrarse asociados a la rizósfera, viviendo dentro de una planta (endófitos) o en simbiosis (Baca et. al., 2000).

1.4. Significación y eficiencia de la simbiosis *Rhizobium*-soja

Las simbiosis entre plantas y microorganismos han sido las asociaciones más estudiadas y utilizadas en la agricultura por su mayor eficiencia en FBN comparado con los fijadores libres. Por lejos, la más importante desde el punto de vista de aporte de N a los cultivos es la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa.

Los rizobios son bacilos Gram negativos, proteobacterias del grupo α mayormente, son aerobios, pueden presentar motilidad, no forman endosporas y son capaces de utilizar varias fuentes de carbono. Pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*, en la cual se incluyen los géneros: *Rhizobium* y *Sinorhizobium* de crecimiento rápido, *Bradyrhizobium* de crecimiento lento y *Azorhizobium* y *Mesorhizobium* entre otros. Algunos autores prefieren utilizar el término de *Rhizobium* o más comúnmente “rizobio” como nombre genérico para referirse a bacterias formadoras de nódulos en

raíces de leguminosas (Herrera, 2010). En adelante nos referiremos, por extensión, a “Bradyrizobios” ya que en este trabajo se utilizaron cepas de *Bradyrhizobium* spp.

La simbiosis en soja ocurre con diazótrofos pertenecientes al género *Bradyrhizobium*. Esa asociación, al igual que otras, es muy específica, es decir no todos los Bradyrizobios interactúan con las variedades de soja para formar nódulos en sus raíces. La especificidad está establecida por señales moleculares planta-bacteria que ocurren en la rizósfera. Las plantas liberan exudados radicales, moléculas llamadas flavonoides que son reconocidas por receptores que poseen las bacterias en su membrana plasmática. Cuando la bacteria y la planta se reconocen, se inicia el ingreso o infección por los Bradyrizobios al pelo radical, seguido de nuevos procesos interactivos que culminarán con la formación de un nuevo órgano visible en la raíz, el nódulo. En las células vegetales del nódulo y como consecuencia de la interacción de ambos simbiosomas, se forman los simbiosomas donde ocurre la FBN. En resumen, hay reconocimiento de los flavonoides específicos de la leguminosa seguido de la activación de los genes de nodulación de la bacteria (*nodABC*) y su expresión en factores *nod* específicos (Kuzma et. al., 1993). La especificidad ocurre en distintas etapas de la formación del nódulo.

El nódulo proporciona el ambiente donde vivirá la bacteria proveyéndola de las condiciones necesarias para que realice sus funciones vitales como también protegerla del O₂ para que la FBN sea posible. Las capas celulares del nódulo, en especial las conocidas como barrera a la difusión de oxígeno, actúan disminuyendo su concentración. Con este mismo fin, en el citoplasma vegetal y cerca del simbiosoma se sintetiza una proteína, la leghemoglobina, encargada de regular un flujo óptimo de O₂. Esta proteína es sintetizada por la planta y la bacteria en conjunto, la planta aporta la estructura proteica y la bacteria el grupo hemo o de hierro encargado de retener el O₂. Establecida la simbiosis, el rizobio pasa por cambios morfológicos y bioquímicos, se llama bacteroide por la que se conoce como fijador de N₂ (Soto- Urzúa y Baca, 2001).

Los agricultores uruguayos utilizan la FBN en sus cultivos de soja, evitando, como se mencionó, el gasto en fertilizante químico e impulsando una agricultura sustentable. Los múltiples beneficios de la FBN se logran utilizando los inoculantes que se producen en Uruguay, de alta calidad y específicos para soja.

1.5. Los inoculantes

El término inoculante refiere a un producto cuyo principio activo son microorganismos vivos, no patógenos, que favorecen la nutrición y/o el desarrollo de las plantas (BIOFAG, 2008). El inoculante para leguminosas es un producto constituido por un soporte que contiene una alta densidad de una o más cepas de rizobios o Bradyrizobios eficientes en fijación biológica del nitrógeno (Frioni, 2011).

En la década de 1960, en Uruguay se desarrolló un programa de selección de cepas de rizobios para leguminosas forrajeras y de materiales como soportes, con el objetivo de disponer de una producción nacional y usar inoculantes de calidad. El mismo fue promovido por el MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) creándose el Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes, el cual actualmente está en actividad. Así se logró establecer la Industria Nacional de

Inoculantes y el marco legal para garantizar su calidad. En 1980, las investigaciones en el tema se ampliaron hacia la producción de inoculantes para soja (Labandera, 2003).

Los criterios aplicados en la selección de cepas para los inoculantes son:

- Alta eficiencia para fijar nitrógeno
- Competencia saprofita
- Compatibilidad ínter-específica
- Estabilidad genética
- Comportamiento industrial
- Sobrevivencia en semillas
- Tolerancia a factores bióticos y abióticos

Por otra parte, los inoculantes nacionales para leguminosas son evaluados y certificados por el laboratorio del MGAP mencionado. Las normas exigen que cada lote fabricado deba cumplir con los estándares de:

- Ausencia de contaminantes
- 2×10^9 UFC bacterias/g de turba o ml en fábrica
- 1×10^9 UFC/g de soporte en el momento de la distribución
- 1×10^8 UFC/g de soporte cumplida la fecha de vencimiento

El control de calidad oficial también incluye evaluaciones de nodulación en plantas por lo que garantiza al agricultor el uso de un producto confiable que le brindará buena nodulación y fijación de nitrógeno si se hace un uso adecuado (Labandera, 2007).

Los inoculantes se preparan en Uruguay en base a turba (sólidos) o líquidos. La turba es un producto con alto contenido en materia orgánica, mientras que el inoculante líquido es un medio de cultivo rico sintético. Ambos soportes son esterilizados y luego inoculados con las cepas de seleccionadas previamente, muchas veces conocidas como “recomendadas” o “comerciales” debido a su destacado comportamiento simbiótico y agronómico.

Se conoce que existen diferencias de protección a los rizobios entre los dos soportes en los que se comercializan los inoculantes y con diferencias de practicidad a la hora de aplicarlos. Estas características son tomadas en cuenta a la hora de elegir cual es el más indicado para cada tipo y condiciones de siembra. Estas diferencias se resumen principalmente en el precio, la turba es más costosa, la sencillez para manipular el producto, el soporte líquido es más práctico ya que la turba puede formar grumos y puede obstruir la salida del producto en la sembradora. Entre un inoculante sólido y uno líquido se han encontrado diferencias en la sobrevivencia de los rizobios tanto en el inoculante como en las semillas inoculadas. Si bien el número bacteriano disminuye en ambos, la turba se destaca frente al líquido amortiguando más la disminución ofreciendo mayor protección. Esto sucede gracias a los microambientes que se forman entre las partículas más pequeñas, que le sirven de protección a las bacterias frente a factores como altas temperaturas, deshidratación y propiedades químicas adversas del suelo (Labandera, 2003; Estrada et. al., 2009; Fuentes y Caballero, 2006).

La inoculación de la semilla de soja y de otras leguminosas forrajeras ha sido y sigue siendo exitosa en Uruguay, tanto por la calidad de los inoculantes como por la total y cuidadosa adopción de la tecnología por los agricultores. Como se mencionó, el rendimiento promedio nacional de soja es de 1.9 toneladas/ha, los cuales deberían ser más altos si se tiene en cuenta el manejo que se le da al cultivo. Aparentemente varios factores serían los responsables de ese rendimiento, los cuales deben ser identificados y entendidos para poder desarrollar una estrategia tecnológica que facilite su control.

En la última década, se ha sumado al cultivo de soja la tecnología de aplicación generalizada de curasemillas, sin un total conocimiento en cuanto a sus ventajas y desventajas de su aplicación. Estos, principalmente fungicidas e insecticidas, se usan tal como se recomiendan en el mercado y con la convicción de que se garantiza la seguridad del cultivo eliminando las plagas y obteniendo entonces altos rendimientos por hectárea.

1.6. Los agroquímicos: tecnología actual en el cultivo de soja

Actualmente la producción de cultivos intensivos y extensivos va de la mano con la adición de un cúmulo de agroquímicos a los cuales se les asigna varios beneficios como control de plagas, estimular el crecimiento de la planta, suplir nutrientes, protección de la semilla entre otros (Henning et. al., 1997).

En general, dentro de la denominación de agroquímicos encontramos:

- Productos para el control de plagas: insecticidas, bactericidas y fungicidas.
- Productos para estimular el crecimiento de las plantas, conocidos como bioestimulantes; con micronutrientes como Mo y Fe.
- Productos combinados: fungicidas más insecticidas y también microorganismos y otros compuestos químicos.

Como se mencionó, la soja no es la excepción al uso de productos químicos sintéticos, sino que por el contrario hay una gran gama de agroquímicos que se utilizan en la región y en nuestro país. Entre ellos fungicidas, insecticidas, repelente de aves, bioestimulantes de raíces, bioestimulantes con Mo para las bacterias, bioprotectores de las células microbianas, etc. Últimamente hay en el mercado otros productos denominados polímeros, recomendados para favorecer la adhesión del inoculante a la semilla, extendiendo su acción a favorecer la sobrevivencia de las bacterias por protección física (Hungría y Campo, 2005). Esta sumatoria de químicos sintéticos es recomendada por diferentes empresas comerciales en el paquete tecnológico de soja, por lo general de aplicación junto con los inoculantes. Se ha constatado que en nuestro país la aplicación de fungicidas está muy extendida aun cuando no hay disponible información sobre los efectos de esos productos al usarlos con semilla inoculada. Tampoco se sabe si los productos tienen o no algún efecto tóxico en las etapas posteriores es decir en la nodulación y en la FBN.

Cuando se trata de agroquímicos el tema es un tanto ambiguo debido a carencia de información en el momento de usar alguno de ellos. Por ejemplo, cuando hablamos de fungicidas estamos agrupando muchos productos químicos con distintos principios activos. Se pueden comportar de

distinta manera ya que lo único que tienen en común es que cumplen un mismo objetivo de controlar determinadas plagas y en algunos casos compartir un determinado principio activo.

Por otra parte, los agroquímicos como los fungicidas e insecticidas pueden contener varias moléculas incluyendo:

- uno o varios materiales activos que aseguran el efecto del pesticida.
- un disolvente que en el caso de los líquidos es por lo general aceite vegetal mientras que para los sólidos suele utilizarse arcilla o talco.
- aditivos que son sustancias sin actividad biológica, facilitan la modificación de la calidad del producto y su empleo.

No se descarta la posibilidad de que la toxicidad de un producto sintético pueda deberse al colorante o al disolvente que acompaña al principio activo.

A la hora de sembrar, los agricultores no siempre tiene información que le avale la elección de uno de ellos, la principal carencia de información se refiere a cuál de esos productos afecta la nodulación y la FBN.

El uso indiscriminado de agroquímicos preocupa a los actores de la cadena de producción de soja y han surgido preguntas que requieren respuesta. ¿Qué efecto tienen cuando están en contacto con los inoculantes en las semillas? ¿Qué ocurre con la nodulación y la fijación de nitrógeno? La preocupación está fundamentada en la escasa o nula nodulación observada en un porcentaje de las siembras extensivas de los últimos años en nuestro país.

A continuación se mencionan los agroquímicos comercialmente disponibles en nuestro país, sin pretender presentar una lista exhaustiva de ellos.

1.6.1. Fungicidas curasemillas

Los fungicidas son sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento o para eliminar los hongos fitopatógenos de la semilla y del suelo. Son el principal grupo de productos químicos para combatir enfermedades de plantas, en especial en etapas tempranas del desarrollo de las raíces. Se aplican localmente a las semillas, mediante pulverizado, rociado o revestimiento.

Se clasifican según sean de contacto o sistémico:

- **Contacto:** cuando cubre una superficie y evita la entrada del hongo
- **Sistémicos:** se aplican sobre la planta o mediante su riego y se transportan al sistema vascular

Cuadro 1: Grupos funcionales y principios activos de fungicidas orgánicos disponibles comercialmente, tipo, espectro y modo de acción.

GRUPOS FUNCIONALES	PRINCIPIO ACTIVO	ACCIÓN POR	ESPECTRO	MODO DE ACCIÓN
DITIOCARBAMATOS	Etilen- bisditiocarbamatos (Mancozeb)	Contacto	Amplio espectro	Interfieren producción de energía dentro de la célula
	Disulfuro de plietilentioruramina + Zn (Metiram)			
	Dimetil- ditiocarbamatos (Ferbem)			
	Tetrametil tiuram (Tiram)			
	Propolen- bisditiocarbamato (Propineb)			
FTALIMIDAS	Captan			Reaccionan con grupos sulfhídricos
	Folpet			
ESTROBILURINAS	Kresoxim- metil			Inhiben respiración celular
	Azoxystrobin			
	Trifloxystrobin			
BENZIMIDAZOLES	Benomil	Sistémico	Amplio espectro	Inhibe síntesis de tubulina, bloquea mitosis
	Carbendazim			
	Metil tiofanato			
	Tiabendazol			
ACILALANINAS	Metalaxil			Biosíntesis de ARN
DICARBOXIMIDAS	Iprodione			Síntesis de ADN, inhibe germinación de esporas
	Procimidone			
TRIAZOLES	Flusilazol			Síntesis de ergosterol

El cuadro 1 muestra los principios activos de los fungicidas según los grupos químicos funcionales que están presentes en sus moléculas. Dada su diversidad y posibilidad de combinaciones químicas entre ellos, son productos que afectan de diferente forma a los hongos (cuadro 1) y que podrían también ser tóxicos para los Bradyrhizobios de los inoculantes. En la bibliografía existen numerosos ejemplos del efecto de fungicidas sobre la sobrevivencia de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en semillas inoculadas (Tesfai y Mallik, 1986) (Dunfield et. al., 1999) en la nodulación y en la fijación de nitrógeno (Andrés et. al., 1996). En nuestro país, se realizó un ensayo en invernáculo para evaluar 3 fungicidas en soja (Labandera, 2003). El autor determinó que los 3 afectaron significativamente el número de nódulos y la masa nodular/planta.

1.6.2. Insecticidas

Los insecticidas en general se refieren a productos sintéticos que matan insectos de las plantas. Integran junto con los fungicidas y herbicidas los compuestos conocidos como plaguicidas.

En nuestro país, existe una alta demanda del insecticida Draza® (Metiocarbamato) como repelente de palomas en las etapas iniciales del cultivo de soja. Se aplica como líquido a la semilla y el producto protege a la plántula ahuyentando a las aves.

