

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Effect of different storage temperatures on the quality of peat inoculants

Efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la calidad de bioinoculantes turbosos

Germán Andrés Estrada Bonilla¹, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago², Vera Lúcia Divan Baldani³

ABSTRACT

The nitrogen is one of the most important elements to the development of crops. In the environment, this element is fixed in the soil by a fertilizer, natural phenomenon and by the action of nitrogen fixing bacteria (NFB), with the last one been considered the most relevant mechanism. Besides, some NFB has additional abilities such as the production of phytohormones that improves the plant growth. Due to the importance of crops like corn, rice and barley in the alimentary security, emerges the need of developing inoculants with high quality based on obligated and facultative endophytic diazotrophic bacteria. Positive effects of the inoculation on plant growth cultivated in greenhouse and field conditions have been observed, despite of the variability response to the bacterial inoculation. In order to determine the main factor that affects the bacterial population in these storage inoculants conditions, it was evaluated the number of different diazotrophic bacteria cells inoculated in the peat and stored at two temperatures as well as the pH and humidity contends, during 150 days. The results show that neither the pH level nor the humidity affected significantly the population of the diazotrophic bacteria present in the peat during the evaluation period ($P < 0.05$).

Keywords: Diazotrophs, peat, nitrogen fixing bacteria, biofertilizers, nitrification.

RESUMEN

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes para el buen desarrollo de los cultivos. En el ambiente este elemento es aportado al suelo por fertilización química, fenómenos naturales y fijado biológicamente, siendo esta fijación biológica el mecanismo más importante. Además, algunos de los microorganismos poseen beneficios adicionales como la producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, producción de acc-deaminasa y de sideróforos. Gracias a estas cualidades, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) han sido utilizadas en el desarrollo de biofertilizantes con el fin de reducir el uso de abonos nitrogenados de síntesis química. Dentro de este campo es de vital importancia para la comercialización de biofertilizantes conservar su calidad el mayor tiempo posible, para lograr mejor integración del producto a la cadena productiva. En este estudio se utilizaron inoculantes obtenidos a partir de 4 bacterias diazotróficas: *Azospirillum brasilense* Sp245, *Azospirillum amazonense* Y2, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 y *Rhizobium tropici* BR322 y se determinó el efecto de almacenarlos a 2 temperaturas: 30 °C y ambiente (19 °C – 26 °C) durante 150 días sobre el número de células, determinando si hay variación en la humedad y el pH del producto. Se encontró que el pH y la humedad no variaron y no afectaron el número de microorganismos del producto. Almacenar los inoculantes a temperatura ambiente mantuvo la población por encima del 10⁸ células por gramo de turba, mientras que a 30 °C, solamente el inoculante basado en *Rhizobium tropici* BR322 tuvo una población superior.

Palabras clave: diazótrofos, turba, fijación biológica de nitrógeno, biofertilizantes, nitrificación.

INTRODUCCIÓN

EL AUMENTO EN EL USO INDISCRIMINADO de fertilizantes de síntesis química, principalmente nitrogenados y fosforados, está afectando la vida de seres humanos, plantas y animales, provocando un desequilibrio ecológico que amenaza ser irreversible y ocasionando impactos negativos como la eutrofización de los cuerpos de agua (Prepas *et al.*, 2003). Por otra parte, la síntesis de fertilizantes químicos nitrogenados, principalmente amonio o urea demanda mucha energía, debido a que estos compuestos se obtienen a través del proceso de Haber-Bosch,

Radicado: 11 de mayo de 2009
Aprobado: 18 de agosto de 2009

¹ Microbiólogo industrial, estudiante de maestría, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Embrapa - Agrobiología, Seropédica, Río de Janeiro, Brasil. germanestra@gmail.com

² Bióloga Ph.D. Microbiología de Suelos, Corpoica, Mosquera, Cundinamarca. rbonilla@corpoica.org.co

³ Microbióloga Ph.D. Embrapa, Agrobiología, Seropédica, Río de Janeiro, Brasil. vera@cnpab.embrapa.br

que combina nitrógeno e hidrógeno. Se requiere 1,3 t de combustible fósil para fijar 1 t de nitrógeno utilizando alta presión (35 a 100 megapascuales -Mpa) y temperaturas de 300 a 400 °C (Marin *et al.*, 1999).

En los últimos años, debido al impacto negativo de la agricultura convencional con altos costos económicos, ecológicos y sociales, se ha planteado el concepto de agricultura sostenible, definida como la manera de cultivar el suelo conservando al máximo la calidad medioambiental, permitiendo ingresos adecuados a los agricultores y generando suficientes alimentos a los consumidores, con el fin último de preservar y regenerar los recursos naturales y producir alimentos sanos y seguros (Benbrook, 1999).

Dentro de este contexto, en los últimos años se han venido produciendo y utilizando biofertilizantes a base de microorganismos simbióticos principalmente rizobios y asimbióticos principalmente a base de *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *Azotobacter* sp., y *Herbaspirillum* sp., para gramíneas de interés económico como la caña de azúcar, el arroz, el maíz, el trigo y la cebada, entre otros. (Vessey, 2003).

