



Laboratorio de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (B.P.C.V.)

Ensayos de compatibilidad RaiSan – *Azospirillum Brasilense*

Castelar, 20 de junio de 2014

Muestras recibidas:

- RaiSan C Lote: 6AC0.6
- RaiSan SC Lote: 5BSC0.6

Protocolo para la evaluación de compatibilidad RaiSan – *Azospirillum Brasilense*

1. Conservación de las muestras recibidas: en lugar fresco y alejado de la luz. De la misma manera se conservaron las mezclas *Azospirillum Brasilense* – RaiSan SC, *Azospirillum Brasilense* – RaiSan C y el inoculante (testigo).

2. Preparación de las mezclas a evaluar con inoculante INTA de *Azospirillum brasilense*: Para cada una de las muestras se hicieron diluciones 1:1 con inoculante. Las mismas se realizaron en tubos tipo falcon estériles de 50 ml.

3. Recuento de células viables de *Azospirillum brasilense* tanto del inoculante como de las distintas combinaciones, mediante siembra en placa de las distintas diluciones por método de microgota.

a- Procedimiento

- El inoculante fue homogeneizado mediante agitación manual durante 30 segundos.
- Se extrajo 1 ml del producto en flujo laminar con micropipeta con tip estéril y se lo diluyó en tubo con 9 ml de solución fisiológica (dilución 10^{-1}).
- Esta dilución se agitó en vortex durante 20 segundos.
- Una vez transcurrido ese tiempo, se transfirió 1 ml de dicha dilución a un tubo de ensayo con 9 ml de solución fisiológica.
- El tubo se agitó en vortex durante 20 segundos.
- De esta manera se siguió hasta la dilución 10^{-7} .

Este procedimiento también fue realizado en las combinaciones Inoculante – RaiSan SC e Inoculante – RaiSan C.

b- Siembra de diluciones

Se sembraron 4 repeticiones de 10 μ l de todas las diluciones para el caso de las combinaciones Raisán – Inoculante y sólo las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} para el inoculante solo. Estas siembras se realizaron en placas de petri con medio de cultivo RC.



Laboratorio de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (B.P.C.V.)

c- Incubación

Luego de ser sembradas las placas con Medio RC, fueron colocadas en forma invertida en estufa con una temperatura aproximada de 36 °C.

d- Lectura

A los 5 días de realizada la siembra se contaron las colonias, verificando la proporcionalidad entre diluciones.

Los resultados se expresaron en ufc/ml de inoculante, calculándose de la siguiente manera:

$$\text{ufc/ml} = \text{N}^\circ \text{ de colonias contadas} \times \text{factor de siembra} \times \text{factor de dilución}$$

Siendo:

- N° de colonias contadas: promedio del número de colonias presentes en las 4 repeticiones.
- Factor de siembra: 100, ya que se sembró 0.01 ml de la muestra por placa.
- Factor de dilución: inversa de la dilución en la cual se realizó el recuento de colonias.

Este procedimiento se realizó para el Inoculante (Testigo) y para cada combinación Raisán – *Azospirillum brasilense* en distintos momentos de muestreo:

- 0 horas.
- 4 horas.
- 7 horas.
- 24 horas.

Tratamientos

- Inoculante solo.
- Inoculante + RaiSan C.
- Inoculante + RaiSan SC.



Laboratorio de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (B.P.C.V.)

Resultados

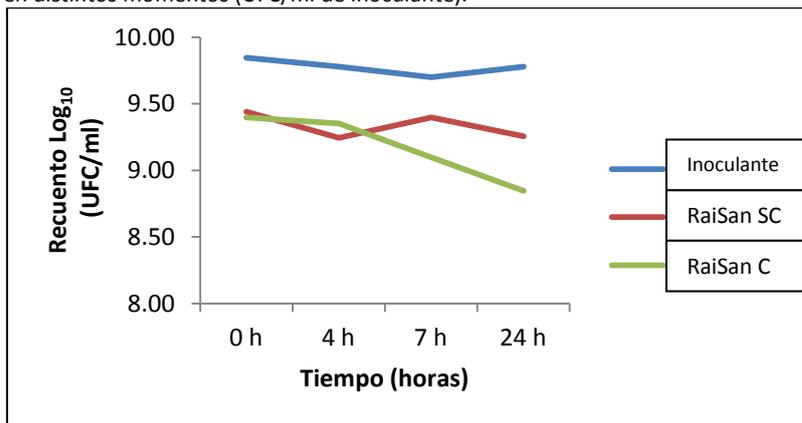
La siguiente tabla muestra los resultados de los recuentos tanto del inoculante como de las combinaciones nombradas anteriormente.

También se realizó un gráfico, donde los resultados fueron transformados a logaritmo en base 10 para una mejor visualización de los mismos.

Tabla: Recuentos del inoculante y de las combinaciones *Azospirillum brasilense* – Raisán en distintos momentos (UFC/ml de inoculante).

Momentos	Inoculante	Inoc. – RaiSan SC	Inoc. RaiSan C
0 h	7,00E+09	2,75E+09	2,50E+09
4 h	6,00E+09	1,75E+09	2,25E+09
7 h	5,00E+09	2,50E+09	1,25E+09
24 h	6,00E+09	1,80E+09	7,00E+08

Gráfico: Recuentos del inoculante y de las combinaciones *Azospirillum brasilense* – Raisán en distintos momentos (UFC/ml de inoculante).



En las combinaciones Inoculante – RaiSan, se vio afectada levemente la viabilidad de las células desde el momento inicial, ya que se partió con un título de 7×10^9 ufc/ml y en las mezclas el título bajó a 2.75×10^9 y 2.5×10^9 ufc/ml, para Raisán SC y Raisán C, respectivamente.

La muestra de RaiSan SC, fue la que presentó menor toxicidad sobre *Azospirillum brasilense*, ya que el título mantuvo el mismo número de orden (10^9) desde el inicio hasta las 24 horas de realizada la mezcla.

Nota

En los ensayos realizados se comprueba la incidencia directa del producto sobre las colonias de *Bradyrhizobium Japonicum*. Como se menciona en la metodología de ensayo, las bacterias son sometidas durante 24hs al contacto directo con el RaiSan, en el medio de ensayo. Esto no simula los métodos de aplicación convencionales donde el producto recubre la semilla e inmediatamente se seca sobre la superficie de esta. Como resultado del ensayo podemos suponer que dado que la mortalidad observada en la peor de las condiciones no es tan elevada, consideramos que en el caso de los métodos de aplicación convencionales, esta no sería apreciable.