1.6.3. Bioestimulantes

Un bioestimulante es una solución cuya fórmula depende del fabricante, pero en general contiene micro y macro nutrientes, Mo, Fe, P, S o cualquier otro elemento requerido por los vegetales. Los ejemplos mencionados evidencian que hay muy distintas formulaciones de productos bioestimulantes, muchos de ellos a base de hormonas, aminoácidos, vitaminas, y enzimas. Se recomiendan para aumentar el desarrollo de las plantas supliéndolas con todos o con la mayoría de los nutrientes que necesita. En el caso del cultivo de soja, algunas de las empresas que venden inoculantes para soja, recomiendan el uso de bioestimulantes en la inoculación. Los bioestimulantes pueden incluir Mo, micro nutriente que favorecería el funcionamiento de la fijación de N₂ ya que es un elemento requerido por la enzima nitrogenasa. Como complemento de la información se menciona que por ejemplo, la empresa argentina Rizobacter S.A. que formula el producto Signum®, el cual prepararía a la planta para reconocer y responder al intenso sistema de señales moleculares que ocurren luego de la germinación, activando la simbiosis, así como los mecanismos de defensa de la planta en respuesta a estrés por patógenos y condiciones ambientales adversas. Otras ventajas que se mencionan para su uso son: activar la fisiología microbiana, mejorar la germinación y el desarrollo del cultivo, promover la actividad microbiana rizoférica, maximizar la FBN e incrementar el rendimiento y la calidad del grano (<http://www.rizobacter.com.ar/>).

Las formulaciones con Mo han surgido principalmente por el interés en conocer y definir el papel del Mo como mejorador de la FBN y los resultados han sido variables (Carvalho Leite et. al., 2009; Campo y Hungria, 1999). Hay distintas maneras de aplicación de sustancias ricas en Mo, la más utilizada es la de embeber las semillas en el producto que lo contiene. Este proceso puede traer problemas como pérdida del poder germinativo de las semillas, disminución del crecimiento y de la producción. Por ejemplo, se estudió en frijol caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) el efecto del agregado de dosis de Mo en *Bradyrhizobium elkanii*. El estudio demostró que la aplicación de Mo no aumentó el número y masa de los nódulos, aun cuando se observó aumento en la eficiencia de la FBN por incremento del contenido de N en las semillas. Si la dosis usada era mayor a 60g de Mo/ha, el rendimiento disminuía (Carvalho Leite et. al., 2009). Si bien Jacob-Neto (1988) mostraron la importancia y beneficios de altas concentraciones de Mo para las bacterias fijadoras de nitrógeno, reconocen la importancia de evaluar la mejor forma de incorporarlo. Otro ejemplo de evaluación de productos bioestimulantes fue realizado en Brasil, el cuál demostró que la aplicación en soja de un compuesto por cinetina, ácido giberélico y ácido indolbutírico aumentó la cantidad de frutos y de granos, tanto si se aplicaba a la semilla o foliarmente (Comelis et. al., 2009).

1.6.4. Polímeros

Son productos utilizados en la fijación a las semillas de fungicidas, insecticidas, micro y macro nutrientes, hormonas etc. Se los conoce también como “protectores” de semillas. Son polímeros adhesivos con o sin colorantes y se los recomienda como protectores a los cambios de temperatura y humedad, tanto en el suelo como en el almacenamiento, las semillas polimerizadas tienden a incrementar la germinación y emergencia en condiciones adversas (Becker Underwood, es.beckerunderwood.com, Basf). Recientemente hay interés, al igual que

para otros productos, en conocer si estos compuestos pueden tener algún efecto nocivo sobre las bacterias cuando se aplican a semillas de leguminosas inoculadas.

1.7. Efectos biológicos de los agroquímicos

En nuestra opinión, el gran incremento en el área de siembra del cultivo de soja en nuestro país en los últimos 10 años apunta a un aumento paralelo en las plagas (hongos y en menor cuantía, bacterias e insectos) con efectos económicos negativos para los productores agrícolas. Las enfermedades ocurren frecuentemente en las semillas, raíces y parte aérea de las plantas, muchas veces por la continuidad del cultivo en las mismas chacras.

En los últimos años, el surgimiento de los fungicidas e insecticidas vino a “solucionar” ese problema, con la idea de evitar la disminución en los rendimientos de los cultivos mediante una fácil y rápida tecnología de aplicación (Henning et. al., 1997). Existen comercialmente muchos productos químicos con diferentes atribuciones y los fabricantes los recomiendan para el tratamiento de las semillas durante su almacenamiento o previo a la siembra. Muchas veces son utilizados varios productos simultáneamente con la finalidad de lograr un mayor control de las posibles plagas.

La necesidad de conocer los efectos biológicos de los productos químicos sintéticos aplicados a las semillas se refiere a lo que ocurre cuando se trata de semillas de leguminosas inoculadas, por ejemplo, soja (Curley y Burton, 1975). Como se mencionó, hay otros productos de reciente aparición, bioestimulantes y polímeros, que si bien no controlan plagas, se aplican también a las semillas sin tener certeza del resultado en la FBN. El efecto negativo de estos productos químicos en el caso de las leguminosas puede ser: a) no compatibilidad en contacto con los bradyrizobios en semilla inoculada, b) escasa o nula nodulación y c) efecto sobre la eficiencia de la FBN (Fabra et. al., 1997; Curley y Burton, 1975; Andrés et. al., 1998; Campo y Hungría, 1999).

Desde el punto de vista de la productividad de la soja, el tema de los agroquímicos unido a la FBN tiene gran importancia porque faltan conocimientos para evitar bajos rendimientos por mal uso, más aún si se tiene en cuenta que la soja es el principal cultivo de grano de nuestro país y todo indica que lo seguirá siendo en los próximos años.

Hipótesis

La fijación biológica de nitrógeno en soja (*Glycine max* L.Merril) es afectada negativamente por algunos fungicidas, insecticidas y otros productos disponibles comercialmente.

Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto de la aplicación de diferentes agroquímicos en la sobrevivencia de cepas de *Bradyrhizobium* spp. de interés industrial, en semillas inoculadas y en la nodulación de soja.

Objetivos Específicos

1. Determinar la sensibilidad *in vitro* de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y *B. elkanii* a agroquímicos, fungicidas, insecticida, bioestimulante, y polímero en medio sólido y líquido.
2. Evaluar los efectos de agroquímicos en la sobrevivencia de cepas en semillas y en la nodulación en soja.
3. Determinar las posibles causas de falla en la nodulación en soja en una siembra comercial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas de *Bradyrhizobium* spp.

Las cepas utilizadas fueron *Bradyrhizobium elkanii*, U1301 y U1302 (Brasil), componentes de los inoculantes comerciales para soja (*Glycine max* L. Merrill) en Uruguay, conocidas como “cepas recomendadas para soja” por su alta eficiencia en fijación biológica de nitrógeno (FBN). Se emplean en los inoculantes líquidos y sólidos (turba). Se incluyó también la cepa *B. japonicum*, E109 (Argentina) recomendada en los inoculantes comerciales para soja de ese país (cuadro 2). Todas ellas se obtuvieron de la colección del laboratorio de Microbiología del Suelo (IECA, Facultad de Ciencias, Udelar) mantenidas a -20 °C y a -80°C.

Cuadro 2: Cepas de *Bradyrhizobium* utilizadas en el trabajo, origen y denominación.

Cepa	Origen y denominación
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U-1301	SEMIA 587 (Brasil)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U-1302	SEMIA 5019; IAC 29W; U-732 (Brasil)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> U-741	E-109 (Argentina)

Las cepas se crecieron en medio EMA (Extracto de levadura Manitol Agar) estéril, sólido o líquido (Somasegaran y Hoben, 1994) a 28°C por 7 días, excepto cuando se especifique.

2.2. Semillas e inoculantes

Se utilizó semilla de soja de una variedad comercial, ampliamente utilizada en las siembras, y previamente fue revisada por tamaño de grano homogéneo y sin otros daños visibles. En todos los experimentos se utilizaron inoculantes para soja comerciales vigentes (al momento de usarlos) obtenidos de 1 o más fabricantes de plaza. Antes de su uso se determinó el número de bradyrizobios/g o ml de inoculante (unidades formadoras de colonias, UFC) (Somasegaran y Hoben, 1994) de manera de comprobar su calidad.

2.3. Agroquímicos

Se eligieron productos recomendados y utilizados en las siembras de soja, así como otros no recomendados. Entre ellos los fungicidas C+T, Envion®, Maxim®, Cruiser® (fungicida e insecticida), Apron®, bioestimulantes con Mo (Fertyactil Leg® y Basfoliar CoMol®) y otros que resultaron de interés por distintas razones, repelente de aves (Draza®), polímeros para protección de semillas (presentado por Proquimur y Becker Underwood) y el fungicida y bactericida Sporekill®. Se obtuvo de la firma que lo comercializa una muestra del producto y una del colorante que tiene incorporado, ambas se evaluaron independientemente. Es un fungicida y bactericida de contacto que una vez

aplicado y seco se biodegrada rápidamente

(http://www.icaonline.co.za/PDFs/Sporekill_act29/Act_29%20Sporekill_leafleENG.pdf).

En cuanto a los otros productos, se obtuvieron las muestras mediante compra en plaza o en forma gratuita por solicitud a los distribuidores y/o representantes. Salvo que se especifique, los productos se utilizaron en las dosis y concentraciones recomendadas para su uso en semillas siguiendo las instrucciones técnicas correspondientes.

2.4. Estrategia de investigación

2.4.1. Efecto de productos agroquímicos en cepas de *Bradyrhizobium* spp.: medio de cultivo sólido

En este experimento se evaluaron agroquímicos con diferentes principios activos, algunos de los cuales contienen más de un compuesto químico (cuadro 3).

Cuadro 3: Agroquímicos utilizados en la evaluación de la sensibilidad de cepas de *Bradyrhizobium* spp. *in vitro* (medio sólido).

PRODUCTO	NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO
Fungicida	APRON [®]	Fludioxonil/ Metalaxil- M
Fungicida	C+T	Tiram / Carbendazim
Fungicida- insecticida	CRUISER [®]	Difenoconazole/ Fludioxonil / Tiametoxam
Fungicida	ENVION [®]	Metalaxil/ Carbendazim/Tiram
Fungicida	MAXIM [®]	Metalaxil- M/ Fludioxonil
Fungicida-bactericida	SPOREKILL [®]	cloruro de didecildimetilamonio
Colorante de fungicida	SPOREKILL	
Bioestimulante	BASFOLIAR COMOL SL. [®]	Solución nutritiva/ 0.2% Co/ 12% Mo
Bioestimulante	FERIACYL LEG [®]	Complejo Fertiactyl (secreto de fábrica) / Co/ Mo
Bioestimulante	STIMULANTE Mo [®]	Acido indolbutírico /acido giberélico /citocinina
Protector de semillas	BECKER UNDERWOOD	
Protector de semillas	PROQUIMUR	
Repelente de aves	DRAZA	Metiocarbamato

Para analizar la sensibilidad de las cepas U1301, U1302 y E109 a los agroquímicos se utilizó el método Kirby-Bauer de difusión en agar descrito por Rodríguez (2005). Se sembraron las cepas en medio EMA líquido y luego de crecidas en agitación a 28°C se homogenizó la turbidez de ellas a una densidad óptica (DO) de 0.8nm medida por espectrofotometría (Somasegaran y Hoben, 1994). Se sembraron por extensión completa en la superficie, 0,2 ml de cada cepa en placas de EMA. Las placas fueron incubadas a 28° por 48 h hasta observar un crecimiento inicial homogéneo de las

bacterias en ellas. Se colocaron sobre la superficie de las bacterias discos de papel de filtro embebidos con los agroquímicos en soluciones con tres concentraciones:

- 100% es el producto directamente como viene envasado en su forma comercial.
- 50% es el producto diluido a la mitad con agua destilada estéril.
- 25% un volumen de producto y tres de agua destilada estéril.

Las dos últimas concentraciones (50 y 25%) se evaluaron con la finalidad de conocer si aún diluido el producto podría ser tóxico para los bradyrizobios. Para cada concentración se realizaron tres repeticiones, los discos fueron embebidos con 0.03 ml en el caso de los bioestimulantes y 0.06 ml para el resto de los productos, debido a que presentaban una consistencia más viscosa y requirieron un mayor volumen para cubrir todo el disco. Luego de aplicado el producto el disco se escurrió en una placa de Petri estéril cuidando de descargar homogéneamente el líquido excedente. Finalmente se colocaron tres discos de cada concentración equidistantes en una placa y se las incubó en la estufa nuevamente. Se utilizó una pinza estéril para colocar los discos embebidos y se presionó suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar y las bacterias. Los discos de papel filtro tenían igual diámetro y se esterilizaron previamente en autoclave. Como tratamiento control se utilizó agua destilada estéril siguiendo la metodología descrita para los otros tratamientos.

Se determinó presencia o ausencia de halo inhibitorio de crecimiento de las cepas alrededor del disco y la dimensión en cm desde el borde del disco hasta donde comenzaba nuevamente el crecimiento, procurando la mayor exactitud visual posible. Esto se realizó a distintos tiempos de incubación luego de colocados los discos: 1, 3 y 5 días respectivamente. Con la finalidad de confirmar los resultados se realizó un nuevo experimento con todos los productos excepto con el Stmiluante® y el colorante del Sporekill® por falta de disponibilidad de material para su evaluación.

2.4.2 Efecto de productos agroquímicos en cepas de *Bradyrhizobium* spp. : medio de cultivo líquido

El objetivo de este ensayo fue determinar la toxicidad en el tiempo de agroquímicos en contacto directo con cepas de *Bradyrhizobium elkanii* y *B. japonicum* (item 2.4.1). Para los recuentos de las bacterias en medio de cultivo extracto de levadura manitol agar (EMA) líquido se utilizó el método de Miles and Misra (Somasegaran y Hoben, 1994) también conocido como recuento de viables en gota. Los agroquímicos estudiados fueron los siguientes:

Cuadro 4: Agroquímicos utilizados en la evaluación en contacto directo con cepas de Bradyrizobios en medio líquido.