Actualmente, se busca mejorar la calidad de los bioinoculantes tratando de garantizar el mayor número de células desde su producción hasta su aplicación. Teniendo en cuenta este aspecto, se han realizado investigaciones para determinar todos los factores que afectan la obtención de un inoculante de calidad, y se ha encontrado que uno de los principales para tener éxito es el soporte, siendo la turba el más viable hasta el momento. Otro factor importante es la condición de almacenamiento hasta su aplicación (Fuentes *et al.*, 2006).

A pesar de muchos resultados positivos, la comercialización a gran escala de inoculantes diferentes a la soya no ha sido posible debido a la imprevisibilidad e inconsistencia de los resultados en campo, sobre todo cuando el productor tiene pocos conocimientos para utilizar esta tecnología de inoculación de bacterias (Bashan *et al.*, 2004). La incongruencia y la variabilidad en el rendimiento de las respuestas han sido atribuidas a condiciones adversas, como la interacción de los organismos rizosféricos, condiciones físicas y químicas del suelo (por ejemplo los bajos pH), la baja competitividad de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) del inoculante, para colonizar las raíces de las plantas, factores ambientales que incluyen temperaturas medias, altas y las bajas precipitaciones durante el crecimiento de la planta. Para conseguir un producto de amplia aplicación es necesario que las técnicas de inoculación sean prácticas, económicas y fáciles de manejar por el agricultor; el producto formulado debe proveer inóculo suficiente para la planta; debe ser com-

petitivo con las normas comerciales vigentes y así mismo, permanecer viable en las condiciones de almacenamiento hasta su utilización (Bashan *et al.*, 2004).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del almacenamiento del inoculante, utilizando turba como soporte, a diferentes temperaturas sobre la población de las siguientes cuatro bacterias: *Azospirillum brasilense* Sp245 (BR11005), *Azospirillum amazonense* Y2 (ATCC35120), *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417) y *Rhizobium tropici* BR322 (CIAT 899). Además, fue evaluado el efecto sobre el pH y la humedad del inoculante hasta 150 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de estudio

Para la realización del presente trabajo se tomaron cuatro cepas de referencia del Banco de Microorganismos de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (Embrapa Agrobiología) en Seropédica. Las cepas evaluadas fueron las siguientes:

- *Azospirillum brasilense* Sp245 (BR11005) (Baldani *et al.*, 1983)
- *Azospirillum amazonense* Y2 (ATCC35120) (Magalhaes *et al.*, 1983)
- *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417) (Baldani *et al.*, 1996)
- *Rhizobium tropici* BR322 (CIAT 899) (Graham *et al.*, 1982)

Se inició con la preparación del preinóculo, a partir de los viales del banco de trabajo, que consistió en inocular en 100 mL de medio NFb líquido *Azospirillum brasilense* Sp245 y *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, LGI líquido para *Azospirillum amazonense* Y2. Estos medios fueron suplementados con extracto de levadura y con una fuente de nitrógeno inorgánica (NH₄Cl) para estimular el crecimiento rápido (Hartmann y Baldani, 2006). Para *Rhizobium tropici* BR322 se utilizó el medio 79 (YMA) líquido. Se llevaron a incubación por 24 h a 30 °C y 150 rpm. Después de este tiempo, se inocularon a 900 mL del respectivo medio de cultivo para cada microorganismo y fueron incubados bajo las mismas condiciones, con el mismo tiempo que el preinóculo. Después de la incubación se verificó la pureza del inóculo, a través de la observación de las características morfológicas en medio sólido 79 con rojo congo para *R. tropici* BR322 y medio batata sólido para las otras bacterias. También se observó al microscopio cada uno de los inóculos para confirmar la pureza (Baldani *et al.*, 2005; Kuykendall *et al.*, 2005).

En el inóculo a base de *R. tropici* BR322 se utilizó la técnica de recuento en placa con microgota. Se sembraron

seis diluciones de 10^{-6} a 10^{-12} por caja de Petri en medio agar 79 con rojo congo, y cada caja se dividió en 6 partes y se hicieron 4 repeticiones por dilución. Se contaron las colonias que presentaron las características propias del género (Kuykendall *et al.*, 2005) de 24 a 48 h después de la incubación, con observaciones cada 12 h.

Para los inóculos a base de *Azospirillum brasilense* Sp245, *A. amazonense* Y2 y *H. seropedicae*, se utilizó la técnica del número más probable (NMP) descrita por Dobereiner y colaboradores (1995) utilizando tres tubos por dilución y realizando diluciones de 10^{-6} a 10^{-12} en el medio semisólido selectivo dependiendo del microorganismo empleado. Para efectuar el recuento se observó el número de tubos positivos (formación de película y viraje del indicador) y se reportó el recuento poblacional basándose en la tabla de McCrady (Dobereiner *et al.*, 1995). Después de observar el crecimiento típico en medio semisólido, se confirmó su pureza por medio de microscopía en fresco; además, se hizo una siembra en medio batata y se observó su morfología de colonia que fue confirmada empleando la descripción de las colonias publicadas en el *Manual de Bergey's* por Baldani y colaboradores (2005).

