



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

Ensayos de compatibilidad RaiSan – *Bradyrhizobium Japonicum*

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 – *Bradyrhizobium Japonicum*

1. Conservación de las muestras recibidas: en lugar fresco y alejado de la luz. De la misma manera se conservaron las mezclas *Bradyrhizobium Japonicum* – RaiSan SC, *Bradyrhizobium japonicum* – RaiSan C y el caldo de cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* (testigo).

2. Preparación de las mezclas a evaluar con caldo de cultivo de *Bradyrhizobium japonicum*:

Las combinaciones fueron 1:1 (caldo de cultivo – muestras recibidas). Las mismas se realizaron en tubos tipo falcon estériles de 50 ml.

3. Recuento de células viables de *Bradyrhizobium Japonicum* tanto del caldo como de las distintas combinaciones, mediante siembra en placa de las distintas diluciones por método de microgota.

a- Procedimiento

- Tanto el caldo como las combinaciones fueron homogeneizados mediante agitación manual durante 30 segundos.
- Se extrajo 1 ml de cada uno en flujo laminar con micropipeta con tip estéril y se diluyeron en tubos con 9 ml de solución fisiológica (dilución 10^{-1}).
- Cada dilución se agitó en vortex durante 20 segundos.
- Una vez transcurrido ese tiempo, se transfirió 1 ml de cada una a tubo de ensayo con 9 ml de solución fisiológica.
- Los mismos se agitaron en vortex durante 20 segundos.
- De esta manera se siguió hasta la dilución 10^{-7} .

b- Siembra de diluciones

Se sembraron 3 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 caldo de cultivo con *Bradyrhizobium japonicum*. Estas siembras se realizaron en placas de petri con medio de cultivo 79.



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

c- Incubación

Luego de ser sembradas las placas con Medio 79, fueron colocadas en forma invertida en estufa con una temperatura aproximada de 28 °C.

d- Lectura

A los 7 días de realizada la siembra se contaron las colonias, verificando la proporcionalidad entre diluciones.

Los resultados se expresaron en ufc/ml de caldo o mezcla, calculándose de la siguiente manera:

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

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 Caldo de cultivo (Testigo) y para cada combinación Raisán – *Bradyrhizobium japonicum* en distintos momentos de muestreo:

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

Tratamientos

- Caldo de cultivo de *Bradyrhizobium Japonicum* solo.
- Caldo de cultivo de *Bradyrhizobium Japonicum* + RaiSan C.
- Caldo de cultivo de *Bradyrhizobium Japonicum* + RaiSan SC

Resultados

La siguiente tabla muestra los resultados de los recuentos tanto del caldo de cultivo como de las a 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.

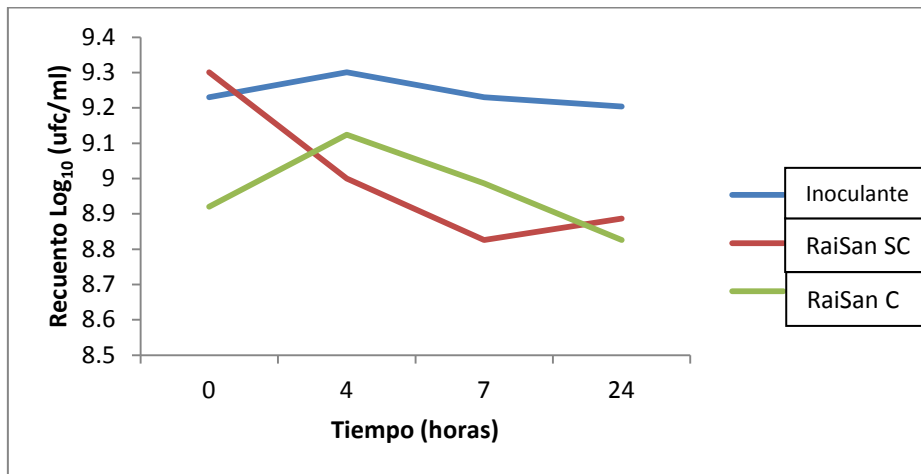


Laboratorio de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (B.P.C.V.)

Tabla: Recuentos del caldo de cultivo y de las combinaciones *Bradyrhizobium Japonicum* – RaiSan en distintos momentos (ufc/ml de inoculante).

Momentos	Inoculante	Inoc. – RaiSan SC	Inoc. – RaiSan C
0 h	1,70E+09	2,00E+09	8,33E+08
4 h	2,00E+09	1,00E+09	1,33E+09
7 h	1,70E+09	6,70E+08	9,70E+08
24 h	1,60E+09	7,70E+08	6,70E+08

Gráfico: Recuentos del caldo de cultivo y de las combinaciones *Bradyrhizobium Japonicum* – RaiSan en distintos momentos (ufc/ml de inoculante).



En la combinación *Bradyrhizobium Japonicum* – RaiSan C, se vio afectada levemente la viabilidad de las células desde el momento inicial, ya que se partió con un título de 1.7×10^9 ufc/ml y en la mezcla el título bajó a 8.33×10^8 ufc/ml. Aparentemente la combinación *Bradyrhizobium Japonicum* – RaiSan SC, favoreció la viabilidad de las células en el momento inicial de la mezcla, ya que se partió de un título de 1.7×10^9 ufc/ml y en la mezcla el título fue de 2×10^9 ufc/ml. Pero en los siguientes momentos de muestreo los títulos de ésta estuvieron por debajo de los otros 2 tratamientos (Caldo de cultivo y combinación caldo – RaiSan C).

Nota:

Los ensayos realizados fueron ideados con el objeto de ver 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 entre las bacterias y 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. 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.