PRODUCTO	NOMBRE COMERCIAL
Fungicida	Carbendazim + Tiram
Fungicida	Carbendazim + Tiram + Metalaxil
Fungicida	Metalaxil + Fludioxonil
Fungicida- bactericida	Cloruro de Didecildimetilamonio
Bioestimulante	Solución nutritiva Mo Co
Repelente de aves	Metiocarbamato

Los productos nombrados en el cuadro 4 fueron elegidos ya que formaron halo en el experimento con discos de papel excepto el fungicida Carbendazim, Tiram, Metalaxil –M que se incluyó como control negativo. El metiocarbamato se incluyó por su uso como repelente de aves. Las cepas se crecieron en tubos con medio EMA líquido a 28°C con agitación durante 5 días hasta que alcanzaron un crecimiento similar, 1.2 DO, determinado por espectrofotómetro. Luego se le añadió 1,25 ml de agroquímico (correspondiente al 25% del volumen inicial de los tubos). Esta concentración de producto es mayor a la utilizada en la práctica, pero se eligió por la alta concentración bacteriano en el caldo de cultivos.

Pasados 30 minutos de haber agregado los productos, se prepararon a partir de ellos diluciones seriadas. Se sembraron en placas con EMA, alícuotas de 0,02ml de las diluciones -6 -7 -8 y -9. Las determinaciones se realizaron a día cero y día tres de incubación. Las placas se incubaron a 28° por seis días. Se incluyó como tratamiento control un tubo con medio EMA líquido crecido con cada cepa pero sin producto. Todos los tratamientos se realizaron por segunda vez para confirmar los datos obtenidos.

Se contaron las colonias en cada tratamiento y se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml utilizando el promedio de las colonias contadas, las diluciones correspondientes y el volumen aplicado:

$$\text{UFC/ml} = \text{nº de colonias} * 1/\text{dilución} * 1/\text{volumen}$$

Los resultados se expresaron en log₁₀.

2.4.3. Protectores de semillas como posibles fuente de carbono para los Bradyrhizobios

Teniendo en cuenta los resultados de la evaluación de los protectores de semilla (especialmente en medio de cultivo sólido) fue de interés determinar si podían ser o no utilizados por los bradyrhizobios como fuente de C (Somasegaran y Hoben, 1994). Son polímeros cuya fórmula química no se conoce. Se eligieron dos productos comerciales disponibles, denominados (A) y (B). Se utilizó el medio mínimo sin fuente de C pero con añadido de los protectores o con manitol como control positivo, todos en matraces de 200ml. Se evaluaron las cepas en estudio, U1301, U1302 y E109 por extensión usando alícuotas de 0,2 ml. Las placas se incubaron a 28° durante siete días. El crecimiento bacteriano fue evaluado visualmente a día tres, cinco y siete comparando los dos productos con el control positivo y un control negativo (sin fuente de C).

Cuadro 5: Tratamientos utilizados para evaluar a los polímeros como posible fuente de C para Bradyrizobios.

n°	Tratamientos
1	Polímero A
2	Polímero B
3	Manitol
4	Sin fuente de C

2.4.4. Compatibilidad de productos agroquímicos con *Bradyrhizobium. spp* en semillas y en la nodulación de soja

2.4.4.1. Sobrevivencia de *Bradyrhizobium spp.* en semilla

Se analizó la compatibilidad del tratamiento de semilla de soja con un fungicida y un bioestimulante vegetal con inoculantes en turba y líquidos (de diferentes fábricas, a los que se les denominó A y B) y con la mezcla de cepas recomendadas en Uruguay (*Bradyrhizobium elkanii*, U1301 y U1302). Se incluyeron tratamientos con uso del fungicida 15 días antes de la inoculación en contraste con su uso en el momento de la inoculación. El bioestimulante se evaluó en la dosis que se recomienda (200ml/100kg de semilla) y en una dosis más alta (300ml/100kg de semilla).

Los tratamientos fueron los siguientes:

Cuadro 6: Tratamientos aplicados a semillas de soja para evaluar el efecto de la compatibilidad de agroquímicos con inoculantes.

n°	TRATAMIENTO
<u>INOCULANTE + FUNGICIDA</u>	
1	Inoculante turba A + fungicida 15 días
2	Inoculante turba A + fungicida 0 días
3	Inoculante líquido A + fungicida 15 días
4	Inoculante líquido A + fungicida 0 días
5	Inoculante turba B + fungicida 15 días
6	Inoculante turba B + fungicida 0 días
7	Inoculante líquido B + fungicida 15 días
8	Inoculante líquido B + fungicida 0 días
<u>INOCULANTE + BIOESTIMULANTE</u>	
9	Inoculante turba A + bioestimulante 200
10	Inoculante turba A + bioestimulante 300
11	Inoculante líquido A + bioestimulante 200
12	Inoculante líquido A + bioestimulante 300
13	Inoculante turba B + bioestimulante 200
14	Inoculante turba B + bioestimulante 300
15	Inoculante líquido B + bioestimulante 200
16	Inoculante líquido B + bioestimulante 300
<u>INOCULANTE + BIOESTIMULANTE + FUNGICIDA</u>	
17	Inoculante turba A + bioestimulante 300 + fungicida 15 días
18	Inoculante turba A + bioestimulante 300 + fungicida 0 días
19	Inoculante líquido A + bioestimulante 300 + fungicida 15 días
20	Inoculante líquido A + bioestimulante 300 + fungicida 0 días
21	Inoculante turba B + bioestimulante 300 + fungicida 15 días
22	Inoculante turba B + bioestimulante 300 + fungicida 0 días
23	Inoculante líquido B + bioestimulante 300 + fungicida 15 días
24	Inoculante líquido B + bioestimulante 300 + fungicida 0 días
<u>CONTROLES</u>	
25	Inoculante turba A
26	Inoculante líquido A
27	Inoculante turba B
28	Inoculante líquido B

Los tratamientos se prepararon con 200g de semilla de soja de la siguiente manera:

- a) Semillas en bolsa plástica y se agregó el fungicida que se dejó secar 10 minutos y luego se inoculó con turba o líquido (tratamiento 0 día), mientras que en el tratamiento de 15 días, el fungicida se aplicó y se dejó 15 días antes de inocular la semilla con los mismos inoculantes.
- b) Semilla en bolsa con bioestimulante según dosis e inoculación con líquido o turba.
- c) Semilla en bolsa con fungicida, espera de 15 días, añadido de bioestimulante en alta dosis seguido de inoculación con turba o líquido.

El principio activo del fungicida utilizado fue Carbendazim (250 g/l) + Tiram (100 g/l) + Metalaxil (50 g/l) y el bioestimulante es una solución nutritiva con Co y Mo. Los volúmenes aplicados a las semillas fueron los recomendados por el fabricante de cada producto, los cuales se describen a continuación:

- Inoculante en turba 4 g/kg + 20ml/kg agua destilada + 0.25g/kg de adhesivo.
- Inoculante líquido 2ml/kg + 5ml/kg agua destilada
- Fungicida 2ml/kg
- Bioestimulante "200" 2ml/kg
- Bioestimulante "300" 3ml/kg

En todos los tratamientos las bolsas se agitaron manualmente y con cuidado luego de añadidos los productos con el fin de que todas las semillas se recubrieran homogéneamente con ellos.

La evaluación de la compatibilidad se obtuvo con la determinación de la sobrevivencia de los bradyrhizobios en las semillas, por el método de recuento en placas (UFC/semilla) (Somasegaran y Hoben, 1994). Los recuentos se realizaron a cero, uno, dos, tres y siete días después del tratamiento a las semillas. Para esto se contaron 100 semillas de cada tratamiento, se colocaron asépticamente en frasco con 90 ml de agua destilada estéril y se agitó durante 10 minutos en agitador circular eléctrico. Luego se realizaron cuatro diluciones seriadas al décimo, de las cuales se sembraron 3 de ellas por duplicado. La siembra en placas con medio EMA fue por extensión con un volumen de 0,2 ml. Se incubaron a 28° durante 7 días. Se calculó las UFC/semilla en cada tiempo (fórmula pág. 18) y los resultados se expresaron en logaritmo.

2.4.4.2. Evaluación de la nodulación

Se utilizaron las semillas de los tratamientos anteriores (2.4.4.1) para evaluar algún efecto en la nodulación y en el desarrollo radical de plántulas, esto sólo en el caso del bioestimulante vegetal. El diseño del experimento fue completamente al azar, se añadió un control sin inoculante y otro con nitrógeno químico, equivalente a 200kg/ha.

Se utilizaron macetas de 330cc con suelo extraído en el Departamento de Lavalleya de una chacra sin historia de soja. Se analizó el contenido de nitrato (laboratorio de Facultad de Ciencias) y se lo mezcló 1:1 con arena dado que el contenido de nitrato era de medio a alto, antes de su esterilización en autoclave. Las semillas de los tratamientos preparados se sembraron, 3 semillas/maceta

utilizando guantes para que no se contamine con otro tratamiento. Se realizaron dos siembras; una el mismo día de aplicado los tratamientos sobre las semillas (día cero) y la segunda 72h después de haber aplicado los tratamientos (día 3). Para cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones.

A los 7 días de la siembra se realizó un raleo dejando una planta por maceta y se cubrió la superficie con perlas de vidrio estériles para conservar la humedad y para evitar contaminaciones. Las plantas se mantuvieron en cuarto de luz (12 horas de luz y 12 de oscuridad) con condiciones de temperatura (21°C) y humedad controladas. El riego se realizó día por medio vertiendo agua destilada en los platos de las macetas.

La cosecha se realizó 40 días después de la siembra, se procedió extrayendo las plantas de forma cuidadosa de las macetas, humedeciendo la tierra para evitar el desprendimiento de los nódulos. Se determinó el número de nódulos por raíz, su ubicación y el color de su interior para detectar presencia de Leghemoglobina. Los nódulos y las raíces se colocaron en estufa a 60° hasta peso constante. Se obtuvo peso seco de nódulos (PSN), y el peso seco de la raíz (PSR) utilizando una balanza de precisión.

2.4.5. Estudio de la mortandad de bradyrizobios; ejemplo práctico

Este ensayo se realizó con el fin de conocer y repetir, en condiciones de laboratorio, el efecto que tiene sobre los bradyrizobios, la mezcla en un mismo recipiente del inoculante y un fungicida (Carbendazim (250 g/l) + Tiram (100 g/l) Metalaxil (50 g/l)) previo a la siembra. Las dosis utilizadas fueron las recomendadas por los fabricantes. Se utilizó inoculante comercial en sus dos presentaciones turba y líquido, con el objetivo de evidenciar si el soporte en el que se encuentran las bacterias tenía alguna influencia en los resultados cuando el procedimiento era simultáneo. Los tratamientos fueron:

Cuadro 7: Tratamientos 1 y 2 con fungicida e inoculante en un mismo recipiente, 3 y 4 controles con empleo diferido del inoculante y del fungicida.

n°	TRATAMIENTOS
1	Inoculante en turba + fungicida en un mismo recipiente
2	Inoculante líquido + fungicida en un mismo recipiente
3	Inoculante en turba + fungicida por separado
4	Inoculante líquido + fungicida por separado

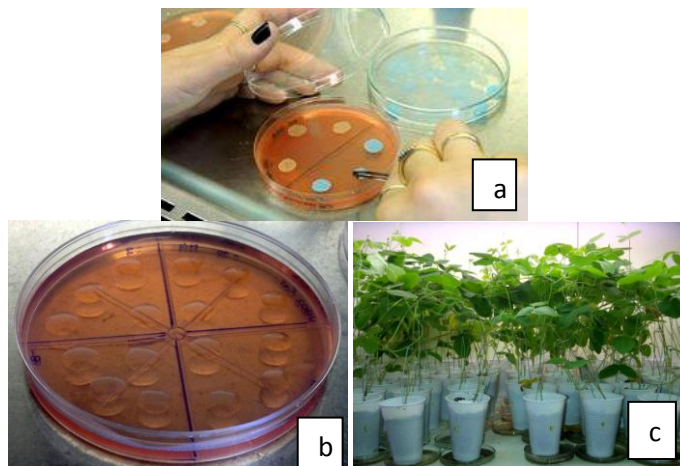
La preparación de los tratamientos en el laboratorio se realizó en forma semejante a la realizada por el agricultor en el momento de la siembra en su chacra. Se pesaron 4 bolsas con 200g de semillas de soja, y se le aplicó a cada una de ellas uno de los tratamientos especificados en el cuadro 7. A los tratamientos 1 y 3 se les añadió el fungicida, se esperó diez minutos para que seque y luego se inoculó. Las cantidades de inoculante, agua y adhesivo en el caso de la turba y fungicida fueron las recomendadas por el fabricante (detalladas en 2.4.4).

Se determinó el efecto de los 2 tipos de inoculación, simultánea y diferida, sobre la densidad de bradyrizobios en las semillas por el método de recuento en placas (UFC/semilla) (Somasegaran y Hoben, 1994) en forma similar a la descrita para otros ensayos. Los recuentos se realizaron a día cero, uno y tres, se calculó las UFC/semilla (fórmula pág. 17) y los resultados se expresaron en $\log_{10}$

2.4.6 Análisis estadístico

Los datos de número y peso seco de nódulos fueron analizados por análisis de varianza (ANAVA), y las medias de los tratamientos fueron comparadas utilizando la prueba Duncan α : 0,05 (InfoSat, 2008).

Figura 1: a) placa de petri con disco embebido con fungicida utilizando el método Kirby- Bauer, b) recuento bacteriano utilizando el método Miles and Misra, c) plantas en cuarto de luz



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto de productos agroquímicos en cepas de *Bradyrhizobium* spp.: medio de cultivo sólido

Se determinó la sensibilidad de las cepas para soja recomendadas en los inoculantes uruguayos (*Bradyrhizobium elkanii*, U1301 y U1302) y argentinos (*B. japonicum* E109) a distintos agroquímicos. Es decir determinar el efecto tóxico directo por contacto con productos comerciales como fungicidas e insecticidas y otros químicos no controladores de plagas.

Fungicidas

La sensibilidad de las bacterias a los fungicidas por difusión en agar dió resultados variables según el químico sintético tal como se describe a continuación.

Sin formación de halo: los curasemillas Cruiser® (Difenoconazole/ Fluidioxonil / Tiametoxam), Envion® (Metalaxil/ Tiram/ Carbendazim) y Apron® (Fludioxonil/ Metalaxil- M) no afectaron el crecimiento de las 3 cepas de bradyrizobios en estudio, independientemente de la concentración de fungicida usada y hasta 5 días luego de la aplicación (no se presentan los resultados). Estos resultados indicarían que esos fungicidas no serían tóxicos para las 3 cepas con la metodología utilizada.

Formación de halo < 1cm: el fungicida Maxim® (Fludioxonil/ Metalaxil- M) presentó halo de inhibición luego de 72 h de aplicado el disco embebido. Los halos fueron < 0.1 cm en el caso de las cepas E109 y U1302 y de 0.3cm para la cepa U1301 (cuadro 8) (Figura 2a). Este fungicida tiene toxicidad para los bradyrizobios, probablemente al no haberse observado inicialmente signifique que no se difunde bien en agar o que no es de alta toxicidad.