La turba empleada en los inoculantes fue de origen brasileiro, de características organolépticas conocidas y relacionadas a continuación:

pH: 3,4; 8,5 cmolc/dm³ de K; 7,1 cmolc/dm³ de Ca; 6,9 cmolc/dm³ de Mg; 22 mg/dm³ de P; 47 mg/dm³ de K y un contenido de materia orgánica de 72 g/kg de turba.

Previo a su utilización, la turba fue molida, secada y esterilizada dos veces a 120 °C, 15 lb de presión, durante 15 minutos en autoclave por 2 días con intervalos de 24 h y neutralizada con CaCO₃ (140 g de K / kg de turba) hasta obtener un pH cercano a la neutralidad. Se utilizaron 35 g por cada bolsa de polipropileno. Posteriormente se inocularon 17 mL de inóculo utilizando una jeringa estéril.

Se utilizó un diseño estadístico al azar donde se evaluaron cuatro inoculantes y un control negativo:

- I1: Turba inoculada con medio de cultivo estéril
- I2: Inoculante a base de *Azospirillum amazonense* Y2
- I3: Inoculante a base de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94
- I4: Inoculante a base de *Rhizobium tropici* BR322 para frijol
- I5: Inoculante a base de *Azospirillum brasilense* Sp245

Estos inoculantes se almacenaron a 2 temperaturas: ambiente (19 a 26 °C) y 30 °C, para un total de cinco tratamientos por cada temperatura; se tomaron muestras cada 15 días durante 150 días, para un total de 11 mues-

treos. Utilizando 4 repeticiones por cada tratamiento, por lo cual fueron utilizadas un total de 478 bolsas de inoculante.

Las bolsas después de la inoculación se mantuvieron en incubadora durante 24 h a 30 °C después de la inoculación para permitir la adaptación del microorganismo a las condiciones de la turba y luego fueron almacenados a las diferentes temperaturas (Ferreira, 2003).

Parámetros de evaluación de los inoculantes

Recuento de los microorganismos en el inóculo y en la turba

El experimento se realizó en condiciones de laboratorio; se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones en cada tratamiento, evaluándose la población cada 15 días. Para el análisis estadístico los datos se transformaron a Log₁₀. La comparación de las medias fue realizada utilizando el test estadístico LSD al 10% de probabilidad en el programa Sisvar® (Ferreira, 2000).

Recuento de bacterias diazotróficas asimbióticas

El recuento de los microorganismos se hizo utilizando la técnica del número más probable (NMP) descrita por Dobereiner y colaboradores (1995), utilizando 3 tubos por dilución en el medio semisólido selectivo dependiendo del microorganismo a evaluar. Para efectuar el recuento se observó el número de tubos positivos (formación de película y viraje del indicador) y se informó basándose en la tabla de McCrady (1946). Después de observar el crecimiento típico en medio semisólido, se confirmó su pureza por medio de microscopía en fresco, además se hizo en repique en medio batata, observando el crecimiento característico, que se confirmó empleando la descripción de las colonias registradas por Baldani y colaboradores (2005) en el *Manual de Bergey's*.

Recuento de bacterias diazotróficas simbióticas

El recuento de *R. tropici* BR322 se llevó a cabo en el medio de cultivo 79 con rojo congo. Se utilizó la técnica de recuento en placa en microgota por duplicado por muestra, para un total de cuatro repeticiones por dilución. Se tomó la información de conteo de las colonias durante 48 h de incubación realizando las observaciones cada 12 horas.

Medición del pH del inoculante

El pH fue calculado diluyendo la turba en agua destilada estéril en una relación de 1:2, se agitó durante 20 minutos a 100 rpm y se dejó reposar 20 minutos. El pH fue medido empleando un potenciómetro MS Mistura® (ISO: 10390:2005).

Medición de la humedad de los inoculantes

Se utilizó el método de secado en horno MR® a una temperatura constante de 60 °C. El porcentaje de humedad (U) se determinó por la diferencia entre la masa de la muestra húmeda (MAU) y la muestra seca (MAS) (Ferreira, 2008):

U (%) = (MAU - MAS) x 100 / MAS

El experimento se realizó utilizando un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, y se evaluó la humedad para cada tratamiento cada 15 días. La comparación de las medias se realizó utilizando el test estadístico LSD al 10% de probabilidad en el programa Sisvar® (Ferreira, 2000).

El recuento de las bacterias y la medición del pH y de la humedad en los inoculantes se realizó en los diferentes tratamientos cada 15 días por un periodo de evaluación de 150 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de las diferentes bacterias diazotróficas en los inoculantes

Temperatura ambiente

Las temperaturas ambientales durante los meses de mayo a septiembre del 2008 en Seropédica, Río de Janeiro, oscilaron entre 19 y 26 °C (tabla 1).

La temperatura ambiente (19 a 26 °C) mantuvo a la población por encima de 10⁸ UFC/g de inoculante hasta

Tabla 1. Temperaturas medias de la ciudad de Río de Janeiro durante los meses de almacenamiento

Temperatura (°C)	Meses				
	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
Máxima	27	25	26	26	26
Mínima	21	19	18	19	19
Media	23	22	21	22	22

Fuente: Estación Meteorológica Embrapa Agrobiología (Seropédica, Brasil).

150 días de almacenamiento (figura 1), lo cual corresponde al valor exigido por la ley vigente No. 86955 del 18 de febrero de 1982 en Brasil, concentración que se ha empleado por diversos autores en experimentos en campo con resultados positivos (De Freitas y Germida, 1991; Di Ciocco y Rodríguez, 1994; Fages, 1994; Okon y González, 1994; Tran Van *et al.*, 2000; Weller y Cook, 1986).

Al cabo de los 150 días de almacenamiento se encontró que no hay diferencia media significativa en las concentraciones celulares de *A. brasilense* Sp245 y *H. seropedicae* ZAE94; por lo tanto, se puede concluir que a temperatura ambiente los inoculantes a base de estos microorganismos tienen un recuento similar a los 150 días de almacenamiento.

La población de *R. tropici* BR322 en los inoculantes inició con concentraciones alrededor de 10¹² UFC/g de inoculante, perdiendo tres unidades exponenciales durante los primeros 30 días, lo cual pudo ser ocasionado por la baja tensión de oxígeno (O₂). Se presentó poca pérdida de humedad durante todo el período de almacenamiento a temperatura ambiente, lo que indica que el polipropile-

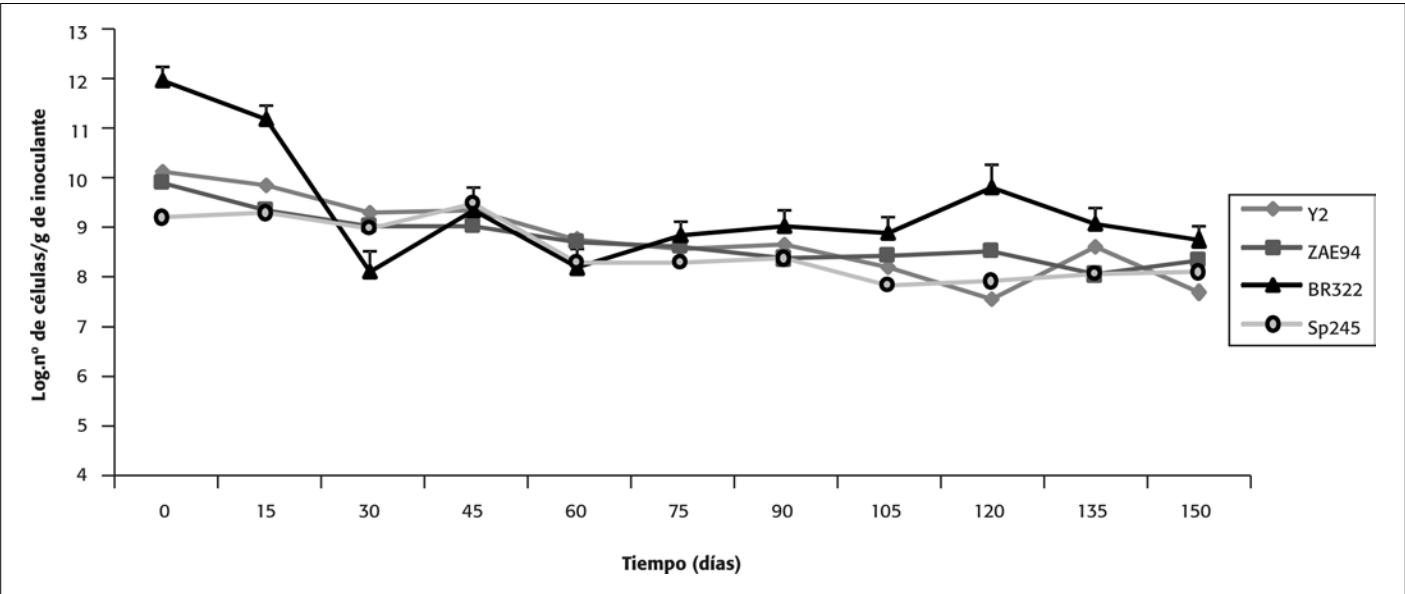


Figura 1. Número de células en los diferentes inoculantes, conservados a temperatura ambiente (19 a 26 °C), durante 150 días de almacenamiento. Las barras indican la diferencia media significativa

no usado tiene poca porosidad, como consecuencia un bajo intercambio gaseoso, haciendo que la tensión de O_2 sólo sea suficiente para mantener la tasa metabólica de cierto número de células, manteniendo las concentraciones sobre 10^8 UFC/g de inoculante durante 150 días de almacenamiento. Después se equilibró la población y los niveles de O_2 , manteniendo la concentración celular más alta (10^{10} UFC/g de inoculante) a partir de los 75 días de almacenamiento comparado con los otros inoculantes, hasta el tiempo final. El número mínimo de células de *Rhizobium* sp., necesario en un inoculante varía en todo el mundo con rangos entre 10^5 y 10^9 UFC/g de inoculante (Olsen *et al.*, 1994).