Los fungicidas tienen en común el Metalaxil como principio activo, son los que en este ensayo generaron menor efecto negativo a los bradyrizobios, esto coincide con los resultados obtenidos por L. Olviera (2013). Para confirmar que el Metalaxil no tiene un efecto marcado sobre los bradyrizobios debería confirmarse mediante su aplicación en semillas y en plantas. Esto último está basado en el hecho de que algunos autores afirman que si bien en menor medida el Metalaxil afectan la sobrevivencia bacteriana (Kyei-Boahen et. al., 2001; Revellin et. al., 1993). Por cuestiones de tiempo y capacidad solo se evaluará uno de ellos el Envion®.

Cuadro 8: Valores medios (tres repeticiones) de amplitud de halo de inhibición (cm) de crecimiento de cepas de *Bradyrhizobium* spp. en contacto con los fungicidas C+T, Sporekill, colorante del Sporekill y Maxim en medio de cultivo sólido.

PRODUCTO	NOMBRE	ESPECIE	CEPA	[]*	Halo día 1	Halo día 3	Halo día 5
FUNGICIDA	C + T	<i>B.elkanii</i>	U-1301	100	0	0	0,7
				50	0	0	0,6
				25	0	0	0,4
			U-1302	100	0	0	0,7
				50	0	0	0,7
				25	0	0	0,5
		<i>B. japonicum</i>	E-109	100	0,2	0,2	0,4
				50	0,1	0,2	0,2
				25	0,1	0,2	0,2
	SPOREKILL	<i>B.elkanii</i>	U-1301	100	0,4	0,5	0,7
				50	0,3	0,4	0,6
				25	0,2	0,3	0,6
			U-1302	100	0,4	0,6	0,7
				50	0,3	0,4	0,6
				25	0,2	0,3	0,7
		<i>B. japonicum</i>	E-109	100	0,4	0,6	1,3
				50	0,4	0,7	1
				25	0,3	0,5	0,6
	COLORANTE SPOREKILL	<i>B.elkanii</i>	U-1301	100	0	0	0
				50	0	0	0
				25	0	0	0
			U-1302	100	0	0	0
				50	0	0	0
				25	0	0	0
		<i>B. japonicum</i>	E-109	100	0	0	0
				50	0	0	0
				25	0	0	0
	Maxim	<i>B.elkanii</i>	U-1301	100	0	0	0
				50	0	0,3	0,3
				25	0	0,3	0,3
			U-1302	100	0	0	0
				50	0	0	0
				25	0	0,1	0,1
		<i>B. japonicum</i>	E-109	100	0	0	0
				50	0	0	0
				25	0	0,1	0,1

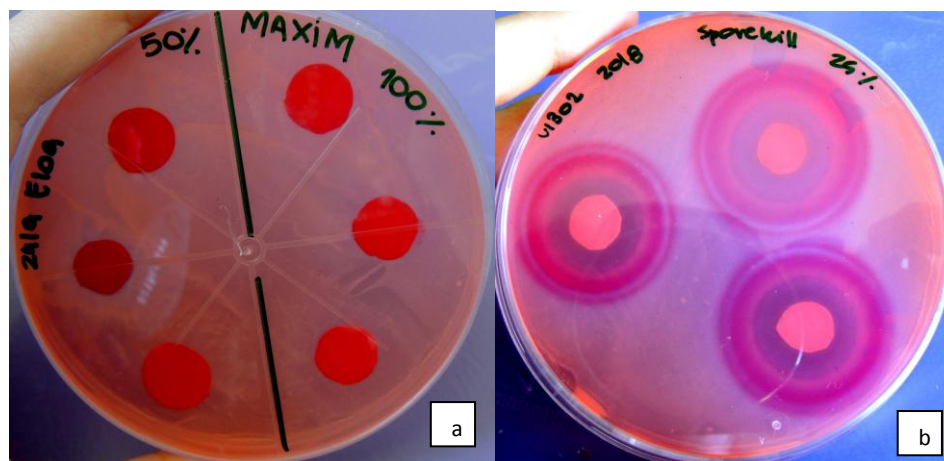
*concentración del producto: 100%, 50% y 25% v/v en agua.

Formación de halo > 1cm: los fungicidas que mostraron mayor efecto tóxico fueron C + T (Carbendazim + Thiram) y Sporekill® (Cloruro de didecildimetilamonio). El fungicida C+T inhibió el crecimiento de E109 y el de U1301 y U1302 posteriormente (5 días) (Cuadro 8). Es un producto tóxico para los bradyrizobios y es interesante la diferencia observada entre las cepas. Esto último

indica diferencias en susceptibilidad concordando con los resultados de Revellin et. al. (1993) obtenidos en otras cepas.

El fungicida y bactericida Sporekill® al contacto resultó más tóxico para los bradyrizobios que el C+T. Produjo un marcado efecto negativo en el crecimiento bacteriano desde el primer día de su aplicación y fue aumentando al transcurrir los días (Figura 2b). Las tres cepas se vieron afectadas de manera muy similar entre sí (Cuadro 8).

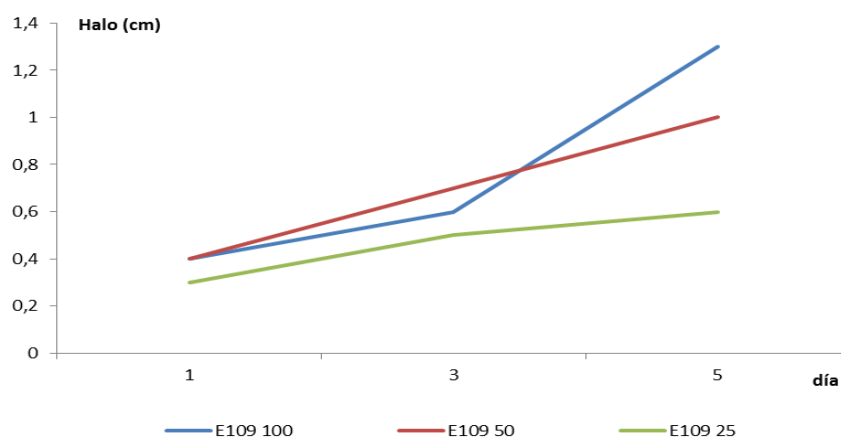
Figura 2: a) placas de petri con discos con Maxim sin halo de inhibición del crecimiento bacteriano, b) discos con Sporekill con halos de inhibición del crecimiento de bradyrizobios.



Por otra parte, la variación de la concentración del producto Sporekill produjo una diferencia en la mortalidad bacteriana. El producto sin diluir (100%) tal como se recomienda su uso, produjo halos de mayor amplitud alrededor de los discos (Cuadro 8). Aparentemente el principio activo, el adyuvante y/o moléculas inertes que lo componen son los posibles componentes tóxicos para los bradyrizobios. La prueba realizada sólo al colorante del Sporekill no produjo halo de inhibición, reafirmando la suposición de que el daño se debe al principio activo del producto (Cuadro 8).

Para una mejor visualización del efecto tóxico del producto, en el gráfico 1 se muestra el efecto del fungicida a diferentes tiempos de contacto con la cepa E-109 y a diferentes concentraciones del producto. Aún en la dilución más alta (25%) hay un efecto negativo sobre los bradyrizobios que aumenta en el tiempo.

Grafico 1. Toxicidad del fungicida Sporekill aplicado en la inoculación de semillas de soja en concentraciones de 100%, 50% y 25% del producto. Valores de amplitud de halo de inhibición de crecimiento (cm) de *Bradyrhizobium japonicum* E109.



Por otra parte, cabe mencionar que el Sporekill es un producto también recomendado como bactericida en cítricos, desinfección de maquinaria y fungicidas para algunas leguminosas como frijol y arvejas (http://www.icaonline.co.za/PDFs/Sporekill_act29/Act_29%20Sporekill_leafleENG.pdf).

Se observó además que la mortalidad que ocasionan los productos es distinta en términos de números a pesar de que compartan los principios activos, tal es el caso del C+T el cual produce halo y el Envion® no, cuando ambos contienen Carbendazim y Tiram. Seguramente entran otras moléculas en la composición química de ellos que marcan las diferencias. Resultados de evaluaciones de fungicidas en semilla inoculada han mostrado que el principio activo Metalaxil y Metalaxil-M aparentemente tienen menor toxicidad para rizobios de leguminosas forrajeras (L. Olivera, comunicación personal).

Bioestimulantes vegetales

Los bioestimulantes son productos sintéticos constituidos por una gran variedad de componentes, vitaminas, fitohormonas, elementos trazas, etc. y recomendados para la promoción del desarrollo vegetal en soja y otros cultivos. En este estudio se evaluaron 3 productos químicos sintéticos comerciales: Estimulante Mo®, Basfoliar COMOL® y Fertiactyl® (Leg). Los dos primeros no fueron tóxicos para las cepas U1301, U1302 y E109 (datos no presentados) ya que no se observaron halos de inhibición de proliferación de Bradyrhizobios alrededor de los discos.

Al igual que en el caso de los fungicidas, se obtuvieron diferencias en la sensibilidad de las cepas estudiadas. La cepa U-1302 no fue afectada por F-Leg, mientras que las otras si (Cuadro 9).

Cuadro 9: Valores medios (tres repeticiones) de amplitud de halo de inhibición (cm) de crecimiento de cepas de *Bradyrhizobium* spp. en contacto con el bioestimulante Fertytacil (Leg) en medio de cultivo sólido.

PRODUCTO	NOMBRE	ESPECIE	CEPA	[I]*	Halo día 1 **	Halo día 3	Halo día 5
BIOESTIMULANTE	LEG	<i>B. elkanii</i>	U-1301	100	0	0	≥0,1
				50	0	0	≥0,1
				25	0	0	≥0,1
		<i>B. elkanii</i>	U-1302	100	0	0	0
				50	0	0	0
				25	0	0	0
		<i>B. japonicum</i>	E-109	100	0	0	0
				50	0	≥0,1	0
				25	0	≥0,1	0

*concentración del producto: 100%, 50% y 25% v/v en agua.

Cuando el experimento fue repetido se encontró que los halos formados en E109 mantuvieron hasta el día 5. De todas maneras, podemos asumir que con esta metodología el bioestimulante no sería un producto de alta toxicidad para las bacterias, esto también fue constatado por Jacob- Neto (1998).

Protectores de semillas

Los protectores de semillas que se comercializan en nuestro país, son polímeros recomendados para proteger a las semillas de otros productos químicos que las puedan afectar. No hay información disponible si afectan o no la densidad de bradyrizobios al entrar en contacto con ellos en la inoculación de las semillas. La falta de información y en un primer intento de evaluación directa se los incluyó en la prueba de difusión en agar.

Cuadro 10: Valores medios (tres repeticiones) de amplitud de halo de inhibición (cm) de crecimiento de cepas de *Bradyrhizobium* spp. en contacto con dos protectores de semillas comerciales (A y B) en medio de cultivo sólido.

PRODUCTO	NOMBRE	ESPECIE	CEPA	[I]*	Halo día 1	Halo día 3	Halo día 5
POLÍMEROS	A	<i>B. elkanii</i>	U-1301	100	0,4	0	0
				50	0,3		
				25	0,2		
			U-1302	100	0,3		
				50	0,3		
				25	0,3		
	B	<i>B. elkanii</i>	U-1301	100	0,5	0	0
				50	0,4		
				25	0,2		
			U-1302	100	0,4		
				50	0,3		
				25	0,2		

*concentración del producto: 100%, 50% y 25% v/v en agua.

Estos dos productos tuvieron resultados diferentes al resto de los agroquímicos ya mencionados. Como se puede observar en el cuadro 10 ambos polímeros mostraron con las 3 cepas halo de inhibición a las 24h de contacto con las bacterias. El efecto inhibitorio fue marcado dentro de las 24h y dependió de la concentración del producto.

Un aspecto llamativo del experimento fue que a las 72h de añadido el producto, los halos no se observaban visualmente en forma nítida si no que en la zona delimitada por ellos había un sobre crecimiento bacteriano o marcada proliferación de bacterias alrededor del disco. Este resultado llevó a pensar una utilización metabólica del mismo. Debido a este resultado se planteó la hipótesis de que los bradyrizobios pudiesen estar utilizando algún componente de los protectores de semilla como fuente de carbono (C), para lo cuál se diseñará un nuevo experimento probandolo como fuente de C.

Repelente de aves

El insecticida en polvo Draza® es recomendado para repeler aves, principalmente palomas en cultivos de soja (<http://cropscience.bayer.com.uy/soluciones-bayer/p229-draza>). Los resultados de su contacto con las bacterias en el tiempo, demostraron que este producto no inhibe su crecimiento de las cepas de Bradyrhizobios estudiadas en medio de cultivo sólido (datos no presentados).

En resumen, el método de difusión en agar permitió detectar fungicidas que son tóxicos para las cepas de bradyrizobios que integran los inoculantes nacionales de soja y como no tóxicos otros fungicidas y un insecticida usado como repelente de palomas. El método no es tan útil en definir resultados para el tipo de productos como los bioestimulantes vegetales y protectores de semillas evaluados en este trabajo.

Muchos factores o variables interactúan a la hora de formar una zona o halo de no proliferación bacteriana, entre ellos: concentración del producto, sensibilidad bacteriana, coeficiente de difusión del producto en el agar, tiempo y temperatura de incubación, pH y composición del medio, cantidad de medio en las placas y tamaño del inóculo (Ramirez y Marin, 2009). Por lo tanto, el diámetro del halo de inhibición no es una medida absoluta del efecto ocasionado. Es recomendable estandarizar la metodología para estos productos de manera de tener resultados reproducibles. De cualquier manera, es un método sencillo y de relativa utilidad para hacer una primera selección y clasificación de los productos cuando son numerosos. En nuestro caso permitió diferenciar que los productos Cruiser, Envion, Apron, Draza Estimulante, Basfoliar, y el colorante de Sporekill no afectan cualitativamente la proliferación de los bradyrizobios estudiados.

3.2 Efecto de productos agroquímicos en cepas de *Bradyrhizobium* spp.: medio de cultivo líquido

Se evaluó el efecto de algunos agroquímicos sobre la sensibilidad de las bacterias crecidas en medio líquido en diferentes tiempos. Se eligieron los agroquímicos teniendo en cuenta los que tuvieron o no efecto negativo sobre la viabilidad de los bradyrizobios en medio sólido y otros por sus características particulares, incluyendo fungicidas, un insecticida y un bioestimulante vegetal.