A. amazonense Y2 tuvo una población por debajo de 10^8 UFC/g de inoculante al final del tiempo de almacenamiento, siendo su diferencia no significativa, con respecto a esa concentración del inoculante.

Temperatura de 30 °C

El inoculante a base de *R. tropici* BR322 tuvo una población superior a 10^8 UFC/g de inoculante, después de 150 días de almacenado (figura 2). Estos resultados están acordes con los encontrados por Feng y colaboradores (2002), quienes demostraron que después de almacenar dos inoculantes a base de *Rhizobium* sp. SU343 y *Bradyrhizobium lupini* WU425, ambos en sustrato de turba, con una humedad inicial de 52% a 30 °C, el número de células de cada uno estaba por encima de 10^8 UFC/g de inoculante a los 90 días de almacenamiento. Los autores determinaron que los gránulos de polihidroxibutirato (PHB) producidos por la bacteria no están relacionados con la mayor sobrevivencia del *Rhizobium*, sugiriendo que era resultado de cambios

fisiológicos en respuesta al estrés ambiental, como el engrosamiento de la pared celular y la oclusión del espacio periplasmático.

Estos resultados son similares a los encontrados por Temprano y colaboradores (2002), quienes obtuvieron recuentos superiores a 10^8 UFC/g de inoculante a una temperatura de 28 °C en un inoculante a base de *Rhizobium etli* ISP42, utilizando turba como soporte, hasta los 150 días. Sin embargo, a los 180 días se obtuvieron recuentos inferiores.

Para los inoculantes a base de *H. seropedicae* ZAE94 y *A. amazonense* Y2 las diferencias presentadas no fueron significativas al final de la evaluación, lo que permite inferir que la conservación de la población a esta temperatura se puede considerar igual por 150 días de almacenamiento. Se observó que hasta los 45 días todos los inoculantes poseían una población superior a 10^8 UFC/g.

El inoculante a base de *A. amazonense* Y2 conservó una población adecuada hasta los 75 días de almacenamiento, mientras que el inoculante que contenía bacterias de *A. brasilense* Sp245 mantuvo la población encima de 10^8 UFC/g de inoculante hasta los 90 días. Entre tanto, *H. seropedicae* ZAE94 mantuvo su concentración hasta los 120 días.

Durante el almacenamiento a 30 °C, se presentó el descenso más marcado de la población debido a que este es el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de *Herbaspirillum* sp., *Rhizobium* sp., y próximo al rango para *Azospirillum* sp., lo cual estimuló las reacciones químicas

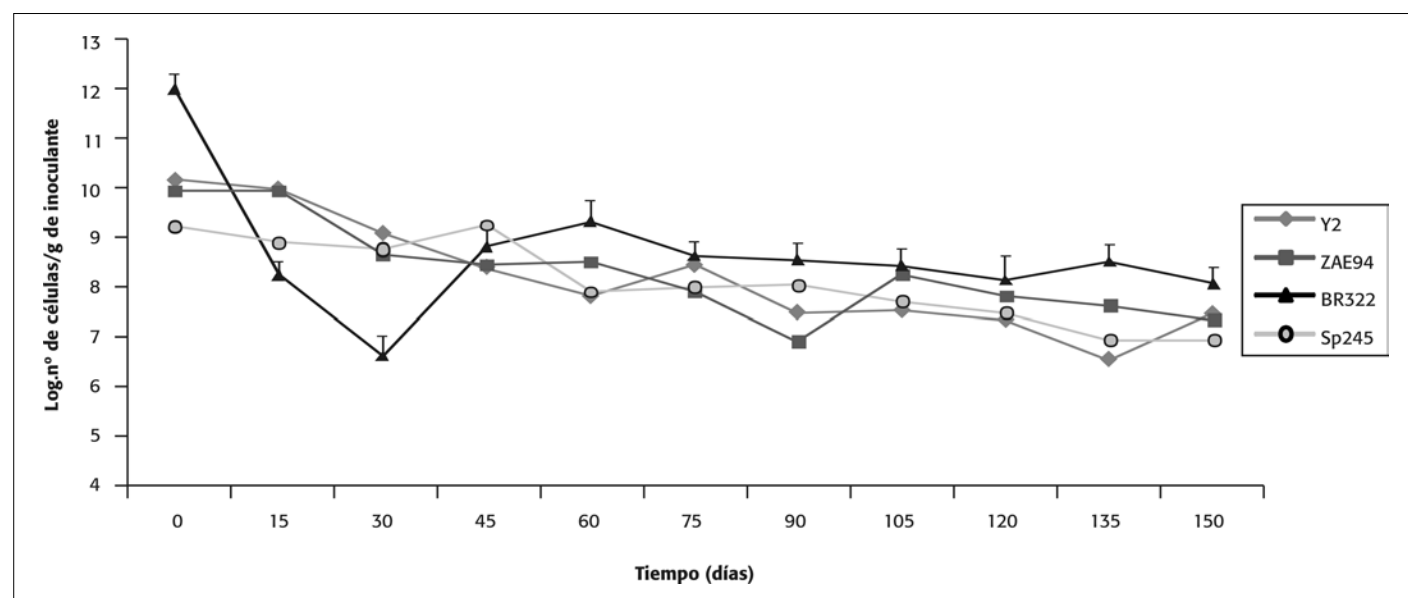


Figura 2. Número de células en los diferentes inoculantes, conservados a 30 °C, durante 150 días de almacenamiento. Las barras indican la diferencia media significativa

y enzimáticas, acelerando el metabolismo microbiano con el incremento en el consumo de nutrientes, causando el agotamiento más rápido de estos en la turba y, consecuentemente, la disminución de la población. Es importante resaltar que la temperatura es uno de los factores que influye en el crecimiento bacteriano y la supervivencia en ambientes naturales, incluidas las bacterias del género *Rhizobium*, utilizadas como principio activo de los inoculantes, la cual es afectada severamente por las altas temperaturas de almacenamiento (Munevar *et al.*, 1981).

Se observó que el inoculante a base de *R. tropici* BR322, en las condiciones del presente estudio, es adecuado para su comercialización, pues se conserva hasta 150 días a 30 °C continuos, con un número de células por gramo de inoculante por encima de 10⁸ UFC/g, y de lo recomendado por diferentes autores internacionalmente. Esto hace que no se requiera refrigeración en ambientes que estén por debajo de esta temperatura disminuyendo los costos de producción y comercialización, haciéndolo más atractivo para el mercado.

En países como Colombia se podrían comercializar todos los inoculantes utilizados en esta investigación, pues la legislación es más flexible en cuanto a la concentración de microorganismos, pues exige mínimo 10⁵ UFC/g de inoculante (ICA, 2006).

Efecto de la temperatura sobre la humedad de los inoculantes a base de diferentes bacterias diazotróficas

En condiciones ambientales se presentaron pérdidas de humedad de 4% a 9% en todos los inoculantes (tablas 2 y 3). En la temperatura controlada a 30 °C, los inoculantes perdieron de 9% a 13% de humedad.

A temperatura ambiente no se observaron pérdidas significativas de humedad, lo que indica que el estrés osmótico no fue un factor importante en la conservación de la población en estos inoculantes. Sin embargo, Vriezen y colaboradores (2007) consideran la desecación como uno de los limitantes en la conservación del inoculante, pues causa acumulación de sales y solutos, estrés hiperosmótico, alteración del metabolismo microbiano cuando una determinada actividad de agua se ha alcanzado, y daños donde la monocapa acuosa es removida de las macromoléculas.

A temperatura continua de 30 °C se pierde más humedad, debido a que se encuentra en un ambiente más seco, manteniéndose aún dentro del rango en que no se afecta el crecimiento de la bacteria. Ferreira (2008) evaluó inoculantes a base de *H. seropedicae* ZAE94 a diferentes humedades, conservándolos en nevera (4 a 10 °C) durante 180 días y los resultados revelaron que cuando el rango

Tabla 2. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes preparados con diferentes bacterias diazotróficas almacenados a temperatura ambiente durante 150 días

Bacteria	Tiempo (días)										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Y2	69,15 a	63,91 a	67,48 b	63,03 a	66,85 b	68,35 b	63,58 a	67,22 ab	67,49 a	66,21 ab	65,02 ab
ZAE94	65,40 b	63,60 a	68,70 b	64,20 a	66,85 b	65,37 a	66,28 b	66,38 a	66,22 a	62,91 a	64,20 a
BR322	70,68 c	70,51 b	67,01 b	66,70 a	71,50 b	68,50 b	67,35 b	68,57 ab	67,69 ab	67,97 b	67,46 bc
Sp245	70,00 ac	65,72 a	68,20 b	72,75 b	71,50 a	68,18 b	69,84 c	70,76 ab	68,96 ab	66,20 ab	66,35 ab
CN	68,00 d	67,00 ab	64,60 a	71,50 b	71,50 b	69,90 b	73,63 d	69,87 b	70,97 b	69,60 b	69,71 c

Letras iguales no difieren entre sí por el test LSD a 10% de significancia. Medias de tres repeticiones.
Y2: *A. amazonense*; ZAE94: *H. seropedicae*; BR322: *R. tropici*; Sp245: *A. brasilense*; CN: Control negativo.

Tabla 3. Porcentaje de humedad de los diferentes inoculantes preparados con diferentes bacterias diazotróficas almacenados a 30 °C durante 150 días

Bacteria	Tiempo (días)										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Y2	69,15 a	62,18 a	63,70 a	59,50 a	64,80 ab	65,63 b	61,73 a	63,28 a	62,30 b	61,54 b	60,00 b
ZAE94	65,40 b	63,24 ab	64,40 a	60,47 a	60,55 ab	63,27 a	63,98 b	62,26 a	57,05 a	57,12 a	59,64 a
BR322	70,68 c	70,46 c	68,26 b	61,60 a	58,00 a	66,10 b	61,68 a	61,97 a	56,01 a	59,39 ab	57,81 ab
Sp245	70,00 ac	64,90 ab	64,00 a	63,12 ab	66,25 b	64,98 a	65,54 b	60,63 a	59,05 ab	60,79 ab	59,28 ab
CN	68,00 d	67,10 bc	67,15 b	66,82 b	62,00 ab	64,98 b	64,49 b	64,58 a	62,19 b	60,51 ab	56,59 a

Letras iguales no difieren entre sí por el test LSD a 10% de significancia. Medias de tres repeticiones.
Y2: *A. amazonense*; ZAE94: *H. seropedicae*; BR322: *R. tropici*; Sp245: *A. brasilense*; CN: Control negativo.

de humedad está entre 43% a 80%, el número de células permaneció alrededor de 10^9 UFC/g. En este experimento se encontró que la humedad de todos los inoculantes durante los 150 días de almacenamiento se mantuvo dentro de este rango.