En el cuadro 11 se presentan los valores de Log₁₀ UFC/ml de medio de cultivo de las cepas a los 30 min y 72 horas de incorporados los productos a cultivos con alta concentración de bacterias (>1.0 x 10⁸ células viables) de las 3 cepas en estudio.

Cuadro 11: Valores medios de Log₁₀ UFC/ml de cepas crecidas de *Bradyrhizobium* spp. a los 30 min. y 72 horas de la incorporación de diferentes agroquímicos (4 repeticiones/tratamiento).

PRODUCTO	NOMBRE	ESPECIE	CEPA	30min (Log10) ± E.E*	72h (Log10) ± E.E
FUNGICIDA	ENVION®	<i>B. elkanii</i>	U1301	11,2 ± 0.24	0 ± 0
			U1302	9,7 ± 0.07	0 ± 0
		<i>B. japonicum</i>	E109	10 ± 0.32	0 ± 0
	MAXIM®	<i>B. elkanii</i>	U1301	11,3 ± 0.17	0 ± 0
			U1302	12,0 ± 0.07	0 ± 0
		<i>B. japonicum</i>	E109	11,9 ± 0.16	0 ± 0
	C + T®	<i>B. elkanii</i>	U1301	12,1 ± 0.02	10,6 ± 0.02
			U1302	11,9 ± 0.04	10,7 ± 0.04
	SPOREKILL®	<i>B. elkanii</i>	U1301	0 ± 0	0 ± 0
			U1302	0 ± 0	0 ± 0
		<i>B. japonicum</i>	E109	0 ± 0	0 ± 0
REPELENTE DE AVES	DRAZA®	<i>B. elkanii</i>	U1301	11,3 ± 0.03	11,5 ± 0.33
			U1302	11,3 ± 0.22	10,4 ± 0.22
		<i>B. elkanii</i>	E109	11 ± 0.43	9,2 ± 0.43
BIOESTIMULANTE	LEG®	<i>B. elkanii</i>	U1301	11,2 ± 0	12,6 ± 0
			U1302	11,6 ± 0.02	12,7 ± 0.02
		<i>B. japonicum</i>	E109	11,5 ± 0	12,6 ± 0
CONTROL	Sin agroquímico	<i>B. elkanii</i>	U1301	11,3 ± 0.15	11,6 ± 0.11
			U1302	12,3 ± 0.28	12 ± 0.17
		<i>B. japonicum</i>	E109	11,3 ± 0.05	11,2 ± 1.81

*E.E: error estandar

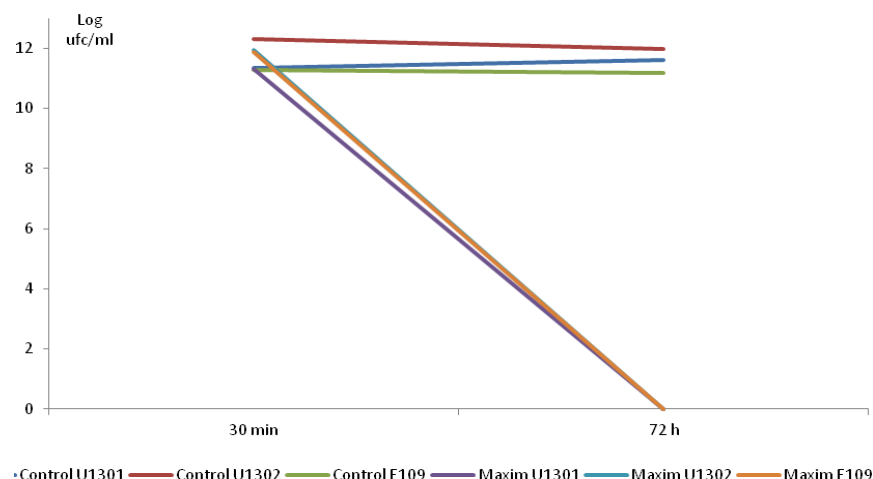
Fungicidas

El fungicida Enviñ® produjo mortalidad en los cultivos de las 3 cepas a los 30 min. de haber sido añadido: 1% para U-1301, 21% para U-1302 y 11% para E-109. Este producto mostró diferencias significativas entre las cepas y en el gráfico 2 se observa con mayor claridad su toxicidad con cada una de ellas.

El fungicida Maxim® no tuvo efecto de inhibición en las 3 cepas comparado con el control a los 30min de contacto, ni evidenció diferencias significativas entre las cepas (cuadro 11). Pero, ambos ocasionaron una mortalidad bacteriana total en los cultivos de las cepas a las 72 horas.

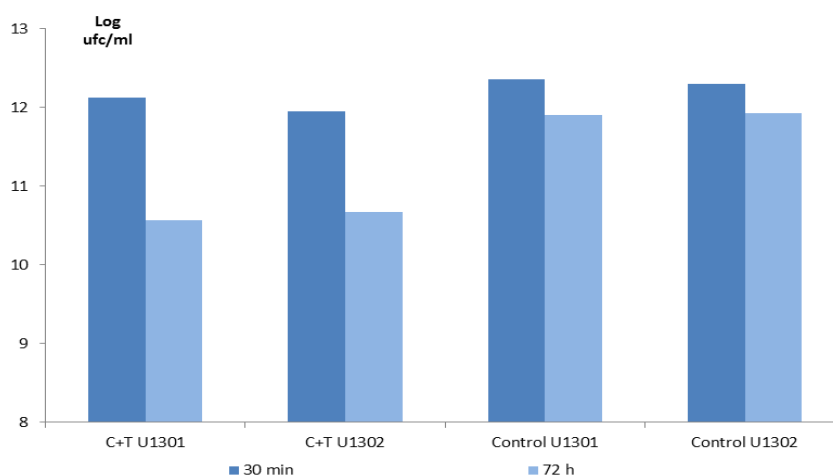
El Sporekill® fue altamente tóxico para las 3 cepas a los 30 min (cuadro 11) de añadido a los cultivos. Estos resultados coinciden con los del ensayo de difusión en agar, donde el producto formó halos de inhibición luego de 24 h de su aplicación (cuadro 10).

Gráfico 2: Log₁₀ UFC/ml de *Bradyrhizobium* spp. U1301, U1302 y E109 a los 30 min. y 72 horas de la incorporación del fungicida Envion.



El fungicida C+T es por sus características físico-químicas difícil de manipular en el laboratorio, en especial para realizar los recuentos de bacterias. El resultado a 30 min no mostró diferencias en Log₁₀ UFC/ml comparado con el control de las cepas U-1301 y U-1302 (cuadro 11). En los recuentos a las 72h se obtuvo una reducción de células vivas de 11% para la cepa U-1301 y de 10% para U-1302 (estos porcentajes están elaborados con sus respectivos controles, datos no presentados). Al mismo tiempo, se observaron colonias de color anaranjado, de aspecto gomoso, borde irregular y mayor tamaño que las colonias típicas de las cepas U-1301 y U-1302, incluso diferentes a las obtenidas en los recuentos realizados a los 30min. Por interés en comprobar las diferencias en las colonias, el ensayo se repitió y se volvió a observar la morfología atípica de las mismas. Los datos se grafican para una mejor observación del efecto del fungicida (gráfico 3).

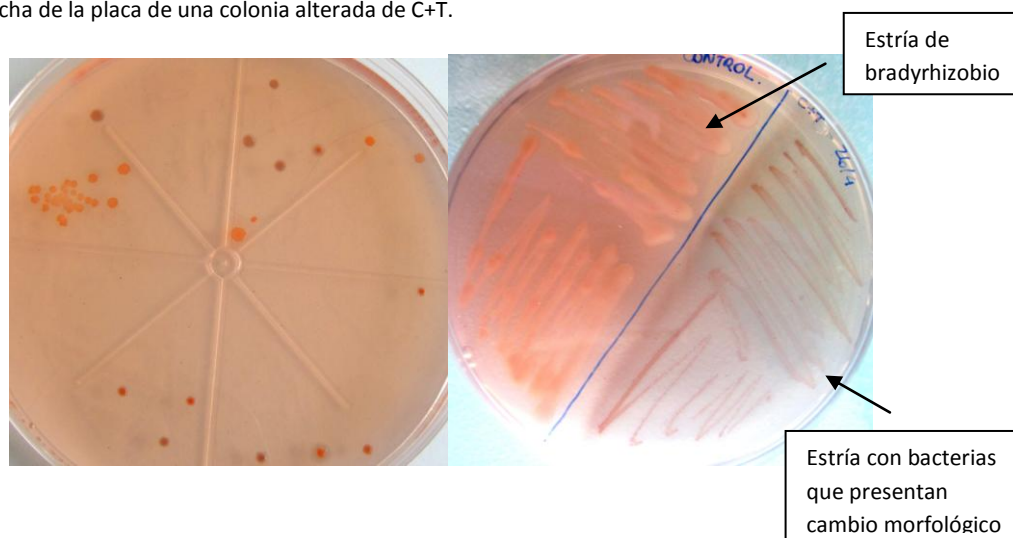
Gráfico 3: Recuento Log₁₀ ufc/ml de *Bradyrhizobium elkanii* U-1301 y U-1302 en contacto con el fungicida C+T por 30 min y por 72horas.



Como se aprecia en el gráfico 3 hubo un efecto tóxico del fungicida a las 72h de incorporado para ambas cepas comparado con el control. La morfología de las colonias de ambas bacterias fue

nuevamente atípica como en los ensayos previos. Para conocer si el cambio morfológico era por el contacto con el producto o un cambio más permanente, se repicaron varias colonias en medio de cultivo sólido, observándose la misma morfología. De acuerdo con lo observado, este producto afecta la morfología de las colonias y quizás algunas otras características de importancia agronómica. Estos resultados concuerdan con Andrés (1996), quien evaluó la sobrevivencia de *B. japonicum* en medio líquido con distintas concentraciones de Tiram, encontrando la reducción en la sobrevivencia y el cambio morfológico en las colonias. Posteriormente Dunfield (1999) evidenció un efecto negativo para rizobios en cultivo de arvejas (*Pisum sativum*), sin embargo no encontró alteración en la nodulación o la FBN.

Figura 3: a) morfología de colonias de bradyrizobios alteradas por C+T b) repique de una colonia normal de bradyrizobio y en la mitad derecha de la placa de una colonia alterada de C+T.



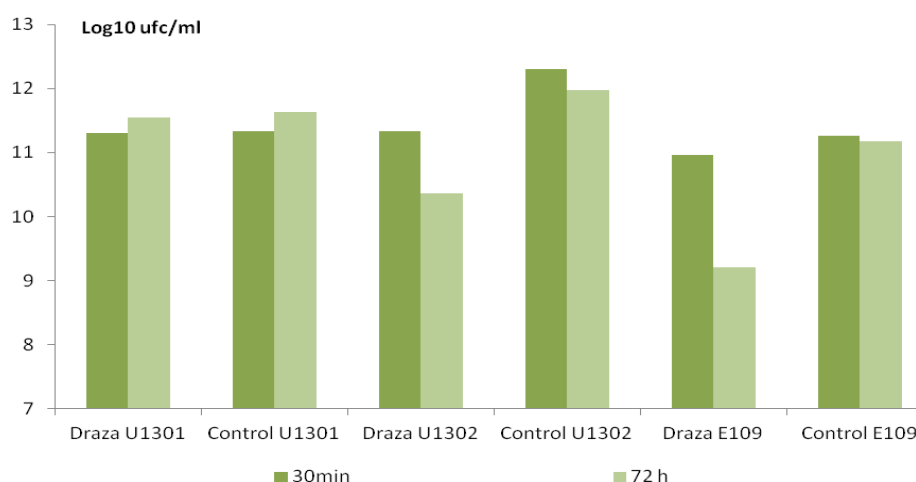
En resumen, las cepas de bradyrizobios U-1301 y U-1302 recomendadas en los inoculantes de soja son sensibles a los fungicidas estudiados al igual que E-109 recomendada en los inoculantes argentinos para soja. Las bacterias presentaron mayor o menor efecto tóxico de los productos, según los tiempos de contacto, a las 72h hubo un efecto negativo marcado. Habría que comprobar si la mortandad pudo ocurrir antes de las 72 horas de contacto (cuadro 11) y ver si fue gradual, como aparentemente ocurriría con el fungicida Envion® a los 30 min.

El Sporekill® mostró su toxicidad en ambos métodos de evaluación (medio sólido y líquido) por lo que es evidente que no debe utilizarse en semillas inoculadas.

Insecticida como repelente de aves

El repelente de aves Draza® es recomendado para agregarlo a la semilla de soja antes de la siembra a fin de reducir el daño por las palomas. Tiene aproximadamente 2 años de presencia activa en el mercado presentado en polvo y más recientemente en líquido (gráfico 4).

Gráfico 4: Recuento Log_{10} ufc/ml de *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302 y *B. japonicum* E109 en contacto con el agroquímico Draza por 30min y por 72 horas.



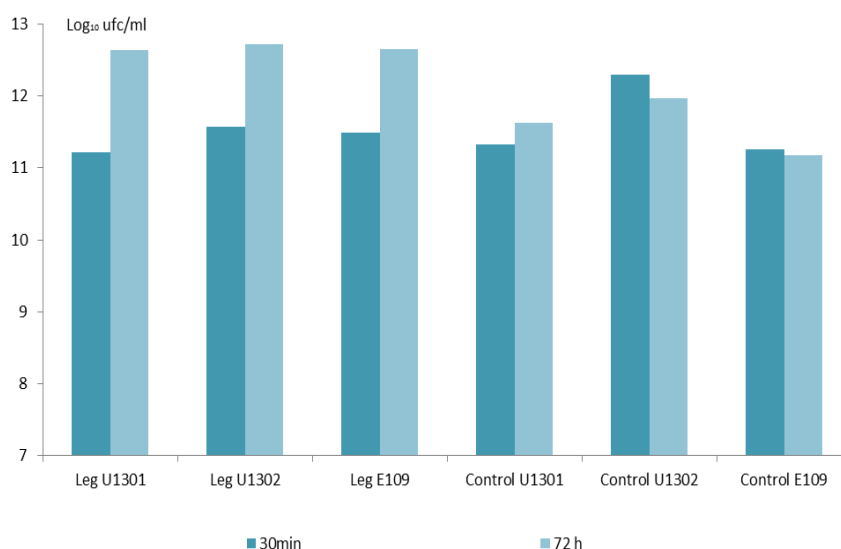
La viabilidad de U-1301 no fue afectada por el contacto directo con el repelente (Gráfico 4), mientras que U-1302 y E-109 mostraron mayor sensibilidad con disminución más marcada comparado con sus respectivos controles en el número bacteriano a los 30min y 72h de incorporado el producto. La sensibilidad de las cepas a este producto es: E109>U1302>U1301.

En la bibliografía no se encontraron resultados de estudios previos con este producto en relación a la inoculación.

Bioestimulante

El bioestimulante Fertyactil Leg® se recomienda para varios cultivos, entre ellos soja, como promotor del crecimiento vegetal. En el ensayo anterior (ítem 3.1.2) este producto formó halo de inhibición del crecimiento bacteriano muy pequeño, resultado que se consideró insignificante dado que había aparecido después de 72h de incubación y con un halo <0,1cm. En el gráfico 5 se observa el efecto de este producto una vez en contacto directo en medio líquido con las cepas en estudio, a los 30min y 72 horas.

Gráfico 5: Recuento Log_{10} ufc/ml de *Bradyrhizobium elkanii* U-1301 y U-1302 y *B. japonicum* E-109 en contacto con el bioestimulante Fertiyactil Leg por 30min y por 72 horas.



La incorporación del bioestimulante a los cultivos crecidos de las cepas dió como resultado aumento en el número bacteriano a las 72 horas comparado con los controles respectivos (gráfico 4). Esto fue observado, en forma similar, con los polímeros en el experimento de difusión en medio de cultivo sólido (ítem 3.1). Ambos resultados indicarían un efecto en favorecer la multiplicación de los bradyrizobios que podría ameritar nuevos experimentos.

El bioestimulante es una solución de nutrientes destinados a la planta y que contiene molibdeno para favorecer la nodulación en las leguminosas. Si bien no se puede predecir o saber con certeza a que se debe dicho crecimiento bacteriano, es probable que al transcurrir los días de cultivo, los nutrientes del medio en el tratamiento control se fueran agotando y esto comprometiera el crecimiento bacteriano, mientras que el bioestimulante agregado aportaría nuevos nutrientes, enzimas, hormonas, etc. que podrían ser metabolizadas.

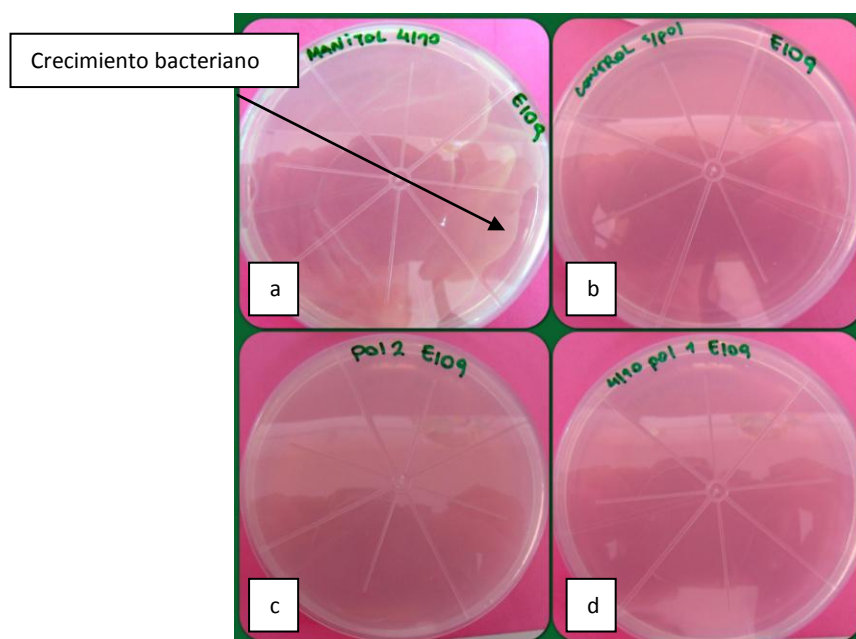
Los resultados hasta esta etapa evidenciaron la importancia de evaluar los productos químicos sintéticos comerciales antes de su recomendación, durante o después de la inoculación de las semillas de soja y de otras leguminosas. La razón es que se pueden tener pérdidas significativas en el rendimiento de los cultivos ya que es bien conocido que existe una proporcionalidad entre baja densidad de bradyrizobios, menor fijación biológica de nitrógeno y productividad. Es evidente que de los productos analizados, los fungicidas son los compuestos químicos sintéticos a los cuales los bradyrizobios son más sensibles, sin descartar los otros que igualmente pueden traer problemas más leves de mortandad bacteriana.

3.3. Protectores de semillas como posibles fuentes de carbono

El crecimiento de las cepas U-1301, U-1302 y E-109 en medio sólido con y sin incorporación de polímeros permitió evaluar cualitativamente si alguna de las cepas en estudio utilizaba a los protectores de semilla como fuentes de C alternativa al manitol. Las tres cepas de bradyrizobios

mostraron inicio de crecimiento a los 3 días de la siembra en medio con manitol y sin manitol pero con cada polímero, así como con el control negativo. Esto se debe probablemente a que los inoculantes preparados en EMA líquido contienen C, lo que permitió que las bacterias crecieran igual que en el control negativo (sin fuente de C). A los 5 días de incubación, se observó menor crecimiento en el control negativo y en los polímeros y un aumento en el medio con manitol. A día 7 este resultado fue visible y definido, no hubo crecimiento porque se agotó la fuente de C del inoculante líquido y las bacterias no la sustituyeron por alguna disponible en los polímeros. En las fotos 4 se muestra el crecimiento en manitol de la cepa E-109.

Figura 4: Fuente de carbono utilizada para el crecimiento en placa de *B. japonicum* E-109
a) manitol b) polímero A c) polímero B d) control negativo.



De este ensayo se puede concluir que las bacterias no mostraron capacidad de utilizar los polímeros como fuente de C.

3.4 Compatibilidad de productos agroquímicos con *Bradyrhizobium*. spp en semillas y en la nodulación de soja

En esta fase complementaria, el objetivo fue conocer la acción de algunos agroquímicos añadidos al momento o separados de la inoculación de las semillas, así como posibles diferencias en los datos por uso de inoculante en turba o líquido. Para esto se estudió la sobrevivencia de las cepas en semillas tratadas y la nodulación en raíces de plántulas.

3.4.1 Sobrevivencia de *Bradyrhizobium* spp. en semillas

Fungicida

Una de las interrogantes en el tema de agroquímicos en soja es conocer si es necesario, desde el punto de vista de la viabilidad de los bradyrizobios, separar el curado de la inoculación de la semilla. Actualmente en nuestro país hay siembras en que se separan esos procesos y en otras no. Es muy escasa la información sobre cómo es mejor proceder.

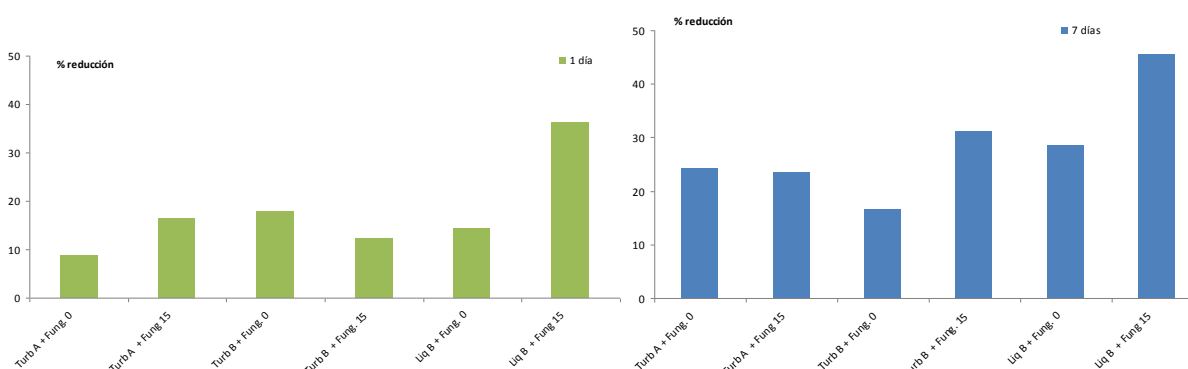
En el cuadro 12 se muestran los resultados del estudio de la sobrevivencia de bacterias cuando no se separa el curado con fungicida (carbendazim/tiram/metaxil-M) de la inoculación y cuando se separa por 15 días, con empleo de inoculante sólido y líquido de dos fábricas.

Cuadro 12: Efecto del tratamiento de semilla de soja con inoculantes sólido y líquido, con fungicida (carbendazim/ tiram /metaxil-M) simultaneo o desfasado días sobre la sobrevivencia de bradyrizobios. Los valores corresponden a la media de una sola repetición expresados en log UFC/semilla (UFC)

Tratamientos	UFC/ semilla en el tiempo				
Inoculante + Fungicida	30min	1día	2días	3días	7días
Turba A + Fungicida 15	6,5	5,4	5,2	5,9	4,9
Turba A + Fungicida 0	6,3	5,9	5,8	5,3	4,9
Turba A	6,5	6,5	6,2	6,1	5,8
Turba B + Fungicida 15	6,7	5,9	6	6,3	4,7
Turba B + Fungicida 0	6,3	5,6	5,6	5,9	5,6
Turba B	6,8	6,3	6	5,9	5,5
Líquido B + Fungicida 15	6,6	4	5,4	4,5	3,4
Líquido B + Fungicida 0	6,4	5,4	4,9	4,1	4,5
Líquido B	6,2	5,3	5,2	4,5	4,7

En el gráfico 6 se muestra el % de reducción del número de bacterias en cada tratamiento para la evaluación a tiempo 1 día y tiempo 7 días luego del tratamiento de la semilla (no se incluyen los datos de los tratamientos con inoculante líquido A).

Gráfico 6 y 7: Comparación del porcentaje de reducción del número de bradyrizobio a día 1 y 7 del efecto del fungicida en simultaneo y desfasado en turba A y B y en líquido B.



Como era de esperar, independientemente del soporte del inoculante el número de células vivas de las bacterias disminuye desde el momento mismo de tratar las semillas, resultado observado luego de 1 día (t1d) y de 7 días (t7d) de almacenamiento en laboratorio, tanto con o sin empleo del fungicida (controles).

Los inoculantes en turba dieron mejor sobrevivencia (menor % de reducción en el número de bacterias/semilla) comparado con el líquido (gráfico 6) resultado que se reitera cuando se estudian condiciones adversas para semillas inoculadas, como es en este caso la adición de un fungicida, siempre la turba ofrece mayor protección. Se registró una disminución más marcada en el número de bradyrizobios/semilla en los tratamientos con separación del fungicida e inoculación (fung.15) que en los simultáneos (fung 0).

En el gráfico 6 y 7 se presentan los datos expresados en Log_{10} UFC/semilla para cada tratamiento en los 2 tiempos analizados. Los resultados no apoyarían el empleo de este fungicida 15 días antes de la inoculación, quizás su toxicidad no disminuye por secado sobre la semilla o por el contrario se renueva con la inoculación porque ésta aporta nuevamente humedad a la semilla. A su vez, también debe tenerse en cuenta que no hay una total homogeneidad en la distribución de las bacterias en cada semilla, eso puede acarrear diferencias en los recuentos.

Estudios realizados por Lopes y Portugal (1986) no concuerdan con los resultados de este estudio, los autores utilizaron tres fungicidas (Triam, Captan y PCNB) en el cultivo de mani, ellos curaron el mismo día de inocular y 10 días previos, y concluyeron que era menos perjudicial para las bacterias utilizadas en ese cultivo curar 10 días antes de la inoculación.

El resultado de este trabajo coincide con la investigación de otros autores como Castro et. al., 1997 el cual utilizando el fungicida Mancozeb, constató una disminución en la sobrevivencia de bradyrizobios cuando está en contacto con el fungicida.

Curley y Burton en 1975, utilizaron como fungicida Captan, Tiram, Carboxin y Pentacloronitrobenzeno (PCNB) en soja y también registraron que el agroquímico producía una significativa mortandad a los rizobios.

Por otra parte, Graham et. al. (1980) estudió la interacción fungicida bacteria en cultivo de frijol, el principio activo utilizado fue Tiram y Captan, y observó como afectaba la sobrevivencia del *Rizobium phaseoli*. También destaca el buen rendimiento del inoculante en turba a pesar de los efectos negativos a la sobrevivencia bacteriana causados por los fungicidas.

La bibliografía sobre compatibilidad de la inoculación con productos químicos en leguminosas de grano y forrajeras es muy controversial por los diferentes métodos usados en los estudios y por falta de resultados cuantitativos.

De este ensayo se concluye que el fungicida afecta la mortalidad bacteriana, en especial cuando se aplica más de un producto a la vez, y que el inoculante en turba ofrece mayor resistencia amortiguando el efecto en la sobrevivencia bacteriana.

Bioestimulante vegetal

En el estudio se evaluó el efecto del bioestimulante vegetal con cobalto y molybdeno sobre la sobrevivencia de bradyrizobios en semilla y en la nodulación de plántulas de soja (sustrato estéril) desarrolladas en cámara de crecimiento. El bioestimulante se usó en 2 concentraciones comerciales (200ml y 300ml/100kg) de semilla al momento de la inoculación con 2 inoculantes comerciales de formulación líquida y sólida.

Los resultados mostraron que independientemente de la dosis de bioestimulante utilizada, la turba favorece la sobrevivencia de los bradyrizobios en la semilla hasta 7 días comparado con el inoculante líquido (cuadro 13), confirmando los resultados obtenidos con el fungicida (gráfico 7). A su vez, se debe tener en cuenta que la comparación turba vs. líquido ya implica menor sobrevivencia en el líquido y que a esa diferencia se le debe añadir el efecto del agroquímico en estudio.

El inoculante comercial A poseía en ese momento una menor concentración inicial de bacterias debido a que era una bolsa que se encontraba hacía mucho tiempo en el laboratorio, se decidió utilizarlo con la finalidad de saber si el efecto de algunos agroquímicos se observaba independientemente de la calidad del inoculante empleado. Esto se confirmó con los resultados del inoculante líquido B que se encontraba en óptimas condiciones (Cuadro 13).

Cuadro 13: Efecto del tratamiento de semilla de soja con inoculantes, sólido y líquido, y con diferentes concentraciones del bioestimulante sobre la sobrevivencia de bradyrizobios. Los valores se expresan en log UFC/semilla.