Existen reportes en los que se evaluaron inoculantes a base de *A. brasilense* ATCC29729 a 20 ± 2 °C, y se obtuvo una población de 4×10^6 UFC/g de inoculante después de 180 días de almacenamiento, con una humedad final de 37% (Fallik y Okon, 1996).

Se ha encontrado que la capacidad de retención de agua está directamente relacionada con la cantidad de materia orgánica de la turba siendo un factor importante para el mantenimiento de la humedad a lo largo del tiempo. Ferreira (2003) encontró que inoculantes preparados con niveles de materia orgánica mayores pierden menos humedad. Otro factor que afecta el mantenimiento de la humedad es el tipo de bolsa plástica empleada durante el almacenamiento. Según Hungria y colaboradores (2005) las bolsas utilizadas para el empaque de los inoculantes deben ser resistentes a la esterilización, permitir el transporte seguro del inoculante y retener la humedad sin perjudicar el intercambio gaseoso con el objetivo de mantener la viabilidad de la bacteria utilizada en el inóculo, y el sistema de cierre debe ser sencillo y seguro para evitar la contaminación.

Efecto de la temperatura sobre el pH de los inoculantes a base de diferentes bacterias diazotróficas

Se observó que ninguno de los rangos de temperatura empleados en la conservación modifica el pH de los diferentes inoculantes evaluados, el cual permaneció dentro de los rangos óptimos para el desarrollo de cada microorganismo (tablas 4 y 5) que según Baldani y colaboradores (2005) es de 5,5 a 7,5 para *Azospirillum* sp., 5,3 a 8,0 para *Herbaspirillum* sp.; y según Kuykendall y colaboradores (2005), 4,0 a 10 para *Rhizobium* sp. Esta menor variación en el pH se debe a la presencia de gran cantidad de materia orgánica en la turba, dándole al soporte mayor capacidad tampón, estabilizando el pH en el inoculante. Ferreira (2008) evaluó inoculantes a base de *H. seropedicae* ZAE94 a dos valores de pH iniciales diferentes y encontró que el pH inicial no afectó la población del inoculante durante 180 días de almacenamiento.

CONCLUSIONES

El desarrollo de la investigación permitió establecer que la temperatura ambiente en el rango de 19 a 26 °C es adecuada para realizar la conservación de los inoculantes durante 150 días de almacenamiento.

Al almacenar los inoculantes a temperatura ambiente (19 a 26 °C) se perdió menos humedad en comparación a 30 °C.

Tabla 4. Efecto de la temperatura ambiente (19 a 26 °C) y bacterias utilizadas en el inoculante sobre el pH del producto durante 150 días

Bacteria	Tiempo (días)										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Y2	7,16	7,06	6,96	6,90	6,90	7,01	7,24	7,19	7,01	7,09	7,09
ZAE94	7,08	7,07	6,99	6,96	6,84	7,07	7,11	7,01	7,02	7,10	7,09
BR322	7,06	6,88	6,80	6,90	6,95	7,04	6,98	7,07	6,93	6,93	7,07
Sp245	6,98	6,78	6,95	6,94	7,01	7,06	7,04	6,98	7,02	7,02	7,22
CN	7,07	6,83	6,96	6,97	6,94	7,00	7,08	7,06	6,50	7,00	7,15

Y2: *A. amazonense*; ZAE94: *H. seropedicae*; BR322: *R. tropici*; Sp245: *A. brasilense*; CN: Control negativo.

Tabla 5. Efecto de la temperatura 30 °C y bacteria utilizada en el inoculante sobre el pH del producto durante 150 días

Bacteria	Tiempo (días)										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Y2	7,16	6,97	6,94	7,07	7,01	7,03	7,14	7,28	7,10	7,09	7,19
ZAE94	7,08	7,08	7,01	7,06	6,97	7,16	7,18	7,17	7,27	7,22	7,15
BR322	7,06	7,15	6,95	7,12	6,90	7,06	7,12	7,13	7,04	7,10	7,22
Sp245	6,98	7,07	6,95	7,04	6,99	7,03	7,00	7,06	7,05	7,05	7,12
CN	7,07	7,25	7,00	6,93	7,02	7,03	7,02	7,11	6,98	7,10	7,08

Y2: *A. amazonense*; ZAE94: *H. seropedicae*; BR322: *R. tropici*; Sp245: *A. brasilense*; CN: Control negativo.

El pH no fue afectado durante los 150 días de almacenamiento, en las condiciones de los experimentos.

En la temperatura de almacenamiento 30 °C sólo *R. tropici* Br322 conservó el número de células encima de lo exigido, durante 150 días. Se recomienda almacenar los inoculantes a base de las especies *H. seropedicae* ZAE94 hasta 120 días, *A. brasilense* Sp245 hasta 90 días y *A. amazonense* Y2 hasta 75 días.

AGRADECIMIENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCIAS

- Baldani V, Baldani J, Döbereiner J. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 29:869-881.
- Baldani J, Pot B, Kirchhof G, Falsen E, Baldani V, Olivares F, Hoste B, Kersters K, Hartmann A, Gillis M, Döbereiner J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*: inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans* a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol* 46: 802-810.
- Baldani J, Krieg N, Baldani V, Hartmann A, Döbereiner J. 2005. *Genus II. Azospirillum*. En: Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. New York, Springer, p 7-26.
- Baldani J, Baldani V, Döbereiner J. 2005. *Genus III. Herbaspirillum*. Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. New York, Springer, p 629-636.
- Bashan Y, Holguin G, Bashan L. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol* 50(8):521-577.
- Benbrook C. 1999. World Food System Challenges and Opportunities: GMOs, Biodiversity and Lessons from America's Heartland. En: *World Food System Challenges and Opportunities*. <http://www.pnac.net/IWFS.pdf>. Consulta: agosto, 2005.
- De Freitas J, Germida J. 1991. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol* 37:780-784.
- Di Ciccio C, Rodríguez E. 1994. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp., in Argentine humid pampas. *Field Crop Res* 37:253-257.
- Döbereiner J, Baldani V, Baldani J. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-CNPAB. 60 p.
- Fages J. 1994. *Azospirillum* inoculants and field experiments. En: Okon Y. *Azospirillum*-plant associations. CRC Press. Boca Ratón, Florida, p 87-110.
- Fallik E, Okon Y. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem* 28:123-126.
- Feng L, Roughley R, Copeland L. 2002. Morphological Changes of *Rhizobia* in Peat Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3):1064-1070.
- Ferreira D. 2000. SISVAR — Sistema de análise de variancia para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.3. UFLA/DEX, Lavras.
- Ferreira J, Costa D, Guimarães S, Baldani J, Baldani V. 2003. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia* 37(92):06-12.
- Ferreira J. 2008. Qualidade de inoculante, inoculação e re-inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado (tesis de doctorado). Universidade Rural do Rio de Janeiro, Brasil. 83 p.
- Fuentes L, Caballero J. 2006. Bacterial Biofertilizers. En: Siddiqui Z. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Netherlands, Springer, p. 143-172.
- Graham P, Viteri S, Mackie F, Vargas A, Palacios A. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res* 5:121-128.
- Hartmann A, Baldani J. 2006. The Genus *Azospirillum*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E. *Prokaryotes*, 3a. ed. New York, Springer, p. 115-140.
- Hungria M, Loureiro M, Mendes I, Campo R, Graham H. 2005. Inoculant preparation, production and application. En: Werner D, Newton W. *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment*. Netherlands, Springer, p. 223-253.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2006. Manual de buenas prácticas de distribución y manejo para insumos agropecuarios. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá, p. 12-17.
- ISO 10390. 2005. Soil quality-Determination of pH. 2a. ed. 8p.
- Kuykendall L, Young J, Martinez E, Kerr A, Sawada H. 2005. *Genus I. Rhizobium*. En: Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. New York, Springer, p. 325-340.
- McCready P. 1946. Standard methods of water analysis. *Am. Pub. Health and Am. Water Assoc.* 9:131-138.
- Magalhaes F, Baldani J, Souto S, Kuykendall J, Döbereiner, J. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Na. Academia Bras. Ci* 55:417-430.
- Marin V, Baldani V, Teixeira K, Baldani, J. 1999. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. En: Embrapa – CNPAB. Documentos, <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>; Consulta: febrero 2008.
- Munevar F, Wollum A. 1981. Growth of *Rhizobium japonicum* strains at temperatures above 27 °C. *Applied and Environmental Microbiology*, 272-276.
- Okon Y, Gonzalez L. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem* 26:1591-1601.
- Olsen P, Rice W, Bordeleau L, Biederbeck V. 1994. Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: the need for an increase in standards. *Plant Soil* 161(1):127-134.
- Prepas E, Charette T, Heinrich D, Holland K. 2003. Worldwide eutrophication of water bodies: causes, concerns, controls. *Treatise on Geochemistry* p. 311-331.
- Temprano F, Abareda M, Camacho M, Daza A, Santamaria C, Nombro D. 2002. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. *Int. Microbiol* 5:81-86.
- Tran Van V, BERGEONGKE S, BALANDREAU J, HEULIN, T. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 281:273-284.
- Vriezen J, Brujin F, Nusslein K. 2007. Responses of *Rhizobia* to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen and temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 3451-3459.
- Vessey K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586.
- Weller D, Cook, R. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Microbiol* 8:328-334.