Tratamientos	UFC/ semilla en el tiempo				
	30min	1día	2día	3día	7día
Turba A + Bioest. 200	6,4	6,2	5,9	6	5,5
Turba A + Bioest.300	6,7	5,9	6,3	5,6	5,2
Turba A	6,5	6,5	6,2	6,1	5,8
Turba B + Bioest. 200	6,4	6,2	6	5,2	5,5
Turba B + Bioest. 300	6,6	6	5,8	5,8	5,1
Turba B	6,8	6,3	6	5,9	5,5
Líquido B + Bioest. 200	5,9	5,3	5,3	4	3,8
Líquido B + Bioest. 300	6,1	4,9	5,2	4,9	4
Líquido B	6,2	5,3	5,2	4,5	4,7

En la bibliografía las determinaciones de sobrevivencia en semilla, en general, se refieren a las 24 horas de realizado el tratamiento. En nuestro caso el primer dato de sobrevivencia es a las 2 horas luego de haber aplicado los tratamientos, luego 24 horas y hasta 7 días. De esta manera se evitan variaciones por el tiempo transcurrido en realizar las manipulaciones de laboratorio.

La comparación de las 2 dosis demostró variabilidad en la sobrevivencia de las bacterias, pero, el empleo de 300 ml mostró una tendencia a más baja sobrevivencia para 1 y 7 días (cuadro 13)

Fungicida y bioestimulante vegetal

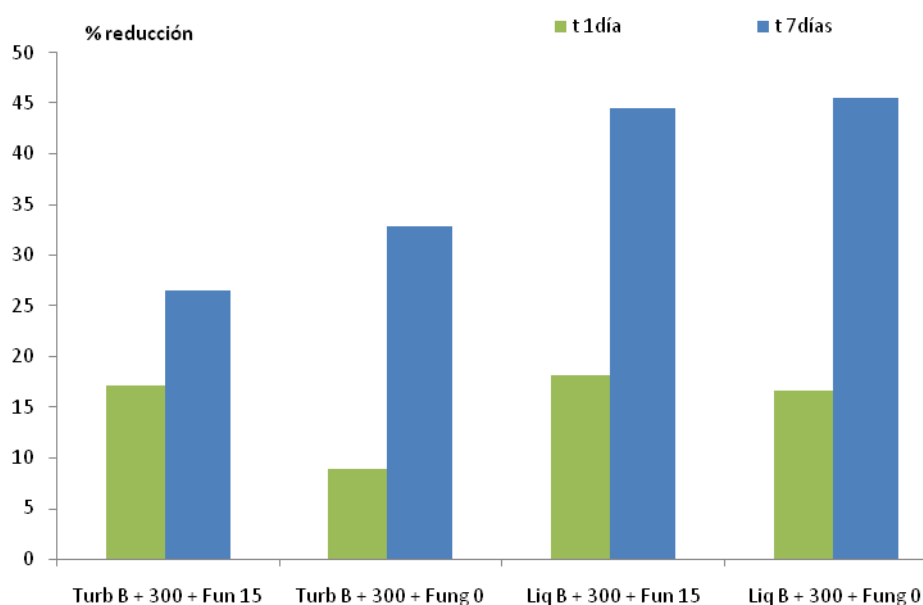
Los ensayos de toxicidad de productos en semilla inoculada, no sólo tienen interés por conocer la manera cómo actúa un químico-sintético sino también la acción de 2 o más de ellos cuando se

aplican simultáneamente en las semillas, práctica a menudo utilizada en las siembras de soja de nuestro país. La aplicación de varios productos junto con la inoculación buscan obtener mayor rendimiento/ha, disminuyendo las pérdidas por patógenos. Es por eso que es importante conocer qué ocurre con los bradyrizobios en combinaciones de 2 productos. En el cuadro 14 se muestran los recuentos bradyrizobios cuando se inocula y se aplica en simultáneo bioestimulante (dosis 300ml/100 kg semilla) y fungicida (fungicida 0) o el fungicida 15 días antes de la inoculación y del bioestimulante (fungicida 15).

Cuadro 14: Efecto del tratamiento de semilla de soja con inoculantes sólido y líquido, bioestimulante (3ml/kg semilla) y con fungicida en simultáneo o desfasado de la inoculación sobre la sobrevivencia de bradyrizobios. Valores en log UFC/semilla (UFC)

Tratamientos	UFC/ semilla en el tiempo				
Inoculante + Bioestimulante+ Fungicida	30min	1día	2días	3días	7días
Turba A + Bioest. 300 + Fungicida 15	6,5	4,4	5,5	5,5	4,1
Turba A + Bioest. 300 + Fungicida 0	6,3	5,2	4,9	5,2	4,3
Turba A	6,5	6,5	6,2	6,1	5,8
Turba B + Bioest. 300 + Fungicida 15	6,3	6,2	6,1	5,4	4,5
Turba B + Bioest. 300 + Fungicida 0	6,3	5,6	5,2	5,7	5
Turba B	6,8	6,3	6	5,9	5,5
Líquido B + Bioest. 300 + Fungicida 15	6	5,2	3,7	3,5	3,4
Líquido B + Bioest. 300 + Fungicida 0	5,8	5,1	4,4	4	3,5
Líquido B	6,2	5,3	5,2	4,5	4,7

Grafico 8: Comparación del porcentaje de reducción de la sobrevivencia a día uno y día siete causado por el bioestimulante y el fungicida en simultaneo y desfasado sobre bradyrizobio.



El gráfico 8 muestra que los tratamientos a los que se les aplicó bioestimulante y fungicida fueron los más afectados, esto se ve reflejado en el cuadro 14 ya que en todos los tratamientos hubo en el tiempo un % de reducción del número bacteriano, o sea en la sobrevivencia. A su vez no se obtuvo

una diferencia en cuanto a la aplicación del fungicida al momento de la inoculación o 15 días previos a la misma cuando se combinan dos agroquímicos. Todos los tratamientos mostraron valores de sobrevivencia semejantes, incluso en la diferenciación observada en la protección brindada por los soportes, si bien hay una leve diferencia a favor de la turba no es tan notoria como con los agroquímicos analizados anteriormente.

3.4.2 Evaluación de la nodulación

Los métodos que se utilizaron en este trabajo para determinar la viabilidad de bradyrizobios dan sólo una estimación cuantitativa de la compatibilidad con los agroquímicos aplicados a las semillas. Tal como lo expresan Curley y Burton (1975) la compatibilidad abarca también que las bacterias retengan la capacidad de producir nódulos. Por lo tanto, el estudio de sobrevivencia en semillas se continuó con la evaluación de la nodulación de todos los tratamientos aplicados (ítem 3.4.1).

Fungicidas

Los resultados de la aplicación de fungicida al momento o 15 días antes de la inoculación se presentan en el cuadro 15. La nodulación, número y peso seco de nódulos, se obtuvo en muestras de semillas sembradas a los 30 min. y a las 72h luego del tratamiento. En las muestras de 30 min. la turba B dió valores variables con el fungicida en número de nódulos y un 50% menos de PSN en el control comparado con el fungicida. El inoculante líquido dió menor número de nódulos con el fungicida y sin embargo el control mostró nuevamente una reducción de aproximadamente el 50% en el PSN. Estos resultados son difíciles de explicar dado la variabilidad de los valores para ambos tipos de inoculantes. En las muestras extraídas a las 72h hubo una reducción en el número de nódulos por aplicación del fungicida con turba y líquido y esto se vió reflejado aún más en el PSN del inoculante líquido que en turba (cuadro 15).

Cuadro 15: Evaluación en planta de peso seco de nódulo PSN, número de nódulos a día cero y tres de la aplicación de fungicida el mismo día de inocular y 15 días previos utilizando dos inoculantes comerciales en turba y líquido.

Tratamientos	Nódulos*	PSN (mg)	Nódulos*	PSN (mg)
Inoculante + Fungicida	t 30 min		t 72h	
Turba B + Fung. 15	10,2 B	20,2 A	13 A	13 A
Turba B + Fung. 0	17,3 A	20,6 A	9 A	10 A
Turba B	13,5 AB	11,5 A	13 A	10,5 A
Líquido B + Fung. 15	11 A	15,9 A	13 AB	13,7 A
Líquido B + Fung. 0	13 A	19,7 A	8,2 B	11,9 A
Líquido B	18 A	9,6 A	17 A	19 A

*Número de nódulos ** PSN: peso seco de nódulos (mg)

Medias seguidas de la misma letra en una misma columna no difieren significativamente al 5% prueba Duncan.

En la evaluación de 30 min., se observa mayor PSN al tratar con fungicida independientemente que haya sido aplicado simultáneo o desfasado con la inoculación (15 días). Esto se explicaría por la

variabilidad en el número de bacterias sobre cada semilla y es probable que en vez de a los 30 min. debería evaluarse a las 24 h ya que en la práctica el tiempo que transcurre hasta la siembra es mayor. A las 72h con el inoculante líquido afectó al número y PSN más que el sólido aun cuando no hubo diferencias significativas entre aplicar el fungicida simultáneo o desfasado (Cuadro 15). Este resultado indicaría que deberían hacerse más repeticiones por tratamiento dada la alta variabilidad en el desarrollo de las raíces y también realizar evaluaciones con otros productos fungicidas antes de aventurar una recomendación.

En la bibliografía sobre el tema, autores como Curley y Burton, (1975), Graham, (1980) y Andrés, (1996) encontraron una significativa proporcionalidad entre la mortandad de bradyrizobios en semilla y las consecuencias negativas en la nodulación.

Bioestimulante

La compatibilidad del bioestimulante en 2 dosis con inoculante líquido y sólido se determinó luego de 30 min. y de 72h de aplicados los tratamientos. Como se trata de un producto de uso en la promoción vegetal, se determinó el peso seco radical (PSR), número y peso seco de nódulos (PSN) y se realizó un análisis de varianza, comparando las medias con la prueba Duncan (α : 0.05) el cual concluyó que no hay diferencias significativas, salvo en el inoculante en turba a las 72h de aplicado el producto con dosis más alta de bioestimulante. Esto concuerda con el ítem anterior, donde la dosis más alta (300ml/100kg semillas) afectó negativamente la viabilidad de los bradyrizobios en las semillas.

Los resultados coinciden con los obtenidos por Carvalho Leite et. al. (2009) quien no obtuvo diferencias significativas en el número de nódulos y en su peso seco en frijol utilizando en la semilla un bioestimulante con Mo. Sin embargo, el autor menciona un incremento en el contenido de N de las plantas con bioestimulante y lo asocia a la utilización del Mo por la nitrogenasa. Por el contrario, estudios realizados por Gris et. al. (2005) afirman que el uso del Mo no incrementa significativamente el rendimiento en soja ya que los requerimientos son bajos y ocurre un aporte por el suelo. Para el autor altas concentraciones de ese elemento pueden ser tóxicas, por lo que es necesario tener en cuenta que el uso de bioestimulantes con Mo debería recomendarse en casos en que hay una deficiencia en el suelo.

De este ensayo se puede concluir que el bioestimulante no es perjudicial para la nodulación salvo en concentraciones altas donde puede resultar tóxico.

Bioestimulante y fungicida

Algunos agricultores utilizan mezclas o incorporaciones simultáneas de más de un producto químico en el momento de la inoculación de soja la realizan algunos agricultores, aunque no hay información sobre cuan extendida está la práctica en nuestro país. Los resultados de la nodulación cuando se combinan un bioestimulante, un fungicida y la inoculación de las semillas se muestran en el cuadro 16.

Cuadro 16: Evaluación PSN, número de nódulos a día cero y día tres, de la aplicación de bioestimulante y fungicida en simultaneo y desfasado utilizando dos inoculantes comerciales en turba y líquido.

Tratamientos	Nódulos*	PSN (mg)	Nódulos*	PSN (mg)
Inoculante + Fungicida	t 30 min		t 72h	
Turba B + Bioest. 300 + Fungicida 15	15 A	14,4 A	12 A	16,8 A
Turba B + Bioest. 300 + Fungicida 0	13 A	17,2 A	20 A	17,8 A
Turba B	14 A	11,5 A	13 A	10,5 A
Líquido B + Bioest. 300 + Fungicida 15	13 A	15 A	8 A	6,9 B
Líquido B + Bioest. 300 + Fungicida 0	10 B	23 A	6 A	6,7 B
Líquido B	18 A	9,6 A	17 B	19 A

*Número de nódulos ** PSN: peso seco de nódulos (mg)

Medias seguidas de la misma letra en una misma columna no difieren significativamente al 5% prueba Duncan.

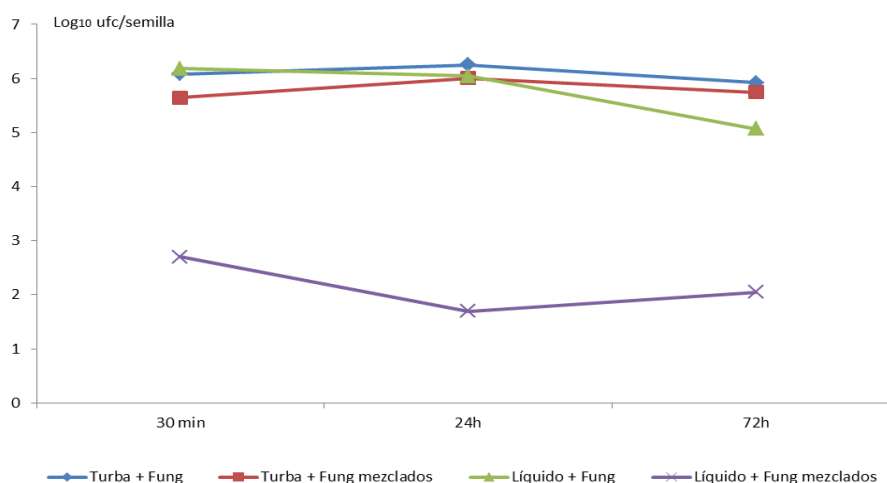
Como se observa en el cuadro 16 para 30 min. el uso de inoculante en turba no mostró diferencias significativas en el número y en el PSN por tratamiento con bioestimulante y fungicida (fung.0 y Fung.15). Por el contrario, el inoculante líquido dió diferencias significativas en número pero no en PSN aún cuando éstos valores fueron marcadamente más bajos en las plantas control. La evaluación a las 72h mostró valores significativamente más bajos en el número y PSN por empleo de fungicida y bioestimulante comparado con el control usando inoculante líquido (Cuadro 16).

3.5 Estudio de la mortandad de bradyrizobios; ejemplo práctico.

Se eligió una situación que podría ocurrir a la hora de preparar las semillas, se reprodujo en el laboratorio y se evaluaron las consecuencias. Para esto se mezcló en un mismo recipiente fungicida e inoculante, esto se realizó con inoculante líquido y en turba.

En el gráfico 9 se muestra la sobrevivencia hasta 72 h del tratamiento T1 inoculante líquido mezclado con fungicida, T2 inoculante en turba mezclado con fungicida y los controles con turba T3 y líquido T4 distanciando el fungicida de la inoculación.

Gráfico 9: Supervivencia (Log_{10} UFC/semilla) a 30min, 24 h y 72 h de *B. elkanii* en semillas cuando se añade fungicida e inoculante juntos o por separado.



En el Gráfico 9 se observa que la mezcla del inoculante líquido con el fungicida produjo una mortandad de las bacterias en el inoculante de 56% 30min luego de realizado el tratamiento. El número bajo de bacterias log_{10} 2.7/semilla induce a pensar que daría como resultado la falta de nódulos en las raíces de las plantas. Esto evidencia una “mala manipulación” en el momento de la inoculación de las semillas que significaría una pérdida económica importante para el agricultor. Los datos muestran una mayor protección de la turba comparado con el líquido aún cuando los datos a 30min ya muestran una reducción en el número de bacterias viables de 7% comparado con el control (gráfico 9). En general, podemos decir que la toxicidad del fungicida se evidenció en los recuentos de viables a 1h tanto cuando se aplicó fungicida e inoculación simultánea independientemente del uso de turba o líquido.

En el estudio se distanció el fungicida de la inoculación porque se tuvo en cuenta las recomendaciones del MGAP (Labandera, 2003) en cómo proceder correctamente en cuanto al uso de agroquímicos con los inoculantes. Desde ese entonces se recomienda curar las semillas primero y luego inocular, separar los procesos aunque esta recomendación no se cumple totalmente como quedó demostrado. Por lo general, los encargados de las siembras en los establecimientos priorizan la facilidad y rapidez que ofrece el inoculante líquido frente al sólido, y el uso de agroquímicos mezclados con ellos, incurriendo en errores con graves consecuencias económicas.

Los resultados evidencian que estos problemas podrían evitarse con más investigación sobre agrotóxicos utilizados en el cultivo de soja, mayor control de su composición por parte del MGAP y una cartilla técnica para proceder correctamente a la hora de utilizar agroquímicos.

4. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas del trabajo son:

1. Las cepas de *Bradyrhizobium elkanii* y *B. japonicum* difieren en su viabilidad frente a fungicidas y otros agroquímicos.
2. El fungicida Carbendazin+Tiram modifica la morfología de las colonias de *Bradyrhizobium* spp.
3. El Sporekill es un producto altamente tóxico para bacterias y no es recomendable utilizarlo en semillas inoculadas.
4. El tratamiento con fungicida antes de la inoculación (15 días) no dio resultados constantes en la viabilidad y sobrevivencia de los bradyrizobios.
5. Los agroquímicos afectan más la sobrevivencia y la nodulación de los bradyrizobios en semillas con inoculante líquido que sólido.
6. Mezclar fungicida con inoculante en un mismo recipiente ocasiona una disminución de la sobrevivencia de 56% para inoculante líquido y 7% para turba.

Finalmente cabe mencionar que este trabajo puso en evidencia la importancia del estudio de la compatibilidad de los agroquímicos con los bradyrizobios en el ámbito de la FBN. Según su principio activo pueden ser más o menos tóxicos en la sobrevivencia de las bacterias en las semillas, con consecuencias en la nodulación, fijación de nitrógeno y rendimiento de los cultivos. Es necesario generar más investigaciones nacionales sobre su efecto en la nodulación ya que pueden no afectar la viabilidad en la semilla pero sí la capacidad de formar nódulos. Se requieren ensayos en campo para determinar el efecto de los agroquímicos y tratar de conocer cuál es el costo/beneficio que implica el uso de estos productos. Se requiere un protocolo que indique a los productores el correcto procedimiento de su uso y que es lo que no se debe hacer para evitar las 'malas manipulaciones' que como se vió traen consecuencias perjudiciales adicionales.

5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi familia por creer en mis capacidades y en mi voluntad de trabajo, por su eterno apoyo y motivación. A todos los integrantes del laboratorio por siempre estar para ayudarme y enseñarme, en especial a Margarita quien con mucha paciencia y dedicación pulió a una estudiante para transformarla en una profesional. Al tribunal por su buena disposición para evaluar este trabajo y a todas las personas que consulte, quienes con muchísima voluntad me aportaron un poco de su conocimiento.

"Porque siempre se puede mejorar"...

6. BIBLOGRAFÍA

- Allen, O. N., Allen, E. K., (1981) The Leguminosae, a source book of characteristics uses, and Nodulation. Madison: The University of Wisconsin Press 812 pages.
- Andres, J., Correa, N., Rosas, S., (1996) Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of Thiram: Isolation of fungicide resistance strains. Biology and Fertility of Soils, (1998) vol. 26: pg. 141-145.
- Arbeletche, P., Carballo, C., (2008). La expansión agrícola en Uruguay: algunas de sus principales consecuencias. Revista de desarrollo rural y cooperativismo agrario. (2009), vol. 12 pg. 7-20.
- Baca, B., Soto, L., Pardo, P., (2000). Fijación biológica del nitrógeno. Elementos nº 38 vol. 7, pg 43.
- Becker Underwood, 'es.beckerunderwood.com'. Consultada el día 16/03/13.
- BIOFAG (red iberoamericana de fertilizantes biológicos para la agricultura y el medio ambiente) (2008) Normativa Iberoamericana para inoculantes formulados con bacterias rizoféricas promotoras del crecimiento vegetal. (www.biofag.org.ar)
- Brock, T., Madigan, M., (1993) Microbiología. Sexta ed. Prentice hall, Madrid España.
- Campo, R.J., Hungria, M., (1999) Efeito do tratamento de sementes com funguicidas na nodulação e fixação simbiótica N₂. Londrina: EMBRAPA vol. 21 pg.1-7, Brasil.
- Carvalho Leite, L.F., Ferreira de Araújo, A.S., Costa, C., Braga, A., (2009). Nodulação e produtividade de grãos de feijão- caupi em resposta ao molibdenio. Revista Ciencias Agronómicas do Fortaleza, vol. 40, nº 4, pag. 492-497, Brasil.
- Castro, S., Vinocur, M., Permigliani, M., Halle, C., Taurian, T., Fabra, A., (1997) Interaction of the fungicide Mancozeb and Rhizobium sp. in pure culture and under field conditions. Biol Fertil Soils vol. 24, pg. 147-151.
- Comelis, D., Desá, M., Arf, E., Furlani, E., De Souza, A., Bueno Melo de Carvalho, F., (2009) Aumento da produtividade de soja com a aplicação de bioestimulante. Bragantia, Campinas (2010) vol. 69, nº 2, pg. 339-347, Brasil.
- Corbera, J., Hernandez, A., (1997). Evaluación de la asociación *Rhizobium*- MVA sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de la soja (*Glycine max* L. Merr). Cultivos Tropicales vol. 18, pg. 10-12.
- Curley, R.L., Burton, J.C., (1975) Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. Agronomy Journal vol. 67, pg. 807-808
- Diario "El observador", 20/12/12, "cosecha uruguaya de soja 2012/2013 sería entre 2.4 y 2.8 millones de toneladas". <http://www.elobservador.com.uy/noticia/239804/cosecha-uruguaya-soja-20122013-seria-de-entre-24-y-28-millones-de-toneladas/>

- Dunfield, K., Siciliano, S., Germida, J., (1999) The fungicides thiram and captan affect the phenotypic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* strain C1 as determined by FAME and Biolog analyses. *Biol Fertil Soil* (2000) vol. 31, pg. 303-309, Springer – Verlog.
- Estrada, G.A., Bonilla, R.R., Divan, V.L., (2009) Efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la calidad de bioinoculantes turbosos. *Corpoica ciencia tecnología agropecuaria* vol. 10, pg. 205-213.
- Freixas, A., Reynaldo, I., Nápoles M., (2010) Influencia de la sequía sobre el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis *Bradyrhizobium* – Soya. *Cultivos tropicales* vol.31 nº. 2.
- Fabra, A., Angelini, J., Donolo, A., Permigiani, M., Castro, S., (1997) Biochemical alterations in *Bradyrhizobium* sp USDA 3187 induced by the fungicide Mancozeb. *Antonie van Leeuwenhoek* (1998) vol. 73, pg. 223–228.
- Frioni, L., (2011) Microbiología: básica ambiental y agrícola. Departamento de Publicaciones y Ediciones, Universidad de la República, Uruguay.
- Fuentes L, Caballero J. (2006) Bacterial Biofertilizers, en: Siddiqui Z. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Netherlands, Springer, pg. 143-172.
- Graham, P.H., Ocampo, G., Ruiz, L.D., Duque, A., (1980) Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. *Agronomy Journal* vol. 72, pg. 625–627.
- Gris, E.P., Conte e Castro, A.M., Faria de Oliveira, F., (2005) Produtividade da soja em resposta à aplicação de molibdenio e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. *R. Bras. Ci. Solo*, vol. 29, pg. 151-155.
- Hashem, F.M., Saleh, S.A., Van Berkum, P., Voll, M., (1997) Survival of *Bradyrhizobium* sp. (Arachis) on fungicide-treated peanut seed in relationship to plant growth and yield. *World Journal Microbiology and Biotechnology* vol. 13, pg. 335–340.
- Henning, A., Campo, R.J., Sfredo, G.J., (1997) Tratamiento con fungicidas, aplicación de micronutrientes e inoculación de semillas de soja. Londrina, EMBRAPA, vol. 58, pg. 1-6, Brasil.
- Herrera, R., (2010) Manual de producción de lentejas pardina (*Lens culinaris*) y garbanzo pedrosillano (*Cicer arietinum*). Universidad de Valladolid. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. España.
- Hungria, M., Campo, R., (2005). Proposta de exigencia de teste de compatibilidade com inoculantes para a obtenção de registro de fungicidas utilizados para o tratamento de sementes. EMBRAPA, Taller iberoamericano sobre normativa y control de calidad de inoculantes para la agricultura, Brasil.
- Jacob-Neto J. (1998) Concentração de nutrientes nas sementes: o papel do molibdenio. *Floresta e Ambiente*, vol. 5, nº 1, pg. 171-183, Brasil.
- Kossalak, R.M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H.E., Appelbaum, E.R., (1987) Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *National Academy of Science of the United States of America*, vol. 84, pg. 7428-7432.

- Kuzman, M., Hunt, S., Layzell, B., (1993) Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual Soybean nodules. *Plant Physiology*, vol. 101 nº 1 pg. 161-169.
- Kyei-Boahen, S., Slinkard, A.E., Walley, F.I., (2001) Rhizobial survival and nodulation of chickpea as influenced by fungicide seed treatment. *Canadian Journal of Microbiology*, vol 47, nº 6, pg. 585-589.
- Labandera, C. (2003) Soja: inoculantes e inoculación. *Revista plan agropecuario* vol. 107 (http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R107/R107_53.pdf).
- Labandera, C. (2007) Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. *Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura*.
- Labandera, C., and Vincent, J.M., (1975) Competition between an introduced strain and native Uruguayan strain of *Rhizobium trifolii* *Plant and Soil*, vol. 42, pg. 327-347.
- Labandera, C., and Vincent, J.M., (1975) Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii* *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 39, pg. 209- 211.
- Lopes, E., Portugal, E.P., (1986) Compatibilidade entre tratamento de sementes de amendoim com fungicidas, sobrevivência de *Rhizobium* e nodulação. *Bragantia Campinas*, vol. 45, nº 2, pg. 293, 302.
- Maruekarajitpleng, S., Homhau, W., Chansa-ngavej, K. (2011) Presence of natural variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *Bradyrhizobium japonicum* and detection of *Bradyrhizobium yuanmingense* in Phitsanulok province, Thailand.
- Minamisawa, K., Onodera, S., Tanimura, Y., Kobayashi, N., Yuhashi, K., (1997) Preferential nodulation of Glycine max, Glycine soja and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species *japonicum* and *elkanii*. *Japon*.
- Oyhantcabal, G., y Narbondo, I., (2011) Sojización: impactos sociales de la expansión de la soja en Uruguay. *Radiografía del agronegocio sojero*. Redes at. Montevideo. Uruguay.
- Perez, F., Zamora, S., (2002) *Nutrición y alimentación humana*. 1 edición, Universidad de Murcia.
- Ramirez, A., Marin, L.S., (2009) Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* Año XV, vol. 42
- Repetto, R., Magrath, W., Wells, M., Beer, C., Rossini, F., (1989) *Wasting assets: natural resources in the national income accounts*, pg. 1-8, Washington, D.C., World Resources Institute.
- Revellin, C., Leterme, P., Catroux, G., (1993) Effect of some fungicide seed treatments on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation and yield of soybean [*Glycine max*. (L) Merr.]. *Biol. Fertil. Soils* vol. 16, pg. 211-214.
- Rocha, P., (2012) Paquete tecnológico aplicado al cultivo de soja genera beneficios ambiental y económico al Cono Sur. *IICA* vol. 32.

- Rodriguez, E., (2005) Bacteriología General: Principios y Prácticas de laboratorio. Universidad de Costa Rica.
- Ruiz-Sainz, J.E., Beringer, J.E., Gutierrez-Navarro, A.M., (1984) Effect of the fungicide captafol on the survival and symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. Journal of Applied Bacteriology vol. 57, pg. 361–370.
- Somasegaran, P., Hoben, H., (1994) Handbook of Rhizobia: Methods in legum-rhizobium technology. Springer-Verlag New York .
- Soto- Urzúa, L., Baca, B., (2001) Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. Revista Latinoamericana de microbiología vol. 43, pg. 37-49, México.
- Taule, C., (2011) Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción. Tesis de Maestría Departamento de bioquímica y genética microbiana. IIBCE. Uruguay.
- Tesfai, k., Mallik, M., (1986) Effect of fungicide application on soybean-rhizobia symbiosis and isolation of fungicide-resistant strains of *Rhizobia japonicum*. Agricultural research center, Langston University, Langston. Springer- Verlag vol. 36, pg. 819-826.
- Tommasino, H., (2008) Algunas consideraciones sobre fertilizantes en Uruguay. Anuario OPAYA vol. 8, pg. 237-444.

PERSONAS CONSULTADAS:

Ing. Agr. Manuel Artigas, Dra. Ing. Agr. Elena Beyhaut, MSc Ing. Agr. Danny Camagro, Bach. Alfonso García Pintos, Tec. Sergio González